



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Impacto de la amenaza de parto prematuro y la rotura prematura de membranas en el cerebro y el sistema cardiovascular fetal. Influencia de la infección y la inflamación intra-amniótica

Clara Murillo Bravo

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Impacto de la amenaza de parto prematuro y la rotura prematura de membranas en el cerebro y el sistema cardiovascular fetal. Influencia de la infección y la inflamación intra-amniótica.

Memoria de Tesis Doctoral presentada por **Clara Murillo Bravo** para optar al grado de doctora por la Universidad de Barcelona.

Dirigida por la Dra. Teresa Cobo Cobo y la Dra. Montserrat Palacio Riera.

Tutora: Dra. Montserrat Palacio Riera

Profesora Teresa Cobo Cobo

Consultora 1
Servicio de Medicina Maternofetal
Institut Clínic de Ginecologia, Obstetrícia i Neonatologia
Hospital Clínic de Barcelona
Profesora Asociada de la Universidad de Barcelona

Profesora Montserrat Palacio Riera

Jefa de Sección de Medicina Materna.
Consultora Senior.
Servicio de Medicina Maternofetal
Institut Clínic de Ginecologia, Obstetrícia i Neonatologia
Hospital Clínic de Barcelona
Profesora Titular de la Universidad de Barcelona

Programa de Doctorado Medicina e Investigación Traslacional.

Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud. Universidad de Barcelona

Junio 2024

FINANCIACIÓN

La doctoranda de la presente tesis doctoral, así como el estudio y análisis de biomarcadores en líquido amniótico ha sido financiada por el *“Ajut a la recerca Josep Font”* otorgado por el Hospital Clínic de Barcelona. La determinación de interleucina-6 en líquido amniótico ha sido financiada por el Instituto de Salud Carlos III (Proyectos de investigación en Salud, PI19/00580 y PI22/00663). La co-directora Teresa Cobo Cobo ha recibido financiación del *Pla estratègic de recerca i innovació en salut* (PERIS)/Generalitat de Catalunya (SLT008718/00126).

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	12
ENUMERACIÓN DE LOS ARTÍCULOS DE LA TESIS	14
INTRODUCCIÓN	15
1. IMPORTANCIA DEL PARTO PRETÉRMINO	16
1.1 Definición	16
1.2 Epidemiología.....	17
1.3 Tipos de parto pretérmino	19
1.3.1 En función de la edad gestacional.....	19
1.3.2 En función de la indicación.....	19
2. PRINCIPALES FORMAS CLÍNICAS DE PRESENTACIÓN DE LAS PACIENTES CON RIESGO DE PARTO PRETÉRMINO ESPONTÁNEO	20
2.1 Amenaza de parto prematuro	20
2.2 Rotura prematura de membranas pretérmino.....	20
3. ETIOPATOGENIA DEL PARTO PRETÉRMINO ESPONTÁNEO	21
3.1 Factores de riesgo conocidos del parto pretérmino espontáneo	21
3.1.1 Factores Obstétricos	21
3.1.2 Factores Maternos	21
3.2 Etiologías del parto pretérmino espontáneo	22
3.2.1 Activación prematura del eje hipotálamo-hipofisario adrenal materno o fetal...	23
3.2.2 Sobredistensión uterina	23
3.2.3 Disfunción vascular placentaria	24
4. ETIOLOGÍA INFECCIOSA/INFLAMATORIA DEL PARTO PRETÉRMINO	25
4.1 Infección intra-amniótica subclínica	25
4.1.1 Definición	25
4.1.2 Prevalencia	25
4.1.3 Microorganismos implicados y vías de infección.....	26
4.1.4 Fisiopatología	28
4.1.5 Implicación clínica	28

4.1.6	Manejo actual.....	30
4.2	Inflamación intra-amniótica estéril	30
4.2.1	Definición	30
4.2.2	Prevalencia	31
4.2.3	Etiopatogenia	31
4.2.4	Implicación clínica	32
4.2.5	Manejo actual.....	33
4.3	Corioamnionitis clínica o Triple I	33
4.3.1	Definición	33
4.3.2	Prevalencia	33
4.3.3	Etiopatogenia	34
4.3.4	Implicación clínica	34
4.3.5	Manejo actual.....	35
5.	MANEJO ANTENATAL DE PACIENTES CON AMENAZA DE PARTO PRETÉRMINO Y ROTURA PREMATURA DE MEMBRANAS PRETÉRMINO	36
5.1	Corticoterapia.....	36
5.2	Sulfato de magnesio	37
5.3	Antibioterapia	37
5.4	Tocolisis.....	39
5.5	Finalización de la gestación	40
6.	CONSECUENCIAS POSTNATALES DERIVADAS DEL PARTO PRETÉRMINO	41
6.1	Mortalidad neonatal.....	41
6.2	Complicaciones respiratorias	42
6.3	Enterocolitis necrotizante	43
6.4	Sepsis neonatal.....	44
6.5	Complicaciones cardiovasculares	44
6.5.1	Complicaciones cardiovasculares a corto plazo.....	44
6.5.2	Complicaciones cardiovasculares a largo plazo	45
6.6	Complicaciones neurológicas	48
7.	JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS: ESTUDIO DE LA PROGRAMACIÓN FETAL CARDIOVASCULAR Y NEUROLÓGICA	53
7.1	Concepto de programación fetal	53

7.2 Programación fetal sobre el sistema cardiovascular	53
7.2.1 Programación fetal cardiovascular y prematuridad	57
7.2.1.1 Ecocardiografía fetal	57
7.2.1.2 Biomarcadores de daño cardíaco	59
7.3 Programación fetal sobre el sistema neurológico	61
7.3.1 Programación fetal neurológica y prematuridad	62
7.3.1.1 Técnicas de imagen cerebral fetal (neurosonografía y resonancia magnética)	63
7.3.1.2 Biomarcadores de daño cerebral.....	64
7.4 Vacío de conocimiento: justificación de la tesis	67
HIPÓTESIS.....	68
OBJETIVOS.....	70
MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS	72
Artículo 1.....	74
Artículo 2.....	106
DISCUSIÓN	132
1. REMODELADO Y DISFUNCIÓN CARDÍACA Y CEREBRAL FETAL.....	134
1.1 Cambios ecográficos cardiovasculares y cerebrales fetales en amenaza de parto pretérmino y rotura prematura de membranas pretérmino. Influencia de la inflamación intra-amniótica.....	134
1.2 Cambios bioquímicos en líquido amniótico en amenaza de parto pretérmino y rotura prematura de membranas pretérmino. Influencia de la inflamación intra-amniótica.	137
1.3 Hipótesis fisiopatológica de los cambios cardiovasculares y cerebrales fetales observados en pacientes con amenaza de parto pretérmino y rotura prematura de membranas pretérmino pretérmino.	140
2. FORTALEZAS Y LIMITACIONES DE LOS ESTUDIOS	145
3. IMPLICACIONES CLÍNICAS	147
4. FUTURAS DIRECCIONES EN LA INVESTIGACIÓN	148
CONCLUSIONES.....	149
BIBLIOGRAFÍA.....	151

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Morbilidad neonatal según edad gestacional al parto. -----	17
Figura 2: Tasa de parto pretérmino estimada en 2020.-----	17
Figura 3: Porcentaje de parto pretérmino en Europa con recién nacido vivo en el año 2019. -----	18
Figura 4: Partos pretérmino en España en el año 2022 estratificado por edad gestacional. -----	18
Figura 5: Prevalencia de inflamación intra-amniótica estéril e inflamación intra-amniótica asociada a infección en pacientes con amenaza de parto pretérmino con membranas íntegras según la edad gestacional en el momento del parto.-----	26
Figura 6: Prevalencia de inflamación intra-amniótica estéril e inflamación intra-amniótica asociada a infección en pacientes con rotura prematura de membranas (RPM) pretérmino según la edad gestacional en el momento del diagnóstico de la RPM.-----	26
Figura 7: Condiciones relacionadas con la mortalidad por debajo de los 5 años de vida. -----	41
Figura 8: Tasa de mortalidad neonatal antes de los 28 días de vida en recién nacidos vivos de gestaciones únicas según la edad gestacional en el momento del parto y la presencia (línea roja) o no (línea azul) de defectos de crecimiento intrauterino severo. -----	42
Figura 9: Masa miocárdica ventricular derecha según la edad gestacional al nacer. -----	45
Figura 10: Masa miocárdica ventricular izquierda según la edad gestacional al nacer. -----	46

Figura 11: Morfología del ventrículo izquierdo en adultos según edad gestacional al nacer. Puede apreciarse el aumento de masa miocárdica y la disminución del volumen de la cavidad ventricular (hipertrofia miocárdica concéntrica) en adultos jóvenes nacidos pretérmino (imagen azul). ----- 46

Figura 12: Riesgo de insuficiencia cardíaca en niños y adultos jóvenes en relación con la edad gestacional en el momento del parto. ----- 47

Figura 13: Hazard ratio ajustada para cardiopatía isquémica según la edad gestacional al nacimiento.----- 47

Figura 14: Resonancia magnética en secuencia T2 con medidas volumétricas de los ventrículos laterales (azul) alrededor de las 41 semanas corregidas en: A) niño sano nacido a término; B) Prematuro nacido a las 28 semanas de vida con lesión moderada de sustancia blanca: lesión difusa de la sustancia blanca, adelgazamiento parcial del cuerpo calloso (flechas amarillas), ventriculomegalia moderada (reconstrucción azul) y lesiones puntiformes periventriculares de sustancia blanca (flechas naranjas); y C) Prematuro nacido a las 29 semanas de vida con lesión moderada-severa de sustancia blanca: quistes múltiples bilaterales (reconstrucción amarilla), adelgazamiento global del cuerpo calloso (flechas naranjas de la imagen superior y amarillas de la imagen inferior), ventriculomegalia (azul).----- 50

Figura 15: Ejemplos de lesión de sustancia gris en resonancia magnética alrededor de las 41 semanas corregidas en: A) neonato sano nacido a término; B) Prematuro nacido a las 31 semanas de gestación con lesión de sustancia gris moderada: retraso en la maduración cortical y aumento del espacio extra-cerebral (flecha amarilla); C-D) Prematuro nacido a las 31 semanas de gestación con lesión severa de sustancia gris (reducción volumétrica de la misma) y quistes porencefálicos. La flecha amarilla de la figura C señala asimetría a nivel de los tálamos. Las flechas amarillas de la figura D señalan una asimetría de los hemisferios cerebelares y una reducción de su volumen.----- 51

Figura 16: Mapa cerebral con profundidad de los surcos corticales diferencial entre nacidos prematuros y a término. La barra de colores muestra las desviaciones estándar: el color rojo y amarillo muestran las regiones donde los nacidos a término presentan surcos más profundos

que los prematuros. El color azul indica regiones donde los surcos son más profundos en nacidos prematuros. ----- 52

Figura 17: Esquema de los principales patrones de remodelado cardíaco. a) geometría globular en retraso de crecimiento intrauterino tardío leve. b) Hipertrofia miocárdica con dilatación auricular en fetos concebidos por técnicas de reproducción asistida. c) Hipertrofia miocárdica y cardiomegalia en fetos expuestos a fármacos antirretrovirales. d) Hipertrofia ventricular, dilatación ventricular y cardiomegalia en retraso de crecimiento intrauterino severo y precoz.

----- 56

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

APP: Amenaza de parto pretérmino

cm: centímetros

cols. : colaboradores

DAMPs: Damage associated molecular patterns

DPPNI: Desprendimiento prematuro de placenta normoinsera

Eje HHA: Eje hipotálamo-hipofisario adrenal

ENE: Enolasa neuroespecífica

ELISA: enzimoimmunoanálisis de adsorción

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial

HMGB1: High mobility group box-1

IC95%: Intervalo de confianza del 95%

IL: Interleucina

IMC: Índice de masa corporal

Índice Tei: Índice de rendimiento miocárdico

Kg: Kilogramo

L: Litro

m²: metro cuadrado

mcg: microgramos

mg: miligramos

mL: mililitro

mm: milímetro

MMP: Metaloproteasa

ng: Nanogramos

NOD-like receptor: *Nucleotide-binding Oligomerization Domain*-like receptor

NT-proBNP: Propéptido natriurético cerebral N-terminal

OR: Odds Ratio

PAMP: Pathogen-associated molecular pattern

Proteína SB100: Proteína B fijadora de calcio S100

PRR: Pattern recognition receptor

RPM: Rotura prematura de membranas

RR: Riesgo relativo

spp: Especies

SR: Strain Rate

TNF: Factor de necrosis tumoral

UCI: Unidad de cuidados intensivos

vs.: *versus*

ENUMERACIÓN DE LOS ARTÍCULOS DE LA TESIS

Tesis en formato de compendio de publicaciones. La tesis consta de seis objetivos y dos artículos.

Artículo 1

Murillo C, Rueda C, Larroya M, Boada D, Grau L, Ponce J, Herranz A, Gómez O, Ferrero S, Andreu-Fernández V, Gratacós E, Crispi F, Palacio M, Cobo T.

Intra-amniotic infection and/or inflammation is associated with fetal cardiac concentric hypertrophy and diastolic dysfunction in preterm labor and preterm prelabor rupture of membranes.

American Journal of Obstetrics and Gynecology. 2024, 230(6):665.e1-665.e30.

Factor de impacto (JCR 2023): 8,7 Primer cuartil.

Artículo 2

Murillo C, Eixarch E, Rueda C, Larroya M, Boada D, Grau L, Ponce J, Aldecoa V, Monterde E, Ferrero S, Andreu-Fernández V, Arca G, Oleaga L, Ros O, Hernández MP, Gratacós E, Palacio M, Cobo T.

Evidence of brain injury in fetuses of mothers with preterm labor with intact membranes and preterm premature rupture of membranes.

American Journal of Obstetrics and Gynecology.2024. Publicado online. S0002-9378(24)00531-3.

Factor de impacto (JCR 2023): 8,7 Primer cuartil.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. IMPORTANCIA DEL PARTO PRETÉRMINO

1.1 Definición

El parto pretérmino se define, según la Organización Mundial de la Salud, como el parto que se produce antes de las 37+0 semanas de amenorrea o de los 259 días desde la fecha de la última menstruación (1).

El parto pretérmino es un problema de salud pública relevante dada su prevalencia y sus complicaciones postnatales, siendo la principal causa de mortalidad neonatal y por debajo de los 5 años de vida. También es una de las principales causas de morbilidad neonatal, presentando una alta tasa de secuelas a corto y largo plazo. Además, presenta un impacto a nivel emocional y social en las familias con un gran coste económico derivado, no únicamente del gasto sanitario que supone el ingreso del neonato prematuro sino también de otros gastos indirectos como reingresos, controles y necesidades especiales que presentan estos niños a lo largo de la vida (2-3). Es por ello que tanto la OMS (4) como Naciones Unidas (5) lo consideran un problema de salud relevante a abordar en los próximos años.

La madurez fetal es un proceso continuo. Así, la prevalencia de morbimortalidad neonatal se reduce a medida que aumenta la edad gestacional al parto (Figura 1) y no desaparece al llegar al término (37+0 semanas de gestación), sino que sigue decreciendo hasta alcanzar las 39+0 semanas de gestación. Es por ello que neonatos nacidos entre las 37+0 y las 38+6 semanas de gestación, considerados nacidos a término, presentan un riesgo incrementado de morbilidad respiratoria, hiperbilirrubinemia o hipoglucemia, entre otras (6).

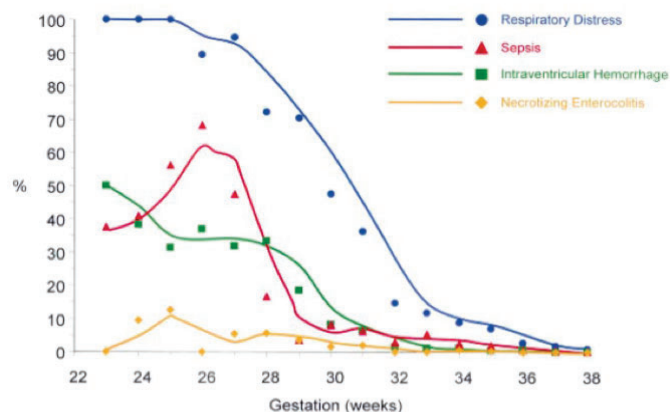


Figura 1: Morbilidad neonatal según edad gestacional al parto. Fuente: Mercer BM. Obstet Gynecol. 2003 (7).

1.2 Epidemiología

Mundialmente, en 2020 se estimó una prevalencia global de parto pretérmino del 9.9% (Figura 2). Esta prevalencia difiere según los países debido a diferencias poblacionales, en los sistemas de salud y socioeconómicas. Así, África Sub-sahariana y Asia del sur acumulan alrededor del 80% de todos los partos pretérmino (8).

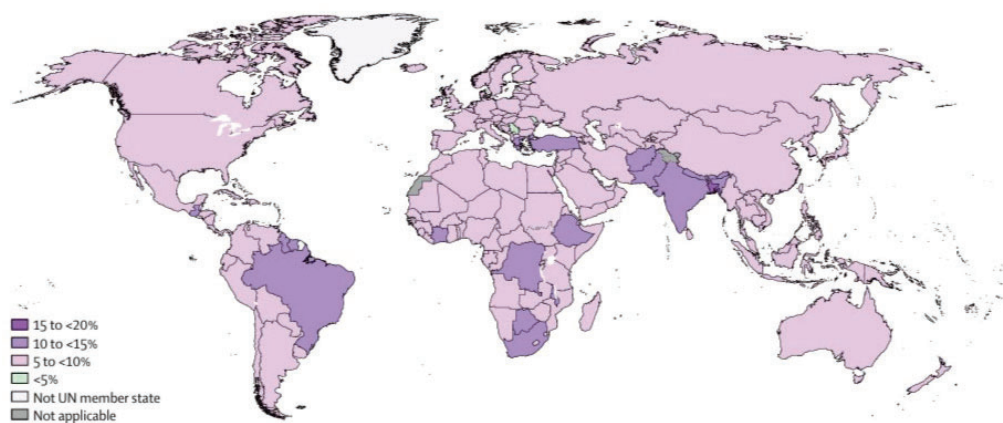


Figura 2: Tasa de parto pretérmino estimada en 2020. Fuente: Ohuma EO. Lancet. 2023 (8).

Europa presenta una prevalencia de parto pretérmino del 6.9%, siendo menor en países nórdicos y bálticos (Figura 3) (9).

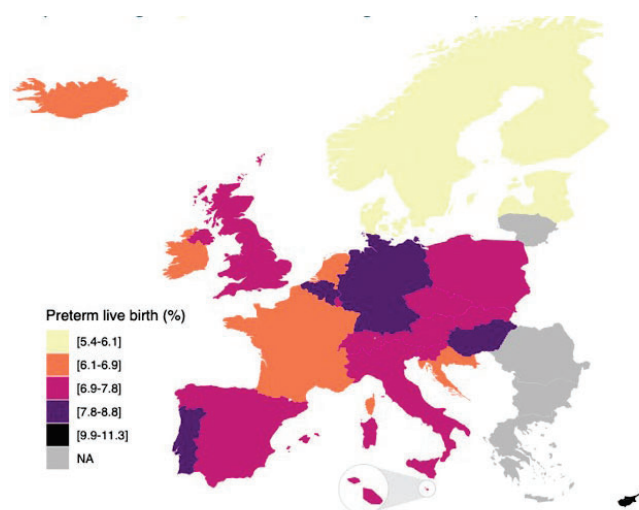


Figura 3: Porcentaje de parto pretérmino en Europa con recién nacido vivo en el año 2019. Fuente: Europeristat (9)

Según el Instituto Nacional de Estadística de España, en el año 2022 se produjeron 18.017 partos pretérmino, presentando una prevalencia del 5.5% de todos los partos. Éstos sucedieron principalmente entre las 32+0 y las 36+6 semanas de gestación (Figura 4) (10).

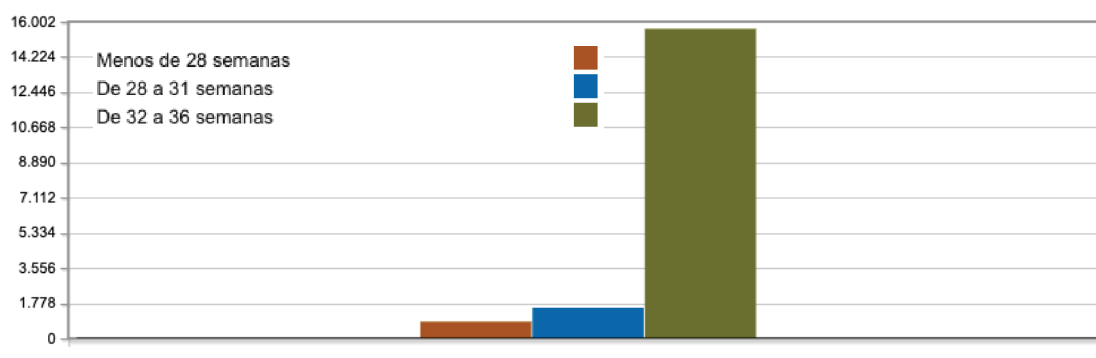


Figura 4: Partos pretérmino en España en el año 2022 estratificado por edad gestacional. Fuente: Instituto Nacional de estadística (10)

En Cataluña, el instituto de estadística reportó en 2022 un total de 3853 partos pretérmino del total de 55.760 partos que se produjeron. Esto representa una prevalencia de parto pretérmino en Cataluña del 6,9% (11).

La incidencia del parto pretérmino en Europa, España y Cataluña se ha mantenido estable desde 2015 (9).

1.3 Tipos de parto pretérmino

1.3.1 En función de la edad gestacional

En función de la edad gestacional en el momento del parto, los prematuros pueden ser (12):

- **Prematuro extremo:** aquél recién nacido cuyo parto se produce antes de las 28+0 semanas de gestación. Representa el 5% de los partos pretérmino.
- **Prematuro grave:** aquél recién nacido cuyo parto se produce entre las 28+0 y 31+6 semanas de gestación. Representa el 15% de los partos pretérmino.
- **Prematuro moderado:** aquél recién nacido cuyo parto se produce entre las 32+0 y 33+6 semanas de gestación. Representa el 20% de los partos pretérmino.
- **Prematuro leve:** aquél recién nacido cuyo parto se produce entre las 34+0 y 36+6 semanas de gestación. Representa el 60% de los partos pretérmino.

1.3.2 En función de la indicación

En función de la indicación, diferenciamos (12):

- **Parto pretérmino espontáneo:** Comprende el 70% de los partos pretérmino y ocurre en pacientes con amenaza de parto prematuro (APP) o rotura prematura de membranas (RPM) pretérmino.
- **Parto pretérmino por indicación médica:** Comprende el 30% de los partos pretérmino y se debe a la presencia de alguna condición preexistente fetal o materna como el retraso de crecimiento intrauterino severo o la preeclampsia grave que hace que el riesgo o complicaciones derivadas de continuar la gestación superen el riesgo de nacer prematuro. En este caso será de vital importancia, si es posible planificar la finalización, considerar las semanas de gestación, dado que la morbilidad neonatal diferirá en función de la edad gestacional al nacimiento.

La presente tesis doctoral se centra en la evaluación de pacientes con APP y RPM pretérmino que son el grupo de riesgo de parto pretérmino espontáneo.

2. PRINCIPALES FORMAS CLÍNICAS DE PRESENTACIÓN DE LAS PACIENTES CON RIESGO DE PARTO PRETÉRMINO ESPONTÁNEO

Existen tres formas clínicas principales de presentación que confieren un aumento del riesgo de parto pretérmino espontáneo. Éstas incluyen la APP, la RPM pretérmino y la incompetencia cervical. En este apartado se explican las relacionadas con el proyecto de tesis, que son la APP y la RPM pretérmino.

2.1 Amenaza de parto prematuro

La APP se define por la presencia de dinámica uterina regular asociada a modificaciones cervicales en pacientes con membranas íntegras entre las 22+0 y las 36+6 semanas de gestación (13).

Únicamente el 10% de las gestantes ingresadas con este cuadro clínico tendrán un parto en los siguientes 7 días. No obstante, la APP es responsable del 45% de los partos pretérmino (14).

2.2 Rotura prematura de membranas pretérmino

La RPM pretérmino se define por la ruptura de las membranas amnióticas antes del inicio de parto. Su diagnóstico se basa en la evidencia de pérdida de líquido amniótico proveniente del canal cervical y se apoya por la evidencia de oligoamnios o anhidramnios en la ecografía abdominal (15-16).

Respecto a la contribución de la RPM en la prematuridad, está presente en el 25% de los partos pretérmino. Aproximadamente el 40% de las pacientes con RPM pretérmino el parto se desencadena en las primeras 72 horas de ingreso (17).

3. ETIOPATOGENIA DEL PARTO PRETÉRMINO ESPONTÁNEO

Numerosos factores médicos, sociodemográficos o nutricionales se han asociado al parto pretérmino espontáneo. Es por ello, que se ha considerado un síndrome con múltiples etiologías, siendo la causa desconocida, la más frecuente (18).

3.1 Factores de riesgo conocidos del parto pretérmino espontáneo

3.1.1 Factores Obstétricos

- El antecedente de parto pretérmino espontáneo antes de la semana 37 de gestación es el factor de riesgo más importante de recurrencia de parto pretérmino en siguientes gestaciones (19, 20).
- El antecedente de una pérdida gestacional de segundo trimestre entre las 16 y las 20 semanas de gestación (21).
- El período intergenésico corto, especialmente inferior a 6 meses (22).
- El acortamiento cervical: La longitud cervical medida por ecografía transvaginal inferior al percentil 5 según la edad gestacional es de los mejores predictores de parto pretérmino de los que disponemos actualmente (23-24).
- La sobredistensión uterina provocada por presencia de miomas (25), polihidramnios (26) o gestaciones múltiples (27).
- La cesárea en curso de parto realizada en mujeres en dilatación completa (28).
- La metrorragia en cualquier trimestre de la gestación (29-32).
- Factores fetales como las malformaciones fetales mayores (33) o el sexo masculino (34).

3.1.2 Factores Maternos

- La raza negra y afrocaribeña (35).
- La edad materna: tanto la adolescencia como la edad materna avanzada (36).

- El índice de masa corporal (IMC) anormal: tanto el infrapeso ($\text{IMC} < 18.5 \text{ kg/m}^2$), el sobrepeso ($\text{IMC} 25\text{-}29.9 \text{ kg/m}^2$) o la obesidad pregestacional ($\text{IMC} > 30 \text{ kg/m}^2$) (37) como la ganancia de peso inadecuada durante la gestación (38).
- La nuliparidad o la gran multiparidad, especialmente la nuliparidad asociada a edades maternas precoces y el antecedente de 3 o más partos previos (36).
- Las condiciones socioeconómicas desfavorables (39) y el bajo nivel educacional (40).
- El hábito tabáquico (41) o el consumo de otras drogas (42).
- La anemia durante la gestación parece aumentar el riesgo de parto pretérmino, aunque los estudios son controvertidos (43)
- El estado nutricional materno: déficits de folato o zinc (44).
- Las malformaciones uterinas, especialmente el útero bidelfo (45).
- Los problemas de fertilidad y las técnicas de reproducción asistida, tanto por las características maternas asociadas a la infertilidad, así como por los tratamientos y procedimientos realizados para obtener la gestación (46).
- La conización y la cirugía cervical: son factores de riesgo una conización de más de 10 mm de profundidad o más de una conización (47).
- El antecedente de dilatación cervical y legrado uterino (48).
- Las infecciones extrauterinas intercurrentes como la vaginosis bacteriana (49), la clamidia (50), la pielonefritis (51), la malaria (52) o la enfermedad periodontal severa (53).
- Algunas enfermedades autoinmunes como la esclerosis sistémica y las conectivopatías (54).
- Los factores genéticos: polimorfismos en los genes de citocinas proinflamatorias (55).
- Los factores endocrinos como el déficit de progesterona (56).

3.2 Etiologías del parto pretérmino espontáneo

Los mecanismos moleculares finalmente responsables del inicio del parto pretérmino no están completamente descritos. A pesar de ello, las cuatro grandes causas que activan la cascada del parto pretérmino son la activación prematura del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal materno o fetal, la distensión uterina patológica, la causa vascular/placentaria y la causa inflamatoria/infecciosa. La causa inflamatoria/infecciosa, que es el objeto de estudio de la presente tesis doctoral, se expondrá en el siguiente apartado (punto 4: Etiología infecciosa/inflamatoria del parto pretérmino).

3.2.1 Activación prematura del eje hipotálamo-hipofisario adrenal materno o fetal

Múltiples factores de riesgo comentados previamente provocan estrés materno, desde patologías como las autoinmunes a la situación socioeconómica desfavorable o la malnutrición. Ante un estímulo de estrés materno, el hipotálamo secreta la hormona liberadora de corticotropina que estimula la liberación hipofisaria de corticotropina. Ésta estimula la liberación de cortisol a nivel de las glándulas suprarrenales que ejerce un estímulo de retroalimentación negativa a nivel hipotalámico y un efecto de retroalimentación positiva a nivel decidual que secreta hormona liberadora de corticotropina, estimulando de nuevo el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal materno y a su vez activando el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal fetal. Esta hormona liberada a nivel decidual aumenta la concentración de prostaglandinas que favorecen las contracciones y las modificaciones cervicales.

A nivel fetal, factores de estrés fetales como la insuficiencia placentaria o las malformaciones fetales pueden activar el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal fetal liberando cortisol que activa la secreción de hormona liberadora de corticotropina a nivel decidual. Por otro lado, existe un aumento de dehidroepiandrosterona y estrógenos que favorecen la RPM pretérmino (57).

3.2.2 Sobredistensión uterina

El estímulo mecánico de la distensión miometrial es uno de los factores principales del inicio del parto (57). Varios factores de riesgo mencionados previamente presentan una sobredistensión uterina, como el polihidramnios, los miomas o la gestación múltiple.

Se han descrito distintas vías que pueden contribuir al inicio del parto ante un estímulo de distensión mecánica:

- Las células miometriales adquieren un fenotipo que favorece la contractilidad y presentan un aumento de las “gap junctions” (58).
- Se activa la producción de proteínas de contracción miometrial como los receptores de oxitocina, las conexinas o las prostaglandinas, entre otros (59-61).
- Se activa la síntesis de citocinas inflamatorias como la interleucina (IL)-8, IL-6 o factor de necrosis tumoral alfa (62,63).

- Se incrementan los canales de sodio y calcio. El aumento de calcio intracelular que se une a la calmodulina es el que provoca la fosforilación de la cadena ligera de la miosina, permitiendo la acción de la actina y la miosina, responsables finales de la contracción muscular (58).

3.2.3 Disfunción vascular placentaria

Un 30-35% de pacientes con RPM pretérmino o APP presentan signos histológicos placentarios sugestivos de patología vascular placentaria, similares a los descritos en pacientes con preeclampsia. Alrededor de un 7-10% de pacientes pueden llegar a mostrar lesiones mixtas (infecciosas y vasculares) a nivel placentario, siendo más probables en edades gestacionales tempranas (64-67).

La sospecha de que la causa vascular/placentaria sea la responsable de un parto pretérmino se basa en el estudio anatomopatológico de la placenta. No existe un criterio diagnóstico claro dada la heterogeneidad de clasificaciones y la variabilidad de las lesiones placentarias. Los hallazgos anatomopatológicos que sugieren una causa vascular/placentaria incluyen el peso placentario inferior al percentil 10, la ausencia de cambios adaptativos de las arterias espirales en segmento miometrial y en lecho placentario persistiendo vasos pequeños, musculares con paredes bien definidas que pueden contener trombos o asociar zonas de infarto, la maduración acelerada desigual de las vellosidades coriónicas, y la hemorragia decidua o placentaria (64-67).

El mecanismo fisiopatológico no es del todo conocido. Cada vez más evidencia sugiere un fallo en la transformación fisiológica de las arterias espirales y una alteración de factores deciduales y miometriales esenciales para una placentación normal que conducen a la isquemia uteroplacentaria (64, 66-70).

El mecanismo subyacente, probablemente, implica que la isquemia uterina aumenta la producción de renina a nivel uterino, aumentando las concentraciones de angiotensina II, la cual puede inducir contracciones miometriales de forma directa o indirecta a través de la liberación de prostaglandinas. Además, si existe isquemia suficiente para provocar necrosis o hemorragia a nivel de la decidua, la producción de trombina podría activar también las contracciones uterinas (71).

4. ETIOLOGÍA INFECCIOSA/INFLAMATORIA DEL PARTO PRETÉRMINO

La causa conocida más frecuente de parto pretérmino, principalmente en edades gestacionales tempranas, es la causa infecciosa y/o inflamatoria (72,73). Un pequeño porcentaje de estas pacientes presentan signos clínicos sugestivos de infección, lo que se conoce como corioamnionitis clínica (74). El resto se presentan de forma subclínica. Hasta el momento, el diagnóstico de infección o inflamación intra-amniótica subclínica necesita de la realización de una amniocentesis, ya que no existe una elevación significativa de marcadores indirectos como la fiebre o los leucocitos para tener un diagnóstico de sospecha.

Se han descrito 4 fenotipos de pacientes en función de la exposición a infección o inflamación en esta etapa subclínica (72,73):

- Infección intra-amniótica asociada a inflamación
- Infección intra-amniótica sin inflamación (colonización)
- Inflamación intra-amniótica sin infección (inflamación estéril)
- Pacientes sin inflamación ni infección intra-amniótica.

4.1 Infección intra-amniótica subclínica

4.1.1 Definición

La infección intra-amniótica subclínica se define por la presencia de microorganismos en el líquido amniótico en ausencia de signos clínicos de infección (75).

4.1.2 Prevalencia

Un 10-20% de las pacientes con APP y hasta un 40% de las pacientes con RPM pretérmino que debutan antes de las 34 semanas de gestación presentan infección intra-amniótica subclínica, siendo ésta responsable de alrededor del 25% de todos los partos pretérmino espontáneos. La prevalencia de la infección intra-amniótica subclínica aumenta conforme disminuye la edad gestacional al diagnóstico siendo de hasta el 40% antes de las 28 semanas de gestación (Figuras 5 y 6) (72,73,75,76).

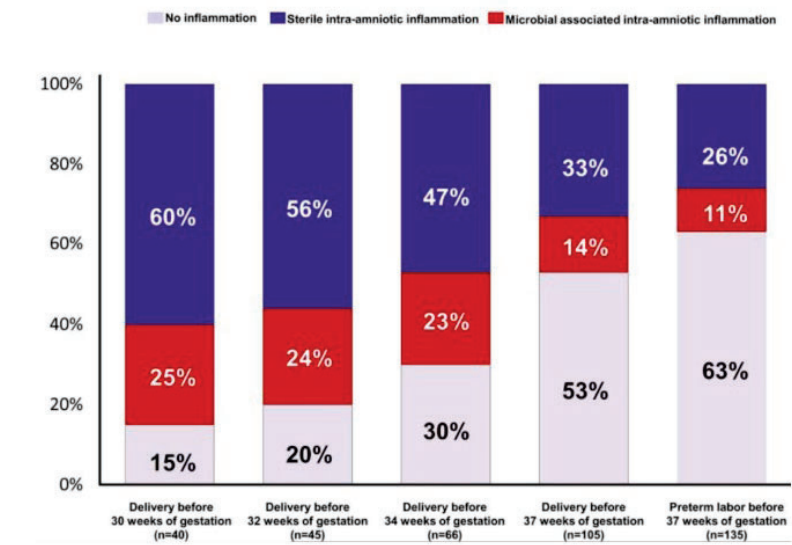


Figura 5: Prevalencia de inflamación intra-amniótica estéril e inflamación intra-amniótica asociada a infección en pacientes con amenaza de parto pretérmino con membranas íntegras según la edad gestacional en el momento del parto. Fuente: Romero R. Am J Reprod Immunol. 2014 (72).

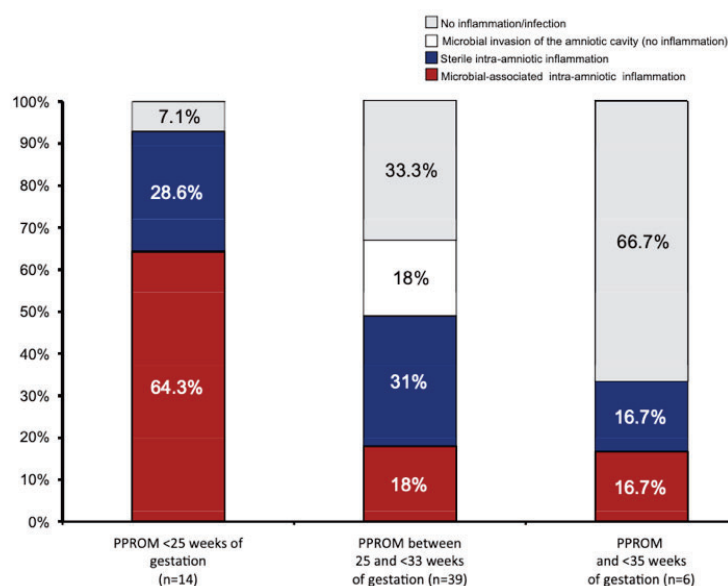


Figura 6: Prevalencia de inflamación intra-amniótica estéril e inflamación intra-amniótica asociada a infección en pacientes con RPM pretérmino según la edad gestacional en el momento del diagnóstico de la RPM. Fuente: Romero R. J Matern Fetal Neonatal Med. 2015 (73).

4.1.3 Microorganismos implicados y vías de infección

El germen que con más frecuencia se aísla en la infección intra-amniótica subclínica es el *Ureaplasma* spp. (especies), siendo el responsable de aproximadamente el 50% de las

infecciones intra-amnióticas. Se trata de una especie de la familia Mycoplasmataceae, por lo que no se aísla en cultivos convencionales y requiere de un cultivo específico o de técnicas moleculares. Otra especie de la misma familia relativamente frecuente sería el *Mycoplasma hominis* (prevalencia del 9% aproximadamente) (77).

También son frecuentes bacterias Gram negativas (*Fusobacterium nucleatum* (9%), *Escherichia coli* (7%), *Haemophilus influenzae* (3%), o *Prevotella bivia* (1%)) o Gram positivas (*Streptococcus agalactiae* (11%), *Peptostreptococcus* spp. (4%), *Enterococcus* spp. (3%), *Streptococcus anginosus* (3%), *Gardnerella vaginalis* (3%), *Streptococcus mitis* (3%), *Streptococcus pneumoniae* (0.8%) o *Listeria monocytogenes* (0.6%)) (78).

Entre todas las bacterias descritas previamente, existen varias anaerobias relativamente frecuentes (*Prevotella bivia*, *Fusobacterium nucleatum* o *Peptostreptococcus* spp.), por lo que será importante añadir cultivos de gérmenes anaerobios al estudio del líquido amniótico.

La infección fúngica es menos frecuente (prevalencia alrededor de 0.6% de las infecciones intra-amnióticas) y se produce por *Candida albicans* principalmente (79).

A pesar de ello, es importante reconocer que existen muchos otros microorganismos no cultivables (virus, por ejemplo) que requieren de otras técnicas de biología molecular que actualmente no se incluyen en la práctica clínica habitual (80,81).

La vía de colonización al líquido amniótico más frecuente es la ascendente desde el tracto genital inferior, por bacterias responsables de disbiosis vaginal como *Ureaplasma* spp., *Mycoplasma hominis* o *Streptococcus agalactiae* (82).

Menos frecuentemente es la vía hematógena. El origen más frecuente de ésta es la cavidad oronasal, siendo un ejemplo de ello la infección por *Fusobacterium nucleatum* con relación a la patología periodontal o por *Listeria monocytogenes* relacionada con la contaminación alimentaria (83). Otro origen hematógeno menos frecuente es el tracto respiratorio, siendo ejemplos de ello la infección por *Haemophilus influenza* o el *Streptococcus pneumoniae*. En ocasiones es difícil establecer la vía de colonización ya que algunas de estas bacterias también se detectan en el tracto genital inferior (*Fusobacterium nucleatum*).

4.1.4 Fisiopatología

Lo más frecuente es que la presencia de microorganismos active una respuesta inflamatoria en el líquido amniótico conocida como inflamación intra-amniótica. Una vez el microorganismo invade la cavidad amniótica, antígenos de superficie conocidos como PAMP (pathogen-associated molecular pattern) se unen a receptores del sistema inmune llamados PRR (pattern recognition receptor), como los Toll-like receptor o los *Nucleotide-binding Oligomerization Domain* (NOD)-like receptor. Esto activa las células locales de la inmunidad innata (neutrófilos, monocitos y macrófagos) materna y fetal. La respuesta más temprana es por parte de los neutrófilos y posteriormente se activan los monocitos/macrófagos. Las funciones más importantes de estas células son la fagocitosis, la liberación de trampas extracelulares que permite atrapar a los microorganismos, la liberación de sustancias antimicrobianas (mieloperoxiadasa, lactoferrina, defensinas, catepsina G o elastasa, entre otros) y de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias (TNF (factor de necrosis tumoral) alfa, proteína inflamatoria de macrófagos- 1 alfa y 1 beta, IL-8, IL-18, IL1alfa e IL1beta). Esta liberación de interleucinas se hace a través del ensamblaje de complejos proteicos citosólicos activado por la unión de los PAMPs a los PRRs conocidos como inflamasomas y que activan la secreción de citocinas inflamatorias por la vía de las caspasas. Las quimiocinas inducen la migración de neutrófilos y macrófagos hacia la placenta y las membranas fetales desarrollando la corioamnionitis histológica. Este proceso finalmente provoca la liberación de prostaglandinas, que inducen el inicio de las contracciones uterinas (84-88). También se han detectado en cavidad amniótica linfocitos B, T y células Natura Killers, aunque su papel está menos definido (89).

En aproximadamente un 5% de los casos de infección intra-amniótica subclínica no existe una respuesta inflamatoria asociada. Habitualmente se utiliza el término “colonización” del líquido amniótico para referirnos a estos casos. Las implicaciones pronósticas de estos casos son similares a las mujeres que no presentan infección ni inflamación intra-amnióticas y pueden englobar casos de falsos positivos del cultivo de líquido amniótico.

4.1.5 Implicación clínica

La infección intra-amniótica subclínica se ha relacionado principalmente con un debut más precoz de los síntomas, una edad gestacional en el momento del parto más temprana y una

latencia al parto (intervalo de tiempo desde debut por APP o RPM y parto) menor. Además, se ha relacionado con un peor resultado neonatal (72,73,75).

En pacientes con APP, la latencia entre la amniocentesis y el parto es de 1-8 días en pacientes con infección intra-amniótica en comparación con los 31 días de media en aquellas pacientes sin infección ni inflamación. Las pacientes con infección intra-amniótica suelen ser casos refractarios al tratamiento tocolítico y con unas condiciones cervicales más avanzadas en el momento del diagnóstico. Asimismo, existe mayor incidencia de corioamnionitis clínica y RPM pretérmino en estas pacientes. La edad gestacional al parto y el peso al nacimiento también son menores, presentando una media de edad gestacional media al parto de 29 semanas en comparación con las 36 semanas de media que alcanzan las pacientes sin infección ni inflamación. La morbilidad neonatal también está relacionada con la edad gestacional al parto y no tanto por la exposición infecciosa/inflamatoria (72,90).

En pacientes con RPM pretérmino, la edad gestacional en el momento de la rotura es más precoz (24-25 semanas de gestación comparado con 32 semanas en pacientes sin infección ni inflamación). También disminuye la edad gestacional en el momento del parto (25 semanas de gestación aproximadamente en comparación con 34 semanas) con una latencia al parto menor (media de 3-5 días desde la amniocentesis hasta el parto en comparación con una media de 12-22 días en casos sin infección). No parece haber diferencias en cuanto a la incidencia de corioamnionitis clínica, aunque sí mayor prevalencia de corioamnionitis histológica (73, 80).

El peor resultado neonatal en pacientes con infección intra-amniótica subclínica se ha relacionado con la edad gestacional en el momento del parto y no tanto por la exposición infecciosa/inflamatoria. La edad gestacional al parto es la variable que más se relaciona con el resultado neonatal (77). Esto lo diferencia de la corioamnionitis clínica en la que se ha observado un peor resultado materno y neonatal por la exposición a la infección en esta etapa tan avanzada (74).

Además de los estudios en humanos, múltiples estudios en modelo animal han demostrado que la inoculación intra-amniótica de bacterias o productos bacterianos como lipopolisacáridos, inducen contracciones y parto pretérmino en ausencia de síntomas sistémicos como la fiebre (91-93).

4.1.6 Manejo actual

El manejo actual ante el diagnóstico de una infección intra-amniótica subclínica no está universalmente establecido. Parece justificado el tratamiento antibiótico con fármacos sensibles que atraviesen la placenta con perfil de seguridad para el feto. A la espera del resultado microbiológico, la antibioterapia de amplio espectro parece una estrategia razonable, cubriendo gérmenes Gram positivos, negativos y, principalmente, *Ureaplasma* spp.

No existe consenso sobre si se requiere finalización de la gestación en estos casos. La evidencia actual sugiere que el principal determinante de los resultados neonatales es la edad gestacional en el momento del parto (77,94). En general, y en beneficio del pronóstico neonatal, no se recomienda la inducción del parto inmediata si no existe repercusión sistémica de la infección (corioamnionitis clínica). Es por ello que la conducta expectante bajo cobertura antibiótica parecería una actitud razonable, contraindicando la utilización de tocolisis en estos casos de infección confirmada. La virulencia del germen, la edad gestacional, comorbilidades asociadas y la evolución clínica de la paciente serán factores a considerar en la finalización activa de la gestación (16, 95).

4.2 Inflamación intra-amniótica estéril

4.2.1 Definición

La inflamación intra-amniótica estéril se define por la presencia de una inflamación intra-amniótica en ausencia de infección intra-amniótica, por lo que su diagnóstico requiere de la realización de una amniocentesis. Posiblemente, la inflamación intra-amniótica estéril está sobrediagnosticada dado que existen microorganismos que no son cultivables y, por tanto, no se detectan con las pruebas microbiológicas convencionales.

Aunque no existe una definición exacta de inflamación intra-amniótica, la mayoría de autores la define por un aumento en la concentración de citocinas como la IL-6 o la metaloproteasa (MMP)-8 en líquido amniótico. Se han definido diferentes puntos de corte en función de la técnica utilizada y en función de la manifestación clínica (APP o RPM pretérmino). Similar a otros autores y utilizando técnicas de enzimoinmunoanálisis de adsorción (ELISA), el punto de corte

de IL-6 en los casos de RPM pretérmino que nuestro grupo ha propuesto es de 1.43 ng/mL y en los casos de APP de 13.4 mg/mL (96,97).

4.2.2 Prevalencia

En pacientes con APP, la inflamación intra-amniótica es más frecuente que la infección (26% vs. 11%, respectivamente) (72). En el caso de la RPM pretérmino, la inflamación intra-amniótica estéril es menos frecuente que la infección cuando el debut es muy precoz (antes de las 25 semanas la prevalencia de inflamación estéril es del 29% vs. el 64% de prevalencia de la infección). El porcentaje de inflamación estéril se mantiene posteriormente alrededor del 30%, mientras que el de infección se reduce a menos del 20% (73). Tanto en casos de APP como RPM pretérmino, la frecuencia de la inflamación estéril aumenta conforme disminuye la edad gestacional al debut clínico (Figuras 5 y 6) (72, 73).

4.2.3 Etiopatogenia

Las alarminas o DAMPs (*damage associated molecular patterns*) son moléculas liberadas en relación a procesos de necrosis, apoptosis, lesión tisular, estrés oxidativo o senescencia celular y sirven de alerta al sistema inmune innato y adquirido que estimulan los mecanismos de defensa del huésped, induciendo una respuesta inflamatoria similar a la observada en una infección (98,99).

Una de las fuentes más importantes de la liberación de alarminas en la cavidad amniótica son los fenómenos de senescencia a nivel de la decidua, involucrados en el parto pretérmino sin infección intra-amniótica y sin corioamnionitis aguda histológica (100-102). Estas alarminas o DAMPs son: IL-1alfa, High mobility group box-1 (HMGB1), la proteína B fijadora de calcio S100 (proteína SB100) y proteínas de *shock* térmico (*heat shock proteins*). Su presencia induce una respuesta inflamatoria en las membranas corioamnióticas, siendo una vía común de activación del parto (103). Esta respuesta pro-inflamatoria a nivel de las membranas incluye la secreción de sustancias proinflamatorias como la IL-6, IL-8, IL-1beta o TNF, entre otros (104) y la sobreexpresión de receptores PRR, comunes a la fisiopatología infecciosa (105).

4.2.4 Implicación clínica

La inflamación intra-amniótica presenta implicaciones clínicas similares a las observadas en la infección intra-amniótica subclínica. Éstas incluyen un debut más precoz de los síntomas y una latencia entre el diagnóstico y el parto más corta, lo que conduce a una edad gestacional al parto más temprana y un peor resultado neonatal.

En pacientes con APP, la latencia hasta el parto es de 3-8 días de media comparado con los 31 días de media en el grupo sin infección ni inflamación, y la edad gestacional media al parto de 27 semanas en comparación con las 36 semanas de media que presenta el grupo sin infección ni inflamación intra-amniótica (72).

A nivel neonatal, estas pacientes con inflamación estéril presentan mayor incidencia de morbilidad neonatal tras analizar la incidencia de síndrome de distrés respiratorio, displasia broncopulmonar, hemorragia intraventricular III-IV, leucomalacia periventricular, sepsis neonatal, enterocolitis necrotizante y mortalidad perinatal en conjunto en comparación con aquellas sin infección ni inflamación intra-amniótica (72).

En pacientes con RPM pretérmino, el debut clínico también es más precoz (28-29 semanas de gestación) con una latencia al parto más corta (9 días de media), y una edad gestacional al parto más temprana (31-32 semanas de gestación aproximadamente) en comparación con aquellas sin infección ni inflamación intra-amnióticas (73,80).

A nivel neonatal, estos casos presentan una menor tasa de complicaciones neonatales (valorando en conjunto displasia broncopulmonar, síndrome de distrés respiratorio, enterocolitis necrotizante, hemorragia intraventricular grado III-IV, necesidad de ventilación mecánica y mortalidad perinatal) que los casos con infección intra-amniótica pero mayor que aquellos sin infección ni inflamación (73,80).

Estos mismos hallazgos se han observado en el modelo animal. La administración sistémica de alarminas inducen el parto pretérmino, la respuesta inflamatoria fetal y el aumento de morbilidad neonatal (105-109).

4.2.5 [Manejo actual](#)

El tratamiento de la inflamación intra-amniótica no está actualmente establecido. Tratamientos como antiinflamatorios no esteroideos (110), corticoides (111,112) o antibióticos se han propuesto en distintos trabajos (muchos de ellos en modelo animal), con poca traslación a la práctica clínica habitual. Entre todos ellos, destaca el tratamiento con claritromicina dado que presenta un potente efecto antiinflamatorio con un buen paso transplacentario y que alarga la latencia al parto y reduce de morbilidad neonatal en el modelo animal (113). Además, la claritromicina parece reducir las concentraciones de IL-6 en mujeres RPM pretérmino, aunque se desconoce la influencia sobre los resultados neonatales (114).

4.3 Corioamnionitis clínica o Triple I

4.3.1 [Definición](#)

La manifestación clínica de la infección intra-amniótica es la corioamnionitis clínica o triple I (infección, inflamación intra-amniótica). Se trata de la inflamación aguda de las membranas placentarias (amnios y corion) de origen infeccioso junto con la infección del contenido amniótico (feto, cordón y líquido amniótico). La corioamnionitis clínica representa un estadio avanzado de la infección intra-amniótica en la cual ya existe repercusión sistémica materna. Se define por la presencia de fiebre materna ($>38.0^{\circ}\text{C}$) asociado a la presencia, al menos, de uno de los siguientes signos: leucocitosis materna ($>15000/\text{mm}^3$ no explicable por otro motivo como la administración de corticoides), taquicardia fetal (más de 160 latidos por minuto durante 10 minutos o más), o flujo cervical purulento. El diagnóstico de confirmación requiere de la realización de una amniocentesis y precisa de la visualización de gérmenes en la tinción de Gram del líquido amniótico, concentración de glucosa en líquido amniótico menor a 5 mg/dL o de un cultivo positivo en líquido amniótico (74).

4.3.2 [Prevalencia](#)

Únicamente un 13% de las infecciones intra-amnióticas evolucionan a corioamnionitis clínica o triple I, siendo responsables de alrededor del 5-10% de todos los partos pretérmino (74).

4.3.3 Etiopatogenia

La corioamnionitis clínica representa un estadio avanzado de la infección intra-amniótica, por lo que las vías de infección y la fisiopatología del parto son compartidas.

Tras la infección del compartimento uterino, la inflamación de la decídua conduce a una liberación de mediadores inflamatorios al torrente sanguíneo materno junto con una posible bacteriemia. Esta respuesta inflamatoria sistémica materna es la responsable de la aparición de la fiebre y la leucocitosis materna (115).

En general los gérmenes implicados (como *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*, *Haemophilus influenzae*) empeoran el pronóstico materno y fetal. Otros gérmenes responsables son *Ureaplasma urealyticum*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, y *Bacteroides* spp. (116). En este caso, además, existe una respuesta sistémica materna a la infección intra-amniótica.

4.3.4 Implicación clínica

La corioamnionitis clínica o Triple I representa un estadio tardío y avanzado de la infección intra-amniótica que es responsable de una morbilidad materna, fetal y neonatal no despreciable (74, 117).

A nivel materno, el diagnóstico de corioamnionitis clínica o triple I se ha asociado a un aumento de hemorragia postparto secundaria a atonía uterina, rotura uterina, histerectomía intraparto, transfusión de sangre, endometritis, infección de herida quirúrgica, absceso pélvico, sepsis, tromboflebitis séptica, admisión en Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) y mortalidad.

A nivel neonatal, presentan más riesgo de Apgar más bajo a los 5 minutos, sepsis precoz, convulsiones neonatales, displasia broncopulmonar, hemorragia intraventricular, leucomalacia periventricular, necesidad de ventilación mecánica, ingreso en UCI neonatales y muerte neonatal. A largo plazo, también se ha asociado con déficits neurológicos y parálisis cerebral (115).

4.3.5 Manejo actual

Debido al cuadro sistémico materno evidente y al mal pronóstico materno y neonatal, la finalización de la gestación bajo antibioterapia de amplio espectro que cubra gérmenes aerobios, anaerobios y micoplasmas es la conducta en estos casos (115, 118).

No existe una contraindicación a la administración de corticoides para maduración fetal. Su administración antenatal se ha asociado a una reducción del síndrome de distrés respiratorio, hemorragia intraventricular III-IV y leucomalacia periventricular, sin aumentar el riesgo de sepsis materna o fetal. Es por ello que se recomienda su administración entre las 23+0 y las 34+6 semanas de gestación, aunque no deben demorar la finalización de la gestación (119).

Dada la recomendación de finalización activa de la gestación, la perfusión periparto de sulfato de magnesio reduce el riesgo de parálisis cerebral, por lo que se recomienda su administración si el parto se produce antes de las 32-34 semanas de gestación (120).

Ante la presencia de fiebre materna, la administración de antitérmicos será crucial ya que la hipertermia fetal se ha relacionado con hipoxia tisular y riesgo de depresión neurológica (121).

Por último, la finalización activa de la gestación no implica que el parto sea mediante cesárea. El parto vaginal es una opción segura. El intervalo de tiempo entre el diagnóstico y el parto no está claramente relacionado con resultados maternos ni neonatales adversos (115). La tocolisis en casos de corioamnionitis clínica está contraindicada.

5. MANEJO ANTENATAL DE PACIENTES CON AMENAZA DE PARTO PRETÉRMINO Y ROTURA PREMATURA DE MEMBRANAS PRETÉRMINO

Las intervenciones que han demostrado mejorar el resultado perinatal se resumen a continuación.

5.1 Corticoterapia

La maduración pulmonar fetal es el principal beneficio de la administración de corticoides dado que favorecen la producción de surfactante pulmonar por los neumocitos tipo 2, mejorando la respuesta ventilatoria neonatal y reduciendo el síndrome de distrés respiratorio y la enfermedad pulmonar crónica. Los corticoides no solamente actúan a nivel pulmonar, habiendo demostrado reducir también la enterocolitis necrotizante, la hemorragia intraventricular y la mortalidad neonatal de los recién nacidos prematuros. A pesar del posible efecto inmunosupresor de los corticoides, no existe mayor riesgo de muerte materna, corioamnionitis, endometritis o sepsis neonatal (122).

Se recomienda su administración en pacientes con APP o RPM pretérmino antes de las 34+6 semanas dado el potencial riesgo de progresión del parto en las siguientes horas o días. El límite inferior para su administración se establece en función de la viabilidad, siendo en nuestro medio a partir de las 23+0 semanas de gestación.

A pesar de que existen varias pautas posibles basadas en dexametasona o betametasona (ambos con buen paso transplacentario), la pauta más establecida en España es la administración de dos dosis de betametasona intramuscular de 12mg separadas 24 horas (123). Está demostrado el efecto protector de los corticoides ya desde pocas horas hasta los 7-14 días después de su administración (124). Las tandas repetidas han demostrado beneficio en la morbilidad respiratoria. Es por ello que debe considerarse repetir el ciclo de corticoides pasados los 7-14 días de su administración si el riesgo de parto inminente es alto. Sin embargo, cabe tener en cuenta que si finalmente el parto sucede más adelante (especialmente si es a término), la exposición antenatal a corticoides puede tener un efecto negativo para el feto. Las dosis repetidas de corticoides se han relacionado con un aumento de desórdenes neurocognitivos, mentales y psicológicos a nivel postnatal (125). Es por ello que se recomienda valorar la

administración de dosis repetidas solamente ante el escenario de un cambio clínico o analítico relevante que sugiera una progresión del parto y no se recomienda su administración de forma profiláctica.

5.2 Sulfato de magnesio

Su administración en las horas previas al parto y durante el parto, si éste sucede antes de las 32-34 semanas de gestación, ha demostrado reducir el riesgo de parálisis cerebral a los 2 años de vida. Es por ello, que se recomienda su administración ante situaciones de parto inminente antes de las 32-34 semanas de gestación siempre que suceda en una edad gestacional viable (126).

Dado su estrecho rango terapéutico y sus posibles efectos secundarios potencialmente graves si existe una hipermagnesemia (depresión respiratoria principalmente), debe administrarse el menor tiempo posible, siempre intentando asegurar su administración al menos 4 horas previas al parto. También es recomendable la monitorización de las constantes maternas para una detección precoz de efectos adversos (127).

5.3 Antibioterapia

El principal beneficio de los antibióticos es materno. Así el tratamiento con antibióticos en pacientes con RPM pretérmino ha demostrado retrasar el parto más de 48 horas y hasta 7 días, reducir la aparición de corioamnionitis clínica y de infecciones puerperales. A nivel neonatal, el beneficio es marginal, aunque se ha observado una reducción en la sospecha clínica o analítica de sepsis neonatal (aunque no en la sepsis confirmada por hemocultivo). También se ha descrito una reducción de complicaciones respiratorias leves (neumonía, necesidad de surfactante o de oxigenoterapia) y cerebrales neonatales (hemorragia intraventricular o ecografía transfontanelar anormal) (128). El beneficio de los antibióticos sobre otras morbilidades neonatales severas (como sepsis neonatal confirmada) o a largo plazo es pobre.

A diferencia de la RPM pretérmino, el uso de antibioterapia de forma sistemática en casos de APP no ha demostrado prolongar la latencia al parto ni reducir complicaciones maternas ni neonatales. Esto probablemente es debido a que la baja prevalencia del 10-20% ya comentada de infección intra-amniótica en estos casos hace que la administración sistemática de

antibióticos a todas las pacientes con APP no resulte efectiva. Por el contrario, se ha reportado que hasta en un tercio de las pacientes con APP en las que existe evidencia de infección intra-amniótica los antibióticos han erradicado la infección permitiendo alargar la latencia al parto (129). Es por ello que, a pesar de que no hay suficiente evidencia para recomendar una amniocentesis de rutina ante el diagnóstico de una APP, algunos autores recomiendan valorar su realización en casos de debut antes de las 28 semanas de gestación (momento en el que la infección es más frecuente), cuando existe sospecha de una infección intra-amniótica (casos de dinámica uterina refractaria al tratamiento tocolítico o aumento de reactantes de fase aguda en la analítica materna) o en los casos de corioamnionitis clínica (presencia de fiebre materna de más de 38°C asociada, leucocitosis materna o taquicardia fetal).

En los casos de infección intra-amniótica o corioamnionitis clínica, el régimen antibiótico debe ser de amplio espectro para permitir cubrir la gran diversidad de gérmenes (aerobios, anaerobios y micoplasma genital) que pueden provocar estos cuadros clínicos (123, 130). Se recomienda incluir en el tratamiento un macrólido, dado que es un antibiótico con buena cobertura para el micoplasma genital que ha demostrado alargar la latencia al parto y reducir complicaciones neonatales (131). Específicamente la claritromicina presenta mejor paso transplacentario que otros macrólidos (132). La triple terapia asociando un macrólido para cubrir micoplasma genital, cefalosporina o derivado de penicilina para cubrir gérmenes aerobios (133), y metronidazol para cubrir gérmenes anaerobios (129, 134) se ha reportado ampliamente en la literatura como opción terapéutica válida en estos casos (135, 136). Otras combinaciones de macrólidos con penicilina y cefalosporina de tercera generación que tengan buena cobertura ante anaerobios también han demostrado eficacia en el aumento de la latencia al parto, así como en la reducción de complicaciones maternas y neonatales (137, 138). La administración de ácido clavulánico en estos casos está contraindicada, dado que ha demostrado aumentar la incidencia de enterocolitis necrotizante en los neonatos prematuros (131).

También se recomienda la antibioterapia ante indicaciones obstétricas como el hallazgo de bacteriuria asintomática, infección del tracto urinario, o profilaxis intraparto de la sepsis neonatal por *Streptococcus agalactiae*.

5.4 Tocolisis

Los tocolíticos no han demostrado reducir el riesgo de parto pretérmino ni mejorar los resultados perinatales *per se*, aunque sí permiten retrasar el parto más de 48 horas y más de 7 días. Esto permite administrar corticoides y sulfato de magnesio y trasladar a la gestante a un centro donde se pueda asumir el parto pretérmino, intervenciones que sí han demostrado tener un impacto en los resultados neonatales (139,140). Por el momento no existen estudios focalizados en el tratamiento tocolítico en edades gestacionales muy precoces, donde es especialmente significativa la mejoría de los resultados neonatales con cada día o semana transcurridos intra-útero. Por otro lado, su administración en casos de RPM pretérmino se ha asociado a un aumento de la corioamnionitis clínica, de test de Apgar a los 5 minutos inferior a 7 y a una mayor necesidad de ventilación neonatal (142).

Los tocolíticos de elección son el atosibán (administración endovenosa) y la nifedipina (administración por vía oral). Ambos han demostrado un perfil de seguridad similar para la paciente gestante en cuanto a hipo/hipertensión, aparición de preeclampsia, eclampsia, diabetes u otros efectos secundarios. Tampoco se han observado diferencias en cuanto a resultados neonatales, con tasas similares de sepsis precoz, displasia broncopulmonar, muerte perinatal, hemorragia intraventricular, leucomalacia periventricular, enterocolitis necrotizante, ingreso en UCI neonatal y ventilación mecánica (143).

En pacientes con APP se recomienda la administración de tocolisis al diagnóstico durante 48 horas para permitir la maduración pulmonar. No se ha demostrado que la tocolisis de mantenimiento mejore los resultados (144, 145). A partir de las 34+6 semanas no estaría justificado el tratamiento con corticoides o sulfato de magnesio por lo que la tocolisis no estaría indicada.

En el caso de la RPM pretérmino, existe evidencia que sugiere que su uso se asocia a un aumento de corioamnionitis clínica sin mejoría de los resultados neonatales, a pesar de que esta evidencia es heterogénea y en población con manejo antenatal diverso (141). Se puede valorar su uso solamente si ésta se asocia a dinámica uterina y modificaciones cervicales en las primeras 48 horas para permitir el tratamiento con corticoides y sulfato de magnesio, pero se recomienda ser restrictivo ya que, en la población con RPM pretérmino, la prevalencia de infección intra-amniótica es mayor (73).

5.5 Finalización de la gestación

Ante el diagnóstico de APP o RPM pretérmino siempre se debe descartar la presencia de criterios de finalización activa de la gestación como la corioamnionitis clínica, DPPNI o pérdida de bienestar fetal.

Si no existe una indicación de finalización activa de la gestación, se recomienda mantener una actitud expectante para mejorar el pronóstico neonatal. En los casos de infección intra-amniótica subclínica, como se ha comentado, el momento de finalización es controvertido, dependiendo de las semanas de gestación, la madurez pulmonar y la virulencia del germen aislado.

En los casos de RPM pretérmino, dado que existe un riesgo incrementado de infección intra-amniótica secundaria a la rotura de las membranas, se debe valorar el riesgo/beneficio de mantener una actitud expectante en función de la edad gestacional. En nuestro medio, la finalización activa de la gestación se recomienda alrededor de las 34-35 semanas de gestación dado que, comparado con la conducta expectante hasta las 37 semanas, reduce la corioamnionitis clínica, la fiebre intraparto, la hemorragia materna ante/intraparto sin empeorar el pronóstico neonatal ni a corto ni a largo plazo (146-148).

6. CONSECUENCIAS POSTNATALES DERIVADAS DEL PARTO PRETÉRMINO

6.1 Mortalidad neonatal

Se define como la muerte en los primeros 28 días de vida y se estima que el 35% de los casos son consecuencia del parto pretérmino. La prematuridad no sólo es la principal causa de mortalidad neonatal, sino también la principal causa de mortalidad por debajo de los 5 años de vida, comprendiendo el 18% de estas muertes (Figura 7) (149).

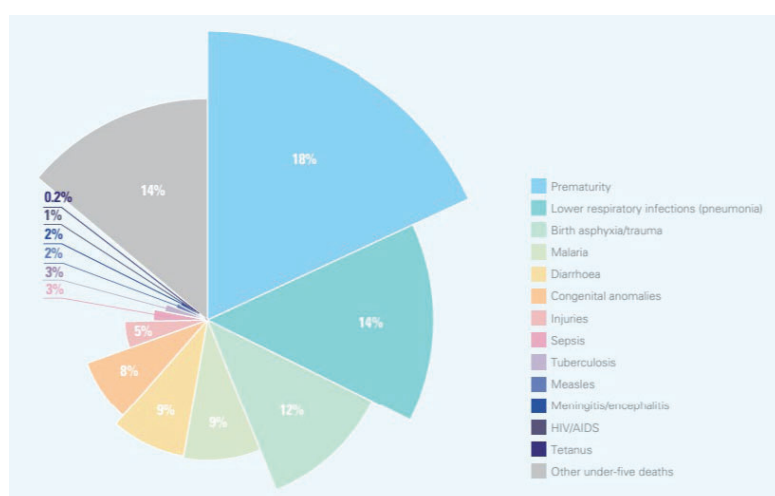


Figura 7: Condiciones relacionadas con la mortalidad por debajo de los 5 años de vida. Fuente: The United Nations Inter-agency Group for Child Mortality Estimation (UN IGME). Levels and trends in child mortality: report 2023 (149)

La mortalidad neonatal se ha reducido drásticamente en los últimos 30 años, estimándose, en 2022, en 17 muertes por cada 1000 nacidos vivos a nivel mundial. En Europa esta tasa se estima alrededor de 3 muertes por cada 1000 nacidos vivos. A pesar de ello, la tasa de prematuridad se ha mantenido bastante estable en los últimos años. Así, gran parte de esta reducción en la mortalidad se debe a las mejoras en estrategias de prevención de complicaciones relacionadas con la prematuridad que se establecen a nivel prenatal (administración de corticoides o de sulfato de magnesio, entre otras) junto con la mejoría del manejo de estos prematuros a nivel postnatal, incluyendo la aparición de UCI neonatales cada vez más sofisticadas con soporte de infraestructuras, mejoras en la ventilación y alimentación, así como nuevas terapias eficaces (6).

El principal determinante de la supervivencia neonatal es la edad gestacional al parto, así como el peso al nacer, muy relacionado con la edad gestacional, dado que, a menor edad gestacional, el peso al nacer también disminuye. A pesar de ello, los recién nacidos con retraso de crecimiento intrauterino comparados con aquellos con peso adecuado a la misma edad gestacional, presentan peores tasas de supervivencia. La mejoría en la supervivencia neonatal no aumenta de forma lineal con las semanas de gestación, sino que presenta un aumento muy significativo en las primeras semanas de la viabilidad (entre 23+0 y 26+0 semanas de gestación) y a partir de las 30 semanas de gestación se estima una supervivencia de más del 90% de los nacimientos, aumentando menos del 1% de forma semanal hasta el término (Figura 8) (150,151).

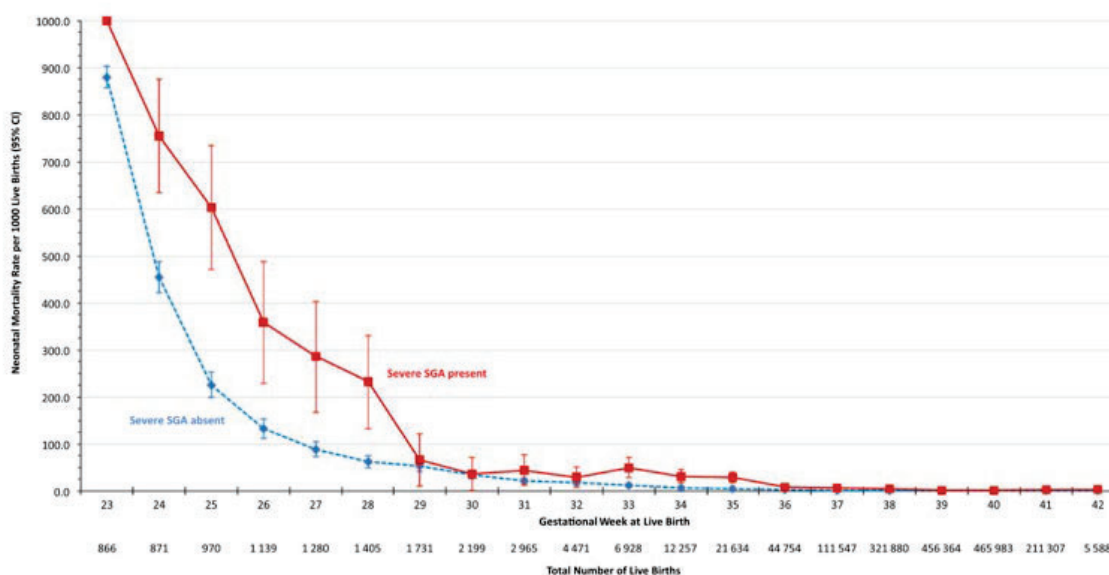


Figura 8: Tasa de mortalidad neonatal antes de los 28 días de vida en recién nacidos vivos de gestaciones únicas según la edad gestacional en el momento del parto y la presencia (línea roja) o no (línea azul) de defectos de crecimiento intrauterino severo. Fuente: Ray JG. Pediatrics. 2017 (150).

6.2 Complicaciones respiratorias

El **síndrome de distrés respiratorio** (clásicamente denominado enfermedad de membrana hialina) es consecuencia de una deficiencia primaria de producción de surfactante a raíz del nacimiento del neonato en un momento en el que los neumocitos tipo 2, responsables de la

producción de surfactante, todavía son inmaduros y no producen la cantidad adecuada. Todo ello conlleva una dificultad en la expansión de los alveolos tras el parto, presentando una insuficiencia respiratoria neonatal. A menor edad gestacional, mayor es la probabilidad de desarrollarlo. Los corticoides antenatales administrados antes de las 34+6 semanas de gestación en pacientes con riesgo de parto pretérmino han demostrado reducir su incidencia. Su tratamiento postnatalmente se basa en soporte respiratorio y administración de la surfactante (152).

La **displasia broncopulmonar** es la enfermedad pulmonar crónica más frecuente en niños, afectando predominantemente a nacidos antes de las 29 semanas de gestación. Se caracteriza por una alteración en el desarrollo del parénquima pulmonar y un crecimiento mal regulado de la vascularización pulmonar, siendo causa de reducción de la capacidad pulmonar, menor tolerancia al ejercicio, hipertensión pulmonar y un factor de riesgo para el desarrollo de una enfermedad obstructiva crónica pulmonar (153). Su tratamiento consiste en administrar al recién nacido el soporte respiratorio necesario, incluyendo ventilación mecánica, y la administración de corticosteroides (154).

El origen de esta patología es multifactorial, aunque la infección intra-amniótica parece ser un factor de riesgo importante que provoca una colonización patológica de la microbiota pulmonar que se asocia con la aparición de displasia broncopulmonar (155). Parece que el tipo de infección puede relacionarse con la severidad de esta patología, siendo el *Ureaplasma spp* uno de los gérmenes más relacionados con la displasia (156), aunque otras bacterias como *Escherichia coli* también se han relacionado con casos severos de displasia broncopulmonar (157).

6.3 Enterocolitis necrotizante

Constituye la causa principal de muerte neonatal debida a complicaciones gastrointestinales, afectando al 5-12% de los prematuros moderados-extremos. El tratamiento inicial es el reposo intestinal y un uso racional de antibióticos, aunque la cirugía es necesaria en algunos casos con perforación intestinal o pneumoperitoneo. En estos casos más severos, la mortalidad alcanza el 20-30% (158).

6.4 Sepsis neonatal

La sepsis neonatal precoz (diagnosticada las primeras 72h tras el parto), así como la tardía (diagnosticada posteriormente a 72h tras el parto) son más frecuentes en neonatos nacidos prematuros y el criterio diagnóstico es un hemocultivo positivo. Esto ocurre tanto por el contexto infeccioso en el que muchos partos pretérmino ocurren (corioamnionitis clínica, infección intra-amniótica), como por un sistema inmune inmaduro de estos neonatos que los hace especialmente vulnerables. Estos cuadros suelen ser más graves conforme disminuyen las semanas de gestación, tanto por aumentar la probabilidad de una infección intrauterina, como por tener un sistema inmunitario más inmaduro. Bacterias como *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli* son los gérmenes más comunes implicados en la sepsis precoz y estafilococos coagulasa negativos constituyen los más frecuentemente implicados en las sepsis tardías. Una buena transmisión de información sobre el tipo de germen aislado a nivel antenatal así como el tratamiento administrado son cruciales para el manejo de estos prematuros. Además, en prematuros extremos y moderados, los cultivos periféricos y hemocultivos tras nacer de forma sistemática son claves para un diagnóstico y tratamiento antibiótico adecuado precoz (159).

6.5 Complicaciones cardiovasculares

6.5.1 Complicaciones cardiovasculares a corto plazo

El **ductus arterioso persistente** consiste en la ausencia del cierre del ductus arterioso tras el nacimiento con la evidencia de flujo sanguíneo en su interior. El ductus arterioso es un vaso que en vida fetal comunica el tronco de la arteria pulmonar con la aorta descendente, permitiendo el paso de un alto porcentaje de la sangre eyectada por el ventrículo derecho a la aorta descendente. Este vaso se cierra durante las primeras semanas de vida, pasando a denominarse ligamento arterioso. El aumento de la presión arterial de oxígeno junto con la disminución de agentes vasodilatadores como las prostaglandinas o el óxido nítrico son parte de los factores que promueven este cierre. La persistencia del ductus arterioso en vida postnatal, tras la reducción de resistencias vasculares pulmonares, produce un cortocircuito izquierda-derecha

que puede complicarse con una insuficiencia cardíaca izquierda, edema pulmonar, displasia broncopulmonar o hipertensión pulmonar. También se ha relacionado con enterocolitis necrotizante y hemorragia intraventricular. Su manejo puede ser expectante, esperando a un cierre espontáneo del ductus, farmacológico, con administración de antiinflamatorios no esteroideos, o el cierre manual del mismo, habitualmente de forma percutánea. El tratamiento de elección es controvertido, aunque ductus persistentes con gran repercusión hemodinámica o respiratoria suelen requerir reparación (160).

6.5.2 Complicaciones cardiovasculares a largo plazo

En las últimas décadas la supervivencia de los nacidos prematuros ha incrementado. A su vez, ha disminuido la edad gestacional que se considera el límite inferior de la viabilidad. Como consecuencia, han llegado a la infancia y la edad adulta cohortes de nacidos prematuros en los cuales las consecuencias cardiovasculares han sido objeto de estudio. En estos niños y adultos se ha descrito una hipertrofia miocárdica concéntrica (Figuras 9 y 10) que dificulta la relajación ventricular en diástole, provocando una disfunción diastólica (161, 162, 163).

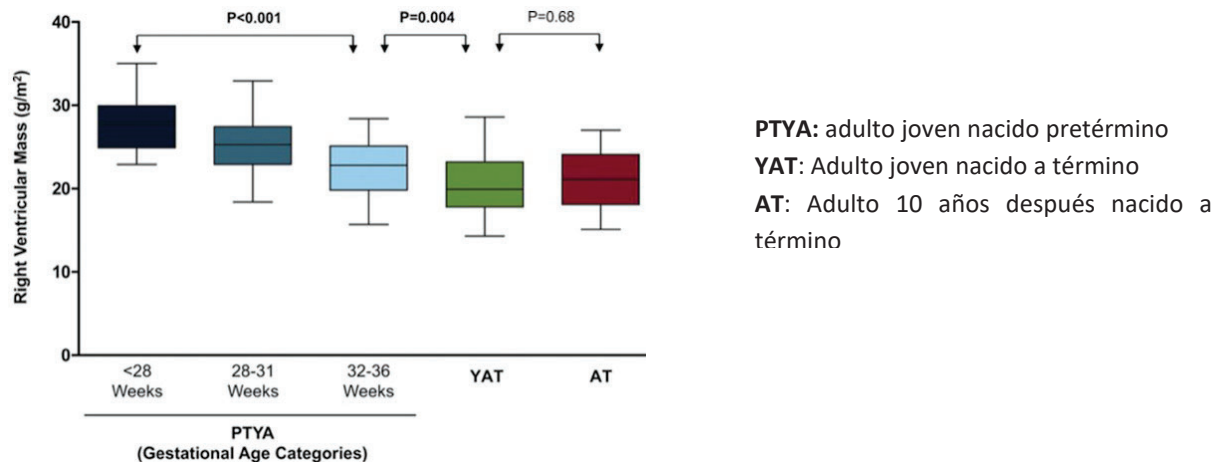
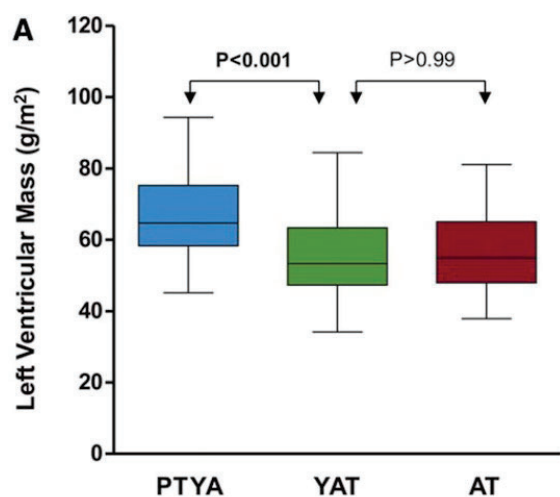


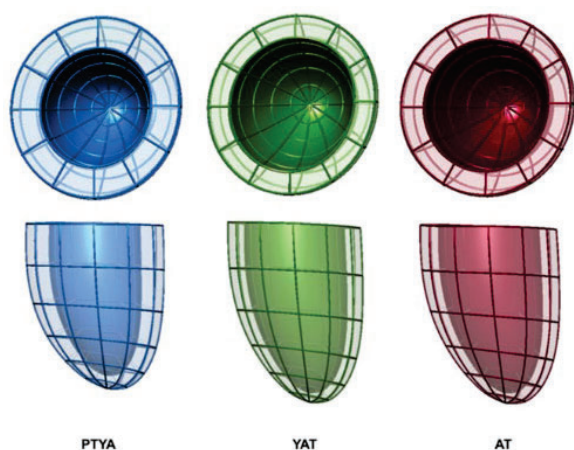
Figura 9: Masa miocárdica ventricular derecha según la edad gestacional al nacer. Fuente: Lewandowski AJ. Circulation. 2013 (163)



PTYA: adulto joven nacido pretérmino
YAT: Adulto joven nacido a término
AT: Adulto 10 años después nacido a término

Figura 10: Masa miocárdica ventricular izquierda según la edad gestacional al nacer. Fuente: Lewandowski AJ. Circulation. 2013 (161).

También se ha observado una reducción del volumen de ambos ventrículos (Figura 11) y del diámetro aórtico (164), así como una reducción de parámetros de disfunción sistólica (161, 163, 165). Se ha reportado, además, un aumento de la rigidez aórtica (166) y de las resistencias pulmonares (167), una rarefacción de la microvasculatura asociada a un estado anti-angiogénico (168).



PTYA: adulto joven nacido pretérmino
YAT: Adulto joven nacido a término
AT: Adulto 10 años después nacido a término

Figura 11: Morfología del ventrículo izquierdo en adultos según edad gestacional al nacer. Puede apreciarse el aumento de masa miocárdica y la disminución del volumen de la cavidad ventricular (hipertrofia miocárdica concéntrica) en adultos jóvenes nacidos pretérmino (imagen azul). Fuente: Lewandowski AJ. Circulation. 2013 (161).

Todos estos cambios se han relacionado con el aumento de riesgo a largo plazo de desarrollar hipertensión arterial, tanto sistémica (169) como pulmonar (170). Especialmente preocupante es el hallazgo de un aumento de insuficiencia cardíaca en adultos jóvenes nacidos prematuros en una larga cohorte sueca (Figura 12) (171), así como de cardiopatía isquémica (Figura 13) (172). Este aumento de riesgo parece ser inversamente proporcional a la edad gestacional al parto, siendo mayor conforme menor es la edad gestacional.

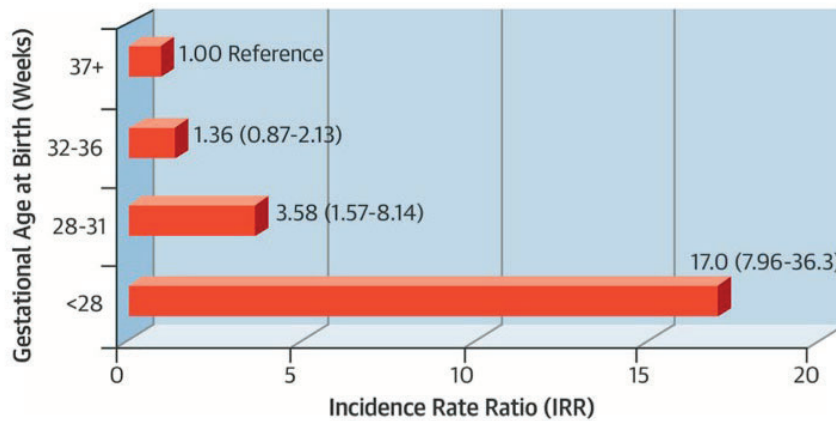


Figura 12: Riesgo de insuficiencia cardíaca en niños y adultos jóvenes en relación con la edad gestacional en el momento del parto. Fuente: Carr H. J Am Coll Cardiol. 2017 (171)

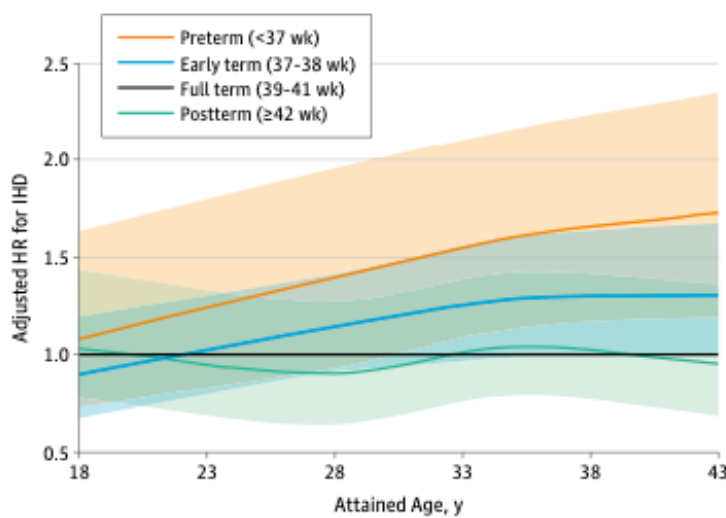


Figura 13: Hazard ratio ajustada para cardiopatía isquémica según la edad gestacional al nacimiento. Fuente: Crump C. JAMA Pediatr. 2019 (172)

La explicación más aceptada del remodelado cardíaco en pacientes nacidos prematuros es el hecho de que el parto ocurre en un período clave del desarrollo cardiovascular, conduciendo a

un cambio ambiental radical al pasar el neonato a un ambiente hiperóxico respecto al prenatal, con resistencias vasculares sistémicas aumentadas y resistencias pulmonares reducidas debido al cambio que se produce tras el nacimiento de la circulación fetal a la postnatal. Además, el crecimiento y desarrollo cardíaco que se produce en tercer trimestre, pasará de ser a expensas de hiperplasia de cardiomiocitos (prenatal) a hipertrofia de los mismos (postnatal). Todo ello conduce a cambios en estructura y función cardíaca que, aunque sean subclínicos, conllevan el desarrollo de un corazón mucho más susceptible a cualquier insulto y, por tanto, a poder desarrollar de forma temprana insuficiencia cardíaca o cardiopatía isquémica (173).

A pesar de que los cambios cardiovasculares postnatales hasta la adultez están ampliamente reportados y que la reducción del volumen de las cavidades cardíacas es bastante consistente a lo largo de la bibliografía, existen discrepancias entre estudios en cuanto a la masa miocárdica, habiendo incluso algunos estudios que encuentran una masa miocárdica reducida en nacidos prematuros. Estas discrepancias sugieren que probablemente exista algún otro factor relacionado con el desarrollo de este remodelado cardíaco, pudiendo influir factores de la vida postnatal (complicaciones postnatales de la prematuridad, estilo de vida o desarrollo de enfermedades concomitantes). Especialmente remarcable sería el papel de la hipertensión, conocido factor de riesgo cardiovascular que es más frecuente en población nacida de forma prematura. Este aumento de su prevalencia podría explicarse por una angiogénesis alterada que conduce a una reducción de la red vascular corporal y a una disfunción endotelial, así como a una alteración de la nefrogénesis con riñones de tamaño reducido. También cabe considerar que factores de la vida prenatal puedan influir en esta variabilidad de remodelado postnatal, dado que las causas de un parto pretérmino son múltiples y diversas, probablemente confiriendo características distintas a estos pacientes (173).

6.6 Complicaciones neurológicas

Una de las morbilidades más preocupantes en un individuo nacido prematuro es la neurológica (prevalencia en torno al 25-50%), tanto por las implicaciones a corto plazo, como por su alta carga emocional, económica y familiar a largo plazo. Su espectro clínico incluye problemas en el comportamiento, psicológicos y del neurodesarrollo. Esta morbilidad es especialmente grave en los casos de corioamnionitis clínica o en partos pretérmino antes de las 28 semanas. Estos

casos están claramente asociados a parálisis cerebral, retraso en el neurodesarrollo y en el lenguaje, disfunciones audiovisuales y trastornos del comportamiento como esquizofrenia o trastornos del espectro autista (174-176). Afortunadamente, este escenario es cada vez menos frecuente debido a las mejoras en los cuidados antenatales y postnatales.

La **parálisis cerebral** consiste en una disfunción del sistema nervioso central no progresiva que provoca un tono muscular anormal y disfunción en el control de los movimientos que también suele asociar retraso cognitivo. No existe tratamiento curativo, aunque requiere de distintas terapias de soporte como fisioterapia o soportes para la movilización (177).

La lesión de sustancia blanca periventricular se conoce clásicamente como **leucomalacia periventricular** y es más frecuente conforme disminuye la edad gestacional en el momento del parto. La lesión neurológica que más se asocia a la prematuridad es la **lesión difusa de sustancia blanca** que está presente en el 50-80% de nacidos prematuros por debajo de las 32 semanas. Esta lesión traduce una lesión de tipo isquémico-necrótico de la sustancia blanca profunda periventricular y un retraso en la mielinización, daño axonal y pérdida de oligodendrocitos. Esto puede conducir a una reducción del volumen de la sustancia blanca y a un aumento ventricular y puede asociar lesiones necróticas focales microscópicas. También existe la **lesión focal (quística) de la sustancia blanca** (menos frecuente) que traduce una necrosis focal de evolución rápida en la que aparecen lesiones destructivas en forma de quistes macroscópicos (más de 1 mm). Esta lesión también suele asociar un componente de lesión difusa de sustancia blanca. El diagnóstico se realiza por prueba de imagen, habitualmente una ecografía cerebral o resonancia magnética (*gold standard* especialmente para la forma difusa), donde suele evidenciarse una hiperecogenicidad adyacente a los ventrículos laterales asociada o no a ventriculomegalia. Esta lesión puede evolucionar en los siguientes días a una forma quística. La hiperecogenicidad persistente, la forma quística y la ventriculomegalia serían hallazgos que confieren peor pronóstico en cuanto a neurodesarrollo (177). La figura 14 representa distintos grados de anomalías de sustancia blanca (178).

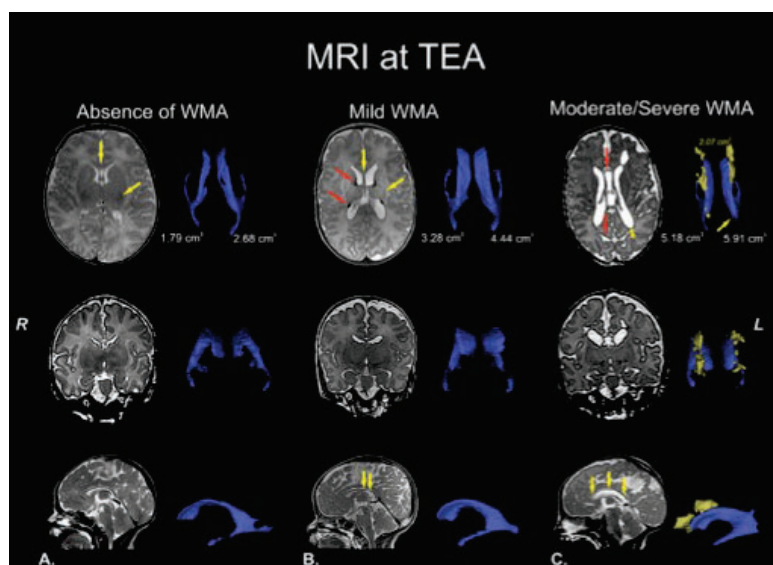


Figura 14: Resonancia magnética en secuencia T2 con medidas volumétricas de los ventrículos laterales (azul) alrededor de las 41 semanas corregidas en: **A)** niño sano nacido a término; **B)** Prematuro nacido a las 28 semanas de vida con lesión moderada de sustancia blanca: lesión difusa de la sustancia blanca, adelgazamiento parcial del cuerpo calloso (flechas amarillas), ventriculomegalia moderada (reconstrucción azul) y lesiones puntiformes periventriculares de sustancia blanca (flechas naranjas); y **C)** Prematuro nacido a las 29 semanas de vida con lesión moderada-severa de sustancia blanca: quistes múltiples bilaterales (reconstrucción amarilla), adelgazamiento global del cuerpo calloso (flechas naranjas de la imagen superior y amarillas de la imagen inferior), ventriculomegalia (azul). Fuente: Hinojosa-Rodríguez M. Neuroimage Clin. 2017 (178).

Los niños y adultos nacidos prematuros presentan también un adelgazamiento y una **reducción** del área del **cuerpo calloso**, especialmente a expensas de la parte posterior, siendo el esplenio la parte más afectada. La lesión quística de sustancia blanca se asocia con el adelgazamiento del cuerpo calloso (179).

La **hemorragia intraventricular** es una de las lesiones cerebrales más frecuentes en nacidos prematuros con una incidencia del 20-30% en niños nacidos por debajo de los 1500 gramos que decrece conforme aumenta la edad gestacional en el momento del parto. La principal causa de esta hemorragia es la rotura de los vasos de la matriz germinal. Su diagnóstico es por prueba de imagen, habitualmente ecografía cerebral o resonancia magnética. El grado III (hemorragia con ventriculomegalia) es el grado más severo que se asocia a peores resultados en el neurodesarrollo. El **infarto hemorrágico periventricular** afecta al 10% de los prematuros nacidos antes de las 32 semanas, su origen es parenquimatoso y suele visualizarse como imágenes quísticas o porencefálicas. Suele asociarse a peores resultados neurológicos que ha hemorragia intraventricular (178).

La **lesión neuro-axonal** también es típica de la prematuridad, y sucede a nivel de sustancia blanca (subplaca o lesiones puntiformes periventriculares), sustancia gris cortical y subcortical (tálamo y ganglios basales) y cerebelo (córtex y núcleo dentado). La necrosis de sustancia blanca genera anomalías a nivel de sustancia gris por la pérdida axonal y por la alteración en la migración neuronal. Esto se traduce en una reducción de la densidad neuronal a varios niveles: 1) **cortical**, con una pérdida de volumen cortical y un retraso en la maduración cortical que implica una reducción de la superficie cortical. A consecuencia de ello, el espacio subaracnoideo suele verse aumentado; y 2) **subcortical**, con una reducción del tamaño y una alteración en la señalización mediante resonancia magnética del tálamo, ganglios basales o hemisferios cerebelares. La Figura 15 representa distintos grados de lesión de sustancia gris (178).

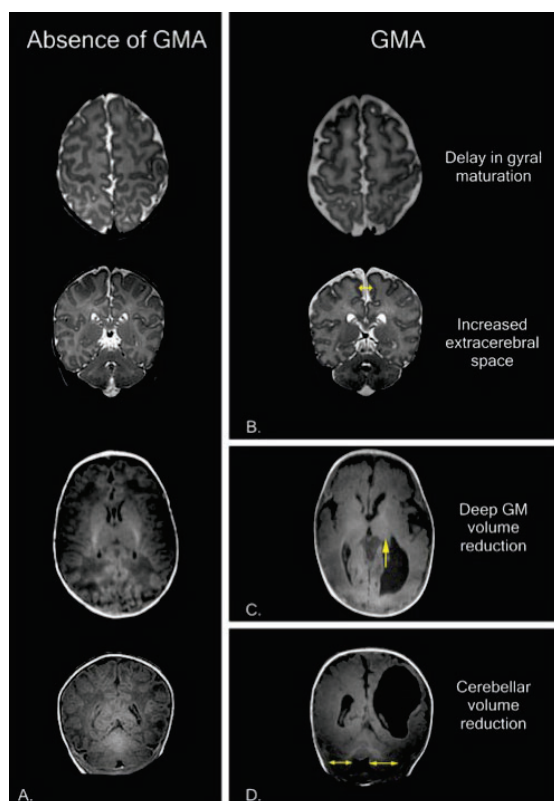


Figura 15: Ejemplos de lesión de sustancia gris en resonancia magnética alrededor de las 41 semanas corregidas en: **A)** neonato sano nacido a término; **B)** Prematuro nacido a las 31 semanas de gestación con lesión de sustancia gris moderada: retraso en la maduración cortical y aumento del espacio extra-cerebral (flecha amarilla); **C-D)** Prematuro nacido a las 31 semanas de gestación con lesión severa de sustancia gris (reducción volumétrica de la misma) y quistes porencefálicos. La flecha amarilla de la figura C señala asimetría a nivel de los tálamos. Las flechas amarillas de la figura D señalan una asimetría de los hemisferios cerebelares y una reducción de su volumen. Fuente: Hinojosa-Rodríguez M. Neuroimage Clin. 2017 (178).

El córtex experimenta un período de rápida expansión y maduración en el tercer trimestre de la gestación, por lo que es especialmente sensible al nacimiento prematuro de un feto y a los efectos de las terapias de cuidados intensivos que estos neonatos requieren. Los recién nacidos prematuros presentan menos surcos corticales y menos profundidad de los mismos, siendo más patente en aquellos con menor peso al nacer, menor edad gestacional y menor perímetro cefálico (Figura 16) (180).

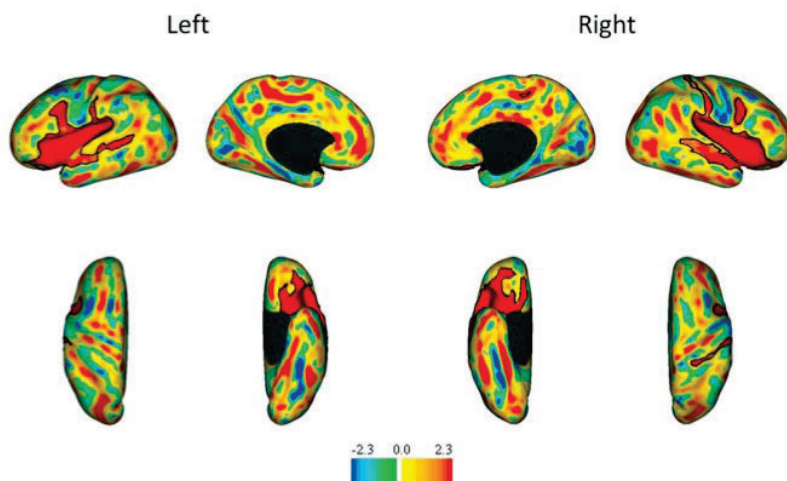


Figura 16: Mapa cerebral con profundidad de los surcos corticales diferencial entre nacidos prematuros y a término. La barra de colores muestra las desviaciones estándar: el color rojo y amarillo muestran las regiones donde los nacidos a término presentan surcos más profundos que los prematuros. El color azul indica regiones donde los surcos son más profundos en nacidos prematuros. Fuente: Engelhardt E. Ann Neurol. 2015 (180).

El pronóstico en cuanto a neurodesarrollo es difícil de predecir en cada individuo. Se ha reportado un peor neurodesarrollo a los dos años de vida en relación al incremento del volumen ventricular y a la reducción del volumen cerebelar, cerebral total, talámico, de ganglios basales, de lóbulos frontales y del cuerpo calloso. El empeoramiento de la función motora se ha relacionado con menor volumen cerebelar, afectación severa de sustancia blanca (lesión quística especialmente) y reducción del cuerpo calloso. El pronóstico cognitivo es peor en aquellos que presentan lesión de sustancia blanca como reducción de su volumen o lesiones puntiformes. La alteración en ganglios basales y tálamos es el predictor más potente de peor pronóstico a nivel de memoria y aprendizaje (178).

7. JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS: ESTUDIO DE LA PROGRAMACIÓN FETAL CARDIOVASCULAR Y NEUROLÓGICA

7.1 Concepto de programación fetal

La programación fetal reconoce la contribución del entorno y las complicaciones prenatales sobre la salud a lo largo de la vida. Este concepto sugiere que el feto se adapta a las distintas exposiciones ambientales o a las distintas enfermedades fetales o maternas, lo cual puede tener efectos a largo plazo en la salud del niño y del adulto. Esto ha implicado importantes avances en el entendimiento de la fisiopatología de algunos problemas postnatales neurológicos, conductuales, psiquiátricos, cardiovasculares o endocrinos, entre otros (181). Así mismo, también se ha demostrado que determinados ambientes fetales óptimos favorecen unos mejores resultados perinatales (182) y en los primeros años de vida (183).

7.2 Programación fetal sobre el sistema cardiovascular

El corazón es un órgano central en la adaptación al ambiente fetal dada su función vital de distribuir sangre, nutrientes y oxígeno a todos los órganos fetales.

Igual que ocurre postnatalmente, el corazón puede sufrir cambios para adaptarse a un insulto (toxinas, fármacos, infecciones, hipoxia, desnutrición o sobrecarga de presión o volumen), pudiendo aumentar posteriormente el riesgo de enfermedad cardiovascular a largo plazo (184).

En general, en fases iniciales de un insulto, el corazón tiende a adaptarse sufriendo cambios en su forma, estructura y tamaño, lo que se define como remodelado cardíaco, con el objetivo de que los cardiomiocitos trabajen en las condiciones más eficientes posibles y poder así mantener de forma óptima su función y asegurar el aporte adecuado de sangre a los distintos órganos. Dichos cambios en la estructura y la forma cardíaca suelen acompañarse de cambios subclínicos en la función cardíaca, pudiendo llegar a afectar a la función sistólica (eyección de sangre a la circulación de forma óptima para perfundir todos los órganos) o diastólica (llenado ventricular óptimo mediante la relajación de las fibras miocárdicas para poder albergar la sangre que posteriormente se eyectará). La función sistólica depende de la contracción miocárdica mediante fuerzas de contracción multidireccional (longitudinal, radial y de torsión) y de la resistencia que encuentra el torrente sanguíneo a la salida de la sangre, así como del volumen

de sangre del que dispone el ventrículo al inicio de la eyección. La función diastólica depende principalmente de la capacidad de relajación del miocardio para poder agrandarse y contener el volumen sanguíneo adecuado, así como del volumen de sangre que llega a los ventrículos desde las aurículas y las venas que drenan la sangre del resto del cuerpo a las mismas.

Estos patrones pueden observarse globalmente en todo el corazón o, más frecuentemente, en una parte (por ejemplo, a nivel ventricular o auricular, o a nivel de cavidades izquierdas o derechas). En etapa fetal, los cambios son típicamente más prominentes en cámaras derechas, dado que es éste ventrículo el que se considera el sistémico, responsable de la perfusión de los órganos fetales y de la placenta.

El remodelado y la adaptación cardíaca siguen distintos patrones según el insulto al que es sometido el feto, su duración y el momento de la exposición fetal a dicho insulto. El remodelado fetal presenta diferencias con el remodelado cardíaco en vida postnatal, dado que en vida fetal el corazón tiene todavía gran potencial para desarrollarse y su estructura puede cambiar y adaptarse, mientras que en vida postnatal estos cambios son mucho más limitados. Por otro lado, en general, el insulto en vida fetal desaparece tras el parto y esos cambios que ha sufrido el corazón de forma prenatal pueden no ser los mejores para hacer frente a los requerimientos de la vida postnatal (184).

Los patrones básicos de remodelado son (Figura 17) (184):

- **Disminución del índice de esfericidad ventricular:** El índice de esfericidad corresponde a la división del diámetro longitudinal ventricular entre el diámetro transversal ventricular. Por tanto, la cámara ventricular presenta una morfología más globular conforme se reduce el índice de esfericidad. En respuesta a un aumento de presión, los ventrículos adquieren geometrías más globulares (más redondeados) que permiten que los cardiomiocitos puedan trabajar correctamente sin necesidad de aumentar su fuerza (hipertrofia). Este patrón se ha descrito en casos de insuficiencia placentaria con defectos del crecimiento intrauterino leves y tardíos que produce una sobrecarga de presión (185,186). A nivel postnatal, a pesar de que el insulto de la placenta desaparece, estos cambios persisten (187,188), habiéndose relacionado con un aumento de riesgo de hipertensión (189) y de mortalidad cardiovascular en la edad adulta (190, 191).

- **Hipertrofia miocárdica sin cardiomegalia:** en respuesta a una sobrecarga de presión mantenida, tras adquirir geometrías ventriculares más globulares, los cardiomiocitos se hipertrofian de forma concéntrica: el miocardio crece hacia el interior de las cavidades de forma que las cavidades cardíacas disminuyen manteniendo un tamaño cardíaco normal. Esto se ha asociado a signos de disfunción diastólica. Este patrón se ha descrito en casos de estenosis pulmonar severa o fetos concebidos por técnicas de reproducción asistida. A nivel postnatal, se ha demostrado que persisten estos cambios (192,193) y que condicionan la necesidad de valvuloplastia pulmonar en casos de estenosis pulmonar (194) y un incremento de la presión arterial y signos de disfunción vascular sistémica y pulmonar durante la infancia en casos de reproducción asistida (193,195).
- **Hipertrofia miocárdica con cardiomegalia:** en respuesta a una sobrecarga de volumen, mediante una elongación de los cardiomiocitos, permite aumentar el volumen de sangre que pueden albergar los ventrículos. Este remodelado suele ser excéntrico (la relación entre la masa miocárdica y las cavidades cardíacas está preservada porque ambas aumentan). Este patrón se ha descrito en casos de diabetes mellitus materna (hipertrofia septal especialmente), en pacientes con tratamiento con Zidovudina (hipertrofia concéntrica en este caso, siendo mayor el aumento de masa miocárdica que el de las cavidades ventriculares) y retraso de crecimiento intrauterino severo y precoz. Se ha asociado a disfunción diastólica (196) y, en el caso de la Zidovudina y el retraso de crecimiento, también sistólica (184, 186, 197). A nivel postnatal se ha demostrado la persistencia de estos cambios durante la infancia (198,199), así como el aumento del riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (200).
- **Remodelado auricular:** es menos común y usualmente ocurre en forma de dilatación auricular. Este patrón se ha descrito en fetos concebidos por técnicas de reproducción asistida (184, 192, 193).

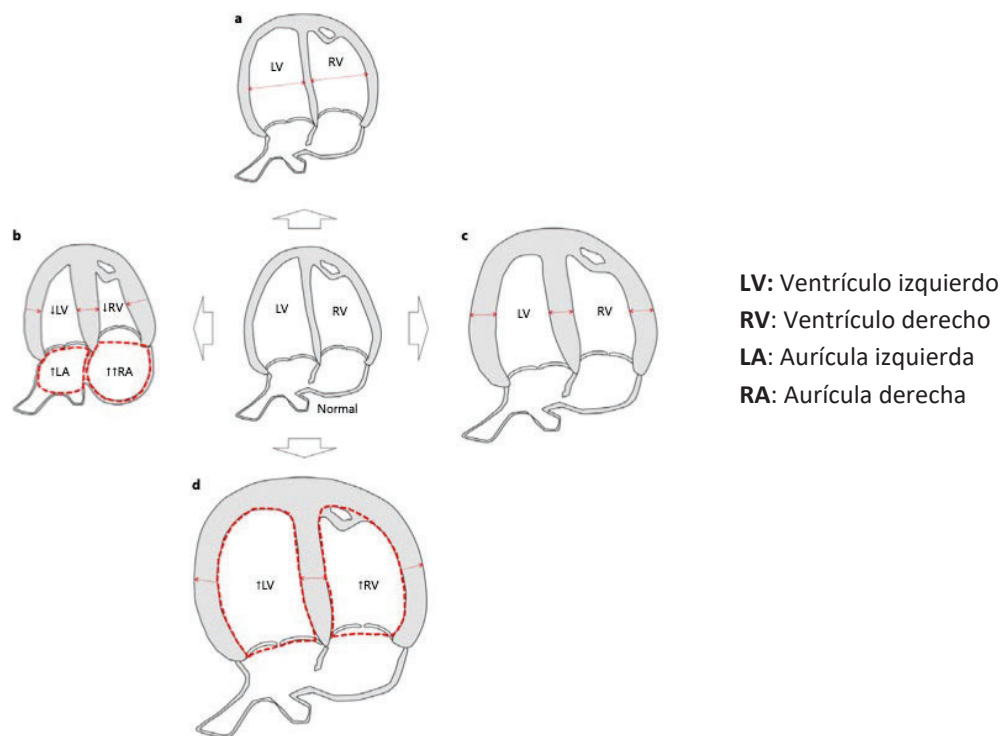


Figura 17: Esquema de los principales patrones de remodelado cardíaco. a) geometría globular en retraso de crecimiento intrauterino tardío leve. b) Hipertrofia miocárdica con dilatación auricular en fetos concebidos por técnicas de reproducción asistida. c) Hipertrofia miocárdica y cardiomegalia en fetos expuestos a fármacos antiretrovirales. d) Hipertrofia ventricular, dilatación ventricular y cardiomegalia en retraso de crecimiento intrauterino severo y precoz. Fuente: Crispi F. Fetal Diagn Ther. 2020 (184).

El estudio del remodelado cardíaco fetal presenta más dificultades que a nivel postnatal, dada la elevada frecuencia cardíaca fetal, las pequeñas dimensiones cardíacas fetales, la falta de un electrocardiograma fetal o los movimientos fetales que dificultan el uso de la resonancia magnética cardíaca, frecuentemente utilizada en el estudio cardíaco postnatal. La ecocardiografía fetal se considera, por tanto, la mejor opción para el estudio del remodelado cardíaco fetal, habiendo demostrado ser una técnica altamente accesible y reproducible siguiendo una metodología estricta y habiéndose publicado ya curvas de normalidad para la mayoría de los parámetros estudiados (184).

Para complementar dicho estudio, marcadores bioquímicos de daño cardíaco evaluados a nivel de líquido amniótico o sangre de cordón pueden ayudar a tipificar el tipo de remodelado cardíaco.

7.2.1 Programación fetal cardiovascular y prematuridad

Muchos estudios realizados postnatalmente sobre remodelado cardíaco engloban a todos los nacidos prematuros en un mismo grupo sin diferenciar si la prematuridad ha sido indicada por causa médica o se trata de casos de prematuridad espontánea. Una de las causas más importantes de la prematuridad indicada por causa médica es el retraso de crecimiento intrauterino, el cual presenta varios patrones de remodelado cardíaco propios ya en vida fetal y que persisten de forma postnatal. A nivel de la prematuridad espontánea, la evidencia de que los fetos presentan cambios cardiovasculares existe, aunque es escasa y parcial.

En modelo animal fetal, se ha demostrado que aquellos fetos expuestos a inyección intra-amniótica de lipopolisacáridos o microorganismos, presentan una alteración en distintos genes de programación cardíaca fetal (201), sobrecarga cardíaca (202), alteración en la relajación cardíaca (203,204), y disfunción cardíaca (205,206), hipertensión arterial y sistémica (207) y una alteración del crecimiento y desarrollo cardíaco (208).

7.2.1.1 Ecocardiografía fetal

Romero y cols. sugirieron por primera vez en humanos la existencia de cambios en la función diastólica en una cohorte de fetos de pacientes ingresadas por RPM pretérmino. Se trató de un estudio retrospectivo que incluyó 67 pacientes con RPM pretérmino y 150 controles sin RPM, a los cuales se realizó un estudio del patrón Doppler pulsado diastólico mitral y tricuspídeo. Se observó en el Doppler mitral que los fetos con RPM pretérmino presentaban una velocidad pico de la onda A (contracción auricular) y una integral de la velocidad-tiempo (VTI) de la onda A mitral menores. Esto resultaba en un aumento de la ratio E/A (velocidad pico de la onda de llenado ventricular pasivo/velocidad pico de la onda de contracción auricular) y de la ratio VTI E/VTI A. Dentro del grupo de las RPM pretérmino, el subgrupo con infección intra-amniótica presentaban una ratio E/A más alta. A nivel tricuspídeo los cambios fueron más discretos, con un aumento en el grupo de RPM pretérmino de la ratio E/A y una reducción del VTI de la onda A, éste último más marcado en aquellos con infección intra-amniótica. En esta cohorte no se estudiaron los tiempos diastólicos, la función sistólica ni la estructura o morfología cardíacas. Los autores sugieren que estos cambios reflejan un corazón con menor resistencia al llenado pasivo ventricular, lo que requeriría una menor contribución de la fase de llenado activo por la

contracción auricular, asemejándose a los cambios sucedidos en el shock séptico del adulto (209). Posteriormente, Di Naro y cols. describieron la alteración de la función diastólica del ventrículo derecho en una cohorte de 12 pacientes con infección intra-amniótica en RPM pretérmino comparado con 27 controles sin RPM. Estudiaron únicamente la función del ventrículo derecho mediante la velocidad del Doppler tisular del llenado ventricular pasivo (E') y de la contracción auricular (A') y mediante técnicas de Strain y Strain Rate (SR). En los fetos con RPM pretérmino e infección se evidenció un aumento del SR en diástole precoz y una disminución de la ratio de la velocidad pico E'/A' en Doppler tisular. Esta alteración diastólica va en línea con la descripción realizada por Romero y cols. previamente. A nivel de función sistólica, un 40% de fetos con infección presentaban también disfunción sistólica con una contractilidad anárquica (210).

Letti Müller y cols. estudiaron el índice de rendimiento miocárdico o índice Tei (fórmula matemática: índice de contracción isovolumétrica + índice de relajación isovolumétrica)/ tiempo de eyección) al ingreso y de forma semanal en 15 pacientes ingresadas por RPM pretérmino (24-33 semanas) comparados con controles a las mismas semanas de gestación. Describieron un índice Tei alargado a expensas de un tiempo de eyección acortado. Además de los parámetros que conforman el índice Tei y de la frecuencia cardíaca, no se realizaron más estudios sobre la morfología, estructura o función cardíaca en esta cohorte (211).

Finalmente, Aye y cols. estudiaron una cohorte de 55 fetos con antecedente de parto pretérmino o de desorden hipertensivo en gestación previa de los cuales 10 resultaron ser prematuros. Por otro lado, estudiaron 137 gestaciones sin factores de riesgo, de las cuales 7 experimentaron un parto pretérmino. Se realizaron ecocardiografías funcionales seriadas desde las 15 semanas a lo largo de la gestación, al nacimiento y 3 meses postparto. Describen que todas las medidas de masa miocárdica estuvieron por debajo del percentil 95 previamente al nacimiento. En los nacidos prematuros el aumento de la masa miocárdica se evidenció a los 3 meses de edad corregida (212). El resto de parámetros ecocardiográficos fetales no están publicados y tampoco se diferenciaron los casos por la causa de la prematuridad, incluyendo todo tipo de partos prematuros.

7.2.1.2 Biomarcadores de daño cardíaco

- **Propéptido natriurético cerebral N-terminal (NT-proBNP):** corresponde a la porción terminal del péptido pre-proBNP, que se divide en el BNP (32 aminoácidos que corresponden al péptido activo) y en el NT-proBNP (76 aminoácidos terminales del pre-proBNP). El método principal para estimar las concentraciones de BNP, que se trata del péptido activo, es medir las concentraciones del NT-proBNP dado que es una molécula más estable (213).

Estos péptidos se producen a nivel de las membranas fetales (corion y amnios) y a nivel de los cardiomiocitos. Las concentraciones de NT-proBNP en líquido amniótico son altas al inicio de la gestación (media de 4111 pg/mL alrededor de las 17 semanas) y decrecen a lo largo de la gestación (media de 50-70 pg/mL alrededor de las 41 semanas) (214).

La producción de NT-proBNP a nivel de las membranas fetales se produce por fenómenos de elongación de las membranas fetales al inicio de la gestación, mientras que el factor de crecimiento epidérmico, que aumenta durante la gestación, inhibe su producción y reduce sus concentraciones conforme avanza la gestación. El NT-proBNP se ha relacionado con una función de quiescencia miometrial, contribuyendo a evitar el inicio de dinámica uterina cuando las concentraciones son altas (al inicio de la gestación) y favoreciendo el inicio espontáneo de parto al llegar a término dada su rápida disminución con las semanas (215). Las concentraciones intraparto no están reportadas en la literatura. A pesar de ello, un estudio demuestra menores concentraciones de NT-proBNP en biopsia de membranas amnióticas obtenidas en el momento de una cesárea pretérmino entre 30-34 semanas en pacientes con diagnóstico de APP que en pacientes sin APP (indicadas por retraso de crecimiento fetal severo, hipertensión materna o placenta previa) (216).

La producción de NT-proBNP a nivel de los cardiomiocitos ventriculares y, de forma secundaria, por otras células cardíacas como los fibroblastos, también está estudiada y se producen principalmente ante un estímulo de extensión o elongación. Se ha demostrado que aumenta en situaciones de sobrecarga cardíaca como insuficiencia cardíaca o infarto agudo de miocardio (217). Se ha demostrado que menos del 5% de NT-proBNP fetal en plasma se excreta por la orina, sugiriendo una baja contribución en condiciones normales de la producción cardíaca fetal sobre las concentraciones de NT-proBNP en líquido amniótico. A pesar de ello, en contexto de cardiopatías congénitas, disfunción miocárdica, arritmias o casos

de sobrecarga cardíaca en casos de fetos receptores en gestaciones monocoriales, se ha demostrado un aumento significativo de sus concentraciones que además se correlaciona con el grado de severidad de la insuficiencia cardíaca (218-220). Irani y cols. estudiaron las concentraciones de NT-proBNP en líquido amniótico de pacientes con APP o RPM con indicación de amniocentesis por dilatación cervical de más de 2 cm, dinámica uterina resistente a tocolisis o fiebre materna, sin encontrar diferencias entre en grupo con infección o inflamación intra-amniótica y el grupo sin ellas (221). En este estudio, el grupo con infección o inflamación intra-amniótica incluyó pacientes con infección intra-amniótica y/o inflamación intra-amniótica severa, definida por la presencia en el perfil proteómico del líquido amniótico mediante espectrometría de masas de 3 o 4 de los siguientes biomarcadores: defensina-1, defensina-2, calgranulina-A y calgranulina-C.

- **Troponina I:** La troponina I es una proteína perteneciente al complejo de las troponinas que regula la interacción entre la actina y la miosina en el músculo estriado y el miocardio. La isoforma cardíaca se libera desde el miocardio al torrente sanguíneo en respuesta al daño miocárdico y a la muerte de cardiomiocitos y se ha demostrado uno de los marcadores más sensibles al daño miocárdico tanto isquémico como no isquémico a nivel postnatal (222). En el corazón fetal, se expresa la isoforma de músculo esquelético lento en condiciones normales y, desde tercer trimestre hasta los primeros meses postparto, esta isoforma se reemplaza completamente por la isoforma cardíaca. Parece que esto permite al miocardio fetal ser más resistente a fenómenos de hipoxia y acidosis. En fetos sin patología musculoesquelética, la isoforma esquelética no se libera en el músculo esquelético sino que tiene un origen cardíaco. Además, en condiciones de patología cardíaca, se ha demostrado que aumenta la producción de la isoforma cardíaca, contribuyendo así al aumento de los niveles totales de troponina I circulante fetal (223).

Las concentraciones de troponina I se han estudiado en líquido amniótico en gestaciones a término no complicadas nacidas por cesárea, siendo la concentración media de 0.45 pg/mL (224). Sus concentraciones en líquido amniótico también están elevadas en algunos casos de *exitus* fetal anteparto, lo que se ha relacionado con fenómenos de daño e hipoxia miocárdica (200-400 mg/mL de media) (225). Existen escasos estudios sobre troponina I en líquido

amniótico y no se dispone actualmente de una curva de normalidad de referencia a lo largo de la gestación. Sus concentraciones elevadas en arteria umbilical se han relacionado con un pH arterial al nacimiento (a término) más bajo, cardiopatías congénitas (226), parto pretérmino, índice de pulsatilidad de la arteria cerebral media inferior al percentil 5 (centralización) y acidosis al nacimiento (227), retraso de crecimiento intrauterino (228) y desórdenes hipertensivos del embarazo (229, 230). También elevadas concentraciones sanguíneas en neonatos con diagnóstico de asfixia intraparto se han relacionado con un aumento de mortalidad (231) y de encefalopatía hipóxico-isquémica (232).

7.3 Programación fetal sobre el sistema neurológico

El cerebro es uno de los órganos vitales fetales y presenta un desarrollo constante desde la concepción hasta años tras el nacimiento que será responsable del neurodesarrollo y de la conducta. Dado que es un órgano en constante desarrollo, también puede ser uno de los más afectados en patologías fetales, independientemente de la edad gestacional a la que suceda el insulto.

Existen múltiples patologías fetales y maternas que han demostrado ser capaces de inducir cambios cerebrales fetales que tendrán repercusión y contribuirán al neurodesarrollo y a la neuroconducta postnatal.

Pueden existir, por tanto, diversos mecanismos que provoquen cambios cerebrales o determinen su desarrollo como la hipoxia (cardiopatías o retraso de crecimiento intrauterino), factores genéticos o daño directo sobre el tejido cerebral (toxinas, productos inflamatorios o fármacos). El tipo de alteraciones cerebrales que puedan suceder a nivel fetal dependerán del tipo de mecanismo, el momento en el que aparece y el tiempo al que el cerebro está expuesto.

- **Retraso de crecimiento intrauterino y preeclampsia:** El retraso de crecimiento intrauterino tiene múltiples causas que pueden provocar alteraciones cerebrales, siendo la más frecuente la insuficiencia placentaria y la hipoxia fetal. Otras causas menos frecuentes serían una anomalía genética, una infección congénita, o el consumo de tóxicos. Se han descrito en estos casos un volumen cerebral menor y un volumen relativo de sustancia gris cortical también reducido, un aumento de la profundidad de la ínsula y una reducción de la cisura de Silvio, una

reducción en la longitud total del cuerpo calloso y un retraso en la maduración cortical (233-238). El retraso en la maduración cortical también se ha descrito en casos de preeclampsia sin retraso de crecimiento asociado (239). A nivel postnatal se han descrito múltiples déficits de neurodesarrollo, motores, sensitivos, cognitivos, conductuales, de atención, de memoria y de aprendizaje (240-243).

- **Infertilidad y gestación concebida por técnicas de reproducción in vitro:** Es complicado diferenciar las consecuencias debidas al problema de fertilidad en sí mismo de las consecuencias debidas a la técnica de reproducción asistida. A nivel prenatal se ha descrito un retraso en la maduración cortical. A nivel postnatal se ha descrito un neurodesarrollo subóptimo y alteraciones de la neuroconducta (trastornos de atención e hiperactividad y trastornos del espectro autista) (244,245).
- **Cardiopatías congénitas:** Se ha demostrado en fetos con cardiopatías una reducción del volumen cerebral, un retraso en el desarrollo cortical y alteraciones en la sustancia blanca (tanto de maduración como de reducción de volumen de sustancia blanca y cuerpo calloso), especialmente en aquellos que presentan hipoxia (246,247). Postnatalmente esta reducción de volúmenes persiste (248,249) y está ampliamente reportado que estos niños sufren un retraso en el neurodesarrollo, probablemente producto de la combinación de factores prenatales como postnatales (necesidad de ingresos, cirugías, o hipoxia) (250).

7.3.1 Programación fetal neurológica y prematuridad

Existe evidencia que correlaciona la presencia de factores inflamatorios/infecciosos prenatales con peores resultados neurológicos postnatales. Así, el déficit neurológico en estos pacientes es especialmente marcado en aquellos que presentaban corioamnionitis clínica o histológica o un ambiente inflamatorio fetal. Este ambiente inflamatorio se define de forma heterogénea en los distintos estudios, incluyendo determinaciones sanguíneas maternas, líquido amniótico o sangre de cordón; así como distintos parámetros evaluados (proteína C-reactiva, IL-6 o IL-8, factor de necrosis tumoral alfa, u otras citocinas pro-inflamatorias). Esto también se ha confirmado en estudios en modelo animal tras la administración endovenosa o intra-amniótica de lipopolisacáridos (174-176,251).

Específicamente, la inflamación intra-amniótica definida como un incremento de IL-6 en líquido amniótico se ha asociado a mayor incidencia de lesiones de sustancia blanca y peores resultados del neurodesarrollo (incluyendo parálisis cerebral, motricidad gruesa y comunicación) (251-252) y se ha identificado como un factor de riesgo independiente de parálisis cerebral a los 3 años de vida (253).

Además, en los casos de madres con antecedentes de amenaza de parto pretérmino, la descendencia ha demostrado peor neurodesarrollo, incluso los casos de niños nacidos a término. Específicamente, el neurodesarrollo fue peor en área cognitiva, motricidad fina y gruesa, memoria, lenguaje receptivo, velocidad de procesamiento, coordinación visual, comunicación, socialización y regulación emocional. Sorprendentemente, los prematuros tardíos y los nacidos a término tras un episodio de APP presentaron similares resultados, siendo el principal determinante el antecedente d APP y no la edad gestacional al parto (254,255).

7.3.1.1 Técnicas de imagen cerebral fetal (neurosonografía y resonancia magnética)

Por un lado, Stori y cols. evalúan el cerebro fetal mediante resonancia magnética en casos de madres con riesgo de parto pretérmino espontáneo, juntando una cohorte heterogénea de 18 pacientes con RPM antes de las 32 semanas con 6 pacientes asintomáticas con antecedente de parto prematuro en gestación previa. A pesar de ello, el estudio (realizado de media sobre las 26 semanas de gestación) evidencia una reducción en los volúmenes de líquido cefalorraquídeo cortical y extracerebral en estas pacientes comparadas con 87 pacientes sin riesgo de parto pretérmino. El volumen cerebral supratentorial y el volumen cerebelar fueron similares. A pesar de la heterogeneidad de la cohorte de estudio, estas pacientes presentaban una media de 10 días entre la resonancia y el parto; y el 90% presentaron una corioamnionitis histológica, por lo que probablemente hubiera un componente inflamatorio/infeccioso importante, aunque no fue objetivo del estudio determinarlo. El líquido cefalorraquídeo tiene funciones de protección mecánica del cerebro, así como de transportar factores de crecimiento que regulan el desarrollo cortical y eliminar productos pro-inflamatorios. Sorprendentemente, a nivel postnatal lo que existe es un aumento del líquido cefalorraquídeo, sugiriendo los autores que en algún momento (probablemente tras el parto) se produce una reducción del volumen cerebral (tanto sustancia blanca como gris), tronco del encéfalo y superficie cortical debido a procesos de atrofia o afectación del crecimiento cerebral, junto con una desregulación de los procesos de absorción

y producción del líquido y un aumento del perímetro cefálico que justificarían estas diferencias (256).

Por otro lado, Thomason y cols. estudian pacientes con alto riesgo de parto pretérmino sin clarificar los criterios exactos de inclusión y las dividieron en aquellas 14 que dieron a luz antes de las 35 semanas y las 18 que dieron a luz a término, excluyendo retrasos de crecimiento fetales. Se realizó una resonancia magnética cerebral fetal alrededor de las 30 semanas de gestación de media, evidenciando una reducción en la conectividad neuronal en el hemisferio izquierdo en la región del pre-lenguaje (próxima al área de Broca) que corresponderá postnatalmente al área que dará soporte a la función del lenguaje. Estos cambios fueron más marcados contra más prematuro fue el parto y no desaparecieron incluso eliminando del análisis las pacientes que dieron a luz en los siguientes 7 días desde la resonancia, excluyendo una posible influencia del proceso del parto en este hallazgo. Los autores también sugieren una posible contribución de un ambiente fetal infeccioso/inflamatorio en estas pacientes dado que hay un alto porcentaje de signos inflamatorios/infecciosos a nivel placentario en el grupo de estudio (257). A pesar de ello, el estudio no evaluó específicamente la posible presencia de infección o inflamación intra-amnióticas.

7.3.1.2 Biomarcadores de daño cerebral

- **Enolasa neuroespecífica (ENE):** se trata de una isoenzima citoplasmática que cataliza la interconversión del fosfo-d-glicerato 2 y del fosfopiruvato en la vía de la glucólisis. Se libera predominantemente en tejido neuronal y neuroendocrino, en el citosol de las neuronas. El daño o la muerte celular libera esta isoenzima al torrente sanguíneo y al líquido cefalorraquídeo. Sus concentraciones en líquido amniótico se han estudiado en gestaciones con amniocentesis por causa genética o riesgo de prematuridad con posterior parto a término y descendencia sin patología, siendo estables a lo largo de toda la gestación (incluido si hay dinámica uterina a término), siendo su concentración media 2.5 mcg/L (258,259). Se ha detectado ENE en la placenta y en el cordón umbilical de gestaciones no complicadas, sugiriendo algún tipo de producción a este nivel y se han visto aumentados en líquido amniótico en casos de daño placentario como infartos o villitis (260).

Se han evaluado las concentraciones en líquido amniótico en 39 pacientes con APP entre las 24 y las 32 semanas con parto pretérmino posterior (media 28 semanas de gestación). Sus concentraciones fueron superiores en aquellos neonatos que desarrollaron en la primera semana leucomalacia periventricular o hemorragia intraventricular grado III-IV (media 9.5 mcg/L) que en aquellos sin hallazgos patológicos en la ecografía cerebral (media 2.0 mcg/L), siendo un buen predictor de ello concentraciones superiores a 6 mcg/L (261). También se han observado concentraciones elevadas de ENE en líquido amniótico en casos de defectos de tubo neural (262).

A nivel neonatal, concentraciones elevadas en líquido cefalorraquídeo se han relacionado en encefalopatía hipóxico-isquémica e infarto cerebral con peor neurodesarrollo a los dos años de vida (263,264).

Su aumento en sangre en adultos se considera un marcador de daño neurológico en accidentes cerebrovasculares, hemorragia intracerebral o traumatismo craneoencefálico.

- **Proteína ácida fijadora de calcio SB100 (proteína SB100):** Se trata de una proteína dimérica con una vida media corta (25 minutos) producida a nivel de astrocitos, oligodendrocitos y células de Schwann (células gliales del sistema nervioso central y periférico) y eliminada por la orina (265).

Dado que es una proteína que se elimina por orina, también se ha propuesto como un posible marcador de resultado neurológico adverso o de inflamación/infección en líquido amniótico (266). Se ha detectado presencia de esta proteína en las membranas amnióticas, placenta y cordón umbilical independiente de las concentraciones en líquido amniótico, lo que sugiere una contribución de éstas en su producción, aunque no está determinado en qué proporción contribuyen (260). Las concentraciones en líquido amniótico de proteína SB100 en una gestación normal no parecen variar a lo largo de la gestación ni durante el proceso de parto, estando alrededor de 25pg/mL. Sus concentraciones en líquido amniótico aumentan en pacientes con infección e inflamación intra-amniótica en comparación con pacientes sin infección en contexto de APP o RPM pretérmino. Las concentraciones más elevadas se han observado en APP con infección intra-amniótica (1133 pg/mL de media), siendo más bajos en APP sin infección y parto pretérmino (99 pg/mL de media), y todavía más bajos si el parto fue a término (51 pg/mL). La media si hay inflamación intra-amniótica (independientemente de si

hay o no infección) fue de 190 pg/mL respecto a la ausencia de inflamación (media de 58 pg/mL, similar a casos de APP con parto a término). En casos de RPM pretérmino, las concentraciones fueron más bajas que en APP, pero más altas que en gestaciones no complicadas, siendo 49 pg/mL de media sin infección y 98 pg/mL de media con infección. En casos de inflamación intra-amniótica (independientemente de si hay o no infección) la media fue de 151 pg/mL, más alta que en RPM pretérmino sin inflamación intra-amniótica (46 pg/mL) (267). Los neonatos de este estudio con morbilidad a corto plazo también presentaron concentraciones más elevadas de SB100 en líquido amniótico, pero en probable relación a la presencia de infección/inflamación intra-amnióticas.

También concentraciones elevadas en líquido amniótico de amniocentesis realizadas por causas genéticas se han correlacionado con *exitus* fetal antes de las 28 semanas (268), preeclampsia y retraso de crecimiento intrauterino (266).

A nivel neonatal, su aumento en sangre, sangre de cordón u orina se ha relacionado con encefalopatía hipóxico-isquémica (269, 270). En orina también se considera un buen predictor de resultado neurológico adverso tras hipoxia perinatal (271) y de hemorragia intraventricular y muerte neonatal en recién nacidos prematuros (272) y sus concentraciones elevadas se han correlacionado con resultados neurológicos adversos a corto plazo en retraso de crecimiento intrauterino (273). Concentraciones elevadas a nivel de líquido cefalorraquídeo y en sangre se han correlacionado con infección o inflamación cerebral como meningitis, aunque su aumento en sangre también se relaciona con procesos inflamatorios/infecciosos extra-cerebrales como neumonía bacteriana o shock séptico (274).

- **Proteína ácida fibrilar glial (GFAP):** Se trata de una proteína fibrilar producida en el citoplasma de los astrocitos (microglía) y se ha confirmado que no se expresa a nivel de placenta ni membranas fetales (260). Se libera a consecuencia de daño cerebral y astrogliosis. Sus concentraciones en líquido amniótico en gestaciones no complicadas no parecen variar a lo largo de la gestación, siendo éstas de alrededor de 0.06 ng/mL. Concentraciones superiores a 0.2 ng/mL en líquido amniótico se han correlacionado con defectos abiertos del tubo neural y *exitus* fetal (probablemente en relación a citolisis del sistema nervioso) (275). Sus concentraciones en líquido amniótico en contexto de APP, RPM pretérmino o

infección/inflamación intra-amnióticas no se ha estudiado previamente. Sin embargo, concentraciones elevadas de GFAP en torrente sanguíneo neonatal (por encima de 0.06 ng/mL) se ha correlacionado con daño cerebral (leucomalacia periventricular, encefalopatía hipóxico-isquémica y hemorragia intraventricular) en neonatos nacidos prematuros (276) y a término (277).

7.4 Vacío de conocimiento: justificación de la tesis

Aunque existe evidencia suficiente que sugiere que existen cambios cardiovasculares fetales en casos de APP, RPM pretérmino e infección o inflamación intra-amnióticas que contribuyen a los cambios cardiovasculares postnatales descritos, no existe ningún estudio detallado ecocardiográfico fetal que describa el remodelado y la función cardíaca completa en fetos con riesgo de parto pretérmino espontáneo. Pocos estudios han evaluado biomarcadores de daño cardíaco en estos casos, sin resultados significativos.

La evidencia descrita previamente confirma que factores prenatales como la inflamación intra-amniótica o el insulto de una APP pueden ser determinantes del neurodesarrollo postnatal. También hay evidencia que demuestra que existen cambios fetales cerebrales en pacientes con riesgo de parto pretérmino. A pesar de ello, no existe ningún estudio que realice una valoración detallada de las distintas estructuras cerebrales fetales, ni que evalúe cuál es la posible contribución de la infección/inflamación intra-amnióticas en estos cambios. También está descrito el aumento de biomarcadores de daño cerebral en el líquido amniótico de estas pacientes con APP, RPM pretérmino, infección o inflamación intra-amnióticas, aunque sin estudio anatómico cerebral asociado.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

1. Los fetos de pacientes con amenaza de parto pretérmino o rotura prematura de membranas pretérmino presentan signos de remodelado y disfunción cardíaca que pueden detectarse prenatalmente mediante ecocardiografía fetal.
2. Los fetos de pacientes con amenaza de parto pretérmino o rotura prematura de membranas pretérmino presentan signos de remodelado y disfunción cardíaca que pueden detectarse prenatalmente mediante el análisis de biomarcadores en líquido amniótico.
3. Los cambios cardiovasculares ecocardiográficos y de biomarcadores en líquido amniótico son más pronunciados en fetos expuestos a infección y/o inflamación intra-amniótica.
4. Los fetos de pacientes con amenaza de parto pretérmino o rotura prematura de membranas pretérmino presentan signos de afectación cerebral que pueden detectarse prenatalmente mediante neurosonografía fetal.
5. Los fetos de pacientes con amenaza de parto pretérmino o rotura prematura de membranas pretérmino presentan signos de afectación cerebral que pueden detectarse prenatalmente mediante el análisis de biomarcadores en líquido amniótico.
6. Los cambios cerebrales neurosonográficos y de biomarcadores en líquido amniótico son más pronunciados ante la presencia de infección y/o inflamación intra-amniótica.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

- 1) Evaluar si existen signos de remodelado y disfunción cardíaca en el estudio ecocardiográfico de fetos de pacientes con amenaza de parto pretérmino o rotura prematura de membranas pretérmino respecto un grupo control.
- 2) Evaluar si los biomarcadores de disfunción cardíaca en el líquido amniótico están sobreexpresados en fetos de pacientes con amenaza de parto pretérmino o rotura prematura de membranas pretérmino respecto un grupo control.
- 3) Evaluar si estos signos de remodelado y disfunción cardíaca son más pronunciados en fetos expuestos a infección y/o inflamación intra-amniótica.
- 4) Evaluar si existen signos de daño cerebral en el estudio neurosonográfico de fetos de pacientes con amenaza de parto pretérmino o rotura prematura de membranas pretérmino respecto un grupo control.
- 5) Evaluar si los biomarcadores de daño cerebral en el líquido amniótico están sobreexpresados en fetos de pacientes con amenaza de parto pretérmino o rotura prematura de membranas pretérmino respecto un grupo control.
- 6) Evaluar si estos signos de daño cerebral son más pronunciados en fetos expuestos a infección y/o inflamación intra-amniótica.

MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS

MATERIAL MÉTODOS Y RESULTADOS

El diseño del estudio, la población de estudio y la metodología utilizada se detallan en las secciones de “Material and Methods” de cada uno de los artículos que constituyen el cuerpo de esta Tesis Doctoral.

A continuación, se incluyen tal y como han sido aceptados y publicados en la literatura científica.

ARTÍCULO 1

Murillo C, Rueda C, Larroya M, Boada D, Grau L, Ponce J, Herranz A, Gómez O, Ferrero S, Andreu-Fernández V, Gratacós E, Crispi F, Palacio M, Cobo T.

Intra-amniotic infection and/or inflammation is associated with fetal cardiac concentric hypertrophy and diastolic dysfunction in preterm labor and preterm prelabor rupture of membranes.

American Journal of Obstetrics and Gynecology. 2024, 230(6):665.e1-665.e30.

Factor de impacto: 8,7. Primer cuartil.

Resumen del artículo

OBJETIVO: Evaluar la morfología y función cardíaca fetal en fetos de madres ingresadas por amenaza de parto pretérmino (APP) o rotura prematura de membranas (RPM) pretérmino, y la asociación de estos cambios con la presencia de infección y/o inflamación intraamniótica.

DISEÑO DEL ESTUDIO: Estudio de cohortes prospectivo incluyendo pacientes con APP o RPM pretérmino entre las 23+0 y 34+0 semanas de gestación con y sin infección y/o inflamación intraamniótica, y un grupo control sin APP ni RPM pretérmino. La morfología y función cardíaca fetal se evaluó mediante ecocardiografía realizada en las primeras 48-72 horas del ingreso de la APP o la RPM, y a una edad gestacional similar en los controles. También se determinaron las concentraciones de troponina-I y propéptido natriurético cerebral N-terminal (NT-proBNP) en el líquido amniótico de las pacientes con APP o RPM, comparándose con 20 muestras de líquido amniótico del Biobanco de pacientes sin APP, RPM ni cardiopatías.

RESULTADOS: Se incluyeron 95 pacientes con APP o RPM pretérmino. De éstas, 41 (28.7%) presentaban infección y/o inflamación intraamniótica y 54 (37.8%) no. 48 (33.6%) fetos se incluyeron en el grupo control. Los fetos de madres con APP o RPM pretérmino mostraron signos de hipertrofia miocárdica concéntrica (mediana del grosor parietal relativo izquierdo de 0.93mm en el grupo con infección y/o inflamación intraamniótica; 0.79mm en el grupo sin infección y/o inflamación intraamniótica; y 0.69mm en los controles; $p<0.001$) y disfunción diastólica (mediana de duración de la onda A tricuspídea de 0.23 segundos; 0.24s; y 0.21s respectivamente; $p=0.007$). Se detectaron valores más altos de troponina I en líquido amniótico (mediana 1413 pg/mL; 1190 pg/mL; y 841pg/mL respectivamente, $p<0.001$). El y NT-proBNP fue detectable en el 35.0% de pacientes con infección y/o inflamación intraamniótica, en el 17% sin infección y/o inflamación intraamniótica, y en el 0% en controles ($p=0.005$), presentando concentraciones más altas en el grupo con infección y/o inflamación intraamniótica.

CONCLUSIÓN: Los fetos de madres con APP o RPM pretérmino mostraron signos de remodelado cardíaco y disfunción subclínica, los cuales fueron más pronunciados en aquellos con infección y/o inflamación intraamniótica. Esto sugiere que los cambios cardiovasculares observados en niños y adultos nacidos prematuros tienen, al menos en parte, un origen prenatal.

OBSTETRICS

Intra-amniotic infection and/or inflammation is associated with fetal cardiac concentric hypertrophy and diastolic dysfunction in preterm labor and preterm prelabor rupture of membranes

Clara Murillo, MD; Claudia Rueda, MD; Marta Larroya, MD; David Boada, MD; Laia Grau, MD; Júlia Ponce, MD; Ana Herranz, MD; Olga Gómez, MD, PhD; Silvia Ferrero, MD, PhD; Vicente Andreu-Fernández, PhD; Eduard Gratacós, MD, PhD; Fátima Crispí, MD, PhD; Montse Palacio, MD, PhD; Teresa Cobo, MD, PhD

BACKGROUND: Preterm delivery is associated with cardiovascular remodeling and dysfunction in children and adults. However, it is unknown whether these effects are caused by the neonatal consequences of preterm birth or if these are already present in utero.

OBJECTIVE: We evaluated fetal cardiac morphology and function in fetuses of mothers admitted for preterm labor or preterm prelabor rupture of membranes and the association of these changes with the presence of intra-amniotic infection and/or inflammation.

STUDY DESIGN: In this prospective cohort study, fetal echocardiography and amniocentesis were performed at admission in singleton pregnant women with preterm labor and/or preterm prelabor rupture of membranes between 24.0 and 34.0 weeks' gestation with (intra-amniotic infection and/or inflammation group, $n=41$) and without intra-amniotic infection and/or inflammation (non-intra-amniotic infection and/or inflammation, $n=54$). Controls ($n=48$) were outpatient pregnant women without preterm labor or preterm prelabor rupture of membranes. Intra-amniotic infection was defined by a positive amniotic fluid culture or positive 16S ribosomal RNA gene. Intra-amniotic inflammation was defined by using the amniotic fluid interleukin-6 cutoff levels previously reported by our group being >1.43 ng/mL in preterm prelabor rupture of membranes and >13.4 ng/mL in preterm labor. Fetal cardiac morphology and function was evaluated using echocardiography, and troponin-I and N-terminal pro-brain natriuretic peptide concentrations were measured in amniotic fluid from women with preterm labor or preterm prelabor rupture of membranes and compared with 20 amniotic fluid Biobank samples obtained for reasons other than preterm labor or preterm prelabor rupture of membranes or cardiac pathology. The data were adjusted for the estimated fetal weight below the 10th percentile and for preterm prelabor rupture of membranes at admission and also for gestational age at amniocentesis when amniotic fluid biomarkers were compared.

RESULTS: From 2018 to 2021, 143 fetuses were included; 95 fetuses were from mothers admitted with a diagnosis of preterm labor or preterm

prelabor rupture of membranes, and among those, 41 (28.7%) were in the intra-amniotic infection and/or inflammation group and 54 (37.8%) were in the non-intra-amniotic infection and/or inflammation group. A total of 48 (33.6%) fetuses were included in the control group. Fetuses with preterm labor and/or preterm prelabor rupture of membranes had signs of subclinical cardiac concentric hypertrophy (median left wall thickness of 0.93 [interquartile range, 0.72–1.16] in the intra-amniotic infection and/or inflammation group; 0.79 [0.66–0.92] in the non-intra-amniotic infection and/or inflammation group; and 0.69 [0.56–0.83] in controls; $P<.001$) and diastolic dysfunction (tricuspid A duration 0.23 seconds [0.21–0.25], 0.24 [0.22–0.25], and 0.21 [0.2–0.23]; $P=.007$). Systolic function was similar among groups. Higher values of amniotic fluid troponin I (1413 pg/mL [927–2334], 1190 [829–1636], and 841 [671–959]; $P<.001$) and N-terminal pro-brain natriuretic peptide were detected (35.0%, 17%, and 0%; $P=.005$) in fetuses with preterm labor or preterm prelabor rupture of membranes when compared with the control group. The highest N-terminal pro-brain natriuretic peptide concentrations were found in the intra-amniotic infection and/or inflammation group.

CONCLUSION: Fetuses with preterm labor or preterm prelabor rupture of membranes showed signs of cardiac remodeling and subclinical dysfunction, which were more pronounced in those exposed to intra-amniotic infection and/or inflammation. These findings support that the cardiovascular effects observed in children and adults born preterm have, at least in part, a prenatal origin.

Key words: amniocentesis, amniotic fluid NT-proBNP, amniotic fluid troponin I, cardiac dysfunction, cardiac dysfunction biomarkers, cardiac hypertrophy, diastolic dysfunction, fetal cardiac function, fetal cardiac remodeling, fetal echocardiography, functional echocardiography, intra-amniotic infection, intra-amniotic inflammation, preterm birth, preterm labor, preterm prelabor rupture of membranes, spontaneous preterm delivery

Cite this article as: Murillo C, Rueda C, Larroya M, et al. Intra-amniotic infection and/or inflammation is associated with fetal cardiac concentric hypertrophy and diastolic dysfunction in preterm labor and preterm prelabor rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2023;XX(X):xx–xx.

0002-9378/\$36.00

© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

<https://doi.org/10.1016/j.ajog.2023.10.017>



Click Video under article title in Contents at ajog.org

Introduction

Preterm delivery before 34 weeks' gestation affects 9% to 12% of pregnancies worldwide and is associated with perinatal death and long-term sequelae.¹ Several studies have demonstrated that children and adults born prematurely have differences in cardiovascular morphology and function. This population has an increased incidence of heart failure² and hypertension³ and have

been reported to present a concentric hypertrophy pattern with poorer ventricular diastolic relaxation^{4,5} and a reduced ventricular ejection fraction.^{6,7} About 40% to 45% of preterm deliveries occur in association with spontaneous preterm labor (PTL) and 25% to 30% occur in association with preterm prelabor rupture of membranes (PPROM).⁸ A proportion of these patients have intra-amniotic infection and/or

AJOG at a Glance

Why was this study conducted?

Preterm delivery is associated with cardiovascular remodeling and dysfunction in childhood and adulthood. In animal models, intra-amniotic inflammation has been related to cardiac dysfunction. Moreover, few retrospective studies performed in human fetuses exposed to intra-amniotic infection have observed cardiac remodeling. However, to our knowledge, there are no prospective data on the evaluation of fetal cardiac structure and function using echocardiography and amniotic fluid biomarkers in fetuses from mothers with preterm labor (PTL) or preterm prelabor rupture of membranes (PPROM) with or without intra-amniotic infection and/or inflammation in comparison with control fetuses. Whether the reported postnatal cardiac changes are already present at the time of PTL or PPRM diagnosis is unknown and merits evaluation.

Key findings

Fetuses from mothers with PTL or PPRM showed signs of cardiac concentric hypertrophy and diastolic dysfunction. These changes were more pronounced in fetuses exposed to intra-amniotic infection and/or inflammation.

What does this add to what is known?

This study provides a complete cardiac study with evidence that fetuses exposed to PTL or PPRM present with subclinical cardiac remodeling and dysfunction, suggesting that the effects observed in childhood and adulthood have, at least in part, a prenatal origin. Identification of fetal cardiac programming represents a unique opportunity to identify a high-risk population that might benefit from early preventive measures to improve their future cardiovascular health.

or inflammation (IAI), which is associated with poorer outcomes.^{9–11} The contribution of the prenatal environment to cardiovascular programming in preterm birth has only been investigated in part.

In animal models, fetuses exposed to IAI show alterations in the gene networks responsible for programming cardiac development,¹² cardiac overload,¹³ impaired cardiac relaxation,^{14,15} cardiac dysfunction, elevated brain natriuretic peptide (BNP) messenger RNA levels,^{16,17} pulmonary and systemic arterial hypertension,¹⁸ and altered cardiac growth and maturation.¹⁹ In human clinical studies, Letti Müller et al²⁰ reported a longer myocardial performance index in fetuses with PPRM. Romero et al²¹ and Di Naro et al²² reported signs of diastolic dysfunction among fetuses exposed to PPRM or to IAI. However, Aye et al²³ did not find differences in cardiac morphology and function in a cohort of fetuses born prematurely,

which included medically-indicated deliveries.

The effect of amniotic fluid (AF) biomarkers of fetal cardiac dysfunction has been evaluated in different fetal conditions.^{24,25} In a normal pregnancy, N-terminal prohormone of BNP (NT-proBNP) concentrations decrease with gestation progression. Fetuses with heart failure, arrhythmias, or congenital heart defects present with high concentrations of AF NT-proBNP, reflecting an increase in cardiac filling pressure.²⁶ Regarding fetuses with IAI, a prospective cohort study by Irani et al²⁷ found no differences in AF NT-proBNP concentrations when compared with fetuses without IAI who were delivered prematurely.

Troponin I has been scarcely studied as a marker of myocardial injury²⁸ in AF. However, high concentrations of troponin I in the umbilical cord have been related to myocardial stress in fetuses with intrauterine growth restriction²⁹ or fetuses with abnormal Doppler findings.³⁰ To our knowledge there are

no data regarding AF troponin I concentrations in fetuses exposed to IAI.

Up to now, cardiovascular preventive strategies have been employed in moderate and extreme premature infants during postnatal life. In this study, we comprehensively evaluated fetal cardiac structure and function using echocardiography and AF biomarkers in fetuses from mothers with PTL or PPRM, with or without IAI, in comparison with control fetuses. Identification of fetal cardiac programming represents a unique opportunity to target a high-risk population that might benefit from earlier preventive strategies to improve their future cardiovascular health.

Materials and Methods**Study population and design****Study groups**

This was a prospective cohort study including consecutive singleton pregnancies complicated by PTL or PPRM between 23+0 to 34+0 weeks of gestation at BCNatal (Hospital Clínic and Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain) from 2018 to 2021. As part of the local clinical protocol, women with singleton pregnancies admitted with PTL or PPRM before 34 weeks' gestation were offered an amniocentesis to rule IAI in or out. Eligible cases were those with an amniocentesis performed at admission. A group of outpatient singleton pregnant women not diagnosed with PTL or PPRM were also recruited as a control group, matched 2:1 by gestational age at study ultrasound with the PTL or PPRM cases.

Three groups of fetuses were compared, namely those of mothers admitted for PTL or PPRM with IAI (IAI group), fetuses of mothers presenting with PTL or PPRM without IAI (non-IAI group), and the previously described control group.

We also performed a subanalysis on the IAI group. Thus, the IAI group was divided according to the presence of intra-amniotic infection and inflammation or the presence of intra-amniotic inflammation without infection (known as sterile intra-amniotic inflammation).

An amniocentesis to rule out intra-amniotic infection and/or inflammation was not performed in the control group because there was no clinical indication for this purpose. Instead, to compare AF biomarkers of cardiovascular dysfunction, 20 AF samples from our Clinic-IDIBAPS Biobank collected for indications other than PTL or PPROM or cardiac pathology were selected (Biobank AF samples). These amniocenteses were performed in the second or third trimester of pregnancy.

Exclusion criteria

The exclusion criteria were delivery before fetal echocardiography; maternal age <18 years; multiple gestations; clinical chorioamnionitis³¹ at admission; major fetal structural malformations or chromosomal anomalies; and PTL or PPROM cases without amniocentesis at admission.

Definitions

PTL was defined as regular uterine contractions with a cervical length below the 5th percentile³² as measured by transvaginal ultrasound. We only evaluated cervical changes by digital examination if there was a suspicion of imminent delivery. PPROM was diagnosed as leakage of AE, confirmed by a positive result in the alpha 1 microglobulin protein test.

Intra-amniotic infection was defined as a positive AF culture for genital *Mycoplasma* (*Mycoplasma* IST 2, bioMérieux for *Ureaplasma* spp. or *Mycoplasma hominis*) or aerobic (Chocolate agar) and anaerobic (Schaefer agar for anaerobes and thioglycolate broth) bacteria. IAI was also diagnosed based on specific polymerase chain reaction amplification of the 16S ribosomal RNA gene using the following primers: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' and 5'-GGA CTA CCA GGG TAT CTA AT-3', followed by Sanger sequencing. Sequences were identified using the Blast algorithm in the National Center for Biotechnology Information database with a minimum of 98% of sequence identity.

Intra-amniotic inflammation was defined as high levels of AF interleukin (IL)-6, with a cutoff of 1.43 ng/mL for

PPROM cases³³ and 13.4 ng/mL for PTL cases³⁴ as previously reported by our group. AF IL-6 levels were measured using the enzyme-linked immunoassay (Diasource ImmunoAssays, Louvain-la-Neuve, Belgium). The minimum detection level was 2 pg/mL. The coefficient of variation was 6.23 for a mean concentration of 123.3 pg/mL and 5.18% for a mean concentration of 317.4 pg/mL.

Gestational age in weeks was calculated according to the first-trimester crown-rump length.³⁵

Clinical management of preterm labor and preterm prelabor rupture of membranes

Two intramuscular injections of 12 mg betamethasone given 24 hours apart were administered for fetal lung maturation until 34+6 weeks' gestation. If there was no clinical contraindication, tocolysis was administered during steroid administration. We only administered broad-spectrum antibiotics to women with PPROM, AF glucose concentrations <5 mg/dL, and/or with microorganisms identified by Gram staining and/or positive AF cultures.

Fetal echocardiography

Fetal echocardiography was performed within 24 to 72 hours after admission of patients with PTL or PPROM and at a similar gestational age in the asymptomatic group. Echocardiography was done using Voluson E10 Expert and Voluson S8 ultrasound equipment. The sonographers were blinded to AF IL-6 levels or culture results.

The study protocol included the assessment of estimated fetal weight (EFW),³⁶ conventional fetoplacental Doppler, and a complete 2-dimensional, M-mode and Doppler echocardiographic examination to assess the cardiac structure, morphometry, and function following a strict standardized methodology.^{37–40}

Fetal cardiac morphometry included the cardi thoracic areas and sphericity, right and left ventricular areas and sphericities, auricular areas, septal and right and left free wall myocardial wall thickness, and right and left relative wall thicknesses by M-Mode.

Fetal cardiac systolic function was evaluated using tricuspid and mitral annular plane systolic excursion (TAPSE, MAPSE), the left shortening fraction, right fractional area change, stroke volumes and cardiac outputs, and left ejection and isovolumetric contraction time.

Fetal cardiac diastolic function was evaluated by atrioventricular peak velocities at early diastole (E) and atrial contraction (A), E/A ratios, tricuspid and mitral inflow time fraction, and left isovolumetric relaxation time.

Details of each measurement are described in [Supplemental Table S1](#).

Cardiac biomarkers in amniotic fluid

A total of 500 μ L of AF was collected and frozen at -80°C . All samples were thawed and immediately centrifuged at 16,000 g for 4 minutes before use or dilution. Total protein concentrations were evaluated using the Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, ref: 23225) to estimate the appropriate dilution factor for the Luminex assays. Samples were analyzed in duplicate and diluted as follows: 1/1 and 1/2 for NT-proBNP; 1/5 and 1/10 for troponin I.

The NT-proBNP DuoSet assay (DY3604-05) was used to detect NT-proBNP, and the Magnetic Luminex performance Human Discovery assay (LXSAHM-04) was used to detect troponin I (manufactured by R&D systems, Minneapolis, Minnesota). An LX100 (LX10010187403) device and Xponent software were used for 96-well MagPlex analyses with a minimum threshold of 50 events. Seven standards with a 1/3 dilution factor were used to perform the calibration curve from a stock solution of 12,150 pg/mL for troponin I and 10,000 pg/mL for NT-proBNP. The lower limit of NT-proBNP detection was 250 pg/mL.

All procedures were performed following the manufacturer's recommendations.

Statistical analysis

Encoded information was processed using an Access database. Qualitative variables were described in tables as

absolute frequency and relative percentage, and quantitative variables were described as median and interquartile range.

For the baseline, fetal, perinatal, and admission characteristics of the study population, univariate analyses were performed using chi-square or Fisher's exact tests for comparison of qualitative variables. For quantitative variables, the Student *t* test was used for independent samples if the data were normally distributed as assessed by the Shapiro-Wilk test and homoskedastic as assessed by the Levene test. The Wilcoxon *W* test was applied for variables that were not normally distributed.

Regarding the analysis of echocardiographic and AF biomarkers, a multivariate analysis was performed using a multiple linear regression (continuous variables) or a logistic

regression (categorical variables) and controlling for possible confounding factors, which were EFW below 10th percentile and PPRM at admission for the echocardiographic evaluation and EFW below the 10th percentile, gestational age at amniocentesis, and PPRM at admission for the AF biomarker concentrations. A linearity trend analysis was also performed among the 3 groups (IAI – non-IAI – control).

A Pearson correlation was used to analyze IL-6 concentrations and echocardiographic parameters and AF biomarkers that significantly differed between groups.

The *z*-scores previously published³⁹ and percentage of cases below the 5th percentile or above the 95th percentile have been calculated for those variables that were statistically different among groups.

The data were analyzed using Stata for Mac (version 15.1 StataCorp LP, College Station, TX). *P* values $\leq .05$ were considered statistically significant.

Ethics

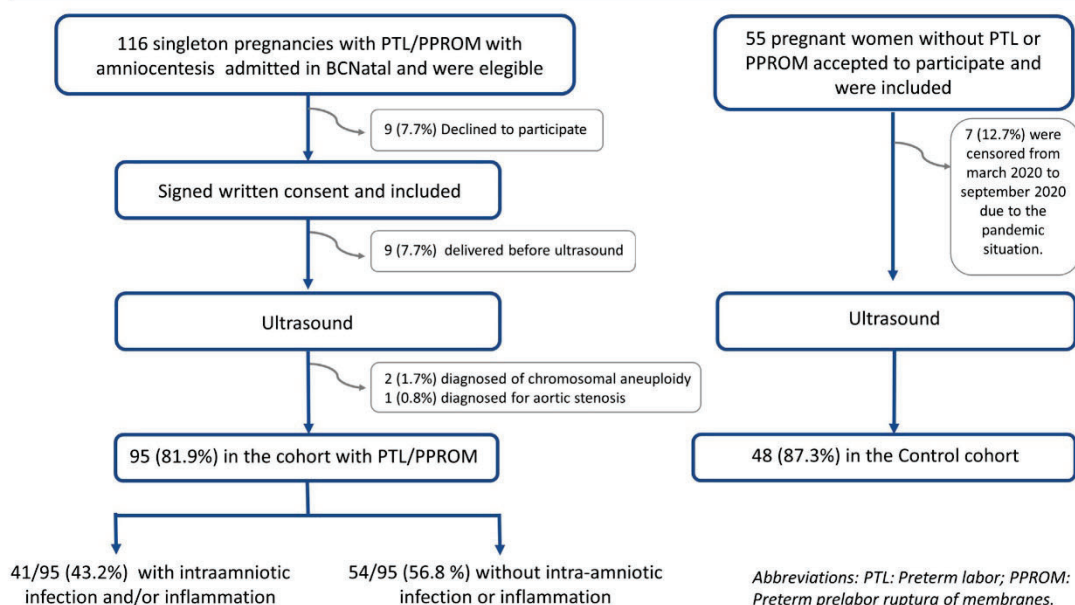
The research ethics committees of the Hospital Clinic and Sant Joan de Déu reviewed and approved the study (HCB/2018/0567 and PIC 150-19, respectively) and all participants were informed and provided signed written consent.

Results

Study population

During the study period, 154 women with singleton pregnancies were admitted for PTL or PPRM between 23+0 to 34+0 weeks' gestation. Of these, 116 were eligible for the study (with an amniocentesis at admission) and 95 were finally included (Figure 1). Approximately 80% of these women with PTL or

FIGURE 1
Flowchart recruitment process



Murillo. Fetal cardiac remodeling in preterm labor and preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2023.

PPROM had been included previously in other noninterventive studies.^{41,42}

Of the pregnancies included in this study, 34 (23.8%) were complicated by PPRM, 61 (42.7%) by PTL, and 48 (32.7%) were controls (without PTL or PPRM). IAI was present in 41 women; 28 of 41 (68.3%) had PPRM and 13 of 41 (31.7%) had PTL, being much more frequent in women with PPRM (82%; 28/34) than among those with PTL (21%; 13/61).

There were no significant differences in the maternal characteristics (Table 1). Only 1 woman presented with chronic hypertension and another with preeclampsia, both being in the non-IAI group. There were no cases of pregestational diabetes or HIV positivity.

Table 2 shows the admission characteristics of the PTL and PPRM groups. Of the AF cultures, 20% were positive and the microorganisms that were isolated are shown in Supplemental Table S2. Antenatal corticosteroids for lung maturation were administered in 100% of patients with PTL or PPRM and in 0% of the control group. Thus, adjustment for this parameter was not required. A total of 57% of our patients who were diagnosed with PTL finally delivered at term.

Table 3 shows the fetal ultrasound findings. There were no differences among the groups in gestational age, EFW, or fetal-placental Doppler at the ultrasound evaluation. However, we found a lower EFW percentile and a higher percentage of fetuses under the 10th percentile in the IAI group (Table 3).

Supplemental Table S3 describes the gestational age and the indication for amniocentesis in the Biobank AF samples selected to compare AF biomarkers. Because gestational age at amniocentesis differed significantly among the groups, AF cardiac dysfunction biomarker concentrations were adjusted for gestational age. The results of all the genetic and infection studies performed in these samples were normal. These Biobank patients did not present risk factors for cardiac remodeling, and healthy

offspring were confirmed in all these cases.

Fetal echocardiographic results

Table 3 shows the fetal echocardiographic results for the 3 groups. Fetuses in the IAI group showed signs of myocardial hypertrophy, defined by a thicker myocardium without cardiomegaly. The observed hypertrophy is concentric because relative wall thickness is increased. Thus, the heart was of normal size but the ventricular areas were reduced because the myocardium was growing inward. These fetuses also showed a preserved stroke volume and cardiac output with an increased (compensatory) left shortening fraction and a shorter ejection time. They also presented signs of impaired relaxation with prolonged tricuspid A duration and left isovolumic relaxation time. All these functional changes are in line with myocardial hypertrophy, because a heart with more muscle can pump harder and faster but takes more time to relax. Indeed, impaired relaxation together with the faster ejection leads to preserved (compensated) cardiac output.

Fetuses in the non-IAI group showed similar, albeit less pronounced, findings to the IAI group. Thus, they also presented signs of concentric myocardial hypertrophy, preserved cardiac output but increased TAPSE, right atrial area, tricuspid inflow time fraction and A duration, and lower tricuspid E/A ratio. The linearity trend analysis of the 3 groups showed that fetuses in the non-IAI group seemed to be an intermediate cardiac remodeling group.

Figures 2 and 3 show the cardiac phenotypes among groups.

Z-scores from the echocardiographic parameters that differed among groups are presented in Supplemental Table S4a. Supplemental Table S4b shows that up to 80% of the patients in the IAI group had concentric cardiac hypertrophy, defined as myocardial thickness above the 95th percentile, that was more frequent than septal hypertrophy. Given that the cardiac functional changes are subclinical (compensated), although there were significant differences among groups,

most of the systolic and diastolic parameters were in the normal range (between the 5th and 95th percentile).

Cardiac biomarkers in amniotic fluid

NT-proBNP was detectable in 35% of women in the IAI group (14/40) and in 17% (9/53) of women in the non-IAI group. Moreover, patients with detectable NT-proBNP values in the IAI group presented significantly higher concentrations than the non-IAI group (median 5750 vs 2662 pg/mL, respectively). In contrast, AF NT-proBNP values were below detection levels in all the pregnancies from the Biobank AF samples.

AF troponin I concentrations were significantly higher in the IAI and non-IAI group than in the Biobank AF samples (Table 4, Figure 4).

We also observed a linear correlation between AF IL-6 concentrations and biomarker concentrations in the AF (Supplemental Table S5).

Subanalysis according to the presence of intra-amniotic infection and inflammation vs sterile intra-amniotic inflammation

The perinatal outcomes among patients with intra-amniotic infection with inflammation and patients with sterile intra-amniotic inflammation were similar (Supplemental Tables S6 and S7). All patients with infection had inflammation. The fetal cardiac morphometry, diastolic function, and AF biomarker concentrations (Supplemental Table S8 and S9) were similar in cases with and those without infection. However, fetuses with intra-amniotic infection and inflammation showed an increased cardiac output when compared with those with sterile inflammation (Supplemental Table S8), most likely reflecting the increased need for compensation.

Comment

Principal findings

This study provides evidence that fetuses with spontaneous PTL or PPRM have echocardiographic and biomarker signs of subclinical cardiac remodeling and dysfunction, supporting a prenatal

TABLE 1
Baseline, fetal, and perinatal characteristics of the study population

Variables	Group 1: PTL or PPROM–IAI (n= 41)	Group 2: PTL or PPROM no-IAI (n=54)	Group 3: Control (n=48)	P1 (1 vs 2)	P2 (1 vs 3)	P3 (2 vs 3)
Maternal characteristics						
Maternal age (y)	33.5 (30.2–37.5)	33.1 (28.8–34.9)	33.6 (30.3–36.9)	.154	.634	.078
BMI (kg/m ²)	23.0 (20.2–27.8)	22.5 (20.3–26.8)	21.8 (20.8–27.1)	.899	.776	.673
Race, n (%)						
White	29/38 (76.3)	37/50 (74.0)	41 (85.4)	.356	.337	.109
Maghrebi	3/38 (7.9)	0	1 (2.1)			
Hispanic	4/38 (10.5)	6/50 (12.0)	6 (12.5)			
Asian	1/38 (2.6)	4/50 (8.0)	0			
Other	1/38 (2.6)	3/50 (6.0)	0			
Maternal smoking, n (%)	2/39 (5.1)	7 (13.0)	5/47 (10.6)	.295	.448	.719
Nulliparity, n (%)	19 (46.3)	34/52 (65.4)	27 (56.3)	.066	.351	.349
Assisted reproductive technology, n (%)	3/34 (8.8)	4/46 (8.7)	6/48 (12.5)	1.000	.729	.740
Pregnancy and delivery data						
GA at inclusion (wk)	28.9 (26.0–30.4)	27.7 (26.0–30.7)	29.4 (27.0–30.9)	.367	.259	.714
Time from inclusion to delivery (d)	11 (6–17)	57 (33–74)	72 (59–81)	<.001 ^a	<.001 ^a	<.001 ^a
Neonatal male sex, n (%)	26 (63.4)	32 (59.3)	22 (45.8)	.681	.097	.175
GA at delivery (wk)	31.1 (27.7–32.4)	37.4 (34.3–39.3)	39.6 (38.9–40.3)	<.001 ^a	<.001 ^a	<.001 ^a
Birth weight (g)	1557 (1080–2166)	2600 (2010–3110)	3270 (3000–3510)	<.001 ^a	<.001 ^a	<.001 ^a
Birth weight percentile	20.5 (5.5–47)	32 (9–59)	48 (19–76)	.301	.002 ^a	.047 ^a
Clinical chorioamnionitis at delivery	7 (17.1)	3 (5.6)	0	.115	.004 ^a	.085
Cesarean delivery, n (%)	18 (43.9)	10 (18.5)	11 (22.9)	.019 ^a	.035 ^a	.805
Induction of labor, n (%)	7 (17.1)	9 (16.7)	27 (56.3)	.837	<.001 ^a	<.001 ^a
Noncephalic presentation, n (%)	14 (34.1)	3 (5.6)	3 (6.3)	.001 ^a	1.000	.001 ^a
APGAR <7 at 5 min, n (%)	3/37 (8.1)	0/43	0/45	.095	.088	NA
pH umbilical artery	7.27 (7.18–7.34)	7.24 (7.19–7.30)	7.21 (7.15–7.27)	.378	.119	.551
Placental histology						
Acute chorioamnionitis without funisitis, n (%)	12 (29.3)	4/26 (15.4)	1/20 (5)	.023 ^a	<.001 ^a	.165
Acute chorioamnionitis + funisitis, n (%)	19 (46.3)	7/26 (26.9)	2/20 (10)			
Neonatal outcome						
NICU admission, n (%)	26/38 (68.4)	11/45 (24.4)	0/46 (0)	<.001 ^a	<.001 ^a	<.001 ^a
Major neonatal morbidity ^b or mortality, n (%)	14/38 (36.8)	3/45 (6.7)	0/46 (0)	.001 ^a	<.001 ^a	.075

Data are presented as number (percentage) for qualitative variables or median (interquartile range) for quantitative variables.

BMI, body mass index; ART, artificial reproduction technique; GA, gestational age; IAI, intra-amniotic infection or inflammation; NICU, neonatal intensive care unit; PPROM, preterm prelabor rupture of membranes; PTL, preterm labor.

^a $P < .05$. Statistically significant; ^b Major complications were defined by the presence of bronchopulmonary dysplasia, necrotizing enterocolitis, intraventricular hemorrhage, periventricular leukomalacia, retinopathy, or early-onset sepsis.

Murillo. Fetal cardiac remodeling in preterm labor and preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2023.

TABLE 2
Admission characteristics

Variables	PTL or PPROM–IAI (n= 41)	PTL or PPROM no-IAI (n=54)	P value
Maternal and pregnancy data			
PPROM at admission, n (%)	28 (68.3)	6 (11.1)	<.001 ^a
Latency from admission to ultrasound (d)	2 (1–3)	2 (1–2)	.104
C-reactive protein (mg/L)	1.06 (0.56–2.2)	0.51 (0.28–1.06)	.021 ^a
White blood cell count ($\times 10^9/L$)	11,300 (8670–14,490)	11,235 (9470–13,900)	.388
Neutrophils (%)	81 (74–89)	78 (73–84)	.756
Cervical length (mm)	20.5 (12.0–31.5)	13 (10–18)	<.001 ^a
AF results			
AF glucose (mg/dL)	22 (11–35)	41 (31–52)	<.001 ^a
AF positive Gram stain, n (%)	3 (7.3)	0	
AF interleukin-6 (pg/mL)	32,090 (7111.3–73,038.3)	1171.5 (728.5–1918.8)	<.001 ^a
Positive AF culture, n (%)	19 (46.3)	0	<.001 ^a

The data are presented as number (percentage) for qualitative variables or median (interquartile range) for quantitative variables.

AF, amniotic fluid; IAI, intra-amniotic infection or inflammation; PPROM, preterm premature rupture of membranes; PTL, preterm labor.

^a $P < .05$. Statistically significant.

Murillo. Fetal cardiac remodeling in preterm labor and preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2023.

origin of cardiovascular programming described in children and adults born prematurely. In general, most of the changes observed were more pronounced in PTL and PPROM fetuses with IAI, supporting an etiopathogenic role of inflammation or infection in the genesis of cardiovascular programming in prematurity.

Results in the context of what is known

Previous postnatal studies reported that children and adults born prematurely have an increased cardiac mass with reduced ventricular internal diameters and systolic and diastolic dysfunction.^{4–7} These findings are in line with this study in which fetuses exposed to PTL or PPROM presented with myocardial concentric hypertrophy (thicker myocardium at the expense of smaller ventricular cavities as the myocardium grows inward) and sub-clinical dysfunction (mainly impaired cardiac filling) with preserved cardiac output. Romero et al²¹ and Di Naro et al²² described fetal diastolic impairment in fetuses exposed to PPROM with

intra-amniotic infection with increased ventricular relaxation, similar to adult septic cardiac changes.⁴³ Although we found similar changes, impaired diastolic function was less pronounced, which may be explained by the inclusion of cases with clinical chorioamnionitis, a late, severe stage of infection, in the former studies. Differences in study population and echocardiographic techniques could also explain the differences between our study and that of Di Naro. When compared with previous studies in fetuses, our findings of a shorter ejection time and longer myocardial performance index are in line with those of Letti Müller in fetuses with PPROM and IAI.²⁰ Aye et al²³ reported no differences in the cardiac structure and function of fetuses subsequently born prematurely. However, this study included both spontaneous and iatrogenic preterm delivery. In addition, the mean gestational age at delivery was 34 weeks' gestation when IAI was uncommon.^{10,11} Concerning cardiac biomarkers in AF, Irani et al²⁷ reported no differences in the AF NT-proBNP levels for fetuses born prematurely with or

without IAI. Some differences with this study may explain the positive findings in our study, including a different definition of IAI, their smaller number of patients, their lack of a control non-preterm group, and a different NT-proBNP analysis technique. This study also reported AF troponin I concentrations in fetuses with PTL or PPROM.

From a pathophysiological perspective, IAI could plausibly be related to a myocardial insult and subsequent cardiovascular dysfunction and remodeling. This notion is supported by animal studies describing alterations in the gene networks that program cardiac development in a primate model¹² and acute generation of proinflammatory cytokines in the myocardium and fetal cardiovascular compromise after animal intra-amniotic lipopolysaccharide injection.^{12,16,17,44} We hypothesize that IAI might directly insult the myocardium and cause a compensatory cardiac hypertrophy, which allows maintenance of a normal stroke volume and cardiac output and allowing normal tissue perfusion. In experimental studies, IAI has also been associated with increased

TABLE 3
Fetal echocardiographic results

Variables	Group 1: PTL or PPROM with IAI (n= 41)	Group 2: PTL or PPROM non-IAI (n=54)	Group 3: control (n=48)	P1 (1 vs 2)	P2 (1 vs 3)	P3 (2 vs 3)	P4 (linearity trend among the 3 groups)
Fetal-placental parameters							
GA at ultrasound (wk)	27.9 (28.7–31.1)	29.6 (27–31.2)	29.4 (26.6–31.3)	.380	.481	.900	.462
EFW at ultrasound (gr)	1150 (864–1547)	1362.5 (1066.5–1741.5)	1380.5 (1088–1705)	.141	.122	.870	.085
EFW percentile	23 (9.5–60.5)	53.5 (22.5–70)	58.5 (27.5–75)	.0139 ^a	.0022 ^a	.553	.004 ^a
Small for gestational age (EFW<10 th percentile)	11 (26.8%)	7 (13.0%)	4 (8.3%)	.088	.020 ^a	.452	.018 ^a
Umbilical artery PI	0.92 (0.72–1.09)	0.99 (0.84–1.11)	1.03 (0.82–1.17)	.208	.168	.603	.083
Middle cerebral artery PI	1.82 (1.56–2.12)	1.76 (1.59–2.05)	2 (1.71–2.25)	.171	.888	.137	.303
Ductus venosus PI	0.41 (0.31–0.54)	0.46 (0.34–0.57)	1.93 (1.65–2.43)	.206	.112	.803	.243
Uterine arteries mean PI	0.76 (0.63–0.96)	0.78 (0.64–0.95)	0.72 (0.64–0.89)	.108	.619	.084	.309
Cardiac morphometry							
Cardiothoracic ratio ^b (%)	29.2 (25.4–33.2)	27.2 (24.5–30.8)	28.7 (26.1–31.5)	.625	.448	.563	.297
Cardiac sphericity index ^c	1.14 (1.07–1.20) ^d	1.16 (1.08–1.21)	1.2 (1.1–1.3)	.814	.010 ^a	.538	.001 ^a
Right atrial area to heart ratio ^d	0.16 (0.14–0.20)	0.19 (0.16–0.20)	0.16 (0.13–0.18)	.754	.060	.003 ^a	.124
Right ventricular area to heart ratio ^d	0.20 (0.16–0.24)	0.23 (0.21–0.28)	0.25 (0.21–0.28)	.266	.010 ^a	.564	.004 ^a
Right ventricular sphericity index ^c	1.62 (1.36–1.82)	1.57 (1.45–1.81)	1.74 (1.56–2.0)	.640	.005	.012	.011 ^a
Right ventricle free wall thickness (mm)	3.4 (3.1–4.2)	3.0 (2.5–3.7)	3.0 (2.5–3.3)	.178	<.001 ^a	.066	<.001 ^a
Right relative wall thickness ^e	1.0 (0.88–1.17)	0.72 (0.64–0.85)	0.65 (0.56–0.81)	<.001 ^a	<.001 ^a	.023 ^a	<.001 ^a
Left atrial area to heart ratio ^d	0.15 (0.14–0.19)	0.16 (0.14–0.19)	0.14 (0.13–0.18)	.927	.242	.111	.384
Left ventricular area to heart ratio ^d	0.22 (0.19–0.26)	0.26 (0.24–0.31)	0.27 (0.22–0.30)	.029 ^a	.005 ^a	.568	.004 ^a
Left ventricular sphericity index ^c	1.69 (1.52–1.91)	1.68 (1.55–1.87)	1.79 (1.60–1.91)	.438	.879	.424	.149
Left ventricle free wall thickness (mm)	3.3 (2.8–4.2)	3.4 (2.6–4.0)	2.8 (2.4–3.3)	.850	.002 ^a	.012 ^a	.003 ^a
Left relative wall thickness ^e	0.93 (0.72–1.16)	0.79 (0.66–0.92)	0.69 (0.56–0.83)	.271	<.001 ^a	.042 ^a	<.001 ^a
Septal wall thickness (mm)	4.1 (3.6–4.9)	3.7 (3.1–4.2)	3.5 (3.1–4.0)	.109	<.001 ^a	.075	<.001 ^a
Systolic function							
TAPSE	6.1 (5.3–7)	6.4 (5.7–7.0)	6.1 (5.4–6.7)	.066	.197	.020 ^a	.523
MAPSE	4.4 (3.6–5)	4.2 (3.8–4.7)	4.3 (3.8–5.2)	.927	.910	.397	.919
Septal thickening ^f	0.24 (0.18–0.30)	0.21 (0.13–0.27)	0.20 (0.12–0.27)	.068	.097	.738	.109
Right fractional area change (FAC) (%) ^g	31.8 (23–41.5)	34.1 (30.2–41.9)	36.0 (27.6–47.9)	.773	.180	.979	.183
Left ventricular shortening fraction (%) ^h	50.0 (42.1–58.6)	43.5 (35.6–54.2)	40.4 (33.7–51.3)	.269	.007 ^a	.276	.007 ^a

Murillo. Fetal cardiac remodeling in preterm labor and preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol 2023.

(continued)

TABLE 3
Fetal echocardiographic results (continued)

Variables	Group 1: PTL or PPRM with IAI (n= 41)	Group 2: PTL or PPRM non-IAI (n=54)	Group 3: control (n=48)	P1 (1 vs 2)	P2 (1 vs 3)	P3 (2 vs 3)	P4 (linearity trend among the 3 groups)
Left isovolumic contraction time (ICT) (%) ^l	12.9 (11.5–14.5)	11.7 (10.5–13.1)	11.9 (10.3–13.0)	.510	.049 ^a	.860	.041 ^a
Left ejection time (ET) (%) ^l	39.0 (37.6–41.1)	39.6 (37.6–41.6)	39.9 (38.5–42.4)	.648	.046 ^a	.242	.028 ^a
Heart rate (bpm)	145 (138–153)	143.5 (137.2–152)	144 (139–152)	.777	.940	.398	.963
Pulmonary artery diameter (mm)	5.9 (5–6.7)	6.1 (5.5–6.8)	5.6 (5.2–6.8)	.078	.871	.209	.715
Right stroke volume (mL/kg) ^j	1.9 (1.5–2.5)	1.9 (1.4–2.4)	1.8 (1.5–2.0)	.523	.110	.112	.177
Right cardiac output (mL/min/kg) ^k	276 (210–370)	281 (218–348)	255 (211–296)	.504	.096	.127	.108
Aortic diameter (mm)	4.4 (4–5.2)	4.8 (4.2–5.3)	4.9 (4.4–5.4)	.019 ^a	.048 ^a	.547	.072
Left stroke volume (mL/kg) ^j	1.1 (0.9–1.7)	1.2 (1.0–1.5)	1.3 (1.0–1.6)	.991	.176	.553	.312
Left cardiac output (mL/min/kg) ^k	168 (127–244)	183 (136–214)	186 (158–237)	.926	.181	.410	.310
Cardiac index (mL/min/kg) ^l	476.1 (307.1–567.6)	466.6 (370.2–546.5)	438.3 (383.4–507.7)	.558	.586	.530	.316
Diastolic function							
Tricuspid E/A ratio	0.71 (0.65–0.76)	0.67 (0.63–0.74)	0.71 (0.65–0.81)	.518	.113	.029 ^a	.253
Tricuspid inflow time fraction ^m	0.39 (0.36–0.42)	0.39 (0.37–0.43)	0.38 (0.34–0.41)	.260	.201	.008 ^a	.150
Tricuspid A duration fraction ^m	0.23 (0.21–0.25)	0.24 (0.22–0.25)	0.21 (0.20–0.23)	.114	.020 ^a	.001 ^a	.007 ^a
Mitral E/A ratio	0.71 (0.62–0.80)	0.71 (0.67–0.75)	0.73 (0.66–0.79)	.763	.219	.314	.440
Mitral inflow time fraction ^m	0.42 (0.39–0.46)	0.43 (0.40–0.46)	0.43 (0.40–0.45)	.858	.554	.948	.939
Mitral A time fraction ^m	0.22 (0.20–0.24)	0.23 (0.21–0.24)	0.22 (0.21–0.24)	.754	.964	.519	.713
Left isovolumic relaxation time (IRT) (%) ^l	12.9 (11.5–14.5)	11.7 (10.5–13.1)	11.9 (10.3–13.0)	.510	.049 ^a	.860	.028 ^a
Combined systolic and diastolic function							
Left MPI index ⁿ	0.55 (0.47–0.65)	0.52 (0.45–0.57)	0.49 (0.43–0.56)	.868	.016 ^a	.276	.018 ^a

Data are presented as number (percentage) for qualitative variables or median (interquartile range) for quantitative variables. P1 was adjusted for the estimated fetal weight <10th percentile and PPRM at admission. P2 and P3 were adjusted for estimated fetal weight <10th percentile.

GA, gestational age; EFW, estimated fetal weight; IAI, intra-amniotic infection or inflammation; MPI, myocardial performance index; PI, pulsatility index; PPRM, preterm prelabor rupture of membranes; PTL, preterm labor.

^a P<.05. Statistically significant. ^b Cardio-thoracic ratio: (cardiac area [cm²]/thoracic area [cm²])×100; ^c Sphericities: cardiac, auricular, or ventricular longitudinal diameter (mm)/transverse diameter (mm); ^d Areas to heart ratio: right or left auricular or ventricular areas (cm²)/cardiac area (cm²); ^e Relative wall thickness (by M-Mode): (septal wall thickness [mm] + right or left free wall thickness [mm])/right or left cavity diameter (mm); ^f Septal thickening: (end-systolic septal thickness [mm] – end-diastolic septal thickness [mm])/end-systolic septal thickness (mm); ^g FAC: ((end-diastolic right ventricular area [cm²] – end-systolic right ventricular area [cm²])/end-diastolic right ventricular area [cm²])×100; ^h Left ventricular shortening fraction (by M-mode): ((end-diastolic ventricular diameter (mm) – end-systolic ventricular diameter [mm])/end-diastolic ventricular diameter [mm])×100; ⁱ IRT, ICT, ET: (IRT, ICT, or ET [ms]/total cycle duration [ms])×100; ^j Stroke volumes: (pulmonary or aortic area [cm²] × pulmonary or aortic VTI [cm/contraction])/EFW (kg); ^k Cardiac outputs index: (pulmonary or aortic stroke volume [mL/contraction] × heart rate [bpm])/EFW (kg); ^l Cardiac index: (right cardiac output [mL/min] + left cardiac output [mL/min])/EFW (kg); ^m Diastolic times fraction: Tricuspid or mitral inflow or A duration (ms)/total cycle duration (ms); ⁿ MPI: (ICT [ms] + IRT [ms])/ET (ms).

Murillo. Fetal cardiac remodeling in preterm labor and preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol 2023.

placental resistance and a higher afterload,^{13–15} which could also contribute to the concentric hypertrophy with normal cardiac size observed in

this study. Likewise, a similar concentric hypertrophy has been described in other conditions with a persistent pressure overload.⁴⁵ The hypothesis is that IAI

overloads the fetal heart, which responds by increasing myocardial mass without cardiomegaly—concentric hypertrophy. This hypertrophy implies that the

FIGURE 2
Heart morphology according study groups

Abbreviations: PTL: Preterm labor; PPRM: Preterm prelabor rupture of membranes; IAI: Intraamniotic infection and/or inflammation. Group with PTL/PPROM with IAI: concentric cardiac hypertrophy (higher myocardium thickness but normal cardiac size). Group with PTL/PPROM without IAI: Intermediate group with some degree of concentric cardiac hypertrophy. Control group: Normal heart.

Murillo. Fetal cardiac remodeling in preterm labor and preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol 2023.

heart can pump harder and faster but takes more time to relax and thus ventricular filling is impaired. Nevertheless, the fetal cardiac changes observed can compensate for this situation because the final cardiac output—blood volume ejected each minute—is preserved. The echocardiographic findings are consistent with the results of the biomarkers because increased NT-pro-BNP and troponin values reflect fetal cardiac overload.^{26,28,29} Strikingly, the cardiac findings correlate with AF fluid IL-6 levels, suggesting that the higher the inflammation the greater the need for cardiac adaptation. Interestingly, the cardiac findings in cases with IAI were remarkably different from those previously reported in intrauterine growth restriction,⁴⁶ which is mainly characterized by larger and globular hearts and decreased longitudinal motion. Although hypertrophy may occasionally be present in severe intrauterine growth restriction, it is normally associated with cardiomegaly and ventricular dilation,

which were not observed in IAI fetuses.⁴⁵ Thus, these findings support a specific mechanism for cardiovascular programming in IAI, which would be different from that caused by undernutrition and hypoxia that occur during placental insufficiency. Likewise, the findings in this study are different from the fetal cardiac changes described in fetuses conceived by assisted reproductive techniques^{47,48} or those exposed to antiretroviral drugs.⁴⁹

Subanalysis of the intra-amniotic infection or inflammation group: effect of intra-amniotic infection with inflammation and sterile intra-amniotic inflammation on fetal cardiac remodeling

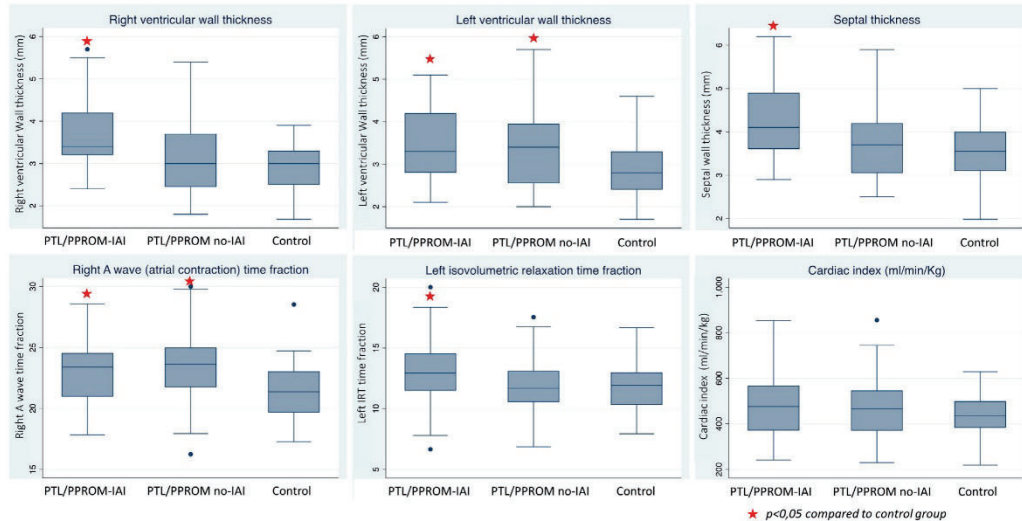
A subanalysis of intra-amniotic infection and inflammation vs sterile inflammation showed augmented cardiac outputs in the infection group, most likely reflecting a greater insult and greater need for compensation. Interestingly, these findings were because of augmented

stroke volumes, whereas the heart rate was similar in both groups.

This finding could translate to some degree of fetal systemic response against the infection.

Clinical implications

Prenatal cardiac changes seem to contribute to cardiac remodeling and cardiovascular risk in children and adults born prematurely. Thus, this study opens a window of opportunity to study early (prenatal) identification of fetuses who will present with postnatal cardiovascular risk and allow targeting of a high-risk cardiovascular population and performing preventive actions in the first months or years of life. The amniocentesis performed to rule IAI in or out helped to target a higher cardiovascular risk group of neonates, which merits further follow-up. This finding might highlight the importance of performing an amniocentesis in these women and particularly among those with pregnancies complicated with

FIGURE 3
Heart morphology and function according study groups

Abbreviations: PTL: Preterm labor; PPROM: Preterm prelabor rupture of membranes; IAI: Intraamniotic infection and/or inflammation.
Right A time fraction: tricuspid A wave duration (ms) / total cycle duration (ms); **Left isovolumetric relaxation time (IRT):** IRT (ms) / total cycle duration (ms) * 100.
Cardiac index: (Right cardiac output (ml/min) + left cardiac output (ml/min)) / Estimated fetal weight (Kg).

Murillo. Fetal cardiac remodeling in preterm labor and preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol 2023.

TABLE 4
Cardiac biomarkers in amniotic fluid

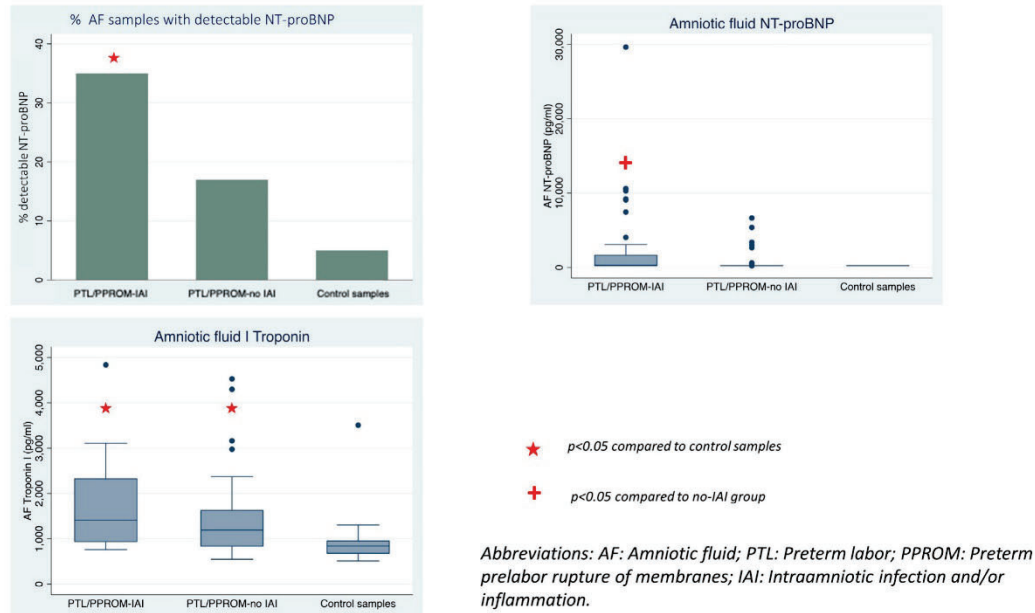
Variables	Group 1: PTL or PPROM with IAI (n=41)	Group 2: PTL or PPROM no IAI (n=54)	Biobank samples (n=20)	P1 (1 vs 2)	P2 (1 vs Biobank)	P3 (2 vs Biobank)	P4 (linearity trend among the 3 groups)
GA at amniocentesis (wk)	28.9 (26.0–30.4)	27.7 (26.0–30.7)	29.5 (28.3–32.0)	.367	.193	.034 ^a	.009 ^a
EFW at ultrasound (g)	1150.0 (864.0–1547.0)	1362.5 (1066.5–1741.5)	1495 (1191.5–2011.5)	.141	.006 ^a	.039 ^a	.005 ^a
Neonatal male sex, n (%)	26 (63.4)	32 (59.3)	12 (60.0%)	.681	.915	.967	
EFW percentile	23.0 (9.5–60.5)	53.5 (22.5–70.0)	56.5 (32.0–77.5)	.014 ^a	.015 ^a	.584	.008 ^a
Detectable NT-proBNP, n (%)	14/40 (35.0)	9/53 (17.0)	0	.079 ^b	.032 ^{a,b}	.383 ^b	.005 ^a
NT-proBNP (pg/mL) ^c	5750 (1565.5–10,300)	2662 (480.6–3391)	NA	.012 ^{a,b}	NA	NA	NA
Troponin-I (pg/mL)	1413.6 (927.3–2334.1)	1190.9 (829.3–1635.9)	841.3 (671.7–959.9)	.435 ^b	.007 ^{a,b}	.037 ^{a,b}	<.001 ^a

Data are presented as number (percentage) for qualitative variables or median (interquartile range) for quantitative variables. P1 was adjusted for estimated fetal weight <10th percentile, gestational age at amniocentesis, and PPROM at admission. P2 and P3 were adjusted for estimated fetal weight <10th percentile and gestational age at amniocentesis.

AF, amniotic fluid; BNP, brain natriuretic peptide; EFW, estimated fetal weight; IAI, intra-amniotic infection or inflammation; PPROM, preterm prelabor rupture of membranes; PTL, preterm labor.

^a P < .05. Statistically significant; ^b Adjusted for gestational age at amniocentesis and estimated fetal weight percentile; ^c Including only the sample levels of detectable NT-proBNP.

Murillo. Fetal cardiac remodeling in preterm labor and preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol 2023.

FIGURE 4
Amniotic fluid biomarker according study groups

Murillo. Fetal cardiac remodeling in preterm labor and preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2023.

PPROM because of the high proportion of IAI identified in this group.

Future research

Future studies are needed to assess postnatal changes in the same cohort and also to identify possible prenatal predictors of cardiovascular risk to target high prenatal cardiovascular risk. Prenatal cardiovascular risk evaluation could be tremendously important given the increased risk for heart failure² and hypertension³ reported in young adults born prematurely.

Strengths and limitations

The main strengths of this study are its prospective design and the recruitment of a well-characterized cohort with data on AF analyses and with complete fetal cardiovascular evaluation data published. Another strength is the evaluation of both echocardiography and cardiovascular AF biomarkers.

However, we have to acknowledge some limitations. The sample size was relatively limited. We excluded cases

with imminent delivery for whom fetal echocardiography was not performed and cases of anhydramnios without amniocentesis. It remains unknown whether these individuals might have a different profile than those studied. Molecular techniques might increase the detection of intra-amniotic infection. Thus, it is possible that some of the patients may possibly have had a positive culture for fungi or viruses that was not detected. Another limitation was the lack of a clear, universal definition of intra-amniotic inflammation. In our study, inflammation was defined by AF IL-6 concentrations, but other authors included other inflammatory biomarkers to define intra-amniotic inflammation.^{50,51} Finally, another limitation was that a postnatal follow-up was not included. Further research is warranted to prospectively evaluate cardiovascular changes postnatally in these cohorts before changing our clinical management of these patients.

Conclusion

Our findings suggest that cardiovascular changes, including concentric cardiac hypertrophy and diastolic impairment observed in premature infants and adults, might already be present, at least in part, at the time that symptoms of PTL and/or PPROM occur and are more pronounced when IAI is present.

GLOSSARY

AF: Amniotic fluid
EFW: Estimated fetal weight
IAI: Intra-amniotic infection and/or inflammation.
IL-6: Interleukin-6
NT-proBNP: N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide
PPROM: Preterm prelabor rupture of membranes
PTL: Preterm labor

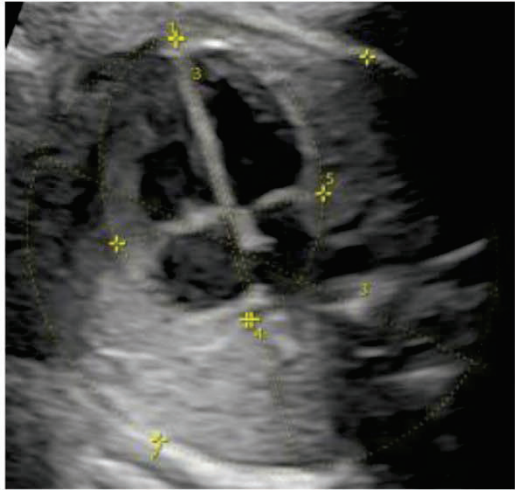
The observation of elevated of AF NT-proBNP and troponin I concentrations strengthen the echocardiographic findings. These results open an opportunity for early detection of cases that might benefit from preventive measures to improve future cardiovascular health later in life. ■

References

1. Chawanpaiboon S, Vogel JP, Moller AB, et al. Global, regional, and national estimates of levels of preterm birth in 2014: a systematic review and modelling analysis. *Lancet Glob Health* 2019;7:e37–46.
2. Carr H, Cnattingius S, Granath F, Ludvigsson JF, Edstedt Bonamy AK. Preterm birth and risk of heart failure up to early adulthood. *J Am Coll Cardiol* 2017;69:2634–42.
3. Lazdam M, de la Horra A, Pitcher A, et al. Elevated blood pressure in offspring born premature to hypertensive pregnancy: is endothelial dysfunction the underlying vascular mechanism? *Hypertension* 2010;56:159–65.
4. Lewandowski AJ, Augustine D, Lamata P, et al. Preterm heart in adult life: cardiovascular magnetic resonance reveals distinct differences in left ventricular mass, geometry, and function. *Circulation* 2013;127:197–206.
5. Mohlert LA, Hallberg J, Broberg O, et al. The preterm heart in childhood: left ventricular structure, geometry, and function assessed by echocardiography in 6-year-old survivors of periviable births. *J Am Heart Assoc* 2018;7:e007742.
6. Lewandowski AJ, Bradlow WM, Augustine D, et al. Right ventricular systolic dysfunction in young adults born preterm. *Circulation* 2013;128:713–20.
7. Lewandowski AJ, Leeson P. Preeclampsia, prematurity and cardiovascular health in adult life. *Early Hum Dev* 2014;90:725–9.
8. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet* 2008;371:75–84.
9. Fahey JO. Clinical management of intra-amniotic infection and chorioamnionitis: a review of the literature. *J Midwifery Womens Health* 2008;53:227–35.
10. Romero R, Miranda J, Chaiworapongsa T, et al. Prevalence and clinical significance of sterile intra-amniotic inflammation in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Reprod Immunol* 2014;72:458–74.
11. Romero R, Miranda J, Chaemsaitong P, et al. Sterile and microbial-associated intra-amniotic inflammation in preterm prelabor rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2015;28:1394–409.
12. Mitchell T, MacDonald JW, Srinouanprachanh S, et al. Evidence of cardiac involvement in the fetal inflammatory response syndrome: disruption of gene networks programming cardiac development in nonhuman primates. *Am J Obstet Gynecol* 2018;218:438.e1–16.
13. Rounioja S, Räsänen J, Ojaniemi M, Glumoff V, Autio-Harmainen H, Hallman M. Mechanism of acute fetal cardiovascular depression after maternal inflammatory challenge in mouse. *Am J Pathol* 2005;166:1585–92.
14. Tare M, Bensley JG, Moss TJ, et al. Exposure to intrauterine inflammation leads to impaired function and altered structure in the preterm heart of fetal sheep. *Clin Sci (Lond)* 2014;127:559–69.
15. Stock SJ, Patey O, Thilaganathan B, et al. Intrauterine *Candida albicans* infection causes systemic fetal candidiasis with progressive cardiac dysfunction in a sheep model of early pregnancy. *Reprod Sci* 2017;24:77–84.
16. Mäkelä K, Rounioja S, Vuolteenaho O, Paakkari J, Hallman M, Räsänen J. Fetal cardiac natriuretic peptide expression and cardiovascular hemodynamics in endotoxin-induced acute cardiac dysfunction in mouse. *Pediatr Res* 2006;59:180–4.
17. Seehase M, Gantert M, Ladenburger A, et al. Myocardial response in preterm fetal sheep exposed to systemic endotoxaemia. *Pediatr Res* 2011;70:242–6.
18. Polglase GR, Hooper SB, Gill AW, et al. Intrauterine inflammation causes pulmonary hypertension and cardiovascular sequelae in preterm lambs. *J Appl Physiol* (1985) 2010;108:1757–65.
19. Vrselja A, Pillow JJ, Bensley JG, et al. Intrauterine inflammation exacerbates maladaptive remodeling of the immature myocardium after preterm birth in lambs. *Pediatr Res* 2022;92:1555–65.
20. Letti Müller AL, Barrios M, Kliemann LM, Valério EG, Gasnier R, Magalhães JA. Tei index to assess fetal cardiac performance in fetuses at risk for fetal inflammatory response syndrome. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2010;36:26–31.
21. Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF, et al. Fetal cardiac dysfunction in preterm premature rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2004;16:146–57.
22. Di Naro E, Cromi A, Ghezzi F, Giocolano A, Caringella A, Loverro G. Myocardial dysfunction in fetuses exposed to intraamniotic infection: new insights from tissue Doppler and strain imaging. *Am J Obstet Gynecol* 2010;203:459.e1–7.
23. Aye CYL, Lewandowski AJ, Lamata P, et al. Disproportionate cardiac hypertrophy during early postnatal development in infants born preterm. *Pediatr Res* 2017;82:36–46.
24. Carvajal JA, Ferrer FA, Araya FI, Delpiano AM. Normal amino-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) values in amniotic fluid. *Clin Biochem* 2017;50:23–6.
25. Blohm ME, Arndt F, Fröschle GM, et al. Cardiovascular biomarkers in amniotic fluid, umbilical arterial blood, umbilical venous blood, and maternal blood at delivery, and their reference values for full-term, singleton, Cesarean deliveries. *Front Pediatr* 2019;7:271.
26. Miyoshi T, Hosoda H, Minamino N. Significance of atrial and brain natriuretic peptide measurements in fetuses with heart failure. *Front Physiol* 2021;12:654356.
27. Irani RA, Buhimschi CS, Cross SN, et al. Fetal myocardial function as assessed by N-terminal fragment brain natriuretic protein in premature fetuses exposed to intra-amniotic inflammation. *Am J Perinatol* 2020;37:745–53.
28. Katrukha IA. Human cardiac troponin complex. Structure and functions. *Biochemistry (Moscow)* 2013;78:1447–65.
29. Perez-Cruz M, Crispi F, Fernández MT, et al. Cord blood biomarkers of cardiac dysfunction and damage in term growth-restricted fetuses classified by severity criteria. *Fetal Diagn Ther* 2018;44:271–6.
30. Alexandre SM, D'Almeida V, Guinsburg R, Nakamura MU, Tufik S, Moron A. Cord blood cardiac troponin I, fetal Doppler velocimetry, and acid base status at birth. *Int J Gynaecol Obstet* 2008;100:136–40.
31. Higgins RD, Saade G, Polin RA, et al. Evaluation and management of women and newborns with a maternal diagnosis of chorioamnionitis: summary of a workshop. *Obstet Gynecol* 2016;127:426–36.
32. Crispi F, Llorca E, Pedrero C, et al. *Revista progresos en obstetricia y Ginecología*. Elsevier. Available at: <https://www.elsevier.es/es-revista-progresos-obstetricia-ginecologia-151-pdf-S0304501304760021>. Published 2004. Accessed November 3, 2023.
33. Cobo T, Palacio M, Martínez-Terrón M, et al. Clinical and inflammatory markers in amniotic fluid as predictors of adverse outcomes in preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2011;205:126.e1–8.
34. Cobo T, Palacio M, Navarro-Sastre A, et al. Predictive value of combined amniotic fluid proteomic biomarkers and interleukin-6 in preterm labor with intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2009;200:499.e1–6.
35. Hadlock FP, Shah YP, Kanon DJ, Lindsey JV. Fetal crown-rump length: reevaluation of relation to menstrual age (5–18 weeks) with high-resolution real-time US. *Radiology* 1992;182:501–5.
36. Hadlock FP, Harrist RB, Carpenter RJ, Deter RL, Park SK. Sonographic estimation of fetal weight. The value of femur length in addition to head and abdomen measurements. *Radiology* 1984;150:535–40.
37. International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, Carvalho JS, Allan LD, et al. ISUOG Practice Guidelines (updated): sonographic screening examination of the fetal heart. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013;41:348–59.
38. Crispi F, Valenzuela-Alcaraz B, Cruz-Lemini M, Gratacós E. Ultrasound assessment of fetal cardiac function. *Australas J Ultrasound Med* 2013;16:158–67.

39. García-Otero L, Gómez O, Rodríguez-López M, et al. Nomograms of fetal cardiac dimensions at 18–41 weeks of gestation. *Fetal Diagn Ther* 2020;47:387–98.
 40. Sepúlveda-Martínez A, García-Otero L, Soveral I, et al. Comparison of 2D versus M-mode echocardiography for assessing fetal myocardial wall thickness. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2019;32:2319–27.
 41. Cobo T, Burgos-Artizzu XP, Collado MC, et al. Noninvasive prediction models of intra-amniotic infection in women with preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 2023;228:78.e1–13.
 42. Cobo T, Aldecoa V, Figueras F, et al. Development and validation of a multivariable prediction model of spontaneous preterm delivery and microbial invasion of the amniotic cavity in women with preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 2020;223:421.e1–14.
 43. Parker MM, McCarthy KE, Ognibene FP, Parrillo JE. Right ventricular dysfunction and dilatation, similar to left ventricular changes, characterize the cardiac depression of septic shock in humans. *Chest* 1990;97:126–31.
 44. Rounioja S, Räsänen J, Glumoff V, Ojaniemi M, Mäkitallio K, Hallman M. Intra-amniotic lipopolysaccharide leads to fetal cardiac dysfunction. A mouse model for fetal inflammatory response. *Cardiovasc Res* 2003;60:156–64.
 45. Crispi F, Sepúlveda-Martínez Á, Crovetto F, Gómez O, Bijnens B, Gratacós E. Main patterns of fetal cardiac remodeling. *Fetal Diagn Ther* 2020;47:337–44.
 46. Pérez-Cruz M, Cruz-Lemini M, Fernández MT, et al. Fetal cardiac function in late-onset intrauterine growth restriction vs small-for-gestational age, as defined by estimated fetal weight, cerebroplacental ratio and uterine artery Doppler. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015;46:465–71.
 47. Valenzuela-Alcaraz B, Crispi F, Bijnens B, et al. Assisted reproductive technologies are associated with cardiovascular remodeling in utero that persists postnatally. *Circulation* 2013;128:1442–50.
 48. Boutet ML, Casals G, Valenzuela-Alcaraz B, et al. Cardiac remodeling in fetuses conceived by ARTs: fresh versus frozen embryo transfer. *Hum Reprod* 2021;36:2697–708.
 49. García-Otero L, López M, Gómez O, et al. Zidovudine treatment in HIV-infected pregnant women is associated with fetal cardiac remodeling. *AIDS* 2016;30:1393–401.
 50. Chaemsaitong P, Romero R, Docheva N, et al. Comparison of rapid MMP-8 and interleukin-6 point-of-care tests to identify intra-amniotic inflammation/infection and impending preterm delivery in patients with preterm labor and intact membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2018;31:228–44.
 51. Nien JK, Yoon BH, Espinoza J, et al. A rapid MMP-8 bedside test for the detection of intra-amniotic inflammation identifies patients at risk for imminent preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195:1025–30.
- Author and article information**
- From the BCNatal — Barcelona Center for Maternal-Fetal and Neonatal Medicine, Hospital Clinic and Hospital Sant Joan de Déu, Institut Clínic de Ginecologia, Obstetrícia i Neonatologia, Fetal i-D Fetal Medicine Research Center, Barcelona, Spain (Drs Murillo, Rueda, Larroya, Boada, Grau, Ponce, Herranz, Gómez, Ferrero, Gratacós, Crispi, Palacio, and Cobo); Fundació de Recerca Clínica Barcelona — Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IIS-FRCS-IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain (Drs Murillo, Rueda, Larroya, Ponce, Herranz, Gómez, Andreu-Fernández, Gratacós, Crispi, Palacio, and Cobo); Center for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBER-ER), Institute of Health Carlos III (ISCIII), 28029 Madrid, Spain (Drs Gómez, Gratacós, Crispi, Palacio, and Cobo); and Biosanitary Research Institute, Valencian International University (VIU), Valencia, Spain (Dr Andreu-Fernández).
- Received May 18, 2023; revised Sept. 29, 2023; accepted Oct. 8, 2023.
- F.C., M.P., and T.C. contributed equally as senior authors.
- F.C., M.P., and T.C. contributed equally as last authors of the paper.
- The authors report no conflict of interest.
- This study was funded by the competitive grant "Ajut a la recerca Josep Font" from the Hospital Clinic of Barcelona. C.M. was employed by the "Ajut a la recerca Josep Font" grant for 3 years to carry out this project. Amniotic fluid analysis and publication costs were funded by the Institute of Health Carlos III (Proyectos de investigación en Salud, PI19/00580). T.C. received funding from PERIS/Generalitat de Catalunya under the grant SLT008/18/00126. F.C. received support from the Instituto de Salud Carlos III (INT21/00027) and the Fundación Jesús Serra, Spain.
- The findings of this paper were presented at the following meetings: the 32nd World Congress 2022 on Ultrasound in Obstetrics and Gynecology of the International Society of Ultrasound in Obstetrics & Gynecology, London, United Kingdom, September 16–18, 2022.
- The 43rd annual pregnancy meeting of the Society for Maternal-Fetal Medicine, San Francisco, CA, February 6–11, 2023.
- Corresponding author: Teresa Cobo, MD, PhD. tcobo@clinic.cat

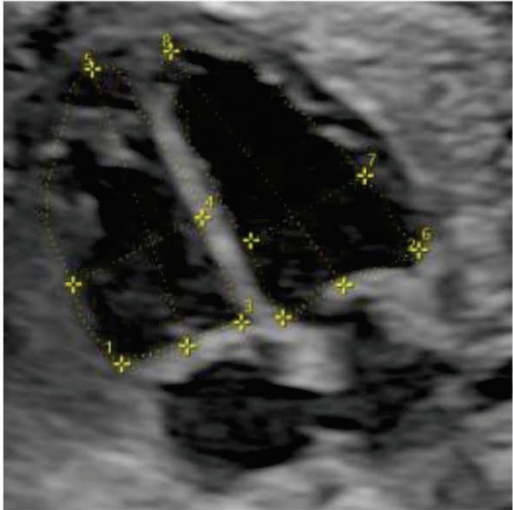
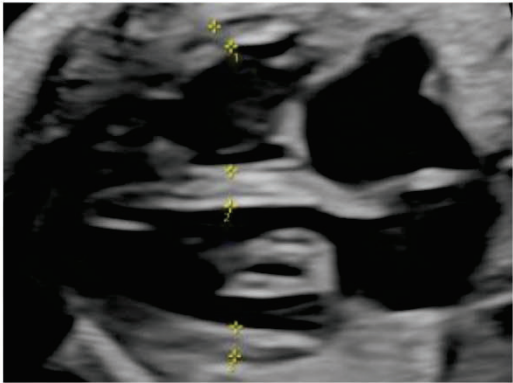
TABLE S1
Fetal echocardiographic measurements

Variables	Methodology	Example
Cardiac morphometry		
Cardiac and thoracic area	Cardiac area was measured in 2D images at maximal distension from an apical or basal 4-chamber view at end-diastole. End-diastole was defined as the frame at which the atrioventricular valves closed and, thus, when the ventricles reached their largest size. Thoracic area was measured in the same image as the cardiac area.	
Atrial areas	Atrial areas were measured in 2D images at maximum atrial distension from a 4-chamber view at end-systole (defined by the frame preceding the atrioventricular valves opening) and, thus, when the atria reached their largest size. The atrial measurements did not include the pulmonary veins/arteries or the atrioventricular valve annulus.	

Murillo. Fetal cardiac remodeling in preterm labor and preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol 2023.

(continued)

TABLE S1
Fetal echocardiographic measurements (continued)

Variables	Methodology	Example
Ventricular areas and sphericities	Ventricular dimensions and areas were measured in 2D images from an apical or basal 4-chamber view at end-diastole. The ventricular basal and longitudinal dimensions were measured at the level of the atrioventricular valves and from the atrioventricular valves (including the atrioventricular valves annulus) to the inner myocardium apex, respectively. Both ventricular areas were measured by manual tracing along the true border of the inner myocardium, including the endocardium, the muscular trabeculations, and the moderator band.	
Myocardial wall thicknesses (mm)	Myocardial wall thicknesses were measured in 2D images from a transverse 4-chamber view at end-diastole below the atrioventricular valve leaflets.	

Murillo. Fetal cardiac remodeling in preterm labor and preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol 2023.

(continued)

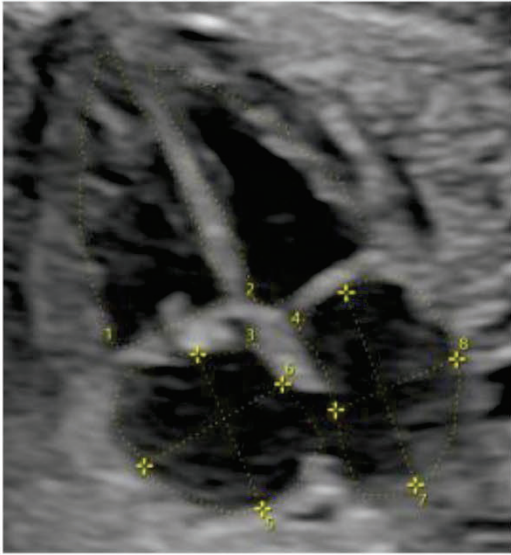
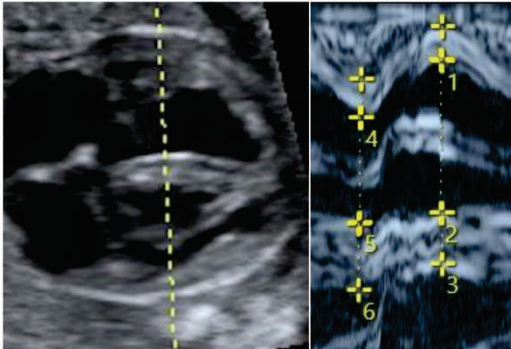
TABLE S1
Fetal echocardiographic measurements (continued)

Variables	Methodology	Example
Relative wall thicknesses (M-Mode)	Myocardial wall thicknesses were measured using M mode images from a transverse 4-chamber view at end-diastole below the atrioventricular valve leaflets.	
Systolic function		
TAPSE, MAPSE	An apical or basal four-chamber view was used, applying M-mode at the tricuspid (TAPSE) or mitral (MAPSE) valve annulus to measure the maximum excursion from end-diastole to end-systole.	
End-systolic septal thickness (used for calculating septal thickening)	Septal thickness was measured in 2D images from a transverse 4-chamber view at end-systole.	

Murillo. Fetal cardiac remodeling in preterm labor and preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol 2023.

(continued)

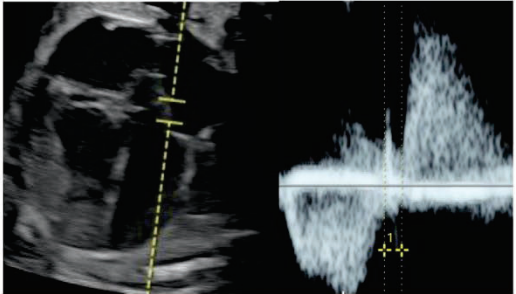
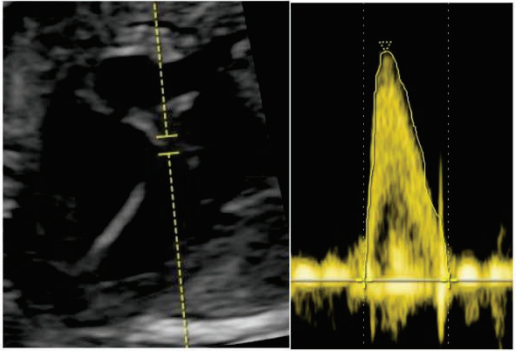
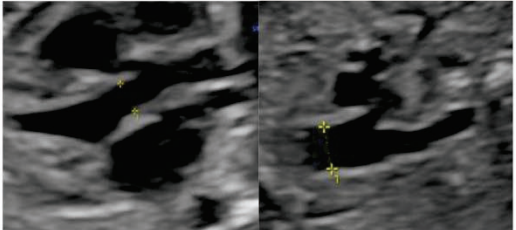
TABLE S1
Fetal echocardiographic measurements (continued)

Variables	Methodology	Example
End-systolic right ventricular area (used for calculating the right fractional change area (FAC))	End systolic right ventricular area was measured in 2D images from an apical or basal 4-chamber view at end-systole by manual tracing along the true border of the inner myocardium, including the endocardium, the muscular trabeculations, and the moderator band.	
Mid diameter of ventricular cavity (used for calculating left ventricular shortening fraction)	Left mid-ventricular cavity was measured at end-systole and end-diastole using M mode images from a transverse 4-chamber view.	

Murillo. Fetal cardiac remodeling in preterm labor and preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol 2023.

(continued)

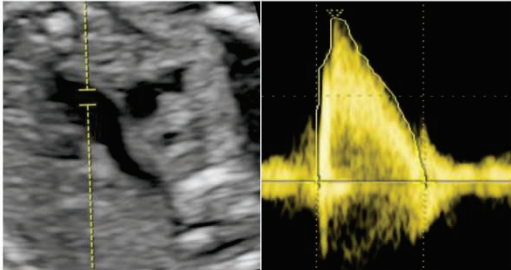
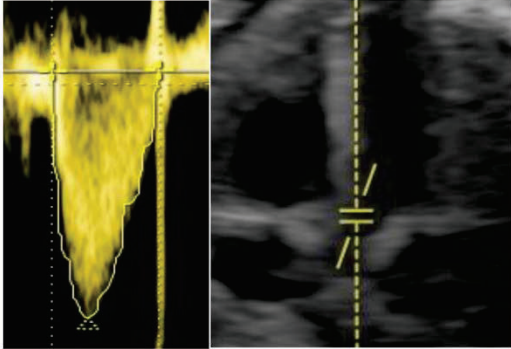
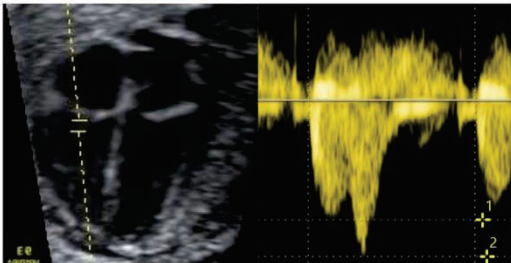
TABLE S1
Fetal echocardiographic measurements (continued)

Variables	Methodology	Example
Left isovolumic contraction time (ICT)	Placing the Doppler sample volume in a four-chamber view on the medial wall of the ascending aorta and displaying the mitral biphasic inflow and the aortic outflow in the same spectral image. ICT includes the time interval from the closure of the mitral valve to the opening of the aortic valve.	
Left ejection time (ET)	Placing the Doppler sample volume in a four-chamber view on the medial wall of the ascending aorta and displaying in the same spectral image the mitral biphasic inflow and the aortic outflow. Ejection time includes the time interval from the opening to closure of the aortic valve.	
Aortic and pulmonary diameters (mm)	Aortic and pulmonary diameters were obtained in frozen real-time images during early to mid-systole by the leading-edge-to-edge method.	

Murillo. Fetal cardiac remodeling in preterm labor and preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol 2023.

(continued)

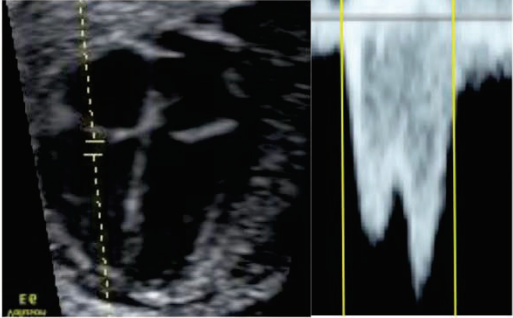
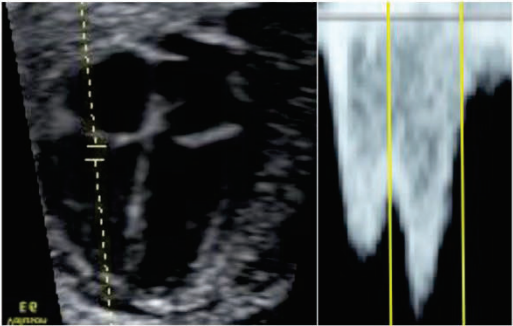
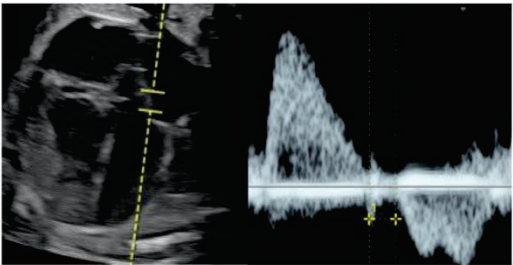
TABLE S1
Fetal echocardiographic measurements (continued)

Variables	Methodology	Example
Aortic and pulmonary velocity-time integrals (used for calculating left and right stroke volume, respectively)	Velocity-time integrals were calculated by manual trace of the spectral Doppler area and can be multiplied by the area of the outflow wave.	 
Diastolic function		
Tricuspid and mitral E/A ratios	Evaluated by the spectral Doppler sample volume below the atrioventricular valves, displaying a biphasic wave. The ratio is obtained by the division of the peak velocities of the E over the A waveform.	

Murillo. Fetal cardiac remodeling in preterm labor and preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol 2023.

(continued)

TABLE S1
Fetal echocardiographic measurements (continued)

Variables	Methodology	Example
Tricuspid and mitral inflow time.	Inflow times were evaluated by the spectral Doppler sample volume below the atrioventricular valves, displaying a biphasic wave. Inflow time includes the time interval from the opening to closure of the atrioventricular valves.	
Tricuspid and mitral A waves duration	A wave duration was evaluated by the spectral Doppler sample volume below the atrioventricular valves, displaying a biphasic wave. A duration includes the time interval of the A wave (second wave).	
Left isovolumic relaxation time (IRT)	Placing the Doppler sample volume in a four-chamber view on the medial wall of the ascending aorta and displaying the mitral biphasic inflow and the aortic outflow in the same spectral image. IRT includes the time interval from the closure of the aortic valve to the opening of the mitral valve.	

Murillo. Fetal cardiac remodeling in preterm labor and preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol 2023.

TABLE S2
Microorganisms isolated in positive amniotic fluid cultures

Gestational age at amniocentesis (weeks+days)	Microorganism isolated in amniotic fluid
23+3	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
30+9	<i>Peptoniphilus indoliticus</i>
26+1	<i>Capnocytophaga sputigena</i> and <i>fusobacterium</i> spp.
30+9	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
32+4	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
33+4	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
26+1	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
27+6	<i>Peptoniphilus harei</i>
25+4	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
29+0	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
23+9	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
30+1	<i>Ureaplasma urealyticum</i> and <i>streptococcus mitis</i>
27+0	Extended spectrum beta-lactamase producing <i>Escherichia coli</i>
30+4	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
27+4	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
25+7	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
26+9	<i>Escherichia coli</i> and <i>Bacteroides vulgatus</i>
29+9	<i>Peptoniphilus indolicus</i>
26+1	<i>Ureaplasma urealyticum</i>

Murillo. Fetal cardiac remodeling in preterm labor and preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol 2023.

TABLE S3
Amniocentesis in amniotic fluid samples from the Biobank

Gestational age at amniocentesis (weeks+days)	Indication for amniocentesis
26+3	Congenital talipes equinovarus
28+0	Hyperechogenic fetal bowel
28+3	Moderate renal pyelectasis
28+5	Mild polyhydramnios + hyperechogenic fetal bowel
28+6	Mild renal pyelectasis
29+3	Hyperechogenic fetal bowel
29+6	Hyperechogenic fetal bowel
31+4	Hypospadias
36+1	Long bones at -1 to -2 standard deviations.
36+3	Long bones at -2 to -3 standard deviations.
27+4	8-9mm right and left brain atrial diameters
27+5	9-10mm right and left brain atrial diameters
28+2	Unilateral mild ventriculomegaly (10mm)
29+2	9mm right brain atrial diameter
29+6	8mm right brain atrial diameter
31,2	Mild delay in cortical maturation
31+3	9 mm left brain atrial diameter
32+6	9 mm right brain atrial diameter
35+2	8 mm left brain atrial diameter
37+4	3 mm arachnoid cyst

All the amniocenteses were performed for extra-cardiac reasons. Pregnancies did not present risk factors for cardiac remodeling, normal results were confirmed in the amniotic fluid analysis and healthy offspring were delivered in all cases. Murillo. Fetal cardiac remodeling in preterm labor and preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol 2023.

TABLE S4A
Z-scores of fetal echocardiographic results different among groups

Variables	Group 1: PTL/PPROM IAI (n= 41)	Group 2: PTL/PPROM no-IAI (n=54)	Group 3: Control (n=48)	p1 (1 vs. 2)	p2 (1 vs. 3)	p3 (2 vs. 3)	p4 (linearity trend among the three groups)
<i>Fetal-placental parameters</i>							
<i>Cardiac morphometry</i>							
Cardiac sphericity index ¹	ZS: -0.53 (-1.2 - -0.05)	ZS: -0.33 (-1.05 - 0.03)	ZS: 0.14 (-0.43 - 0.83)	0.873	0.005	0.149	0.001
Right ventricular area	-0.06 (-0.7-0.6)	0.3 (-0.2-0.9)	-0.2 (-0.5-0.2)	0.440	0.438	0.001	0.124
Right ventricular sphericity index ¹	-0.2 (-0.8-0.3)	-0.3(-0.6-0.3)	ZS: 0.2 (-0.3-0.7)	0.533	0.004	0.009	0.528
Right ventricle free wall thickness (mm)	1.9 (1.1-2.7)	0.9 (-0.4-1.5)	0.4 (-0.5-1.3)	0.017	<0.001	0.056	< 0.001
Right relative wall thickness ²	1.8 (1.3-2.7)	1.4 (0.69-2.20)	0.9 (0.0-1.9)	0.028	< 0.001	0.013	0.001
Left ventricular area	-0.1 (-0.6-0.7)	0 (-0.4-0.4)	-0.5 (-0.9-0.1)	0.825	0.054	0.001	0.045
Left ventricle free wall thickness (mm)	1.5 (0.4-2.3)	1.1 (-0.6-2.2)	0.2 (-0.4-1.2)	0.349	< 0.001	0.008	< 0.001
Left relative wall thickness ²	1.8 (0.7-2.9)	1.7 (0.85-2.4)	1.0 (0.0-2.0)	0.839	0.007	0.034	0.012
Septal wall thickness (mm)	4 (2.4-4.8)	1.9 (1.0-3.7)	1.5 (0.8-2.4)	0.010	< 0.001	0.031	< 0.001
<i>Systolic function</i>							
TAPSE	-0.8 (-1.2- -0.3)	-0.6(-1.3- -0.1)	-0.9 (-1.3- -0.6)	0.628	0.028	0.007	0.426
Left Isovolumic contraction time (ICT)	0.9(-0.1-1.4)	0.6 (0-1.4)	0.6(-0.1-1.2)	0.504	0.333	0.698	0.193
Left ejection time	-0.8(-2- -0.2)	-0.8 (-1.8-0)	-0.5(-1.2-0.4)	0.450	0.016	0.042	0.032
<i>Diastolic function</i>							
Left isovolumic relaxation time (IRT)	1.7(0.9-2.4)	1.1(0.5-1.6)	1.1(0.4-1.9)	0.373	0.111	0.677	0.362

IAI, intra-amniotic infection or inflammation; GA, gestational age; EFW, estimated fetal weight; PI, pulsatility index; MPI: Myocardial performance index.

¹ **sphericities**: cardiac, auricular or ventricular longitudinal diameter (mm)/ transverse diameter (mm); ² **Relative wall thickness (by M-Mode)**: (septal wall thickness (mm) + right or left free wall thickness (mm))/ right or left cavity diameter (mm).Data are presented as number (percentage) for qualitative variables or median (25th centile-75th centile) for quantitative variables. **p1** was adjusted for estimated fetal weight <10th centile and PPRM at admission. **p2** and **p3** were adjusted for estimated fetal weight <10th centile.

Murillo. Fetal cardiac remodeling in preterm labor and preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol 2023.

TABLE S4B

Percentage of patients below 5th or above 95th percentiles of fetal echocardiographic results different among groups

Variables	Group 1: PTL/PPROM IAI (n= 41)	Group 2: PTL/PPROM no-IAI (n=54)	Group 3: Control (n=48)	p1 (1 vs. 2)	p2 (1 vs. 3)	p3 (2 vs. 3)
<i>Fetal-placental parameters</i>						
<i>Cardiac morphometry</i>						
Cardiac sphericity index ¹	3/40 (7.5)	4/50 (8.0)	0	1.00	0.097	0.118
Right ventricular area ¹	1/38 (2.63)	0	0	0.447	0.452	NA
Right ventricular sphericity index ¹	1/39 (2.56)	0	0	0.448	0.459	NA
Right ventricle free wall thickness (mm) ²	16/35 (45.71)	8/44 (18.18)	4/47 (8.51)	0.008	<0.001	0.222
Right relative wall thickness ²	32/36 (88.89)	14/49 (28.57)	10/46 (21.74)	<0.001	<0.001	0.444
Left ventricular area ¹	1/38 (2.63)	0	2/47 (4.35)	0.447	1.00	0.242
Left ventricle free wall thickness (mm) ²	12/35 (34.29)	12/44 (27.27)	5/48 (10.42)	0.501	0.012	0.037
Left relative wall thickness ²	22/36 (61.11)	20/51 (39.22)	12/46 (26.09)	0.044	0.001	0.170
Septal wall thickness (mm) ²	28/35 (80.0)	21/44 (47.73)	18/48 (37.5)	0.033	<0.001	0.321
<i>Systolic function</i>						
TAPSE ¹	1/39 (2.56)	1/52 (1.92)	4/38 (9.52)	1.00	0.361	0.169
Left Isovolumic contraction time (ICT) ¹	1/38 (2.63)	0	0	0.427	0.442	NA
Left ejection time ¹	11/37 (29.73)	11/50 (22.0)	5/47 (10.64)	0.461	0.027	0.132
<i>Diastolic function</i>						
Left isovolumic relaxation time (IRT) ²	14/37 (37.84)	10/50 (20.0)	10/47 (21.28)	0.066	0.095	0.877

IAI, intra-amniotic infection or inflammation; GA, gestational age; EFW, estimated fetal weight; P₁, pulsatility index; MPI: Myocardial performance index.

¹ Percentage of cases below 5th percentile; ² Percentage of cases above 95th percentile

Data are presented as number (percentage). **p1** was adjusted for estimated fetal weight <10th centile and PPROM at admission. **p2 and p3** were adjusted for estimated fetal weight <10th centile.

Murillo. Fetal cardiac remodeling in preterm labor and preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol 2023.

TABLE S5
Correlation between amniotic fluid IL-6 and echocardiographic and biomarkers findings

Echocardiographic findings	Pearson's correlation coefficient	p
Cardiac sphericity index ¹	-0.04	0.731
Right atrial area to heart ratio ²	-0.11	0.323
Right ventricular sphericity index ¹	0.03	0.778
Right ventricle free wall thickness (mm)	0.03	0.774
Right relative wall thickness ³	0.31	0.004
Left ventricular area to heart ratio ²		
Left ventricle free wall thickness (mm)	-0.01	0.929
Left relative wall thickness ³	0.12	0.289
Septal wall thickness (mm)	0.05	0.639
TAPSE	-0.289	0.006
Left ventricular shortening fraction (%) ⁴	0.04	0.729
Left Isovolumic contraction time (ICT, %) ⁵	0.05	0.649
Left ejection time (ET, %) ⁵	0.03	0.770
Tricuspid E/A ratio	0.10	0.362
Tricuspid inflow time fraction ⁶	0.05	0.626
Tricuspid A duration fraction ⁶	0.02	0.865
Left isovolumic relaxation time (IRT, %) ⁵	0.06	0.600
Left myocardial performance index ⁷	0.04	0.692
Amniotic fluid Troponin I concentrations (pg/ml)	0.29	0.002
Amniotic fluid NT-proBNP (pg/ml) in positive NT-proBNP samples	0.29	0.001

¹ Sphericities: cardiac, auricular or ventricular longitudinal diameter (mm)/ transverse diameter (mm); ² Areas to heart ratio: right or left auricular or ventricular areas (cm²) / cardiac area (cm²); ³ Relative wall thickness (by M-Mode): (septal wall thickness (mm) + right or left free wall thickness (mm)) / right or left cavity diameter (mm); ⁴ Left ventricular shortening fraction (by M-Mode): ((End-diastolic ventricular diameter (mm) - End-systolic ventricular diameter (mm)) / End-diastolic ventricular diameter (mm)) * 100; ⁵ IRT, ICT, ET: (IRT, ICT or ET (ms) / total cycle duration (ms)) * 100; ⁶ Diastolic times fraction: tricuspid or mitral inflow or A duration (ms) / total cycle duration (ms); ⁷ Myocardial performance index: (ICT (ms) + IRT (ms)) / ET (ms).

Murillo. Fetal cardiac remodeling in preterm labor and preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol 2023.

TABLE S6

Baseline, fetal and perinatal characteristics of the PTL/PPROM-IAI group sub-analysis

Variables	Intra-amniotic infection and inflammation (n= 19)	Sterile intra-amniotic inflammation (n= 22)	p
<i>Maternal and fetal characteristics</i>			
Maternal age (years)	33.8 (30.5-37.0)	33.7 (28.2-37.6)	0.389
BMI (Kg/m ²)	22.7 (20.0-28.3)	23.0 (21.1-25.8)	0.971
Race			
White, n (%)	12/17 (70.1)	17/21 (81)	0.561
Maghrebi, n (%)	2/17 (11.8)	1/21 (4.8)	
Hispanic, n(%)	1/17 (5.9)	3/21 (14.3)	
Asian, n(%)	1/17 (5.9)	0	
Other, n(%)	1/17 (5.9)	0	
Maternal smoking, n(%)	0	2/39 (5.1)	0.492
Primiparity, n(%)	6 (33.3)	13 (59.1)	0.105
ART technique, n(%)	1/15 (6.7)	2/19 (10.5)	1.000
GA at inclusion (weeks)	27.6(26.0-30.4)	28.9 (26.8-31.7)	0.524
Time from inclusion to delivery (days)	9 (5-16)	13 (6-23)	0.207
<i>Perinatal data</i>			
Neonatal male sex, n(%)	11 (61.1)	15 (68.2)	0.641
GA at delivery (weeks)	30.3 (27.4-32.1)	31.4 (28.3-33.0)	0.188
Birthweight (g)	1300 (1040-1600)	1748 (1282-2240)	0.030
Birthweight centile	11.5 (3-21)	29.5 (6-51)	0.333
Clinical chorioamnionitis at delivery	4 (21.1)	3 (13.6)	0.685
Variables	Intra-amniotic infection and inflammation (n= 19)	Sterile intra-amniotic inflammation (n= 22)	p
<i>Histological funisitis or chorioamnionitis</i>			
Acute chorioamnionitis without funisitis, n(%)	8 (42.1)	4 (18.2)	0.241
Acute chorioamnionitis + funisitis, n(%)	7 (36.8)	12 (54.6)	
Cesarean, n(%)	12 (63.2)	6 (27.3)	0.021
Induction of labor, n(%)	4 (21.1)	3 (13.6)	0.685
Non cephalic presentation, n(%)	9 (47.4)	5 (22.7)	0.097
APGAR <7 at 5 min, n(%)	1/18 (5.6)	2/19 (10.5)	1.000
pH umbilical artery	7.26 (7.08-7.35)	7.27 (7.18-7.34)	0.302
NICU admission n(%)	13/18 (72.2)	13/20 (65.0)	0.632
Major neonatal morbidity ¹ or mortality, n(%)	6/18 (33.3)	8/20 (40.0)	0.671

BMI, body mass index; ART, artificial reproduction technique; GA, gestational age; NICU, neonatal intensive care unit.

¹ Major complications defined by the presence of bronchopulmonary dysplasia, necrotizing enterocolitis, intraventricular hemorrhage, periventricular leukomalacia, retinopathy or early onset sepsis.

Data are presented as number (percentage) for qualitative variables or median (25th centile; 75th centile) for quantitative variables.

Murillo. Fetal cardiac remodeling in preterm labor and preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol 2023.

TABLE S7
Admission characteristics of the PTL/PPROM-IAI group sub-analysis

Variables	Intra-amniotic infection and inflammation (n= 19)	Sterile intra-amniotic inflammation (n= 22)	p
PPROM at admission, n(%)	13 (68.4)	15 (68.2)	0.781
C-reactive protein (mg/L)	1.71 (1.22-3.1)	0.59 (0.23-1.01)	<0.001
White blood cell count ($\times 10^9$ / L)	13915 (8720-17950)	11250 (8660 – 13280)	0.370
Neutrophils (%)	83 (80-89)	77 (73-88)	0.137
Cervical length (mm)	20 (16-30)	21 (10-31)	0.777
AF glucose (mg/dL)	20.5 (3-32)	25.5 (10-38)	<0.001
AF interleukin-6 (pg/mL)	67994.45 (37593.2 – 143387.0)	17600.4 (4282.1-33581.8)	<0.001
Positive AF culture, n(%)	19 (100)	0	<0.001
Latency from admission to ultrasound (days)	1.5 (1-3)	2 (1-3)	0.064

PPROM, preterm premature rupture of membranes; AF, amniotic fluid.

Data are presented as number (percentage) for qualitative variables or median (25th centile; 75th centile) for quantitative variables.
 Murillo. Fetal cardiac remodeling in preterm labor and preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol 2023.

TABLE S8
Fetal echocardiographic results of the PTL/PPROM-IAI group sub-analysis

Variables	Intra-amniotic infection and inflammation (n= 19)	Sterile intra-amniotic inflammation (n= 22)	p
<i>Fetal-placental parameters</i>			
GA at ultrasound	27.6 (26.3 – 30.6)	29.2 (26.3- 31.7)	0.411
EFW at ultrasound (gr)	980 (857 – 1508)	1230 (966 – 1712)	0.372
EFW centile	20 (10-43)	26 (7-64)	0.832
Small for gestational age (EFW < 10th centile), n(%)	5 (26.3)	6 (27.3)	0.972
Umbilical artery PI	0.81 (0.71-0.98)	0.93 (0.73-1.16)	0.115
Middle cerebral artery PI	1.81 (1.68-2.31)	1.82 (1.54-2.05)	0.217
Ductus venosus PI	0.41 (0.31-0.59)	0.39 (0.31-0.53)	0.586
Uterine arteries PI average	0.85 (0.63-1.10)	0.74 (0.63-0.845)	0.886
<i>Cardiac morphometry</i>			
Cardiothoracic ratio ¹ (%)	29.5 (25.9 - 33.3)	29.1 (25.6-33.0)	0.775
Cardiac sphericity index ²	1.12 (1.07-1.19)	1.15 (1.08-1.22)	0.236
Right atrial area to heart ratio ³	0.15 (0.14-0.20)	0.17 (0.14-0.21)	0.234
Right ventricular area to heart ratio ³	0.20 (0.16-0.22)	0.21 (0.18-0.27)	0.088
Right ventricular sphericity index ²	1.61 (1.38 - 1.84)	1.62 (1.34 - 1.77)	0.411
Right ventricle free wall thickness (mm)	3.4 (3.2 - 3.9)	3.3 (2.8 - 4.2)	0.881
Right relative wall thickness ⁴	1.0 (0.92-1.12)	1.05 (0.85 – 1.23)	0.786
Left atrial area to heart ratio ³	0.14 (0.13 - 0.15)	0.15 (0.14 - 0.20)	0.380
Left ventricular area to heart ratio ³	0.21 (0.16 - 0.25)	0.23 (0.19 - 0.27)	0.412
Left ventricular sphericity index ²	1.71 (1.59 - 1.79)	1.64 (1.47-1.95)	0.438
Left ventricle free wall thickness (mm)	3.3 (2.9 - 4.5)	3.2 (2.8 - 3.8)	0.610
Left relative wall thickness ⁴	0.92 (0.76 – 1.11)	0.95 (0.69 – 1.20)	0.635
Septal wall thickness (mm)	4.1 (3.8 - 5.0)	4.1 (3.5 - 4.9)	0.932
<i>Systolic function</i>			
TAPSE	5.9 (5.3-6.4)	6.7 (5.4-7.1)	0.197
MAPSE	4.4 (3.6-4.8)	4.4 (3.6-5.2)	0.636
Septal thickening ⁵	0.04 (-0.04-0.17)	0.07 (-0.03-0.14)	0.929
Right fractional change area (FAC) ⁶	37.0 (24.2-43.4)	30.7 (22.8-38.1)	0.715
Left shortening ⁷	0.51 (0.44-0.53)	0.50 (0.42-0.59)	0.448
Isovolumetric contraction time (ICT, %) ⁸	8.6 (7.0-9.6)	8.9 (7.4-10.1)	0.972
Ejection time (ET, %) ⁸	39.0(37.6-40.6)	39.0 (37.7-41.6)	0.808
Heart rate (bpm)	144 (139-153)	146 (136-153)	0.856
Pulmonary diameter (mm)	5.8 (5.4-6.8)	6 (4.8-6.5)	0.582
Right stroke volume (ml/contraction/kg) ⁹	2.4 (2.0-2.7)	1.6 (1.3-1.8)	<0.001
Right cardiac output (ml/min/kg) ¹⁰	363 (283-402)	232 (191-271)	<0.001
Aortic diameter (mm)	4.5 (4.0-5.2)	4.4 (3.7-5.1)	0.663
Left stroke volume (ml/contraction/kg) ⁹	1.4 (1.0-1.8)	1.0 (0.9-1.3)	0.016

Data are presented as number (percentage) for qualitative variables or median (25th centile; 75th centile) for quantitative variables.
Murillo. Fetal cardiac remodeling in preterm labor and preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol 2023.

TABLE S8

Fetal echocardiographic results of the PTL/PPROM-IAI group sub-analysis (continued)

Variables	Intra-amniotic infection and inflammation (n= 19)	Sterile intra-amniotic inflammation (n= 22)	p
Left cardiac output (ml/min/kg) ¹⁰	200 (148-263)	143 (113-183)	0.014
Cardiac index (ml/min/kg) ¹¹	564.7 (481.0-601.6)	372.8 (334.8-463.1)	<0.001
<i>Diastolic function</i>			
Tricuspid E/A ratio	0.72 (0.64-0.76)	0.70 (0.65-0.78)	0.587
Tricuspid inflow time fraction ¹²	0.39 (0.36 – 0.41)	0.39 (0.37 - 0.43)	0.490
Tricuspid A time fraction ¹²	0.23 (0.22 – 0.24)	0.24 (0.20 – 0.25)	0.983
Mitral E/A ratio	0.70 (0.61-0.77)	0.72 (0.63-0.82)	0.466
Mitral inflow time fraction ¹²	0.42 (0.39 – 0.46)	0.42 (0.40 – 0.47)	0.959
Mitral A time fraction ¹²	0.23 (0.22 – 0.25)	0.22 (0.21 – 0.25)	0.715
Left isovolumic relaxation time (IRT, %) ⁸	12.9 (11.2-14.7)	13.1 (11.7-14.5)	0.950
<i>Combined systolic and diastolic function</i>			
MPI index ¹³	0.54 (0.46-0.65)	0.58 (0.47-0.66)	0.869

GA, gestational age; EFW, estimated fetal weight; PI, pulsatility index; MPI, Myocardial performance index.

¹ **Cardio-thoracic ratio:** (cardiac area (cm²)/thoracic area (cm²))*100; ² **sphericities:** cardiac, auricular or ventricular longitudinal diameter (mm)/ transverse diameter (mm); ³ **Areas to heart ratio:** right or left auricular or ventricular areas (cm²) / cardiac area (cm²); ⁴ **Relative wall thickness (by M-Mode):** (septal wall thickness (mm) + right or left free wall thickness (mm))/ right or left cavity diameter (mm); ⁵ **Septal Thickening:** (End-systolic septal thickness (mm) – end-diastolic septal thickness (mm))/ End-systolic septal thickness (mm); ⁶ **FAC:** ((End-diastolic right ventricular area (cm²) – End-systolic right ventricular area (cm²)) / End-diastolic right ventricular area (cm²))*100; ⁷ **Left ventricular shortening fraction (by M-Mode):** ((End-diastolic ventricular diameter (mm) - End-systolic ventricular diameter (mm)) / End-diastolic ventricular diameter (mm))*100; ⁸ **ICT, ET, IRT:** (ICT, ET or IRT (ms) / total cycle duration (ms))*100; ⁹ **Stroke volumes:** (Pulmonary or aortic area (cm²)* pulmonary or aortic VTI (cm/contraction))/EFW (Kg); ¹⁰ **Cardiac outputs index:** (Pulmonary or aortic stroke volume (ml/contraction) * heart rate (bpm)) / EFW (Kg); ¹¹ **Cardiac index:** (Right cardiac output (ml/min) + left cardiac output (ml/min)) / EFW (Kg); ¹² **Diastolic times fraction:** tricuspid or mitral inflow or A duration (ms) / total cycle duration (ms); ¹³ **MPI index:** ((ICT (ms) + IRT (ms)) / ET (ms)).

Data are presented as number (percentage) for qualitative variables or median (25th centile; 75th centile) for quantitative variables.
Murillo. Fetal cardiac remodeling in preterm labor and preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol 2023.

TABLE S9

Amniotic fluid biomarkers

Variables	Intra-amniotic infection and inflammation (n= 19)	Sterile intra-amniotic inflammation (n= 22)	p
AF positive NT-proBNP, n (%)	7/18 (38.9)	7 (31.8)	0.641
AF NT-proBNP (pg/ml) in positive NT-proBNP samples	7450 (1565.5-10570)	3086 (648.6-10300)	0.737
AF Troponin-I (pg/ml)	1438 (1058.4-2421.3)	1173.8 (927.3-2234.6)	0.945

Data are presented as number (percentage) for qualitative variables or median (25th centile; 75th centile) for quantitative variables.
Murillo. Fetal cardiac remodeling in preterm labor and preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol 2023.

ARTÍCULO 2

Murillo C, Eixarch E, Rueda C, Larroya M, Boada D, Grau L, Ponce J, Aldecoa V, Monterde E, Ferrero S, Andreu-Fernández V, Arca G, Oleaga L, Ros O, Hernández MP, Gratacós E, Palacio M, Cobo T.

Evidence of brain injury in fetuses of mothers with preterm labor with intact membranes and preterm premature rupture of membranes.

American Journal of Obstetrics and Gynecology.2024. Publicado online. S0002-9378(24)00531-3.

Factor de impacto 8,7. Primer cuartil.

Resumen del artículo

OBJETIVO: Evaluar los cambios cerebrales en fetos de pacientes con amenaza de parto pretérmino (APP) o rotura prematura de membranas (RPM) pretérmino, e investigar la posible influencia de la inflamación intraamniótica como mediador de riesgo.

DISEÑO DEL ESTUDIO: Estudio de cohortes prospectivo incluyendo pacientes con APP o RPM pretérmino entre las 23+0 y 34+0 semanas de gestación con y sin inflamación intraamniótica, y un grupo control sin APP ni RPM pretérmino. El grupo con inflamación intraamniótica incluyó pacientes con infección intra-amniótica asociada a inflamación, y aquellas con inflamación intra-amniótica estéril. Se realizó una neurosonografía en las primeras 48-72 horas del ingreso de la APP o la RPM, y a una edad gestacional similar en los controles. También se determinaron las concentraciones de enolasa neuroespecífica, la proteína SB100 y la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) en el líquido amniótico de las pacientes con APP o RPM, comparándose con 20 muestras de líquido amniótico del Biobanco de pacientes sin APP, RPM ni patología neurológica.

RESULTADOS: Se incluyeron 95 pacientes con APP o RPM pretérmino. De éstas, 41 (28.7%) presentaban inflamación intraamniótica y 54 (37.8%) no. 48 (33.6%) fetos se incluyeron en el grupo control. Los fetos de madres con APP o RPM pretérmino mostraron signos de remodelación y lesión cerebral. Se evidenció: 1) una reducción del tamaño cerebelar en pacientes con inflamación intraamniótica (menor diámetro transcerebelar ($p=0.019$) y menor altura del vermis ($p=0.041$); 2) menor área del cuerpo calloso en pacientes con APP o RPM ($p=0.006$); y 3) un retraso en la maduración cortical a nivel de la cisura de Silvio ($p<0.001$), y de la cisura parieto-occipital derecha ($p=0.012$). Finalmente, en el líquido amniótico se detectaron mayores concentraciones de enolasa neuroespecífica ($p<0.001$), proteína S100B ($P<0.001$) y proteína ácida fibrilar glial ($p=0.002$). Todos los cambios fueron más acentuados en el grupo de pacientes con inflamación intraamniótica.

CONCLUSIÓN: Los fetos de madres con APP o RPM pretérmino presentaron signos prenatales de remodelación y lesión cerebral en el momento de la presentación del cuadro clínico. Estos cambios fueron más pronunciados en fetos con inflamación intraamniótica.

OBSTETRICS

Evidence of brain injury in fetuses of mothers with preterm labor with intact membranes and preterm premature rupture of membranes

Clara Murillo, MD; Elisenda Eixarch, MD, PhD; Claudia Rueda, MD; Marta Larroya, MD; David Boada, MD; Laia Grau, MD; Júlia Ponce, MD; Victoria Aldecoa, MD, PhD; Elena Monterde, MD; Silvia Ferrero, MD, PhD; Vicente Andreu-Fernández, PhD; Gemma Arca, MD, PhD; Laura Oleaga, MD, PhD; Olga Ros, BSc; Maria Pilar Hernández, BSc; Eduard Gratacós, MD, PhD; Montse Palacio, MD, PhD; Teresa Cobo, MD, PhD

BACKGROUND: Brain injury and poor neurodevelopment have been consistently reported in infants and adults born before term. These changes occur, at least in part, prenatally and are associated with intra-amniotic inflammation. The pattern of brain changes has been partially documented by magnetic resonance imaging but not by neurosonography along with amniotic fluid brain injury biomarkers.

OBJECTIVE: This study aimed to evaluate the prenatal features of brain remodeling and injury in fetuses from patients with preterm labor with intact membranes or preterm premature rupture of membranes and to investigate the potential influence of intra-amniotic inflammation as a risk mediator.

STUDY DESIGN: In this prospective cohort study, fetal brain remodeling and injury were evaluated using neurosonography and amniocentesis in singleton pregnant patients with preterm labor with intact membranes or preterm premature rupture of membranes between 24.0 and 34.0 weeks of gestation, with (n=41) and without (n=54) intra-amniotic inflammation. The controls for neurosonography were outpatient pregnant patients without preterm labor or preterm premature rupture of membranes matched 2:1 by gestational age at ultrasound. Amniotic fluid controls were patients with an amniocentesis performed for indications other than preterm labor or preterm premature rupture of membranes without brain or genetic defects whose amniotic fluid was collected in our biobank for research purposes matched by gestational age at amniocentesis. The group with intra-amniotic inflammation included those with intra-amniotic infection (microbial invasion of the amniotic cavity and intra-amniotic inflammation) and those with sterile inflammation. Microbial invasion of the amniotic cavity was defined as a positive amniotic fluid culture and/or positive 16S ribosomal RNA gene. Inflammation was defined by amniotic fluid interleukin 6 concentrations of >13.4 ng/mL in preterm labor and >1.43 ng/mL in preterm premature rupture of membranes. Neurosonography included the evaluation of brain structure biometric parameters and cortical development. Neuron-specific enolase, protein S100B, and glial fibrillary acidic protein were selected as amniotic fluid brain injury biomarkers. Data were adjusted for cephalic biometrics, fetal growth percentile, fetal sex, noncephalic presentation, and preterm premature rupture of membranes at admission.

RESULTS: Fetuses from mothers with preterm labor with intact membranes or preterm premature rupture of membranes showed signs of brain remodeling and injury. First, they had a smaller cerebellum. Thus, in the intra-amniotic

inflammation, non-intra-amniotic inflammation, and control groups, the trans cerebellar diameter measurements were 32.7 mm (interquartile range, 29.8–37.6), 35.3 mm (interquartile range, 31.2–39.6), and 35.0 mm (interquartile range, 31.3–38.3), respectively ($P=.019$), and the vermian height measurements were 16.9 mm (interquartile range, 15.5–19.6), 17.2 mm (interquartile range, 16.0–18.9), and 17.1 mm (interquartile range, 15.7–19.0), respectively ($P=.041$). Second, they presented a lower corpus callosum area (0.72 mm² [interquartile range, 0.59–0.81], 0.71 mm² [interquartile range, 0.63–0.82], and 0.78 mm² [interquartile range, 0.71–0.91], respectively; $P=.006$). Third, they showed delayed cortical maturation (the Sylvian fissure depth-to-biparietal diameter ratios were 0.14 [interquartile range, 0.12–0.16], 0.14 [interquartile range, 0.13–0.16], and 0.16 [interquartile range, 0.15–0.17], respectively [$P<.001$], and the right parieto-occipital sulci depth ratios were 0.09 [interquartile range, 0.07–0.12], 0.11 [interquartile range, 0.09–0.14], and 0.11 [interquartile range, 0.09–0.14], respectively [$P=.012$]). Finally, regarding amniotic fluid brain injury biomarkers, fetuses from mothers with preterm labor with intact membranes or preterm premature rupture of membranes had higher concentrations of neuron-specific enolase (11,804.6 pg/mL [interquartile range, 6213.4–21,098.8], 8397.7 pg/mL [interquartile range, 3682.1–17,398.3], and 2393.7 pg/mL [interquartile range, 1717.1–3209.3], respectively; $P<.001$), protein S100B (2030.6 pg/mL [interquartile range, 993.0–4883.5], 1070.3 pg/mL [interquartile range, 365.1–1463.2], and 74.8 pg/mL [interquartile range, 44.7–93.7], respectively; $P<.001$), and glial fibrillary acidic protein (1.01 ng/mL [interquartile range, 0.54–3.88], 0.965 ng/mL [interquartile range, 0.59–2.07], and 0.24 mg/mL [interquartile range, 0.20–0.28], respectively; $P=.002$).

CONCLUSION: Fetuses with preterm labor with intact membranes or preterm premature rupture of membranes had prenatal signs of brain remodeling and injury at the time of clinical presentation. These changes were more pronounced in fetuses with intra-amniotic inflammation.

Key words: amniocentesis, biomarkers, cerebellum, corpus callosum, cortical maturation, fetal brain, glial fibrillary acidic protein, intra-amniotic inflammation, microbial invasion of the amniotic cavity, neuron-specific enolase, neurosonography, preterm labor with intact membranes, preterm premature rupture of membranes, protein S100B, spontaneous preterm delivery

Cite this article as: Murillo C, Eixarch E, Rueda C, et al. Evidence of brain injury in fetuses of mothers with preterm labor with intact membranes and preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol 2024;XX:x:ex–x.ex.

0002-9378/\$36.00 • © 2024 Published by Elsevier Inc. • <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2024.04.025>

 Click Video under article title in Contents at ajog.org

AJOG at a Glance

Why was this study conducted?

This study aimed to evaluate the prenatal features of brain remodeling and injury associated with spontaneous preterm delivery and the potential influence of intra-amniotic inflammation (IAI).

Key findings

Our study found that fetuses from mothers with preterm labor (PTL) with intact membranes or preterm premature rupture of membranes had sonographic signs of brain remodeling, even in the absence of IAI. Thus, the fetuses had a smaller cerebellum, lower corpus callosum area, and decreased Sylvian fissure depth. Interestingly, these fetuses presented signs of brain injury with high concentrations of gray and white brain damage biomarkers, such as amniotic fluid neuron-specific enolase, amniotic fluid protein S100B, and amniotic fluid glial fibrillary acidic protein. All changes were particularly prominent in fetuses exposed to IAI.

What does this add to what is known?

Our study provides evidence of the existence of fetal brain remodeling and injury in fetuses from mothers with PTL with intact membranes or preterm premature rupture of membranes and the causal role of IAI as a mediator of risk in these cases.

Introduction

Spontaneous preterm delivery is associated with brain injury and remodeling in the offspring. Children and adults born prematurely have an increased incidence of cerebral palsy, impaired neurodevelopment, speech and audiovisual dysfunctions, and psychiatric disorders, together with altered postnatal brain imaging, including changes in several relevant brain structures and cortical folding delay (lower gyrification index and cortical surface area compared with term controls, diffuse white matter gliosis, neuronal-axonal injury of the white and gray matter, periventricular leukomalacia, and periventricular hemorrhagic infarction).^{1–3} Several lines of evidence support that brain injury in preterm infants occurred, at least in part, prenatally. First, children of mothers complicated with preterm labor (PTL) with intact membranes have poorer neurodevelopment, regardless of whether delivery was before term or not.^{4,5} Second, magnetic resonance imaging (MRI) studies^{6,7} in fetuses from pregnancies who later delivered preterm show a reduction in cortical and extra cerebral spinal fluid volumes⁶ and neuronal connectivity in the left

hemisphere prelanguage region.⁷ Third, amniotic fluid markers of brain injury, specifically neuron-specific enolase (NSE) and protein S100B, are elevated in women with PTL.^{8,9} Finally, intra-amniotic inflammation (IAI) is a risk factor for worse neurodevelopmental outcomes¹⁰ and cerebral palsy at 3 years.¹¹ The role of IAI in the genesis of fetal brain damage has been further supported by animal studies.^{12–16}

The pattern of prenatal brain injury in PTL and intact membranes and preterm premature rupture of membranes (PPROM) has been partially documented with MRI in 2 previous studies,^{6,7} but there is no study evaluating the fetal brain by ultrasound (US). Neurosonography allows a highly detailed evaluation and measurement of fetal brain structures and cortical development^{17–19} and is more accessible to the clinical setting than MRI. In addition, no previous study has combined the use of fetal brain imaging with biomarkers of brain damage in the amniotic fluid. This could add further information to document prenatal brain injury and support the prognostic value of brain imaging changes and their relationship with IAI.

This study aimed to comprehensively investigate the pattern of signs suggesting fetal brain injury and remodeling associated with spontaneous preterm delivery and their association with IAI. Moreover, we prospectively evaluated neurosonography and amniotic fluid brain injury biomarkers in fetuses from pregnancies with PTL with intact membranes and PPROM, with and without IAI, and from uncomplicated pregnancies.

Material and Methods**Study design and population**

This was an observational prospective cohort study that included consecutive singleton pregnant patients complicated with PTL with intact membranes or PPROM between 23 0/7 to 34 0/7 weeks of gestation at BCNatal (Hospital Clínic de Barcelona and Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain) from 2018 to 2021. As part of the local clinical protocol, patients with singleton pregnancies admitted with PTL with intact membranes or PPROM below 34 weeks of gestation were offered amniocentesis to rule in or rule out IAI. Eligible cases were patients who underwent amniocentesis at admission. In addition, a group of outpatient singleton pregnant patients not diagnosed with PTL with intact membranes or PPROM in the second and third trimesters of pregnancy from US screening were recruited as the control group, matched 2:1 by gestational age with the PTL with intact membranes or PPROM cases at study US.

Of note, 3 groups of fetuses were compared: those of mothers admitted for PTL with intact membranes or PPROM with IAI (IAI group), those of mothers with PTL with intact membranes or PPROM without IAI (non-IAI group), and the previously described control group.

In addition, we performed a subanalysis of the IAI group. Thus, the IAI group was divided according to the presence or absence of microbial invasion of the amniotic cavity into subgroups with intra-amniotic infection (both present) and with sterile IAI (just IAI present).

Amniocentesis to rule out IAI was not performed in the control group because there was no clinical indication for this purpose. Alternatively, to compare amniotic fluid brain damage biomarkers, 20 amniotic fluid samples from our Fundació de Recerca Clínica Barcelona - Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer biobank collected for indications other than PTL with intact membranes or PPROM or brain or genetic pathology were selected (biobank amniotic fluid samples). Amniocenteses were performed in the second or third trimester of pregnancy.

Exclusion criteria

The exclusion criteria were delivery before fetal neurosonography, maternal age <18 years, multiple pregnancies, clinical chorioamnionitis²⁰ at admission, major fetal structural malformations or chromosomal anomalies, or PTL with intact membranes or PPROM cases without amniocentesis at admission.

Definitions

PTL with intact membranes was defined as regular uterine contractions with a cervical length up to the 5th percentile²¹ by transvaginal US. All patients had intact membranes. We only evaluated cervical changes by digital examination on suspicion of imminent delivery. PPROM was diagnosed as leakage of amniotic fluid confirmed by a positive alpha 1 microglobulin protein test.

Inflammation was defined by the presence of high levels of amniotic fluid interleukin 6 (IL-6) measured using the enzyme-linked immunoassay (DIA-source ImmunoAssays, Ottignies-Louvain-la-Neuve, Belgium), with 1.43 ng/mL being the cutoff for PPROM cases²² and 13.4 ng/mL being the cutoff for PTL with intact membranes cases²³ as previously reported by our group. The minimum detectable level of IL-6 was 0.2 ng/mL. The coefficients of variation were 6.23% for a mean concentration of 123.3 pg/mL and 5.18% for a mean concentration of 317.4 pg/mL.

Microbial invasion of the amniotic cavity was defined as a positive amniotic fluid culture for genital mycoplasma (*Mycoplasma* IST 2, bioMérieux for

Ureaplasma spp. or *Mycoplasma hominis*), aerobic (chocolate agar), and anaerobic bacteria (Schaeffer agar for anaerobes and thioglycolate broth). In addition, it was diagnosed based on specific polymerase chain reaction amplification of the 16S ribosomal RNA gene using the primers: 5'-AGA GTT TGATCC TGG CTC AG-3' and 5'-GGA CTA CCA GGG TAT CTA AT at-3' followed by Sanger sequencing. Sequences were identified using the BLAST algorithm of the National Center for Biotechnology Information database, with a minimum sequence identity of 98%.

Gestational age was calculated according to first-trimester crown-rump length.²⁴

Clinical management of preterm premature/preterm premature rupture of membranes

Of note, 2 intramuscular administrations of betamethasone 12 mg given 24 hours apart were administered for fetal lung maturation until 34 6/7 weeks of gestation. If there was no clinical contraindication, tocolysis (nifedipine or atosiban) was administered during steroid administration. We only administered broad-spectrum antibiotics to patients with PPROM, amniotic fluid glucose concentrations of <5 mg/dL, with microorganisms identified using Gram staining, positive amniotic fluid cultures, intrapartum group B streptococcus prophylaxis, and to patients with clinical chorioamnionitis. From 2018 to 2019, patients with high suspicion of microbial invasion of the amniotic cavity received parenteral ampicillin 1 g per 6 hours and gentamicin 80 mg per 8 hours and a single dose of oral azithromycin 1 g. Beyond 2019, our local protocol substituted this antibiotic combination with parenteral ceftriaxone 1 g per 12 hours and ampicillin 2 g per 6 hours and oral clarithromycin 500 mg per 8 hours. Antibiotic treatment was discontinued when the amniotic fluid cultures were negative. In women diagnosed with microbial invasion of the amniotic cavity who remained pregnant after microbiological results, we individualized the antibiotic treatment according to the microorganism isolated until 7 to 10 days. We changed to parenteral

piperacillin-tazobactam 4 g per 6 hours when clinical chorioamnionitis was suspected. Labor induction was considered only if clinical chorioamnionitis occurred or after 34 weeks of gestation in women with microbial invasion of the amniotic cavity.

Fetal ultrasound and neurosonography assessment

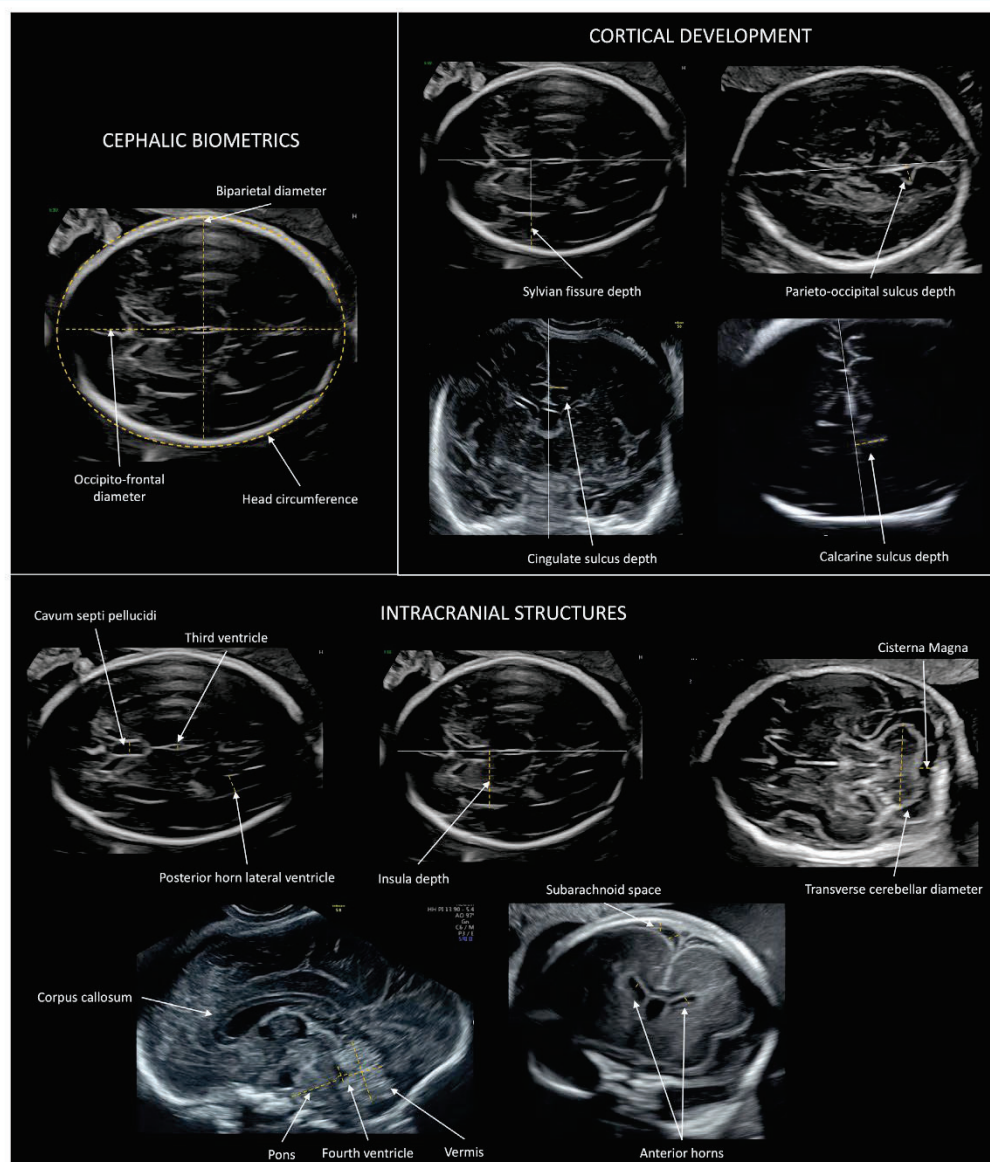
Vaginal and abdominal fetal USs and neurosonographies were performed in the first 24 to 72 hours after amniocentesis in the group with PTL with intact membranes or PPROM and at similar gestational age in the control group. US was performed using Voluson E10 Expert and Voluson S8 US devices equipped with a 5 to 9 MHz transvaginal transducer (GE Medical Systems, Zipf, Australia). The measurements were performed by 2 experienced examiners (C.M. and E.E.) who were blinded to amniotic fluid IL-6 concentrations and culture results at the time the US was performed.

The study US protocol included the assessment of estimated fetal weight (EFW),²⁵ conventional fetoplacental Doppler and complete 2-dimensional neurosonography following a strict standardized methodology^{17,18,26} and according to the protocol of our institution.²⁷

Cephalic biometrics included biparietal diameter (BPD), occipitofrontal diameter (OFD), head circumference, and cephalic index (calculated by dividing BPD by OFD $\times$ 100). Brain structure measurements included transcerebellar diameter²⁸; cerebellar vermian measurements (anteroposterior [AP] diameter and height)²⁸; AP pontine diameter²⁹; insular depth ratio (defined as insular depth/BPD)¹⁸; right and left, anterior and posterior horns of the lateral ventricles^{26,30,31}; third ventricle³²; fourth ventricle width and height³³; cavum of the septum pellucidum width³⁴; cisterna magna³⁰; and craniocortical and sinocortical subarachnoid width.³⁵ These measurements are illustrated in Figure 1.

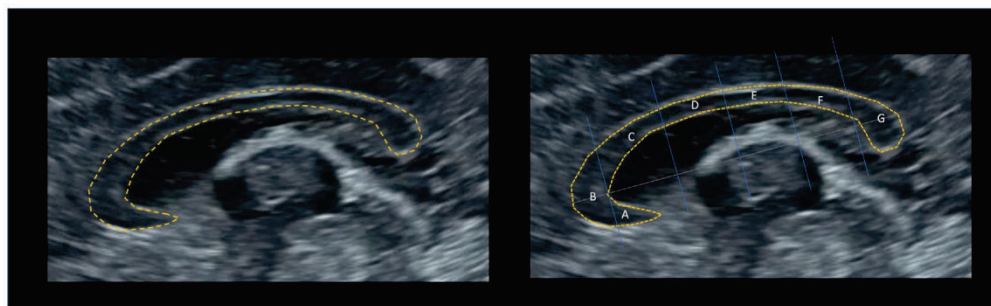
Regarding cortical development, the depths of the Sylvian fissure and parieto-occipital, calcarine, and cingulate sulcus were measured according to previous studies.^{18,36,37} Furthermore, the Sylvian fissure and the parieto-occipital,

FIGURE 1
Comprehensive evaluation of fetal brain development



Murillo. Antenatal brain injury in fetuses presenting with preterm labor with intact membranes or preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol 2024.

FIGURE 2
Corpus callosum area and Witelson subdivision



The image shows the rostrum (A), genu (B), rostral body (C), anterior midbody (D), posterior midbody (E), isthmus (F), and splenium (G).

Murillo. Antenatal brain injury in fetuses presenting with preterm labor with intact membranes or preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2024.

calcarine, and cingulate sulci were evaluated and graded from 0 to 5 according to a previous publication by Pistorius et al³⁸ (Figure 1).

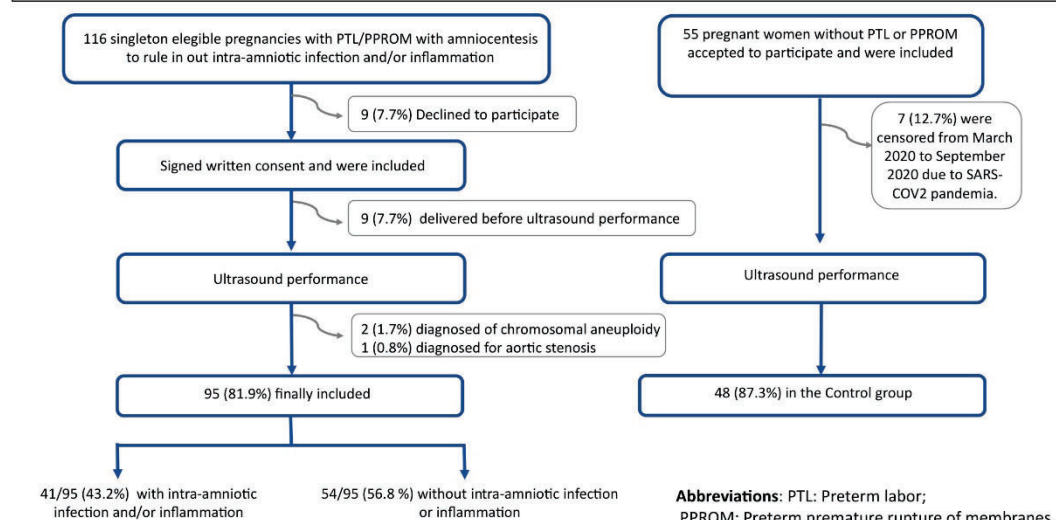
Assessment of the corpus callosum included the maximum length and body thickness.³⁹ Midsagittal DICOM images were processed using an in-house MATLAB tool (2009; MathWorks,

Natick, MA)⁴⁰ for total corpus callosum area and Witelson subdivision evaluation. The total corpus callosum area was delineated through cursor-guided free-hand traces as the region was limited superiorly by the hyperechoic sulcus of the corpus callosum and inferiorly by the cavum septi pellucidi and cavum vergae. The corpus callosum was automatically

subdivided into the 7 areas described by Witelson,⁴¹ including the rostrum, genu, rostral body, anterior midbody, posterior midbody, isthmus, and splenium areas (Figure 2). Delineation was performed twice in each case, and the mean value was used for further analyses.

The Witelson regions represent white matter tracts from different brain

FIGURE 3
Flowchart of the study population



PPROM, preterm premature rupture of membranes; PTL, preterm labor.

Murillo. Antenatal brain injury in fetuses presenting with preterm labor with intact membranes or preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2024.

TABLE 1
Baseline, fetal, and perinatal characteristics of the study population

Variables	Group 1: IAI (n=41)	Group 2: non-IAI (n=54)	Group 3: control (n=48)	P value 1 (1 vs 2)	P value 2 (1 vs 3)	P value 3 (2 vs 3)
Maternal age (y)	33.5 (30.2–37.5)	33.1 (28.8–34.9)	33.6 (30.3–36.9)	.15	.63	.08
Body mass index (kg/m ²)	23.0 (20.2–27.8)	22.5 (20.3–26.8)	21.8 (20.8–27.1)	.90	.78	.67
Race						
White	29/38 (76.3)	37/50 (74.0)	41 (85.4)	.36	.34	.11
Maghrebi	3/38 (7.9)	0 (0)	1 (2.1)			
Hispanic	4/38 (10.5)	6/50 (12.0)	6 (12.5)			
Asian	1/38 (2.6)	4/50 (8.0)	0 (0)			
Other	1/38 (2.6)	3/50 (6.0)	0 (0)			
Maternal smoking	2/39 (5.1)	7 (13.0)	5/47 (10.6)	.30	.45	.72
Nulliparity	19 (46.3)	34/52 (65.4)	27 (56.3)	.07	.35	.35
Assisted reproductive technique	3/34 (8.8)	4/46 (8.7)	6/48 (12.5)	1.00	.73	.74
Preterm labor at admission (n=61)	13/61 (21.0)	48/61 (79.0)	—	<.001	—	—
PPROM at admission (n=34)	28/34 (82.0)	6/34 (18.0)	—	<.001	—	—
Gestational age at amniocentesis (wk)	28.9 (26.0–3.0)	27.7 (26.0–30.7)	29.4 (27.0–30.9)	.37	.26	.71
Days from inclusion to delivery	11 (6–17)	57 (33–74)	72 (59–81)	<.001	<.001	<.001
Neonatal sex (male)	26 (63.4)	32 (59.3)	22 (45.8)	.68	.10	.18
Gestational age at delivery (wk)	31.1 (27.7–32.4)	37.4 (34.3–39.3)	39.6 (38.9–40.3)	<.001	<.001	<.001
Birthweight (g)	1557 (1080–2166)	2600 (2010–3110)	3270 (3000–3510)	<.001	<.001	<.001
Birthweight percentile	20.5 (5.5–47.0)	32.0 (9.0–59.0)	48.0 (19.0–76.0)	.30	.002	.04
Clinical chorioamnionitis at delivery	7 (17.1)	3 (5.6)	0 (0)	.12	.004	.09
Histologic funisitis or chorioamnionitis						
Acute chorioamnionitis without funisitis	12 (29.3)	4/26 (15.4)	1/20 (5.0)	.02	<.001	0.17
Acute chorioamnionitis with funisitis	19 (46.3)	7/26 (26.9)	2/20 (10.0)	—	—	—
Cesarean delivery	18 (43.9)	10 (18.5)	11 (22.9)	.02	.04	.81
Induction of labor	7 (17.1)	9 (16.7)	27 (56.3)	.84	<.001	<.001
Noncephalic presentation	14 (34.1)	3 (5.6)	3 (6.3)	.001	1.00	.001
Apgar score of <7 at 5 min	3/37 (8.1)	0/43 (0)	0/45 (0)	.10	.09	N/A
pH umbilical artery	7.27 (7.18–7.34)	7.24 (7.19–7.30)	7.21 (7.15–7.27)	.38	.12	.55

Marillo. Antenatal brain injury in fetuses presenting with preterm labor with intact membranes or preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol 2024.

(continued)

TABLE 1
Baseline, fetal, and perinatal characteristics of the study population (continued)

Variables	Group 1: IAI (n=41)	Group 2: non-IAI (n=54)	Group 3: control (n=48)	P value 1 (1 vs 2)	P value 2 (1 vs 3)	P value 3 (2 vs 3)
Neonatal intensive care unit admission	26/38 (68.4)	11/45 (24.4)	0/46 (0)	<.001	<.001	<.001
Major neonatal morbidity ^a or mortality	14/38 (36.8)	3/45 (6.7)	0/46 (0)	.001	<.001	.08

Data are presented as median (interquartile range) for quantitative variables or number/total number (percentage) for qualitative variables, unless otherwise indicated.

IAI, intra-amniotic inflammation; N/A, not available.

^a Major complications defined by the presence of bronchopulmonary dysplasia, necrotizing enterocolitis, intraventricular hemorrhage, periventricular leukomalacia, retinopathy, or early-onset sepsis. Murillo. Amniotic fluid brain injury in fetuses presenting with preterm labor with intact membranes or preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2024.

regions. Thus, the rostrum corresponds to the caudal or orbital prefrontal and inferior premotor regions, the genu corresponds to the prefrontal region, the rostral body corresponds to the premotor and supplementary motor regions, the anterior midbody corresponds to the motor region, the posterior midbody corresponds to the somesthetic and posterior parietal regions, the isthmus corresponds to the superior temporal and posterior parietal regions, and the splenium corresponds to the occipital and inferior temporal regions.

Amniotic fluid brain injury biomarkers (neuron-specific enolase, protein S100B, and glial fibrillary acidic protein) using multiplex immunoassay (Luminex technology) analysis

A total of 500 μ L of amniotic fluid was collected immediately after amniocentesis and frozen at -80°C . All samples were thawed and immediately centrifuged at $16,000 \times g$ for 4 minutes before use or dilution. Total protein concentrations were evaluated using the Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA; reference number: 23225) to estimate the appropriate dilution factor for the Luminex assays. Samples were analyzed in duplicate and diluted as follows: 1/1 and 1/2 for glial fibrillary acidic protein (GFAP) and with a 1/5 and 1/10 dilution factor for protein S100B and NSE.

The GFAP DuoSet assay (DY2594-05) was used to detect GFAP, and the Magnetic Luminex Human Discovery assay (LXSAHM-04) was employed to detect protein S100B and NSE. All commercial kits were manufactured by R&D Systems (Minneapolis, MN). This technology is based on magnetic bead sets labeled with specific concentrations of fluorescent dyes, resulting in more than 300 differentiated colored bead sets. The bead mixture is incubated with the samples, and the median fluorescence intensities are detected on a Luminex device. The LX100 (LX10010187403) device and XPonent software were used for 96-well MagPlex analyses with a minimum threshold of 50 events. Of note, 7 standards with a 1/3 dilution factor were used

to perform the calibration curve from a stock solution of 13,270 pg/mL for protein S100B, 90,990 pg/mL for NSE, and 20 ng/mL for GFAP. The lower limit of GFAP detection was 0.3 ng/mL. All procedures were performed following the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

Encoded information was processed using an Access database. Qualitative variables were described in tables as absolute frequency and relative percentage, and quantitative variables were described in tables as median and interquartile range.

The Shapiro-Wilk test was initially used to assess continuous data for normality. For the baseline, fetal, perinatal, and admission characteristics of the study population, univariate analysis was performed using the chi-square or Fisher exact test for comparison of qualitative variables. For quantitative variables, the Student *t* test was used for independent samples, assuming a normal distribution, except for the subanalysis within the group exposed to IAI (microbial invasion of the amniotic cavity vs "sterile" inflammation), for which a nonparametric test was applied (Mann-Whitney *U* test). In this last subanalysis, normal distribution was evaluated using the Shapiro-Wilk test, and homoskedasticity was evaluated using the Levene test. The Wilcoxon *W* test was applied for variables with a non-normal distribution.

Regarding sonographic and amniotic fluid biomarker analysis, multivariate analysis was performed using multiple linear regression (continuous variables) or logistic regression (categorical variables), controlling for possible confounding factors, which were cephalic biometrics, fetal sex, fetal weight percentile, noncephalic presentation, and PPROM at admission for the US evaluation and fetal weight percentile, fetal sex, gestational age at amniocentesis, and PPROM at admission for the amniotic fluid biomarkers. In addition, a linearity trend analysis was performed in the 3 groups.

Finally, we performed the Pearson correlation to evaluate the correlation

TABLE 2
Clinical, ultrasound, and biochemical comparisons according to the presence of intra-amniotic infection and/or inflammation in women with preterm labor and preterm premature rupture of membranes

Variables	Group 1: IAI (n=41)	Group 2: non-IAI (n=54)	P value
Preterm premature rupture membranes at admission	28 (68.3)	6 (11.1)	<.001
C-reactive protein (mg/L)	1.06 (0.56–2.20)	0.51 (0.28–1.06)	.02
White cell count ($\times 10^9/L$)	11,300 (8670–14,490)	11,235 (9470–13,900)	.39
Neutrophils (%)	81 (74–89)	78 (73–84)	.76
Cervical length (mm)	20.5 (12.0–31.5)	13.0 (10.0–18.0)	<.001
Amniotic fluid glucose (mg/dL)	22 (11–35)	41 (31–52)	<.001
Amniotic fluid interleukin 6 concentration (pg/mL)	32,090.0 (7111.3–73,038.3)	1171.5 (728.5–1918.8)	<.001
Positive amniotic fluid culture	19 (46.3)	0 (0)	<.001
Latency from admission to ultrasound (d)	2 (1–3)	2 (1–2)	.10

Data are presented as number (percentage) for qualitative variables or median (interquartile range) for quantitative variables, unless otherwise indicated.

IAI, intra-amniotic inflammation.

Murillo. Antenatal brain injury in fetuses presenting with preterm labor with intact membranes or preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2024.

between amniotic fluid IL-6 concentrations and brain structures among groups.

The data were analyzed using Stata for MAC (version 15.1; StataCorp LP, College Station, TX). For statistical analysis, *P* values of $\leq .05$ were considered statistically significant.

Ethics

The research ethics committees of the Hospital Clínic de Barcelona and Hospital Sant Joan de Déu reviewed and approved the study (identification numbers: HCB/2018/0567 and PIC 150-19, respectively), and all participants were informed and provided signed written consent.

Results

During the study period (2018–2021), 154 patients were admitted with a diagnosis of PTL with intact membranes or PPROM at <34 weeks of gestation. Among these, 116 were eligible for the study, and 95 were finally included (Figure 3). Approximately 80% of patients with PTL with intact membranes or PPROM were included in other noninterventive studies.^{42,43}

Of the overall population, 34 patients had PPROM, 61 had PTL with intact membranes, and 48 were controls. Among the patients with PPROM and PTL with intact membranes, 41 had IAI

(28/41 and 13/41, respectively). There was no difference in maternal characteristics (Table 1). All patients with microbial invasion of the amniotic cavity had IAI.

Table 2 shows clinical, US, and biochemical comparisons according to the presence of IAI in PTL with intact membranes or PPROM groups. Of note, 20% of the total amniotic fluid cultures or 16S rRNAs were positive. Moreover, the microorganisms isolated are shown in Supplemental Table 1. Antenatal corticosteroids were administered to 100% of patients with PTL with intact membranes or PPROM and to 0% of the patients in the control group. Thus, adjustment for this parameter was not required. Moreover, 57% of the patients diagnosed with PTL with intact membranes finally delivered at term.

Regarding fetal US, gestational ages at US were similar among the groups. However, we found a lower EFW percentile and a higher percentage of fetuses under the 10th percentile in the IAI group without fetal-placental Doppler differences (Table 3).

Supplemental Table 2 shows the gestational age and indication for amniocentesis in the Biobank group selected to compare amniotic fluid biomarkers. All genetic and infectious studies performed on these samples were

normal, and healthy offspring were confirmed in all cases.

Fetal brain in fetuses with intra-amniotic inflammation

The transcerebellar diameter and cerebellar vermian height were lower in fetuses with IAI than in those in the control group, whereas the insular depth ratio and fourth ventricular width were higher in fetuses with IAI than in those in the control group (Table 3).

Regarding cortical development, Sylvian and right parieto-occipital depth ratios were lower in fetuses with IAI than in those in the control group (Table 4).

The corpus callosum total area and Witelson subregions 3, 5, and 6 (rostral body, posterior midbody, and isthmus areas) were smaller (Table 4 and Figure 4) in fetuses with IAI than in those in the control group.

Amniotic fluid NSE and protein S100B concentrations were significantly higher in the IAI group. GFAP was detected in 68.3% of fetuses with IAI and in only 30.0% of fetuses in the control group (Table 5 and Figure 5).

Subanalysis: intra-amniotic infection vs sterile intra-amniotic inflammation

Fetuses with sterile IAI had similar perinatal outcomes compared with those with intra-amniotic infection (Sup

TABLE 3
Fetal ultrasonographic comparison: fetal-placental and intracranial structures and cephalic biometrics

Variables	Group 1: IAI (n=41)	Group 2: non-IAI (n=54)	Group 3: control (n=48)	P value 1 (1 vs 2)	P value 2 (1 vs 3)	P value 3 (2 vs 3)	P value 4 (linearity trend among the 3 groups)
Fetal-placental parameters							
Gestational age at ultrasound (wk)	27.9 (28.7–31.1)	29.6 (27.0–31.2)	29.4 (26.6–31.3)	.38	.48	.90	.46
Estimated fetal weight at ultrasound (g)	1150.0 (864.0–1547.0)	1362.5 (1066.5–1741.5)	1380.5 (1088.0–1705.0)	.14	.12	.87	.09
Estimated fetal weight percentile	23.0 (9.5–60.5)	53.5 (22.5–70.0)	58.5 (27.5–75.0)	.01	.002	.55	.004
Small for gestational age (estimated fetal weight <10th percentile)	11 (26.8)	7 (13.0)	4 (8.3)	.09	.02	.45	.02
Umbilical artery pulsatility index	0.92 (0.72–1.09)	0.99 (0.84–1.11)	1.03 (0.82–1.17)	.21	.17	.60	.08
Middle cerebral artery pulsatility index	1.82 (1.56–2.12)	1.76 (1.59–2.05)	2.00 (1.71–2.25)	.17	.89	.14	.30
Ductus venosus pulsatility index	0.41 (0.31–0.54)	0.46 (0.34–0.57)	1.93 (1.65–2.43)	.21	.11	.80	.24
Uterine arteries pulsatility index average	0.76 (0.63–0.96)	0.78 (0.64–0.95)	0.72 (0.64–0.89)	.11	.62	.08	.31
Cephalic biometrics							
Biparietal diameter (mm)	69.5 (62.5–75.0)	74.0 (68.0–78.0)	74.0 (68.0–79.0)	.14	.11	.91	.03
Occipitofrontal diameter (mm)	89.0 (82.5–98.0)	94.0 (87.0–100.0)	96.5 (89.0–102.0)	.21	.03	.61	.007
Head circumference (mm)	253.0 (235.0–276.5)	268.0 (248.0–287.0)	273.5 (248.5–288.5)	.15	.10	.86	.02
Cephalic index (%)	76.8 (73.8–79.1)	78.1 (75.6–80.6)	77.2 (74.5–78.8)	.46	.33	.17	.93
Intracranial structures							
Transcerebellar diameter (mm)	32.7 (29.8–37.6)	35.3 (31.2–39.6)	35.0 (31.3–38.3)	.09	.02	.19	.37
Cerebellar vermis anteroposterior diameter (mm)	14.60 (13.30–17.50)	15.05 (12.95–16.75)	15.40 (13.80–16.20)	.13	.81	.20	.89
Cerebellar vermis height (mm)	16.9 (15.5–19.6)	17.2 (16.0–18.9)	17.1 (15.7–19.0)	.04	.04	.84	.93
Pontine anteroposterior diameter (mm)	10.2 (9.3–11.3)	10.9 (9.8–11.9)	10.4 (9.6–11.8)	.83	.26	.44	.66
Insular depth ratio ^a	0.33 (0.32–0.34)	0.32 (0.31–0.34)	0.32 (0.30–0.32)	.18	.001	.06	<.001
Right anterior horn of the lateral ventricle (mm)	1.7 (1.1–2.0)	1.7 (1.1–2.0)	1.5 (1.2–2.0)	.68	.99	.85	.57
Left anterior horn of the lateral ventricle (mm)	1.65 (1.25–2.42)	1.60 (1.30–2.20)	1.50 (1.25–1.95)	.94	.67	.46	.33
Right posterior horn of the lateral ventricle (mm)	4.60 (4.00–5.40)	5.05 (4.05–6.70)	4.50 (3.80–5.70)	.09	.21	.58	.91
Left posterior horn of the lateral ventricle (mm)	4.75 (4.00–5.50)	5.10 (4.15–6.70)	4.45 (3.60–5.70)	.28	.92	.30	.50
Third ventricle (mm)	0.90 (0.60–1.30)	1.00 (0.80–1.20)	1.00 (0.80–1.20)	.41	.84	.61	.22
Fourth ventricle height (mm)	2.80 (2.40–3.60)	3.25 (2.60–4.00)	2.80 (2.40–3.10)	.94	.18	.11	.16
Fourth ventricle width (mm)	4.00 (2.80–4.50)	3.65 (3.00–4.10)	3.10 (2.60–3.50)	.02	<.001	.04	.004

Murillo. Antenatal brain injury in fetuses presenting with preterm labor with intact membranes or preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol 2024.

(continued)

TABLE 3
Fetal ultrasonographic comparison: fetal-placental and intracranial structures and cephalic biometrics (continued)

Variables	Group 1: IAI (n=41)	Group 2: non-IAI (n=54)	Group 3: control (n=48)	P value 1 (1 vs 2)	P value 2 (1 vs 3)	P value 3 (2 vs 3)	P value 4 (linearity trend among the 3 groups)
Cavum septum pellucidum width (mm)	5.40 (4.60–6.60)	5.50 (4.60–6.30)	5.10 (4.80–5.90)	.46	.06	.15	.43
Cisterna magna (mm)	5.70 (4.90–6.80)	6.05 (5.20–7.10)	5.75 (5.00–6.65)	.49	.33	.09	.96
Subarachnoid craniocortical width (mm)	2.55 (2.20–3.20)	2.85 (2.30–3.45)	2.90 (2.60–3.30)	.64	.53	.66	.10
Subarachnoid sinocortical width (mm)	2.00 (1.40–2.50)	1.95 (1.50–2.50)	2.30 (1.80–2.60)	.79	.42	.18	.06

Data are presented as median (interquartile range) for quantitative variables or number (percentage) for qualitative variables, unless otherwise indicated. Sample sizes for corpus callosum areas measurements were 24 in the IAI group, 38 in the non-IAI group, and 42 in the control group. Statistical analysis was adjusted for head circumference, percentile, fetal sex, noncephalic presentation, and preterm premature rupture of membranes at admission. Occipitofrontal diameter was considered instead of head circumference in the IAI, intra-amniotic inflammation.

^a Depth ratios: insular or sulcus depth (mm) to biparietal diameter (mm).

Murillo. Antenatal brain injury in fetuses presenting with preterm labor with intact membranes or preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol 2024.

plemental Tables 3–5). Only an enlarged cisterna magna and higher amniotic fluid protein S100B concentrations were observed in fetuses with intra-amniotic infection (Supplemental Tables 5 and 6).

Fetal brain in the non-intra-amniotic inflammation group

Fetuses in the non-IAI group presented similar but less pronounced changes compared with those in the IAI group regarding Sylvian fissure, corpus callosum total area, Witelson subregions, and amniotic fluid protein S100B, NSE, and GFAP (Tables 4 and 5 and Figures 3 and 4).

Correlation of amniotic fluid interleukin 6 concentrations with neurologic changes

There was a significant correlation between amniotic fluid IL-6 concentrations and cerebral structures. Thus, higher amniotic fluid IL-6 concentrations were related to lower trans-cerebellar diameter; right parieto-occipital and right cingulate sulci depth ratio; total corpus callosum area; and Witelson subregions 3, 6, and 7 and higher concentrations of amniotic fluid NSE and GFAP (Supplemental Table 7).

Comment

Principal findings

Fetuses of mothers diagnosed with PTL with intact membranes or PPROM presented structural brain changes and signs of brain injury measured using neurosonography and amniotic fluid biomarkers. Although most changes were more pronounced in pregnancies with IAI, those without IAI also presented some differences concerning controls, suggesting that IAI is a mediator but not the only factor associated with fetal brain injury in patients with PTL with intact membranes or PPROM.

Results in the context of what is known

Our brain imaging findings are in line with those of previous MRI studies with smaller sample sizes^{5,7} reporting prenatal brain changes in fetuses with a subsequent preterm delivery. The current study adds to previous knowledge by

TABLE 4
Fetal ultrasonographic comparison: cortical development and corpus callosum

Variables	Group 1: IAI (n=41)	Group 2: non-IAI (n=54)	Group 3: control (n=48)	P value 1 (1 vs 2)	P value 2 (1 vs 3)	P value 3 (2 vs 3)	P value 4 (linearity trend among the 3 groups)
Cortical development							
Sylvian fissure grading	4 (3–4)	4 (3–4)	4 (3–5)	.78	.10	.14	.07
Sylvian fissure depth ratio ^a	0.14 (0.12–0.16)	0.14 (0.13–0.16)	0.16 (0.15–0.17)	.19	.003	.04	<.001
Right parieto-occipital sulcus grading	3 (2–4)	3 (2–4)	3 (2–5)	.54	.15	.38	.16
Right parieto-occipital sulcus depth ratio ^a	0.09 (0.07–0.12)	0.11 (0.09–0.14)	0.11 (0.09–0.14)	.06	.01	.82	.05
Left parieto-occipital sulcus grading	3 (2–4)	3 (2–4)	3 (2–5)	.93	.25	.39	.35
Left parieto-occipital sulcus depth ratio ^a	0.10 (0.06–0.12)	0.11 (0.08–0.13)	0.11 (0.09–0.13)	.69	.18	.39	.06
Right cingulate sulcus grading	2.0 (1.0–4.0)	2.5 (2.0–4.0)	3.0 (1.0–4.0)	.59	.45	.73	.27
Right cingulate sulcus depth ratio ^a	0.03 (0.01–0.04)	0.04 (0.03–0.06)	0.04 (0.02–0.06)	.03	.09	.42	.10
Left cingulate sulcus grading	2.0 (1.0–4.0)	2.5 (2.0–4.0)	3.0 (1.0–4.0)	.80	.57	.78	.03
Left cingulate sulcus depth ratio ^a	0.03 (0.01–0.05)	0.04 (0.03–0.06)	0.04 (0.02–0.07)	.21	.31	.38	.21
Right calcarine sulcus grading	4 (2–5)	4 (3–5)	4 (2–5)	.37	.32	.66	.59
Right calcarine sulcus depth ratio ^a	0.13 (0.09–0.16)	0.14 (0.12–0.16)	0.14 (0.11–0.16)	.14	.55	.28	.54
Left calcarine sulcus grading	4 (2–5)	4 (3–5)	4 (2–5)	.68	.46	.66	.78
Left calcarine sulcus depth ratio ^a	0.13 (0.10–0.15)	0.14 (0.12–0.15)	0.13 (0.10–0.16)	.59	.93	.45	.82
Corpus callosum							
Corpus callosum length (mm)	34.55 (31.60–37.10)	35.90 (33.15–39.60)	36.30 (33.50–38.30)	.45	.34	.08	.39
Corpus callosum thickness (mm)	1.7 (1.5–1.9)	1.9 (1.55–2.15)	1.9 (1.6–2.1)	.29	.21	.76	.13
Corpus callosum total area (mm ²)	0.715 (0.587–0.810)	0.713 (0.630–0.819)	0.781 (0.713–0.912)	.69	.04	.004	.006
Witelson subregion 1 rostrum (mm ²)	0.033 (0.018–0.042)	0.027 (0.015–0.036)	0.033 (0.022–0.050)	.33	.88	.20	.53
Witelson subregion 2 genu (mm ²)	0.108 (0.078–0.131)	0.095 (0.071–0.094)	0.118 (0.094–0.143)	.67	.15	.16	.07
Witelson subregion 3 rostral body (mm ²)	0.158 (0.126–0.169)	0.156 (0.136–0.175)	0.179 (0.147–0.203)	.61	.02	.002	.004
Witelson subregion 4 anterior midbody (mm ²)	0.085 (0.063–0.098)	0.080 (0.072–0.094)	0.089 (0.078–0.103)	.37	.28	.03	.05

Murillo. Antenatal brain injury in fetuses presenting with preterm labor with intact membranes or preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol 2024.

(continued)

TABLE 4
Fetal ultrasonographic comparison: cortical development and corpus callosum (continued)

Variables	Group 1: IAI (n=41)	Group 2: non-IAI (n=54)	Group 3: control (n=48)	P value 1 (1 vs 2)	P value 2 (1 vs 3)	P value 3 (2 vs 3)	P value 4 (linearity trend among the 3 groups)
Witelson subregion 5 posterior midbody (mm ²)	0.074 (0.054–0.084)	0.076 (0.067–0.090)	0.088 (0.073–0.107)	.61	.02	.02	.002
Witelson subregion 6 isthmus (mm ²)	0.052 (0.046–0.066)	0.058 (0.047–0.076)	0.069 (0.058–0.088)	.42	.003	.007	<.001
Witelson subregion 7 splenium (mm ²)	0.214 (0.170–0.234)	0.202 (0.172–0.241)	0.213 (0.181–0.249)	.99	.31	.24	.20

Data are presented as median (interquartile range) for quantitative variables or number (percentage) for qualitative variables, unless otherwise indicated. Sample sizes for corpus callosum areas measurements were 24 in the IAI group, 38 in the non-IAI group, and 42 in the control group. Statistical analysis was adjusted for head circumference, percentile, fetal sex, noncephalic presentation, and preterm premature rupture of membranes at admission. Occipitofrontal diameter was considered instead of head circumference in the corpus callosum length adjustment.

IAI, intra-amniotic inflammation.

^a Depth ratios: insular or sulcus depth (mm) to biparietal diameter (mm).

Murtillo. Antenatal brain injury in fetuses presenting with preterm labor with intact membranes or preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol 2024.

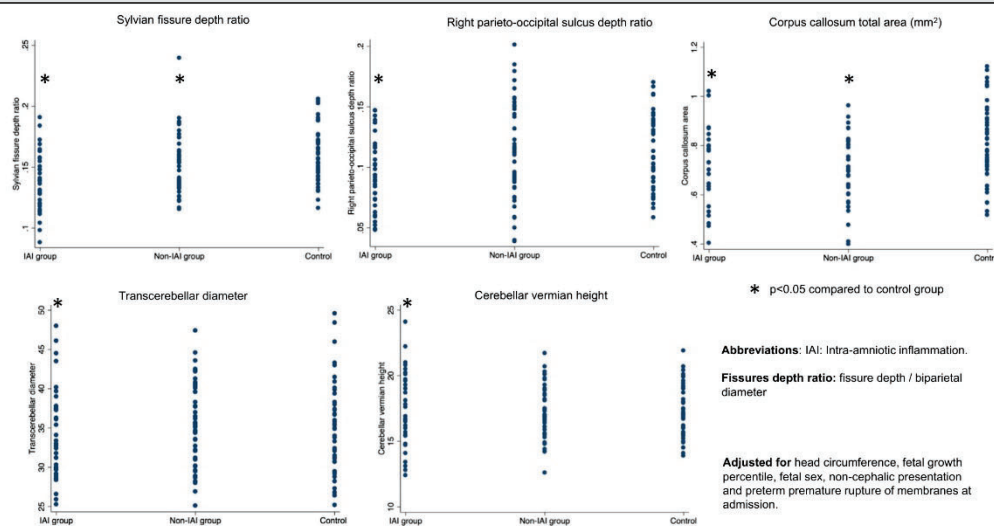
providing a comprehensive evaluation of fetal brain changes by neurosonography and evaluating additional brain structures compared with those previously reported. Another value of our study is the evaluation of cases according to the presence or absence of IAI, which provides an additional line of evidence to support the contribution of infectious or inflammatory status as a mediator of fetal brain injury associated with spontaneous preterm delivery.

Among the main fetal brain findings in this study, we found a smaller cerebellum in the IAI group, but not in the non-IAI group, than in the control group. These findings are in line with those of a previous study in very premature infants and adolescents.² In contrast, other authors⁶ did not find changes in cerebellar volume prenatally, possibly because MRI was performed at an earlier gestational age than in the current study. Cerebellar growth is most prominent at >28 weeks of gestation.^{44,45} Cerebellar damage in premature infants² has been associated with worse cognitive outcomes and motor disabilities.^{46–48}

In addition, fetuses with PTL with intact membranes or PPRM presented decreased Sylvian fissure depth and a larger insula, suggesting delayed cortical maturation. This finding has been previously reported in premature infants.^{49,50} Changes were more pronounced in fetuses with IAI, which is in line with findings from animal models exposed to intra-amniotic lipopolysaccharide (LPS) infusion.⁵¹ Cortical sulci development has been associated with worse neurodevelopmental outcomes,⁵² autism, and mood and speech disorders.^{53,54}

Finally, the corpus callosum of fetuses with PTL with intact membranes or PPRM was smaller than the corpus callosum of fetuses in the control group with preservation of length but a reduction in the area of the medium and posterior regions. We hypothesize that this might be explained because the corpus callosum length increases earlier in pregnancy, before PTL with intact membranes or PPRM occurs, whereas the corpus callosum thickness increases following an anterior-to-posterior direction in the third trimester of

FIGURE 4
Ultrasound fetal brain comparison in the entire study group



IAI, intra-amniotic inflammation.

Murillo. Antenatal brain injury in fetuses presenting with preterm labor with intact membranes or preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2024.

pregnancy.^{55–57} The results are in line with previous findings in premature infants³ and in LPS-exposed fetal sheep.⁵⁸ Structural alterations of the corpus callosum are a predictor of impaired neurodevelopment and have been associated with worse speech outcomes and neurobehavioral performance in adolescents and infants born before term.^{59,60}

We found a significant correlation between amniotic fluid IL-6 concentrations and the cerebellum, sulci depths, Witelson subdivisions, and amniotic fluid concentrations of NSE and GFAP, which supports a mediating role of IAI in the genesis of brain injury and is in line with previous studies reporting that fetuses with IAI present worse postnatal results.¹⁰

Regarding fetal brain damage biomarkers, increased concentrations of amniotic fluid protein S100B have been described previously in patients with PTL with intact membranes and PPROM, with higher concentrations in those with IAI, in line with the current study. Postnatally, higher concentrations of serum and urine S100B have been associated with schizophrenia,⁶¹ hypoxic-ischemic encephalopathy,⁶² and intra-ventricular

hemorrhage.⁶³ Overexpression of serum NSE and S100B can predict neurodevelopmental adverse outcomes at 1 year of life after cardiac arrest.⁶⁴ High concentrations of amniotic fluid NSE have been associated with postnatal gray matter injury, intraventricular hemorrhage, and periventricular leukomalacia in patients with PTL with intact membranes and subsequent preterm delivery.⁸ Postnatally, high concentrations of NSE in the cerebrospinal fluid have been correlated with worse neurodevelopmental outcomes at 2 years of life in arterial ischemic stroke and hypoxic-ischemic encephalopathy.^{65,66} Higher concentrations of amniotic fluid GFAP have been associated with neural tube defects,⁶⁷ and higher serum concentrations are considered a neuroinflammation biomarker in other conditions, such as multiple sclerosis.⁶⁸

Clinical implications

Prenatal brain changes seem to contribute to brain changes widely reported in preterm children and adults. Thus, our findings highlight the importance of early (prenatal) identification of fetuses that will present postnatal

neurologic impairment, allowing the targeting of a high-risk population and the performance of preventive actions in the first months or years of life (including fetal life), when neuronal plasticity is maximum. The amniocentesis performed to rule in or rule out IAI helped to target the highest-risk group of neonates that merits further follow-up.

Future research

Future studies are needed to assess postnatal changes in these cohorts of patients and identify possible prenatal predictors of neurologic impairment. Prenatal neurologic risk evaluation could be extremely important, given the neurodevelopmental disorders reported in this population and the importance of early neurologic stimulation or prenatal therapies to improve outcomes.

Strengths and limitations

The main strengths of this study are the prospective design and recruitment of a well-characterized cohort of patients with PTL with intact membranes and/or PPROM with information on IAI. This cohort study was published with a

TABLE 5
Evaluation of amniotic fluid biomarkers in the entire study group

Variables	Group 1: IAI (n=41)	Group 2: non-IAI (n=54)	Control samples (n=20)	P value 1 (1 vs 2)	P value 2 (1 vs control)	P value 3 (2 vs control)	P value 4 (linearity trend among the 3 groups)
Gestational age at amniocentesis (wk)	28.9 (26.0–3.0)	27.7 (26.0–30.7)	29.2 (28.2–33.3)	.37	.22	.09	.02
Estimated fetal weight at ultrasound (g)	1150.0 (864.0–1547.0)	1362.5 (1066.5–1741.5)	1328.0 (1025.0–1991.0)	.14	.05	.26	.04
Neonatal sex (male)	26 (63.4)	32 (59.3)	12 (60.0)	.68	.92	.97	.74
Estimated fetal weight percentile	23.0 (9.5–60.5)	53.5 (22.5–70.0)	43.5 (22.5–63.0)	.01	.19	.49	.09
Neurospecific enolase (pg/mL)	11,804.55 (6213.40–21,098.75)	8397.70 (3682.10–17,398.30)	2393.65 (1717.05–3209.25)	.47 ^a	.001 ^b	<.001 ^b	<.001
Protein S100B (pg/mL)	2030.60 (993.00–4883.45)	1070.30 (365.10–1463.20)	74.80 (44.65–93.70)	.038 ^a	.048 ^b	<.001 ^b	<.001
Glial fibrillary acidic protein (ng/mL)	1.010 (0.540–3.880)	0.965 (0.590–2.070)	0.240 (0.200–0.280)	.95 ^a	.18 ^b	.15 ^b	.002
Detectable glial fibrillary acidic protein ^c	68.29	62.96	30.00	.59 ^a	.002 ^b	.005 ^b	.010

Data are presented as median (interquartile range) for quantitative variables or number (percentage) for qualitative variables, unless otherwise indicated.

^a Adjusted for percentile, fetal sex, and gestational age at amniocentesis and preterm premature rupture of membranes at admission; ^b Adjusted for percentile, fetal sex, and gestational age at amniocentesis; ^c Including only the sample levels of detectable glial fibrillary acidic protein.

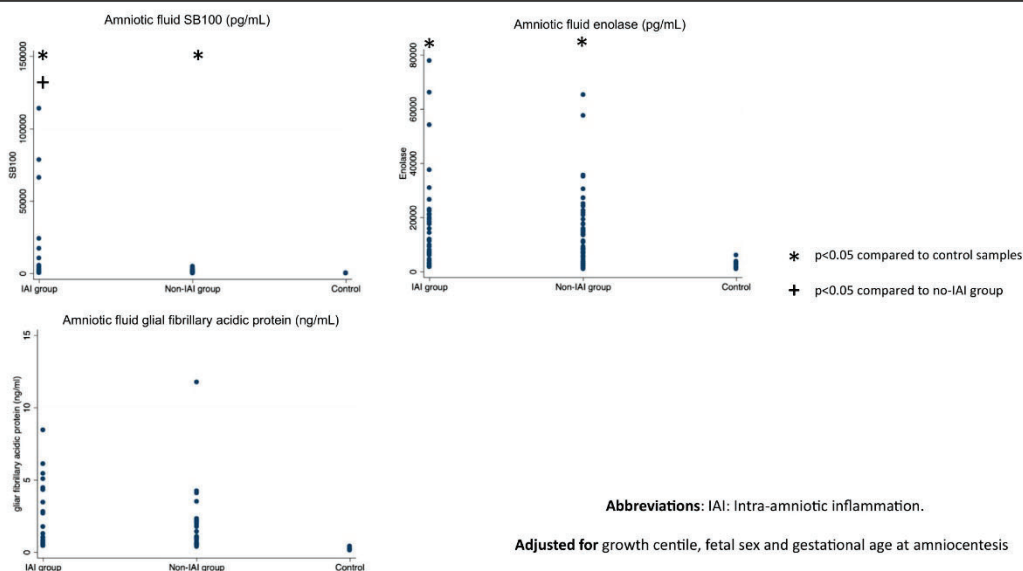
Murillo. Antenatal brain injury in fetuses presenting with preterm labor with intact membranes or preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol 2024.

complete fetal brain evaluation, including both neurosonography and brain damage amniotic fluid biomarkers. Another strength is that the amniotic fluid brain damage biomarkers found in the control samples were concordant with those reported in previous studies.^{9,69} Although MRI is considered a gold standard technique for brain evaluation, neurosonography has been shown to be an adequate method to evaluate brain structures^{17–19} and has been demonstrated to be sensitive to show prenatal brain changes in placental disease,^{18,70} congenital heart disease,⁷¹ ventriculomegaly,⁷² and reproductive assistance techniques.⁷³ Compared with MRI, neurosonography is more accessible in the clinical setting, is rapid to perform, is cheaper, and is not affected by issues related to the patient, such as claustrophobia.

However, we also acknowledge some limitations. We excluded cases with imminent delivery without fetal neurosonography and cases with anhydramnios without amniocentesis because of technical limitations. It remains unknown whether these patients may have a different profile than those studied. In addition, we acknowledge the lack of molecular techniques to diagnose IAI as another limitation. It is possible that some of these patients had a positive culture for fungi or viruses and were not detected. Another limitation was the lack of a clear and universal definition of IAI. Here, inflammation was defined according to amniotic fluid IL-6 concentrations, but other authors included other inflammatory biomarkers.^{74,75} In addition, we acknowledge that only 69% of patients with PTL with intact membranes or PPROM had an optimal corpus callosum image to assess the areas. Oligohydramnios, fetal position, and limited vaginal examination in patients with PTL with intact membranes and PPROM because of the high risk of spontaneous preterm delivery in this group were the main determinants of the lack of assessment of these areas.

Finally, we acknowledge as a limitation that no postnatal follow-up was included. Further research is warranted to prospectively evaluate neurologic

FIGURE 5
Amniotic fluid biomarkers comparison in the entire study group



IAI, intra-amniotic inflammation.

Murillo. Antenatal brain injury in fetuses presenting with preterm labor with intact membranes or preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2024.

changes postnatally in these cohorts before changing the clinical management in these patients.

Conclusions

Our findings suggest that structural brain changes, including smaller cerebellum, corpus callosum medium-posterior areas, and impaired cortical development in premature infants and adults, may already be present in fetal life at the time when symptoms of PTL with intact membranes and/or PPROM occur, especially in those with IAI. The observation of elevated concentrations of amniotic fluid NSE, protein S100B, and GFAP strengthened our neurosonographic findings and supported the hypothesis of the presence of prenatal brain injury in fetuses with PTL with intact membranes or PPROM, regardless of being born before term or at term and the exposition to IAI.

References

- Engelhardt E, Inder TE, Alexopoulos D, et al. Regional impairments of cortical folding in premature infants. *Ann Neurol* 2015;77:154–62.
- Hinojosa-Rodríguez M, Harmony T, Carrillo-Prado C, et al. Clinical neuroimaging in the preterm infant: diagnosis and prognosis. *NeuroImage Clin* 2017;16:355–68.
- Hart AR, Whitby EW, Griffiths PD, Smith MF. Magnetic resonance imaging and developmental outcome following preterm birth: review of current evidence. *Dev Med Child Neurol* 2008;50:655–63.
- Paules C, Pueyo V, Martí E, et al. Threatened preterm labor is a risk factor for impaired cognitive development in early childhood. *Am J Obstet Gynecol* 2017;216:157.e1–7.
- Campos-Berga L, Moreno-Giménez A, Sahuquillo-Leal R, et al. Emotional regulation and psychomotor development after threatening preterm labor: a prospective study. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 2022;31:473–81.
- Story L, Davidson A, Patkee P, et al. Brain volumetry in fetuses that deliver very preterm: an MRI pilot study. *NeuroImage Clin* 2021;30:102650.
- Thomason ME, Scheinost D, Manning JH, et al. Weak functional connectivity in the human fetal brain prior to preterm birth. *Sci Rep* 2017;7:39286.
- Elimian A, Figueroa R, Verma U, Visintainer P, Sehgal PB, Tejani N. Amniotic fluid neuron-specific enolase: a role in predicting neonatal neurologic injury? *Obstet Gynecol* 1998;92:546–50.
- Friel LA, Romero R, Edwin S, et al. The calcium binding protein, S100B, is increased in the amniotic fluid of women with intra-amniotic infection/inflammation and preterm labor with intact or ruptured membranes. *J Perinat Med* 2007;35:385–93.
- Rodríguez-Trujillo A, Ríos J, Ángeles MA, et al. Influence of perinatal inflammation on the neurodevelopmental outcome of premature infants. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2019;32:1069–77.
- Yoon BH, Romero R, Park JS, et al. Fetal exposure to an intra-amniotic inflammation and the development of cerebral palsy at the age of three years. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182:675–81.
- Polglase GR, Nitsos I, Baburamani AA, et al. Inflammation in utero exacerbates ventilation-induced brain injury in preterm lambs. *J Appl Physiol* (1985) 2012;112:481–9.
- Normann E, Lacaze-Masmonet T, Eaton F, Schwendemann L, Gressens P, Thébaud B. A novel mouse model of Ureaplasma-induced perinatal inflammation: effects on lung and brain injury. *Pediatr Res* 2009;65:430–6.
- Hagberg H, Mallard C, Jacobsson B. Role of cytokines in preterm labour and brain injury. *BJOG* 2005;112(Suppl1):16–8.
- Ophelders DRMG, Gussenhoven R, Lammens M, et al. Neuroinflammation and structural injury of the fetal ovine brain following

- intra-amniotic *Candida albicans* exposure. *J Neuroinflammation* 2016;13:29.
16. Saito M, Matsuda T, Okuyama K, et al. Effect of intrauterine inflammation on fetal cerebral hemodynamics and white-matter injury in chronically instrumented fetal sheep. *Am J Obstet Gynecol* 2009;200:663.e1–11.
 17. Paladini D, Malinge G, Birnbaum R, et al. ISUOG Practice Guidelines (updated): sonographic examination of the fetal central nervous system. Part 2: performance of targeted neurosonography. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2021;57:661–71.
 18. Paules C, Miranda J, Policiano C, et al. Fetal neurosonography detects differences in cortical development and corpus callosum in late-onset small fetuses. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2021;58:42–7.
 19. Hagmann CF, Robertson NJ, Leung WC, Chong KW, Chitty LS. Foetal brain imaging: ultrasound or MRI. A comparison between magnetic resonance imaging and a dedicated multidisciplinary neurosonographic opinion. *Acta Paediatr* 2008;97:414–9.
 20. Higgins RD, Saade G, Polin RA, et al. Evaluation and management of women and newborns with a maternal diagnosis of chorioamnionitis: summary of a workshop. *Obstet Gynecol* 2016;127:426–36.
 21. Crispí F, Llurba E, Pedrero C, et al. Curvas de normalidad de la longitud cervical ecográfica según edad gestacional en población española. *Progr Obstet Ginecol* 2004;47:264–71.
 22. Cobo T, Palacio M, Martínez-Terrón M, et al. Clinical and inflammatory markers in amniotic fluid as predictors of adverse outcomes in preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2011;205:126.e1–8.
 23. Cobo T, Palacio M, Navarro-Sastre A, et al. Predictive value of combined amniotic fluid proteomic biomarkers and interleukin-6 in preterm labor with intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2009;200:499.e1–6.
 24. Hadlock FP, Shah YP, Kanon DJ, Lindsey JV. Fetal crown-rump length: reevaluation of relation to menstrual age (5–18 weeks) with high-resolution real-time US. *Radiology* 1992;182:501–5.
 25. Hadlock FP, Harrist RB, Carpenter RJ, Deter RL, Park SK. Sonographic estimation of fetal weight. The value of femur length in addition to head and abdomen measurements. *Radiology* 1984;150:535–40.
 26. Malinge G, Paladini D, Haratz KK, Monteagudo A, Pilu G, Timor-Tritsch IE. ISUOG Practice Guidelines (updated): sonographic examination of the fetal central nervous system. Part 1: performance of screening examination and indications for targeted neurosonography. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2020;56:476–84.
 27. Neurosonografía fetal. [medicinafetalbarcelona website]. *Medicinafetalbarcelona*. Available at: https://medicinafetalbarcelona.org/protocolos/es/patologia-fetal/Neurosonografia_fetal.html. Accessed October 2022.
 28. Chavez MR, Ananth CV, Smulian JC, Yeo L, Oyelese Y, Vintzileos AM. Fetal transcerebellar diameter measurement with particular emphasis in the third trimester: a reliable predictor of gestational age. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:979–84.
 29. Ginath S, Lerman-Sagie T, Haratz Kraiden KH, et al. The Fetal vermis, pons and brainstem: normal longitudinal development as shown by dedicated neurosonography. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2013;26:757–62.
 30. Napolitano R, Molloy M, Donadono V, et al. International standards for fetal brain structures based on serial ultrasound measurements from Fetal Growth Longitudinal Study of INTERGROWTH-21st Project. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2020;56:575–70.
 31. Viñals F, Correa F, Gonçalves-Pereira PM. Anterior and posterior complexes: a step towards improving neurosonographic screening of midline and cortical anomalies. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015;46:585–94.
 32. Sari A, Ahmetoglu A, Dinc H, et al. Fetal biometry: size and configuration of the third ventricle. *Acta Radiol* 2005;46:631–5.
 33. Leibovitz Z, Shkolnik C, Haratz KK, Malinge G, Shapiro I, Lerman-Sagie T. Assessment of fetal midbrain and hindbrain in mid-sagittal cranial plane by three-dimensional multiplanar sonography. Part 1: comparison of new and established nomograms. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2014;44:575–80.
 34. Falco P, Gabrielli S, Visentin A, Perolo A, Pili G, Bovicelli L. Transabdominal sonography of the cavum septum pellucidum in normal fetuses in the second and third trimesters of pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2000;16:549–53.
 35. Malinge G, Lerman-Sagie T, Achiron R, Lipitz S. The subarachnoid space: normal fetal development as demonstrated by transvaginal ultrasound. *Prenat Diagn* 2000;20:890–3.
 36. Alonso I, Borenstein M, Grant G, Narbona I, Azumendi G. Depth of brain fissures in normal fetuses by prenatal ultrasound between 19 and 30 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2010;36:693–9.
 37. Hahner N, Puerto B, Perez-Cruz M, et al. Altered cortical development in fetuses with isolated nonsevere ventriculomegaly assessed by neurosonography. *Prenat Diagn* 2018;38:365–75.
 38. Pistorius LR, Stoutenbeek P, Groenendaal F, et al. Grade and symmetry of normal fetal cortical development: a longitudinal two- and three-dimensional ultrasound study. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2010;36:700–8.
 39. Achiron R, Achiron A. Development of the human fetal corpus callosum: a high-resolution, cross-sectional sonographic study. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2001;18:343–7.
 40. Montede E, Pérez Cruz M, Eixarch E, Bonet-came E, Domínguez M. Corpus callosum length and area measurements, an open source software for ultrasound and MR images. Virtual poster No. 1934 Organization for human Brain Mapping (OHBM) Annual Meeting.
 41. Witelson SF. The brain connection: the corpus callosum is larger in left-handers. *Science* 1985;229:665–8.
 42. Cobo T, Burgos-Artizzu XP, Collado MC, et al. Noninvasive prediction models of intra-amniotic infection in women with preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 2023;228:78.e1–13.
 43. Cobo T, Aldecoa V, Figueras F, et al. Development and validation of a multivariable prediction model of spontaneous preterm delivery and microbial invasion of the amniotic cavity in women with preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 2020;223:421.e1–14.
 44. Limperopoulos C, Soul JS, Gauvreau K, et al. Late gestation cerebellar growth is rapid and impeded by premature birth. *Pediatrics* 2005;115:688–95.
 45. Welsh JP, Yuen G, Placantonakis DG, et al. Why do Purkinje cells die so easily after global brain ischemia? Aldolase C, EAAT4, and the cerebellar contribution to posthypoxic myoclonus. *Adv Neurol* 2002;89:331–59.
 46. Pierrat V, Marchand-Martin L, Arnaud C, et al. Neurodevelopmental outcome at 2 years for preterm children born at 22 to 34 weeks' gestation in France in 2011: EPIPAGE-2 cohort study. *BMJ* 2017;358:j3448.
 47. Bodensteiner JB, Johnsen SD. Cerebellar injury in the extremely premature infant: newly recognized but relatively common outcome. *J Child Neurol* 2005;20:139–42.
 48. Allin M, Matsumoto H, Santhouse AM, et al. Cognitive and motor function and the size of the cerebellum in adolescents born very pre-term. *Brain* 2001;124:60–6.
 49. Dubois J, Lefèvre J, Angleys H, et al. The dynamics of cortical folding waves and prematurity-related deviations revealed by spatial and spectral analysis of gyrification. *Neuroimage* 2019;185:934–46.
 50. Shimony JS, Smyser CD, Wideman G, et al. Comparison of cortical folding measures for evaluation of developing human brain. *Neuroimage* 2016;125:780–90.
 51. Dean JM, van de Looij Y, Sizonenko SV, et al. Delayed cortical impairment following lipopolysaccharide exposure in preterm fetal sheep. *Ann Neurol* 2011;70:846–56.
 52. Egaña-Ugrinovic G, Sanz-Cortes M, Figueras F, Couve-Perez C, Gratacós E. Fetal MRI insular cortical morphometry and its association with neurobehavior in late-onset small-for-gestational-age fetuses. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2014;44:322–9.
 53. Gasquoin PG. Contributions of the insula to cognition and emotion. *Neuropsychol Rev* 2014;24:77–87.
 54. Craig AD. Significance of the insula for the evolution of human awareness of feelings from the body. *Ann N Y Acad Sci* 2011;1225:72–82.
 55. De León Reyes NS, Bragg-Gonzalo L, Nieto M. Development and plasticity of the corpus callosum. *Development* 2020;147:dev189738.
 56. Moses P, Courchesne E, Stiles J, Trauner D, Egaas B, Edwards E. Regional size reduction in the human corpus callosum following pre- and

- perinatal brain injury. *Cereb Cortex* 2000;10:1200–10.
57. Paul LK. Developmental malformation of the corpus callosum: a review of typical callosal development and examples of developmental disorders with callosal involvement. *J Neurodev Disord* 2011;3:3–27.
 58. van de Looij Y, Lodygensky GA, Dean J, et al. High-field diffusion tensor imaging characterization of cerebral white matter injury in lipopolysaccharide-exposed fetal sheep. *Pediatr Res* 2012;72:285–92.
 59. Nosarti C, Rushe TM, Woodruff PWR, Stewart AL, Rifkin L, Murray RM. Corpus callosum size and very preterm birth: relationship to neuropsychological outcome. *Brain* 2004;127:2080–9.
 60. Liu F, Cao S, Liu J, Du Z, Guo Z, Ren C. Ultrasound measurement of the corpus callosum and neural development of premature infants. *Neural Regen Res* 2013;8:2432–40.
 61. Rothermundt M, Ponath G, Arolt V. S100B in schizophrenic psychosis. *Int Rev Neurobiol* 2004;59:445–70.
 62. Nagdyman N, Kömen W, Ko HK, Müller C, Obladen M. Early biochemical indicators of hypoxic-ischemic encephalopathy after birth asphyxia. *Pediatr Res* 2001;49:502–6.
 63. Gazzolo D, Bruschetti M, Lituanian M, Serra G, Bonacci V, Michetti F. Increased urinary S100B protein as an early indicator of intraventricular hemorrhage in preterm infants: correlation with the grade of hemorrhage. *Clin Chem* 2001;47:1836–8.
 64. Rosén H, Sunnerhagen KS, Herlitz J, Blomstrand C, Rosengren L. Serum levels of the brain-derived proteins S-100 and NSE predict long-term outcome after cardiac arrest. *Resuscitation* 2001;49:183–91.
 65. Arca G, Arnaez J, Agut T, et al. Neuron-specific enolase is correlated with lesion topology, relative infarct volume and outcome of symptomatic NAIS. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2020;105:132–7.
 66. León-Lozano MZ, Arnaez J, Valls A, et al. Cerebrospinal fluid levels of neuron-specific enolase predict the severity of brain damage in newborns with neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy treated with hypothermia. *PLoS One* 2020;15:e0234082.
 67. Lopez J, Mikaelian I, Gonzalo P. Amniotic fluid glial fibrillary acidic protein (AF-GFAP), a biomarker of open neural tube defects. *Prenat Diagn* 2013;33:990–5.
 68. Azzolini F, Gilio L, Pavone L, et al. Neuroinflammation is associated with GFAP and sTREM2 levels in multiple sclerosis. *Biomolecules* 2022;12:222.
 69. Elmian A, Figueroa R, Patel K, Visintainer P, Sehgal PB, Tejani N. Reference values of amniotic fluid neuron-specific enolase. *J Matern Fetal Med* 2001;10:155–8.
 70. Basso A, Youssef L, Nakaki A, et al. Fetal neurosonography at 31–35 weeks reveals altered cortical development in pre-eclampsia with and without small-for-gestational-age fetus. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2022;59:737–46.
 71. Pérez-Cruz M, Gómez O, Gilbert M, et al. Corpus callosum size by neurosonography in fetuses with congenital heart defect and relationship with expected pattern of brain oxygen supply. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2022;59:220–5.
 72. Malinge G, Birnham R, Haratz KK. Dedicated neurosonography for recognition of pathology associated with mild-to-moderate ventriculomegaly. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2020;56:319–23.
 73. Boutet ML, Eixarch E, Ahumada-Droguett P, et al. Fetal neurosonography and infant neurobehavior following conception by assisted reproductive technology with fresh or frozen embryo transfer. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2022;60:646–56.
 74. Chaemsaitong P, Romero R, Docheva N, et al. Comparison of rapid MMP-8 and interleukin-6 point-of-care tests to identify intra-amniotic inflammation/infection and impending preterm delivery in patients with preterm labor and intact membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2018;31:228–44.
 75. Nien JK, Yoon BH, Espinoza J, et al. A rapid MMP-8 bedside test for the detection of intra-amniotic inflammation identifies patients at risk for imminent preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195:1025–30.
- (Hospital Clínic de Barcelona and Hospital Sant Joan de Déu), Institut Clínic de Ginecologia i Neonatologia, Barcelona, Spain (Drs Murillo, Eixarch, Rueda, Larroja, Boada, Grau, Ponce, and Aldecoa, Drs Monterde, Ferrero, and Arca, Ms Ros, and Drs Gratacós, Palacio, and Cobo); Fundació de Recerca Clínica Barcelona - Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain (Drs Murillo, Eixarch, Rueda, Larroja, Monterde, Andreu-Fernández, Arca, Oleaga, Gratacós, Palacio, and Cobo); Center for Biomedical Research on Rare Diseases, Institute of Health Carlos III, Madrid, Spain (Drs Eixarch, Gratacós, Palacio, and Cobo); Biosanitary Research Institute, Valencian International University, Valencia, Spain (Dr Andreu-Fernández); and Department of Radiology, Clinical Diagnostic Imaging Centre, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain (Dr Oleaga and Ms Hernández).
- Received Jan. 25, 2024; revised April 10, 2024; accepted April 23, 2024.
- E.E., M.P., and T.C. contributed equally as last authors of the article.
- The authors report no conflict of interest.
- This study is funded by the competitive grant "Ajut a la recerca Josep Font" from the Hospital Clínic de Barcelona. C.M. was employed by the same grant "Ajut a la recerca Josep Font" for 3 years to conduct this project. Amniotic fluid analysis and costs for publication were also funded by the Institute of Health Carlos III (proyectos de investigación en salud: PI19/00580 and PI22/00663). E.E. was partially supported by Convocatòria Intensificació Interna per als Professionals de l'Hospital Clínic de Barcelona 2023, granted by the Hospital Clínic de Barcelona.
- The findings of this article were presented in the following meetings: the 19th World Congress in Fetal Medicine, Fetal Medicine Foundation, Crete, Greece, June 26–30, 2022; the 32nd World Congress 2022 on Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, London, United Kingdom, September 16–18, 2023; the Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM) 43rd Annual Pregnancy Meeting, SMFM, San Francisco, CA, February 6–11, 2023; and the 20th World Congress in Fetal Medicine, Fetal Medicine Foundation, Valencia, Spain, June 25–29, 2023.
- Corresponding author: Eduard Gratacós, MD, PhD. gratacos@clinic.cat

Author and article information

From the BCNatal Fetal Medicine Research Center, Barcelona Center for Maternal-Fetal and Neonatal Medicine

SUPPLEMENTAL TABLE 1

Microorganisms isolated in the positive amniotic fluid cultures

Gestational age at amniocentesis (wk)	Microorganism isolated in amniotic fluid
23.3	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
30.9	<i>Peptoniphilus indolicus</i>
26.1	<i>Capnocytophaga sputigena</i> and <i>Fusobacterium</i> spp.
30.9	<i>U urealyticum</i>
32.4	<i>U urealyticum</i>
33.4	<i>U urealyticum</i>
26.1	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
27.6	<i>Peptoniphilus harei</i>
25.4	<i>F nucleatum</i>
29.0	<i>U urealyticum</i>
23.9	<i>U urealyticum</i>
30.1	<i>U urealyticum</i> and <i>Streptococcus mitis</i>
27.0	Extended spectrum beta-lactamase producing <i>Escherichia coli</i>
30.4	<i>U urealyticum</i>
27.4	<i>U urealyticum</i>
25.7	<i>U urealyticum</i>
26.9	<i>E coli</i> and <i>Bacteroides vulgatus</i>
29.9	<i>P indolicus</i>
26.1	<i>U urealyticum</i>

Murillo. Antenatal brain injury in fetuses presenting with preterm labor with intact membranes or preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol 2024.

SUPPLEMENTAL TABLE 2**Indications for amniocentesis in the nonexposed cohort**

Gestational age at amniocentesis (wk)	Indication for amniocentesis
25 0/7	Right renal agenesis
26 0/7	Aberrant left subclavian artery
26 3/7	Congenital talipes equinovarus
27 0/7	Aberrant right subclavian artery and congenital talipes equinovarus
28 0/7	Hyperechogenic fetal bowel
28 3/7	Moderate renal pyelectasis
28 4/7	SGA and long bones at -2 SD
28 5/7	Mild polyhydramnios + hyperechogenic fetal bowel
28 6/7	Mild renal pyelectasis
29 1/7	SGA
29 3/7	Hyperechogenic fetal bowel
29 6/7	Hyperechogenic fetal bowel
31 4/7	Hypospadias
32 0/7	Aberrant right subclavian artery and 2-mm muscular ventricular septal defect
33 0/7	SGA and muscular ventricular septal defect (2 mm)
33 6/7	Absent ductus venosus
35 1/7	SGA and muscular ventricular septal defect (2 mm)
35 3/7	Absent ductus venosus
36 1/7	Long bones at -1 to -2 SD
36 3/7	Long bones at -2 to -3 SD

All the amniocenteses were performed for extra brain reasons, the pregnancies did not present risk factors for brain anomalies, and normal results in the amniotic fluid analysis (genetics and infections) and healthy offspring were confirmed in all cases. SGA cases were all between the 3rd and 10th percentile with a normal Doppler study.

SD, standard deviations; SGA, Small for gestational age.

Murillo. Antenatal brain injury in fetuses presenting with preterm labor with intact membranes or preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol 2024.

SUPPLEMENTAL TABLE 3

Baseline, fetal, and perinatal characteristics according to the presence of IAI

Variables	Intra-amniotic infection (n=19)	Sterile IAI (n=22)	P value
Maternal and fetal characteristics			
Maternal age (y)	33.8 (30.5–37.0)	33.7 (28.2–37.6)	.39
Body mass index (kg/m ²)	22.7 (20.0–28.3)	23.0 (21.1–25.8)	.97
Race			
White	12/17 (70.1)	17/21 (81.0)	.56
Maghrebi	2/17 (11.8)	1/21 (4.8)	
Hispanic	1/17 (5.9)	3/21 (14.3)	
Asian	1/17 (5.9)	0 (0)	
Other	1/17 (5.9)	0 (0)	
Maternal smoking	0 (0)	2/39 (5.1)	.49
Primiparity	6 (33.3)	13 (59.1)	.11
Assisted reproductive technique	1/15 (6.7)	2/19 (10.5)	1.00
Gestational age at inclusion (wk)	27.6 (26.0–30.4)	28.9 (26.0–3.0)	.52
Days from inclusion to delivery (d)	9 (5–16)	13 (6–23)	.20
Perinatal data			
Neonatal sex (male)	11 (61.1)	15 (68.2)	.64
Gestational age at delivery (wk)	30.3 (27.4–32.1)	31.4 (28.3–33.0)	.19
Birthweight (g)	1300 (1040–1600)	1748 (1282–2240)	.03
Birthweight percentile	11.5 (3.0–21.0)	29.5 (6.0–51.0)	.33
Clinical chorioamnionitis at delivery	4 (21.1)	3 (13.6)	.69
Histologic funisitis or chorioamnionitis			
Acute chorioamnionitis without funisitis	8 (42.1)	4 (18.2)	.24
Acute chorioamnionitis + funisitis	7 (36.8)	12 (54.6)	
Cesarean delivery	12 (63.2)	6 (27.3)	.02
Induction of labor	4 (21.1)	3 (13.6)	.69
Noncephalic presentation	9 (47.4)	5 (22.7)	.10
Apgar score of <7 at 5 min	1/18 (5.6)	2/19 (10.5)	1.00
pH umbilical artery	7.26 (7.08–7.35)	7.27 (7.18–7.34)	.30
Neonatal intensive care unit admission	13/18 (72.2)	13/20 (65.0)	.63
Major neonatal morbidity ^a or mortality	6/18 (33.3)	8/20 (40.0)	.67

Data are presented as median (interquartile) for quantitative variables or number (percentage) or number/total number (percentage) for qualitative variables, unless otherwise indicated.

IAI, intra-amniotic inflammation.

^a Major complications defined by the presence of bronchopulmonary dysplasia, necrotizing enterocolitis, intraventricular hemorrhage, periventricular leukomalacia, retinopathy, or early-onset sepsis. Murillo. Antenatal brain injury in fetuses presenting with preterm labor with intact membranes or preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol 2024.

SUPPLEMENTAL TABLE 4

Clinical, ultrasound, and biochemical comparisons according to the presence of IAI

Variables	Intra-amniotic infection (n=19)	Sterile IAI (n=22)	P value
Preterm premature rupture of membranes at admission	13 (68.4)	15 (68.2)	.78
C-reactive protein (mg/L)	1.71 (1.22–3.10)	0.59 (0.23–1.01)	<.001
White cell count ($\times 10^9/L$)	13,915 (8720–17,950)	11,250 (8660–13,280)	.37
Neutrophils (%)	83 (80–89)	77 (73–88)	.14
Cervical length (mm)	20 (16–30)	21 (10–31)	.78
Amniotic fluid glucose (mg/dL)	20.5 (3.0–32.0)	25.5 (10.0–38.0)	<.001
Amniotic fluid interleukin 6 concentration (pg/mL)	67,994.45 (37,593.2–143,387.0)	17,600.4 (4282.1–33,581.8)	<.001
Positive amniotic fluid culture	19 (100.0)	0 (0)	<.001
Latency from admission to ultrasound (d)	1.5 (1.0–3.0)	2.0 (1.0–3.0)	.06

Data are presented as number (percentage) for qualitative variables or median (interquartile range) for quantitative variables, unless otherwise indicated.

IAI, intra-amniotic inflammation.

Murillo. Antenatal brain injury in fetuses presenting with preterm labor with intact membranes or preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2024.

SUPPLEMENTAL TABLE 5

Ultrasound fetal brain parameters in patients with IAI

Variables	Intra-amniotic infection (n=19)	Sterile IAI (n=22)	P value
Fetal-placental parameters			
Gestational age at ultrasound (wk)	27.6 (26.3–30.6)	29.2 (26.3–31.7)	.41
Estimated fetal weight at ultrasound (g)	980 (857–1508)	1230 (966–1712)	.37
Estimated fetal weight percentile	20 (10–43)	26 (7–64)	.83
Small for gestational age (estimated fetal weight < 10 th percentile)	5 (26.3)	6 (27.3)	.97
Umbilical artery pulsatility index	0.81 (0.71–0.98)	0.93 (0.73–1.16)	.12
Middle cerebral artery pulsatility index	1.81 (1.68–2.31)	1.82 (1.54–2.05)	.22
Ductus venosus pulsatility index	0.41 (0.31–0.59)	0.39 (0.31–0.53)	.59
Uterine arteries pulsatility index average	0.85 (0.63–1.10)	0.74 (0.63–0.845)	.89
Cephalic biometrics			
Biparietal diameter (mm)	66.0 (63.0–74.0)	71.5 (62.0–77.0)	.61
Frontal-occipital diameter (mm)	87 (84–92)	94 (83–99)	.35
Head circumference (mm)	246 (235–269)	264 (241–278)	.51
Cephalic index (%)	76.3 (73.9–79.3)	76.8 (73.7–78.6)	.53
Brain structures			
Transcerebellar diameter (mm)	32.7 (29.9–37.8)	33.4 (29.8–37.3)	.26
Cerebellar vermis AP diameter (mm)	14.30 (12.90–18.30)	14.75 (13.90–16.90)	.40
Cerebellar vermian height (mm)	16.60 (14.80–20.20)	17.35 (16.20–19.30)	.42
Pons AP diameter (mm)	19 (8.7–10.7)	10.8 (9.8–11.5)	.26
Insular depth ratio ^a	0.33 (0.32–0.34)	0.34 (0.32–0.35)	.39
Right anterior horn of the lateral ventricle (mm)	1.80 (1.65–2.15)	1.60 (1.00–2.00)	.20
Left anterior horn of the lateral ventricle (mm)	1.90 (1.25–2.40)	1.55 (1.30–2.55)	.73
Right posterior horn of the lateral ventricle (mm)	5.05 (4.25–5.50)	4.30 (3.50–4.60)	.09
Left posterior horn of the lateral ventricle (mm)	5.05 (4.05–5.50)	4.60 (4.00–5.50)	.66
Third ventricle (mm)	0.90 (0.75–1.20)	0.90 (0.50–1.40)	.47
Fourth ventricle height (mm)	2.8 (2.5–3.4)	2.8 (2.4–3.6)	.91
Fourth ventricle width (mm)	4.1 (2.8–4.4)	3.9 (3.3–4.8)	.80
Cavum septum pellucidum width (mm)	5.4 (4.9–6.8)	5.4 (4.6–6.3)	.35
Cisterna magna (mm)	5.8 (5.1–7.3)	5.2 (4.7–6.1)	.04
Subarachnoid craniocortical width (mm)	2.50 (2.20–3.40)	2.55 (2.30–3.10)	.41
Subarachnoid sinocortical width (mm)	2.00 (1.40–2.70)	1.85 (1.40–2.40)	.11
Cortical development			
Sylvian fissure grading	3.5 (3.0–4.0)	3.5 (3.0–4.0)	.70
Sylvian fissure depth ratio ^a	0.13 (0.12–0.15)	0.14 (0.13–0.16)	.18
Right parietooccipital sulcus grading	3 (2–4)	2 (2–4)	.44
Right parietooccipital sulcus depth ratio ^a	0.10 (0.06–0.12)	0.09 (0.07–0.12)	.98
Left parietooccipital sulcus grading	3 (2–4)	2 (2–4)	.19
Left parietooccipital sulcus depth ratio ^a	0.10 (0.06–0.11)	0.10 (0.08–0.12)	.42
Right cingulate sulcus grading	1.5 (1.0–4.0)	2.0 (1.0–4.0)	.91

Murillo. Antenatal brain injury in fetuses presenting with preterm labor with intact membranes or preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol 2024.(continued)

SUPPLEMENTAL TABLE 5

Ultrasound fetal brain parameters in patients with IAI (continued)

Variables	Intra-amniotic infection (n=19)	Sterile IAI (n=22)	P value
Right cingulate sulcus depth ratio ^a	0.02 (0.10–0.03)	0.03 (0.02–0.04)	.34
Left cingulate sulcus grading	1.0 (1.0–4.0)	2.5 (1.0–4.0)	.62
Left cingulate sulcus depth ratio ^a	0.03 (0.01–0.04)	0.03 (0.01–0.07)	.44
Right calcarine sulcus grading	4.0 (2.0–4.0)	4.0 (2.5–5.0)	.79
Right calcarine sulcus depth ratio ^a	0.13 (0.09–0.14)	0.14 (0.08–0.16)	.89
Left calcarine sulcus grading	4 (2–4)	4 (3–5)	.55
Left calcarine sulcus depth ratio ^a	0.13 (0.10–0.17)	0.13 (0.11–0.15)	.30
Corpus callosum			
Corpus callosum length (mm)	34.55 (31.65–37.00)	34.40 (31.60–37.10)	.41
Corpus callosum thickness (mm)	1.60 (1.50–1.80)	1.75 (1.50–2.00)	.45
Corpus callosum total area (mm ²) (n=9/15)	0.634 (0.483–0.797)	0.730 (0.633–0.823)	.87
Witelson subregion 1 (mm ²) (n=9/15)	0.040 (0.026–0.042)	0.027 (0.017–0.042)	.88
Witelson subregion 2 (mm ²) (n=9/15)	0.110 (0.074–0.113)	0.107 (0.081–0.131)	.94
Witelson subregion 3 (mm ²) (n=9/15)	0.130 (0.101–0.170)	0.159 (0.156–0.169)	.44
Witelson subregion 4 (mm ²) (n=9/15)	0.066 (0.060–0.096)	0.085 (0.068–0.098)	.38
Witelson subregion 5 (mm ²) (n=9/15)	0.071 (0.051–0.090)	0.076 (0.056–0.084)	.67
Witelson subregion 6 (mm ²) (n=9/15)	0.048 (0.045–0.062)	0.054 (0.046–0.066)	.63
Witelson subregion 7 (mm ²) (n=9/15)	0.212 (0.115–0.236)	0.216 (1.177–0.231)	.83

Data are presented as median (interquartile range) for quantitative variables or number (percentage) for qualitative variables, unless otherwise indicated. The results were adjusted for head circumference, percentile, fetal sex, and noncephalic presentation. The adjustment for head circumference was not included in the cephalic biometrics, depth ratios, and sulcus operculization. Occipitofrontal diameter was considered instead of head circumference in the corpus callosum length adjustment.

AP, anteroposterior; IAI, intra-amniotic inflammation.

^a Depth ratios: insular or sulcus depth (mm) to biparietal diameter (mm).

Murillo. Antenatal brain injury in fetuses presenting with preterm labor with intact membranes or preterm premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol 2024.

SUPPLEMENTAL TABLE 6

Amniotic fluid biomarkers concentrations according to the presence of IAI

Variables	Intra-amniotic infection (n=19)	Sterile IAI (n=22)	P value
Neuron-specific enolase (pg/mL)	15,073.25 (9160.3–21,230.6)	6983.45 (3946.4–20,966.9)	.61
Protein S100B (pg/mL)	3573.9 (1307.4–17,158.3)	1657.8 (758.8–2533.2)	.02
Glial fibrillary acidic protein (ng/mL)	1.39 (0.63–3.88)	0.82 (0.51–4.25)	.53
Detectable glial fibrillary acidic protein (%)	63.16	72.73	.51

Data are presented as median (interquartile range) for quantitative variables, unless otherwise indicated. The *P* values were adjusted for percentile, fetal sex, gestational age at amniocentesis, and preterm premature rupture of membranes at admission.

IAI, intra-amniotic inflammation.

^aIncluding only the sample levels of detectable glial fibrillary acidic protein.

Murillo. Antenatal brain injury in fetuses presenting with preterm labor with intact membranes or preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2024.

SUPPLEMENTAL TABLE 7

Correlation between amniotic fluid interleukin 6 concentrations and brain structures and amniotic fluid biomarkers in preterm labor with intact membranes and preterm premature rupture of membranes groups

Brain structures	Pearson correlation coefficient	P value
Transcerebellar diameter (mm)	−0.25	.02
Cerebellar vermis height (mm)	−0.16	.16
Insular depth ratio ^a	0.03	.75
Left Levene ventricular index (mm)	−0.10	.46
Fourth ventricular width (mm)	−0.07	.60
Sylvian fissure depth ratio ^a	−0.17	.13
Right parieto-occipital sulcus depth ratio ^a	−0.28	.01
Right cingulate sulcus depth ratio ^a	−0.25	.04
Corpus callosum length (mm)	−0.19	.10
Corpus callosum total area (mm ²)	−0.26	.039
Witelson subregion 1 (mm ²)	0.10	.43
Witelson subregion 2 (mm ²)	−0.16	.22
Witelson subregion 3 (mm ²)	−0.25	.048
Witelson subregion 4 (mm ²)	−0.16	.22
Witelson subregion 5 (mm ²)	−0.22	.09
Witelson subregion 6 (mm ²)	−0.25	.048
Witelson subregion 7 (mm ²)	−0.30	.019
Amniotic fluid neuron-specific enolase (pg/mL)	0.86	.019
Amniotic fluid protein S100B (pg/mL)	0.40	.09
Amniotic fluid glial fibrillary acidic protein (ng/mL)	0.93	.01

^a Depth ratios: insular or sulcus depth (mm) to biparietal diameter (mm).

Murillo. Antenatal brain injury in fetuses presenting with preterm labor with intact membranes or preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2024.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Tanto en el **Estudio 1** como en el **Estudio 2**, todas las pacientes que presentaron infección intra-amniótica, presentaron inflamación asociada. Es por ello que a partir de ahora, para simplificar la nomenclatura, al grupo que incluye pacientes con infección y/o inflamación intra-amniótica, lo denominaremos siempre como el grupo con inflamación intra-amniótica. Formarán parte de este grupo tanto pacientes con infección intra-amniótica asociada a inflamación, como pacientes con inflamación estéril.

Los principales resultados de la presente tesis se resumen en los siguientes puntos:

1. Los fetos de pacientes con APP o RPM pretérmino presentan una hipertrofia miocárdica concéntrica y una disfunción diastólica subclínica con tiempos diastólicos alargados y sistólicos acortados, pero con una función sistólica y un gasto cardíacos conservados.
2. Igualmente, se ha observado una sobreexpresión en líquido amniótico de los biomarcadores de sobrecarga y daño cardíaco troponina I y NT-proBNP.
3. Estos signos de remodelado y disfunción cardíaca subclínica son más pronunciados en los fetos que presentan inflamación intra-amniótica.
4. Los fetos de pacientes con APP o RPM pretérmino presentan una alteración en la maduración cortical (cisura de Silvio y parieto-occipital derecha menos profundas) y una reducción en el área total del cuerpo calloso a expensas de las regiones medio-posteriores. Además, en el grupo de APP o RPM pretérmino con inflamación intra-amniótica se ha observado una reducción del cerebelo fetal.
5. Se ha observado una sobreexpresión en líquido amniótico de los biomarcadores de daño cerebral proteína SB100 y ENE.
6. Estos hallazgos de afectación cerebral son más pronunciados en los fetos que presentan inflamación intra-amniótica.

1. REMODELADO Y DISFUNCIÓN CARDÍACA Y CEREBRAL FETAL

1.1 Cambios ecográficos cardiovasculares y cerebrales fetales en amenaza de parto pretérmino y rotura prematura de membranas pretérmino. Influencia de la inflamación intra-amniótica.

El tipo de remodelado cardíaco y de disfunción que se reporta en el **Estudio 1** es totalmente concordante con los cambios cardiovasculares observados en estudios de niños y adultos nacidos prematuros: una hipertrofia cardíaca concéntrica con reducción de las cavidades ventriculares sin cardiomegalia y una disfunción subclínica, principalmente diastólica (161-163, 165). Estos resultados sugieren que los cambios cardiovasculares descritos en niños y adultos nacidos prematuros tienen, en parte, un origen prenatal y, por tanto, que la programación fetal cardiovascular también existe en pacientes con APP y RPM pretérmino.

En el **Estudio 1** observamos, en pacientes con APP o RPM pretérmino, un índice Tei alargado a expensas de una reducción del tiempo de eyección y un índice de relajación isovolumétrica alargado. Este hallazgo es concordante con una hipertrofia miocárdica, que dificulta la relajación cardíaca, pero favorece la contracción. Estos resultados van en línea con los observados por Letti Müller y cols., que describen en fetos con RPM pretérmino un índice Tei alargado a expensas de un tiempo de eyección acortado (211).

Sin embargo, nuestros resultados difieren de los observados por otros autores como Romero y cols. (209) y Di Naro y cols. (210), los cuales describen una alteración de la función diastólica del ventrículo izquierdo y derecho, respectivamente, en fetos de madres con RPM pretérmino, siendo más pronunciados en aquellos fetos expuestos a infección intra-amniótica. Ambos autores describen un corazón que presenta una relajación ventricular aumentada con menor contribución del llenado activo (contracción auricular). Estos autores sugieren que se trata de un escenario similar al observado en el shock séptico del adulto. Las diferencias con nuestro estudio podrían explicarse porque no son estudios comparables, ni en la población de estudio ni en la metodología utilizada. Así, incluyen pacientes con corioamnionitis clínica, hecho que podría explicar que los hallazgos fetales fueran más comparables con los del shock séptico del adulto. Además, no incluyen pacientes con APP ni el estudio de la morfología cardíaca en su exploración ecocardiográfica. Romero y cols. únicamente realiza un estudio Doppler pulsado diastólico, mientras que DiNaro y cols. valoran la deformación y la contractilidad miocárdica,

pero no la morfología cardíaca. La fortaleza de nuestro estudio es que estudia el remodelado cardíaco y la disfunción cardíaca antes de la aparición de la corioamnionitis clínica, en una etapa subclínica y más frecuente. Asimismo, realiza una caracterización exhaustiva no sólo de la función sino también de la morfología cardíaca.

Los resultados del **Estudio 1**, también difieren de los reportados por Aye y cols. (121), que no observan diferencias a nivel cardiovascular en fetos que nacerán prematuros. Sin embargo, de nuevo, su población de estudio no es comparable con la nuestra ya que incluye partos pretérmino espontáneos e indicados médicamente a diferencia de nuestro estudio que únicamente tiene en consideración los partos pretérmino espontáneos. Además, la edad gestacional media que reportan en el momento del parto es de 34 semanas de gestación, a diferencia de nuestro grupo con inflamación intra-amniótica, que presenta una mediana de edad gestacional en el momento del parto de 31 semanas. Por lo tanto, la prevalencia de infección o inflamación intra-amniótica en su población es posiblemente baja (72, 73).

Los hallazgos del **Estudio 2** a nivel de reducción del cuerpo calloso y del cerebelo y del retraso en la maduración cortical son totalmente concordantes con parte de los cambios postnatales descritos en nacidos prematuros de estudios previos (179, 180, 178), por lo que parece lógico atribuir parte de los cambios postnatales a la etapa prenatal.

Existen pocos estudios que hayan evaluado la neuroimagen de fetos de madres con APP o RPM a pesar de que existe evidencia de la asociación de la APP o la inflamación intra-amniótica con peor neurodesarrollo, independientemente de la edad gestacional al parto como ya se ha descrito en el punto 4.3.1 (Programación fetal neurológica y prematuridad). Los dos estudios que existen sobre neuroimagen fetal en este contexto (256, 257) están realizados ambos con resonancia magnética y mayoritariamente evalúan parámetros que no se han evaluado en el **Estudio 2**, como el volumen de líquido cefalorraquídeo, volumen cerebral y conectividad neuronal, por lo que a pesar de que se sugiere que existe afectación cerebral fetal en estos casos (en línea con los resultados presentados), los resultados son poco comparables entre sí.

Stori y cols. sí que evaluaron específicamente el volumen cerebelar sin encontrar diferencias entre grupos (256). Esta discrepancia con nuestros resultados, donde se evidencia una

reducción del diámetro transversal del cerebelo y de la altura del vermis, podría deberse a varios factores: primero, la cohorte evaluada en el trabajo de Stori y cols. es heterogénea: se mezclan pacientes con RPM pretérmino y pacientes asintomáticas con antecedentes de parto pretérmino. Además, no subclasifican según la existencia o no de inflamación intra-amniótica. Por otro lado, el estudio con resonancia magnética se realizó alrededor de las 26 semanas de gestación, mientras que la neurosonografía del **Estudio 2** se realizó de media a las 29 semanas. Dado que el cerebelo presenta su etapa más importante de crecimiento a partir de las 28 semanas de gestación, es lógico pensar que no se encontrasen diferencias a las 26 semanas, pero sí a las 29 semanas. Además, la concordancia con la reducción del volumen cerebelar postnatal ya descrito y que el aumento del crecimiento del cerebelo lo hace especialmente vulnerable a insultos infecciosos/inflamatorios (278), refuerza nuestro resultado.

Respecto al desarrollo cortical, éste es el primer estudio que evalúa el desarrollo cortical fetal en pacientes con APP o RPM pretérmino. Nuestros resultados van en línea con los reportados en niños prematuros, describiendo una reducción de la profundidad de la cisura de Silvio junto con una ínsula más profunda (279,280). La alteración en el desarrollo cortical se ha asociado a peor neurodesarrollo, autismo y disfunciones del lenguaje, hallazgos también asociados a la prematuridad (281, 282). Además, estos cambios han podido observarse también en modelo animal con infusión intra-amniótica de lipopolisacáridos (283).

Respecto al cuerpo calloso, tampoco existen estudios previos en humanos que evalúen su estructura en fetos de madres con APP, RPM pretérmino o inflamación intra-amniótica. A pesar de ello, nuestros resultados son concordantes con la reducción del cuerpo calloso, especialmente de la parte posterior, observada a nivel postnatal en niños nacidos prematuros (179) y también con los hallazgos en modelo animal tras administración intra-amniótica de lipopolisacáridos (284). Las alteraciones estructurales del cuerpo calloso se han relacionado con peor neurodesarrollo neonatal (285) y también con desórdenes del lenguaje en adolescentes nacidos prematuros (286).

Concretamente en el **Estudio 2**, el cuerpo calloso presenta una reducción de las áreas medio-posteriores con las áreas anteriores y la longitud total preservadas. Esta afectación especialmente posterior es concordante con los hallazgos en prematuros y probablemente tenga su explicación en el desarrollo fisiológico del cuerpo calloso fetal. Durante los primeros

meses de embarazo el cuerpo calloso crece en longitud, mientras que el grosor aumenta en dirección anteroposterior más adelante, durante el tercer trimestre, momento en el cual se da el insulto de la APP o RPM pretérmino (287-289).

1.2 Cambios bioquímicos en líquido amniótico en amenaza de parto pretérmino y rotura prematura de membranas pretérmino. Influencia de la inflamación intra-amniótica.

Una de las fortalezas del **Estudio 1** es confirmar la disfunción cardíaca observada en las ecocardiografías fetales también en el líquido amniótico. Así, las pacientes con APP o RPM pretérmino presentan una sobreexpresión en líquido amniótico de NT-proBNP y troponina I, considerados biomarcadores de disfunción cardíaca (218-220, 223, 224).

En condiciones fisiológicas, las concentraciones de NT-proBNP disminuyen conforme avanza la gestación (215). Aunque la edad gestacional en la obtención de la muestra fue similar en los grupos con APP o RPM pretérmino y en el grupo control, no detectamos NT-proBNP en este último, posiblemente porque sus concentraciones estaban por debajo del límite de detección de la técnica utilizada. A pesar de esta limitación, sí observamos la sobreexpresión de NT-proBNP en pacientes con APP o RPM pretérmino, especialmente en el grupo con inflamación intra-amniótica. Resultados contrarios se han reportado por Irani y cols. que no encontraron diferencias en las concentraciones de NT-proBNP en líquido amniótico en fetos con y sin infección y/o inflamación intra-amniótica severa (221). Estas diferencias con nuestros resultados podrían deberse a diferencias en la población de estudio: solamente incluyeron casos con dilatación cervical de más de 2 cm, dinámica uterina resistente a tocolisis o fiebre materna. En el caso del **Estudio 1**, se excluyeron los casos de fiebre materna y se incluyeron todas las APP y RPM, independientemente de la dilatación cervical o la respuesta al tratamiento. A diferencia del **Estudio 1** donde se detectaron un 26% de fetos por debajo del percentil 10 en el grupo con inflamación intra-amniótica, no hubo ningún caso de retardo de crecimiento intrauterino en el estudio de Irani y cols. Dado que sus pacientes sin infección ni inflamación intra-amniótica severa presentaban una edad gestacional al parto significativamente menor que el grupo sin inflamación intra-amniótica del **Estudio 1** (31 semanas vs. 37 semanas de gestación, respectivamente), se reclutaron en unas condiciones mas avanzadas o refractarias al tratamiento, y solamente se clasificaron en el grupo con

infección/inflamación aquellas con inflamación intra-amniótica severa, sus grupos de comparación probablemente sean más similares entre sí que los nuestros. Por último, su tamaño de muestra fue pequeño por lo que no puede descartarse un problema de potencia en su estudio.

Respecto la troponina I, no existen estudios previos que hayan evaluado su comportamiento en líquido amniótico en pacientes con APP o RPM pretérmino, así como tampoco existen curvas de normalidad en líquido amniótico. A pesar de ello, concentraciones en líquido amniótico de 200-400 pg/mL de media se han relacionado con daño e hipoxia miocárdica (225). Las pacientes con APP o RPM pretérmino de nuestro estudio presentaron concentraciones alrededor de 1100 pg/mL en el grupo sin inflamación intra-amniótica y de 1400 pg/mL en el grupo con inflamación intra-amniótica de media sugiriendo, incluso, mayor afectación cardíaca que los estudios publicados.

El aumento de ENE, proteína SB100 y GFAP en líquido amniótico en las pacientes con APP o RPM pretérmino, especialmente en el grupo de inflamación intra-amniótica refuerza y complementa los resultados neurosonográficos descritos en el **Estudio 2**.

En cuanto a las concentraciones de ENE en líquido amniótico, las concentraciones alrededor de 2.5 mcg/L determinadas en nuestras muestras de control son similares a las descritas en la literatura (258). Las concentraciones en pacientes con APP reportadas de media a las 28 semanas de gestación por Elimian y cols. fueron de alrededor de 9.5 mcg/L (261). Estas concentraciones son concordantes con las observadas en el **Estudio 2** en los grupos con APP o RPM pretérmino (8.4 mcg/L en pacientes sin inflamación intra-amniótica y 11.8 mcg/L en pacientes con inflamación intra-amniótica). En el estudio previo, Elimian y cols. también observaron que las concentraciones de ENE se correlacionaban con lesiones cerebrales postnatales, por lo que la sobreexpresión de ENE en las pacientes con APP o RPM pretérmino parece traducir la existencia de daño cerebral fetal.

A pesar de que la producción de ENE no es exclusiva del tejido neuronal cerebral (también se produce en órganos neuroendocrinos) y que puede aumentar en otras patologías fetales como el retraso de crecimiento intrauterino (290) o defectos del tubo neural (262), la sobreexpresión

que observamos en el **Estudio 2** no está en relación a estos factores, ya que se excluyeron fetos con patología fetal y los resultados están ajustados por el peso fetal estimado en el momento de la amniocentesis.

En referencia a las concentraciones obtenidas de proteína SB100 en líquido amniótico, los valores en nuestras muestras control son similares a los descritos por Friel y cols. en la gestación normal (mediana de 23.4 pg/mL (percentil 25-75: 23.3-182.8 pg/mL) (267) vs. 74.8 pg/mL (44.6-93.7 pg/mL) en el **Estudio 2**). Su aumento en pacientes con APP o RPM pretérmino, especialmente en pacientes con infección y/o inflamación intra-amniótica también se ha descrito en el estudio previo (267). A pesar de ello, las concentraciones detectadas en nuestras pacientes con inflamación intra-amniótica fueron superiores a las descritas previamente. Las diferencias podrían deberse a diferencias en la técnica utilizada o a distintos grupos de comparación. En ambos estudios es importante mencionar que el percentil 75 de los grupos con inflamación intra-amniótica es llamativamente alto, de alrededor de 20000-30000 en el estudio de Friel y cols. y de 48000 en el **Estudio 2**. Esto sugiere que existen ciertas pacientes en este grupo con una afectación especialmente acentuada. A pesar de que las concentraciones de proteína SB100 en líquido amniótico pueden aumentar en otras patologías como la preeclampsia y retraso de crecimiento intrauterino (266), en nuestro estudio no hubo diferencias entre grupos en cuanto a la proporción de preeclampsia y los resultados se ajustaron por el peso fetal estimado en el momento de la amniocentesis, por lo que dichos factores no pudieron influir en los hallazgos observados.

En cuanto a las concentraciones de GFAP en líquido amniótico, dado que las concentraciones normales reportadas en líquido amniótico son de alrededor de 0.06 ng/mL y el límite inferior de detección de nuestra técnica fue de 0.2 ng/mL, era esperable que la GFAP no fuera detectable en la mayoría de las muestras control. A pesar de que concentraciones elevadas en líquido amniótico se han correlacionado con defectos abiertos de tubo neural o *exitus* fetal (275), en nuestro estudio no se incluyeron fetos con esta patología y tampoco hubo diferencias en cuanto al porcentaje de *exitus* fetal. Las concentraciones de GFAP en líquido amniótico en pacientes con APP, RPM pretérmino o inflamación intra-amniótica no se habían evaluado previamente. Concentraciones séricas por encima de 0.06 ng/ mL en neonatos se han correlacionado con daño cerebral en prematuros (276). La concentración media de GFAP en

líquido amniótico del **Estudio 2** de alrededor de 1 ng/mL, lo que sugiere correlación con el daño cerebral que se ha descrito.

1.3 Hipótesis fisiopatológica de los cambios cardiovasculares y cerebrales fetales observados en pacientes con amenaza de parto pretérmino y rotura prematura de membranas pretérmino pretérmino.

El remodelado cardíaco y la disfunción cardíaca subclínica descritos a nivel fetal en el **Estudio 1** son claramente más marcados en aquellos expuestos a inflamación intra-amniótica. Dichos cambios cardiovasculares podrían tener un doble mecanismo. Por un lado, el daño miocárdico directo debido a la presencia de inflamación intra-amniótica y, por otro lado, el aumento de la postcarga debido al aumento de resistencias placentarias. Todo ello conduciría a un corazón con más masa miocárdica sin cardiomegalia (hipertrofia concéntrica) que permitiría al corazón eyectar sangre más de forma más eficiente pero que requiere más tiempo para relajarse. Todos estos cambios permiten que la función principal del corazón (mantener un gasto cardíaco apropiado para la correcta perfusión del organismo) esté preservada.

Los hallazgos cardiovasculares fueron muy similares en el subanálisis realizado en el grupo con inflamación intra-amniótica (infección asociada a inflamación intra-amniótica vs. inflamación estéril). Dado que todas las pacientes con infección presentaron inflamación intra-amniótica, posiblemente la causa principal de este daño miocárdico directo sea la respuesta inflamatoria independientemente de si va asociada a infección. Este insulto cardíaco directo se ha demostrado previamente en modelo animal. Así tras la inoculación intra-amniótica de lipopolisacáridos, se ha descrito una alteración de los genes implicados en el desarrollo cardíaco en primates (201), y una producción aguda de citocinas proinflamatorias en el miocardio con afectación cardiovascular fetal (202, 205, 206). El aumento de las concentraciones de troponina I observadas en líquido amniótico parece derivado de fenómenos de daño miocárdico, dado que no existe patología extracardíaca que justifique otra fuente de liberación (222,223). Así, el aumento de troponina I intra-amniótica en el grupo con inflamación intra-amniótica refuerza la hipótesis de que existe daño miocárdico directo.

Por otro lado, en estudios experimentales en modelo animal, la administración intra-amniótica de lipopolisacáridos también se ha relacionado con un aumento en las resistencias placentarias y un aumento de la postcarga cardíaca (202). Este aumento de presión es uno de los mecanismos principales que provocan hipertrofia cardíaca concéntrica sin cardiomegalia (184), mismo patrón que el observado en el **Estudio 1**. La sobreexpresión de NT-proBNP en líquido amniótico probablemente se debe al fenómeno de sobrecarga cardíaca que parece existir en estos fetos (216,219, 220).

No obstante, reconocemos que la inflamación intra-amniótica no debe ser el único factor que determine la disfunción cardíaca en pacientes con APP y RPM pretérmino ya que, en el grupo sin inflamación intra-amniótica, también se han detectados signos de disfunción cardíaca. Esto sugiere que la inflamación intra-amniótica es un determinante importante para el remodelado cardíaco, pero no el único. El origen de la disfunción en el grupo sin inflamación intra-amniótica es desconocido. Es un grupo heterogéneo de pacientes en el que no se han estudiado otras causas de APP/RPM salvo la relacionada con la inflamación/infección intra-amniótica, por lo que no podemos extraer conclusiones sobre la posible fisiopatología de los cambios cardiovasculares observados en este grupo.

En el **Estudio 1**, el porcentaje de fetos pequeños para edad gestacional fue superior en el grupo con APP o RPM pretérmino. Esto podría haber interferido en nuestros resultados sobre el remodelado cardíaco, pero es improbable por dos motivos: 1) el remodelado descrito en fetos con retraso de crecimiento intrauterino consiste en corazones con geometrías más globulares y, en casos severos, hipertrofia asociada a cardiomegalia con cavidades ventriculares dilatadas (184). El remodelado descrito en nuestra población es distinto. 2) Además, ajustamos los resultados ecocardiográficos por percentil fetal inferior al percentil 10 con el objetivo de reducir ese potencial factor de confusión.

Aunque existe evidencia de la presencia de remodelado cardíaco en poblaciones sometidas a técnicas de reproducción asistida, preeclampsia, hipertensión crónica, pacientes con VIH en tratamiento retroviral y pacientes diabéticas (184), no encontramos diferencias en la prevalencia de estas complicaciones en nuestra población de estudio por lo que no fue necesario ajustar por dichos factores de confusión.

Otro factor a valorar en la interpretación de nuestros resultados es la administración antenatal de corticoides. Ésta se ha asociado a enfermedad cardiovascular a largo plazo, especialmente cuando el parto se demora más de una semana y cuando se administran tandas repetidas de corticoides (291). La administración de betametasona intramuscular se ha asociado a una disminución transitoria de la frecuencia cardíaca fetal tras su administración en pacientes gestantes (292). A pesar de ello, no se evidenciaron diferencias significativas en cuanto a frecuencia cardíaca fetal entre nuestros grupos. Además, existe evidencia que reporta que el remodelado cardíaco que presentan de forma postnatal los prematuros no está influenciado por la administración de corticoides (291).

Respecto al **Estudio 2**, existen varios resultados que apuntan a un origen inflamatorio de los hallazgos neurológicos. Primero, los fetos del grupo con inflamación intra-amniótica presentan cambios de imagen y bioquímicos más pronunciados. Segundo, dado que en el subanálisis realizado dentro del grupo con inflamación intra-amniótica (infección asociada a inflamación intra-amniótica vs. inflamación estéril) no se evidencian diferencias y que no se ha reportado en nuestra cohorte ningún caso de infección sin inflamación, podemos hipotetizar que la causa principal de este daño es la inflamación intra-amniótica (independientemente de si se asocia o no a una infección). Por último, la correlación significativa entre las concentraciones de IL-6 y el tamaño del cerebelo, profundidad de las cisuras y áreas del cuerpo calloso refuerzan esta hipótesis.

Además, la exposición fetal en modelo animal a lipopolisacáridos se ha relacionado con daño cerebelar (293), retraso en el desarrollo cortical (285) y reducción del cuerpo calloso (286), lo cual refuerza esta hipótesis.

El hecho de que también existan cambios en el grupo de APP o RPM sin inflamación intra-amniótica sugiere que la presencia de esta inflamación es un determinante importante para el remodelado cerebral, pero no el único que existe en casos de APP o RPM pretérmino. Paralelamente al **Estudio 1**, las posibles causas que provocan estos cambios en el grupo sin inflamación intra-amniótica son, por el momento, desconocidas.

Además de la inflamación intra-amniótica, existen otros factores a discutir sobre el remodelado cerebral observado en pacientes con APP o RPM pretérmino que podrían ser considerados factores de confusión.

Incluimos fetos con retraso de crecimiento intrauterino (no estructural ni genético) en los grupos de comparación del **Estudio 2** dado que, en nuestra población, el insulto vascular/placentario forma parte de la etiopatología del parto pretérmino espontáneo. En nuestro estudio no encontramos diferencias en el estudio Doppler feto-placentario y la gran mayoría de los fetos con peso por debajo del percentil 10 tenían el diagnóstico de fetos pequeños para la edad gestacional (definidos por un percentil entre el 3 y el 10 con estudio Doppler feto-placentario normal). Dado que estos fetos pueden presentar cambios similares a los descritos en nuestro estudio, incluyendo una cisura de Silvio menos profunda con una ínsula más prominente y una reducción del cuerpo calloso (éste último solamente en los fetos con crecimiento intrauterino restringido), decidimos ajustar nuestros hallazgos por el porcentaje de fetos con peso fetal estimado por debajo del percentil 10 (233-236).

No hubo diferencias entre grupos en cuanto a uso de técnicas de reproducción asistida, pacientes con preeclampsia, hipertensión pregestacional, toma de fármacos antiretrovirales ni diabetes, por lo que no fue necesario tenerlos en consideración en el ajuste.

Las dosis repetidas de corticoides antenatales se han asociado postnatalmente a peor neurodesarrollo, alteraciones conductuales y defectos audiovisuales, especialmente si no se produce el parto en los días posteriores a la administración. La neuroimagen postnatal ha sido menos estudiada que los cambios clínicos, pero se ha reportado una reducción del perímetro cefálico al nacimiento en relación a dosis repetidas (294), un adelgazamiento cortical regional en neonatos finalmente nacidos a término (295) y un aumento del volumen de la amígdala en neonatos nacidos a término expuestos a altas dosis de corticoides a las 15 semanas de gestación (296). En el modelo animal fetal, los principales cambios se han demostrado en administración de dosis repetidas o en su administración en fetos a término. Se han demostrado cambios estructurales tras administración de una dosis de corticoides en el estudio anatomopatológico cerebral realizado unos días tras la administración, incluyendo una reducción del diámetro anteroposterior cerebral, una reducción de la profundidad y de la superficie cortical y una reducción del peso y del número de neuronas del hipocampo (297,298). En el **Estudio 2**, la

neurosonografía se realizó de media a las 48h del ingreso, por lo que la influencia de los corticoides sobre los hallazgos cerebrales fetales observados es poco probable. Tampoco hay estudios que evalúen la posible influencia de los corticoides sobre los biomarcadores de daño cerebral en líquido amniótico, aunque se ha demostrado una reducción en las concentraciones de proteína SB100 en sangre de cordón en neonatos prematuros nacidos en los siguientes 7 días tras la administración de corticoides en comparación con aquellos que no los recibieron o aquellos que nacieron una semana más tarde (299). En el modelo animal, se ha observado una reducción en las concentraciones de GFAP en el sistema nervioso central tras dosis repetidas de corticoides (300). Por lo tanto, la administración de corticoides no justificaría la sobreexpresión de biomarcadores de daño cerebral en nuestro estudio. Además, la amniocentesis se realizó en la mayoría de las pacientes antes de la administración de corticoides.

Dado que tanto el grupo con inflamación intra-amniótica como el grupo sin inflamación intra-amniótica que sufrieron cuadros de APP o RPM estuvieron tratados en su totalidad con betametasona, la posible contribución de la misma a las diferencias entre estos dos grupos queda también excluida.

2. FORTALEZAS Y LIMITACIONES DE LOS ESTUDIOS

Las principales fortalezas de ambos estudios residen en su carácter prospectivo y el reclutamiento de una cohorte exhaustivamente caracterizada, así como una evaluación cardiovascular y neurológica completa que incluyen ecocardiografía, neurosonografía y determinación de biomarcadores de daño cardíaco y neurológico en líquido amniótico.

En todas las pacientes incluidas en los estudios se realizaron estudios microbiológicos mediante cultivo de aerobios/anaerobios/micoplasma genital y, si existían dudas en los resultados de cultivo, también mediante la secuenciación del gen 16S rRNA. De la misma manera se determinó la concentración de IL-6 en líquido amniótico para identificar la inflamación intra-amniótica.

La coherencia entre los resultados de biomarcadores de daño cardíaco y cerebral y los hallazgos ecográficos dan solidez a los resultados.

Sin embargo, ambos estudios presentan algunas limitaciones. Las pacientes ingresadas por APP o RPM pretérmino que tuvieron lapso de tiempo desde el ingreso hasta el parto corto en las cuales no se pudo realizar el estudio ecográfico, así como los casos de anhidramnios en los cuales no pudo realizarse una amniocentesis, fueron excluidos. Ambas situaciones son, en general, escenarios que podrían tener peor pronóstico, mayor grado de inflamación intra-amniótica o una prevalencia más alta de infección intra-amniótica. A pesar de ello, es desconocido si presentan el mismo perfil cardiovascular y neurológico que las pacientes incluidas en nuestra cohorte.

Por otro lado, a pesar de que el estudio de líquido amniótico en nuestro estudio permite identificar bacterias aerobias, anaerobias, hongos y micoplasmas, existen ciertas infecciones, como las víricas, que son indetectables con las técnicas utilizadas (301).

Otra limitación es en relación con la definición heterogénea de inflamación intra-amniótica, dado que existen distintas definiciones en la literatura, incluyendo la elevación de otras citocinas intra-amnióticas distintas a la IL-6 (302, 303) y distintos puntos de corte publicados (72, 73).

En relación con la evaluación de las áreas del cuerpo calloso, el software utilizado requiere de una imagen óptima y nítida de toda la extensión del cuerpo calloso. En el **Estudio 2** solamente pudo obtenerse dicha imagen para la valoración del área del cuerpo calloso en el 69% de las

pacientes con APP o RPM pretérmino. Esto es debido a que el anhidramnios y las presentaciones fetales anómalas en casos de RPM y la limitación en la ecografía transvaginal dada la bolsa rota o el cérvix corto limitaron tanto temporalmente como técnicamente la neurosonografía. Por último, la evaluación postnatal para valorar la persistencia de los cambios descritos y su significado clínico no está incluido en estos estudios. Sin embargo, el seguimiento postnatal de estas cohortes se ha realizado y está pendiente de explotar.

3. IMPLICACIONES CLÍNICAS

Los estudios presentados en esta tesis doctoral demuestran que los cambios cardiovasculares y neurológicos descritos postnatalmente en pacientes nacidos prematuros tienen, en parte, un origen prenatal. Estos resultados abren una ventana de oportunidad para tratar de detectar de forma muy precoz (prenatal) aquellos fetos con mayor riesgo cardiovascular o neurológico. La identificación de estos pacientes podría permitir iniciar estrategias preventivas o de seguimiento de estos pacientes de alto riesgo, incluso de forma prenatal. Esto es especialmente importante en este punto crítico del desarrollo, dado que está demostrado que el seguimiento, acciones preventivas o la estimulación neurológica son altamente eficaces en los primeros años de vida y tendrán un efecto a largo plazo.

En el caso del riesgo cardiovascular, una dieta de calidad por parte de la paciente gestante (304), la lactancia materna (305) o la instauración de unos hábitos de vida saludables (306) desde etapas tempranas han demostrado reducir este riesgo.

En el caso del neurodesarrollo, la lactancia materna (305), una dieta saludable o el Mindfulness de la madre durante la gestación (183, 307) han demostrado mejorar el neurodesarrollo. Las terapias de estimulación neurológica también han demostrado ser más eficaces si se inician lo más precozmente posible, idealmente durante los primeros años de vida (308).

A pesar de que estos estudios son solamente la primera evidencia de que estos cambios existen y que permitirían instaurar prevención o terapias precoces, se necesitan más estudios para valorar la trascendencia clínica de estos cambios a nivel postnatal, definir posibles marcadores prenatales identificadores de esta población de alto riesgo, así como definir qué estrategias serían las más adecuadas en nuestra población.

4. FUTURAS DIRECCIONES EN LA INVESTIGACIÓN

Los dos estudios presentados demuestran la contribución prenatal a los cambios cardiovasculares y neurológicos descritos postnatalmente en pacientes nacidos después de una APP o RPM pretérmino. A pesar de ello, en el campo de la medicina fetal y de la programación fetal, es especialmente importante correlacionar estos hallazgos prenatales con los cambios postnatales. Es por ello que el seguimiento cardiovascular a los 6 meses de vida y el neurológico al año de vida se ha llevado a cabo en nuestra cohorte de pacientes y está pendiente de analizarse y publicarse. Si esta correlación se confirma, la identificación de los mejores predictores prenatales de mayor riesgo cardiovascular o peor neurodesarrollo permitirían establecer una estrategia eficaz para la identificación temprana de estos niños. El seguimiento, no sólo a medio plazo como ya se ha realizado, sino a largo plazo, será clave para establecer la verdadera relevancia clínica de este estudio y la posibilidad de un cribado prenatal. Finalmente, el análisis de coste-eficacia de posibles acciones preventivas sobre estos niños será importante antes de establecer un circuito clínico para esta población. Por otro lado, ahondar en el estudio del grupo de APP o RPM sin inflamación intra-amniótica para establecer otras posibles causas de estos cambios también será importante para identificar qué fetos de este grupo son los que presentan más riesgo cardiovascular o peor resultado neurológico.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los fetos de madres que presentan una amenaza de parto prematuro o rotura prematura de membranas pretérmino presentan una hipertrofia cardíaca concéntrica junto con una alteración de la función diastólica subclínica y una función sistólica preservada (compensada).
2. Los fetos de madres que presentan una amenaza de parto prematuro o rotura prematura de membranas pretérmino presentan mayores concentraciones en líquido amniótico en el momento del diagnóstico de troponina I y propéptido natriurético cerebral N-terminal.
3. Los cambios ecocardiográficos y de biomarcadores en líquido amniótico son más pronunciados en los casos de amenaza de parto prematuro o rotura prematura de membranas pretérmino que presentan infección y/o inflamación intra-amnióticas.
4. Los fetos de madres que presentan una amenaza de parto prematuro o rotura prematura de membranas pretérmino presentan cambios cerebrales estructurales que incluyen una reducción de las dimensiones del cerebelo, menor profundidad de las cisuras de Silvio y parieto-occipital y una reducción del área total del cuerpo calloso a expensas de las zonas medio-posteriores.
5. Los fetos de madres que presentan una amenaza de parto prematuro o rotura prematura de membranas pretérmino presentan mayores concentraciones en líquido amniótico en el momento del diagnóstico de proteína B fijadora de calcio S100, enolasa neuroespecífica y proteína ácida fibrilar glial.
6. Los cambios neurosonográficos y de biomarcadores en líquido amniótico son más pronunciados en los casos de amenaza de parto prematuro o rotura prematura de membranas pretérmino que presentan infección y/o inflamación intra-amnióticas.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

1. WHO. Recommended definitions, terminology and format for statistical tables related to the perinatal period and use of a new certificate for cause of perinatal deaths. Modifications recommended by FIGO as amended October 14, 1976. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1977;56(3):247-253.
2. Petrou S. The economic consequences of preterm birth during the first 10 years of life. *BJOG*. 2005;112 Suppl.1:10-15.
3. Petrou S, Mehta Z, Hockley C, Cook-Mozaffari P, Henderson J, Goldacre M. The impact of preterm birth on hospital inpatient admissions and costs during the first 5 years of life. *Pediatrics*. 2003;112(6 Pt. 1):1290-1297.
4. Yoshida S, Martines J, Lawn JE, Wall S, Souza JP, Rudan I, et al. Setting research priorities to improve global newborn health and prevent stillbirths by 2025. *J Glob Health*. 2016;6(1):010508.
5. Lawn JE, Blencowe H, Kinney MV, Bianchi F, Graham WJ. Evidence to inform the future for maternal and newborn health. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2016;36:169-183.
6. Vogel JP, Chawanpaiboon S, Moller AB, Watananirun K, Bonet M, Lumbiganon P. The global epidemiology of preterm birth. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018;52:3-12.
7. Mercer BM. Preterm premature rupture of the membranes. *Obstet Gynecol*. 2003;101(1):178-193.
8. Ohuma EO, Moller AB, Bradley E, Chakwera S, Hussain-Alkhateeb L, Lewin A, et al. National, regional, and global estimates of preterm birth in 2020, with trends from 2010: a systematic analysis. *Lancet*. 2023;402(10409):1261-1271.
9. Europeristat. European perinatal health report. Core indicators of the health and care of pregnant women and babies in Europe from 2015 to 2019. [Internet]. [citado 1 de julio de 2024]. Recuperado de: https://www.europeristat.com/images/Euro-Peristat_Fact_sheets_2022_for_upload.pdf.
10. Instituto Nacional de estadística. Partos por residencia de la madre, grupo de edad de la madre y semanas de gestación. [Internet]. [citado 1 de julio de 2024]. Recuperado de: https://www.ine.es/jaxiT3/Datos.htm?t=32627#_tabs-grafico.
11. Instituto de estadística de Cataluña. Part segons l'edat de la mare i maturitat. [Internet]. [citado 1 de julio de 2024]. Recuperado de: <https://www.idescat.cat/pub/?id=naix&n=54&fil=39&col=&lang=es>.

12. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*. 2008;371:75-84.
13. Crispi F, Llurba E, Pedrero C, Carreras E, Higuera T, Hermosilla E, et al. Curvas de normalidad de la longitud cervical ecográfica según edad gestacional en población española. *Prog Obstet Ginecol*. 2004;47:264-71.
14. De Franco EA, Lewis DF, Odibo AO. Improving the screening accuracy for preterm labor: Is the combination of fetal fibronectin and cervical length in symptomatic patients a useful predictor of preterm birth? A systematic review. *Am J Obstet Gynecol*. 2013;208:233.e1-6.
15. Thomson AJ, Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. Care of Women Presenting with Suspected Preterm Prelabour Rupture of Membranes from 24+0 Weeks of Gestation: Green-top Guideline No. 73. *BJOG*. 2019;126(9):e152-e166.
16. BCNatal (Hospital Clínic de Barcelona y Hospital Sant Joan de Déu). Protocolo: Rotura prematura de membranas a término y pretérmino. [Internet]. [citado 1 de julio de 2024]. Recuperado de: <https://fetalmedicinebarcelona.org/wp-content/uploads/2024/02/rotura-prematura-de-membranas-hcp-hsjd.pdf>.
17. Murillo C, Ferrero S, Cobo T, Renau MI, Aldecoa V, Grau L, et al. Outpatient management of preterm prelabor rupture of membranes before 34 weeks: Maternal and neonatal outcomes. *Int J Gynaecol Obstet*. 2023;162(2):703-710.
18. Ferrero DM, Larson J, Jacobsson B, Di Renzo GC, Norman JE, Martin JN, et al. Cross-country individual participant analysis of 4.1 million singleton births in 5 countries with very high human development index confirms known associations but provides No biologic explanation for 2/3 of all preterm births. *PLoS One*. 2016;11(9):e0162506.
19. Phillips C, Velji Z, Hanly C, Metcalfe A. Risk of recurrent spontaneous preterm birth: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*. 2017;7(6):e015402.
20. Beta J, Akolekar R, Ventura W, Syngelaki A, Nicolaides KH. Prediction of spontaneous preterm delivery from maternal factors, obstetric history and placental perfusion and function at 11-13 weeks. *Prenat Diagn*. 2011;31(1):75-83.
21. Patel K, Pirie D, Heazell AEP, Morgan B, Woolner A. Subsequent pregnancy outcomes after second trimester miscarriage or termination for medical/fetal reason: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2024;103(3):413-422.
22. Schummers L, Hutcheon JA, Hernandez-Diaz S, Williams PL, Hacker MR, VanderWeele TJ, et al. Association of Short Interpregnancy Interval With Pregnancy Outcomes According to Maternal Age. *JAMA Intern Med*. 2018;178(12):1661-1670.
23. Berghella V, Saccone G. Cervical assessment by ultrasound for preventing preterm delivery. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019;9(9):CD007235.

24. Gire C, Faggianelli P, Nicaise C, Shojai R, Fiori A, Chau C, et al. Ultrasonographic evaluation of cervical length in pregnancies complicated by preterm premature rupture of membranes. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2002;19(6):565-569.
25. Parazzini F, Tozzi L, Bianchi S. Pregnancy outcome and uterine fibroids. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2016;34:74-84.
26. Pri-Paz S, Khalek N, Fuchs KM, Simpson LL. Maximal amniotic fluid index as a prognostic factor in pregnancies complicated by polyhydramnios. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2012;39(6):648-653.
27. Multifetal Gestations: Twin, Triplet, and Higher-Order Multifetal Pregnancies: ACOG Practice Bulletin, Number 231. *Obstet Gynecol.* 2021;137(6):e145-e162.
28. Zhou H, Lai KF, Xiang Q, Zhang LL, Xu Y, Cheng C, et al. Second-stage cesarean delivery and preterm birth in subsequent pregnancy: A large multi-institutional cohort study. *J Gynecol Obstet Hum Reprod.* 2022;51(8):102447.
29. Karimi A, Sayehmiri K, Vaismoradi M, Dianatinasab M, Daliri S. Vaginal bleeding in pregnancy and adverse clinical outcomes: a systematic review and meta-analysis. *J Obstet Gynaecol.* 2024;44(1):228224.
30. Jauniaux E, Alfirevic Z, Bhide AG, Belfort MA, Burton GJ, Collins SL, et al. Placenta Praevia and Placenta Accreta: Diagnosis and Management: Green-top Guideline No. 27a. *BJOG.* 2019;126(1):e1-e48.
31. Ruiter L, Ravelli AC, de Graaf IM, Mol BW, Pajkrt E. Incidence and recurrence rate of placental abruption: a longitudinal linked national cohort study in the Netherlands. *Am J Obstet Gynecol.* 2015;213(4):573.e1-573.e8.
32. Xiang L, Wei Z, Cao Y. Symptoms of an intrauterine hematoma associated with pregnancy complications: a systematic review. *PLoS One.* 2014;9(11):e111676.
33. Purisch SE, DeFranco EA, Muglia LJ, Odibo AO, Stamilio DM. Preterm birth in pregnancies complicated by major congenital malformations: a population-based study. *Am J Obstet Gynecol.* 2008;199(3):287.e1-287.e8.
34. Ingemarsson I. Gender aspects of preterm birth. *BJOG.* 2003;110 Suppl. 20:34-38.
35. Thoma ME, Drew LB, Hirai AH, Kim TY, Fenelon A, Shenassa ED. Black-White Disparities in Preterm Birth: Geographic, Social, and Health Determinants. *Am J Prev Med.* 2019;57(5):675-686.
36. Kozuki N, Lee AC, Silveira MF, Sania A, Vogel JP, Adair L, et al. The associations of parity and maternal age with small-for-gestational-age, preterm, and neonatal and infant mortality: a meta-analysis. *BMC Public Health.* 2013;13 Suppl. 3:S2.

37. Liu B, Xu G, Sun Y, Du Y, Gao R, Snetselaar LG, et al. Association between maternal pre-pregnancy obesity and preterm birth according to maternal age and race or ethnicity: a population-based study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2019;7(9):707-714.
38. LifeCycle Project-Maternal Obesity and Childhood Outcomes Study Group; Voerman E, Santos S, Inskip H, Amiano P, Barros H, et al. Association of Gestational Weight Gain With Adverse Maternal and Infant Outcomes. *JAMA*. 2019;321(17):1702-1715.
39. Smith LK, Draper ES, Manktelow BN, Dorling JS, Field DJ. Socioeconomic inequalities in very preterm birth rates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2007;92(1):F11-F14.
40. Ruiz M, Goldblatt P, Morrison J, Kukla L, Švancara J, Riitta-Järvelin M, et al. Mother's education and the risk of preterm and small for gestational age birth: a DRIVERS meta-analysis of 12 European cohorts. *J Epidemiol Community Health*. 2015;69(9):826-833.
41. Wisborg K, Henriksen TB, Hedegaard M, Secher NJ. Smoking during pregnancy and preterm birth. *Br J Obstet Gynaecol*. 1996;103(8):800-805.
42. Gouin K, Murphy K, Shah PS; Knowledge Synthesis group on Determinants of Low Birth Weight and Preterm Births. Effects of cocaine use during pregnancy on low birthweight and preterm birth: systematic review and metaanalyses. *Am J Obstet Gynecol*. 2011;204(4):340.e1-340.e12.
43. Rahmati S, Azami M, Badfar G, Parizad N, Sayehmiri K. The relationship between maternal anemia during pregnancy with preterm birth: a systematic review and meta-analysis. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2020;33(15):2679-2689.
44. Tamura T, Goldenberg RL, Freeberg LE, Cliver SP, Cutter GR, Hoffman HJ. Maternal serum folate and zinc concentrations and their relationships to pregnancy outcome. *Am J Clin Nutr*. 1992;56(2):365-370.
45. Hirsch L, Yeoshoua E, Miremberg H, Krissi H, Aviram A, Yogev Y, et al. The association between Mullerian anomalies and short-term pregnancy outcome. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2016;29(16):2573-2578.
46. Qin JB, Sheng XQ, Wu D, Gao SY, You YP, Yang TB, et al. Worldwide prevalence of adverse pregnancy outcomes among singleton pregnancies after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet*. 2017;295(2):285-301.
47. Zhuang H, Hong S, Zheng L, Zhang L, Zhuang X, Wei H, et al. Effects of cervical conisation on pregnancy outcome: a meta-analysis. *J Obstet Gynaecol*. 2019;39(1):74-81.
48. Henriët L, Kaminski M. Impact of induced abortions on subsequent pregnancy outcome: the 1995 French national perinatal survey. *BJOG*. 2001;108(10):1036-1042.
49. Leitich H, Kiss H. Asymptomatic bacterial vaginosis and intermediate flora as risk factors for adverse pregnancy outcome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2007;21(3):375-390.

50. Tang W, Mao J, Li KT, Walker JS, Chou R, Fu R, et al. Pregnancy and fertility-related adverse outcomes associated with Chlamydia trachomatis infection: a global systematic review and meta-analysis. *Sex Transm Infect.* 2020;96(5):322-329.
51. Klein LL, Gibbs RS. Infection and preterm birth. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2005;32(3):397-410.
52. Kapisi J, Kakuru A, Jagannathan P, Muhindo MK, Natureeba P, Awori P et al. Relationships between infection with Plasmodium falciparum during pregnancy, measures of placental malaria, and adverse birth outcomes. *Malar J.* 2017;16(1):400.
53. Jeffcoat MK, Geurs NC, Reddy MS, Cliver SP, Goldenberg RL, Hauth JC. Periodontal infection and preterm birth: results of a prospective study. *J Am Dent Assoc.* 2001;132(7):875-880.
54. Chen JS, Roberts CL, Simpson JM, March LM. Pregnancy Outcomes in Women With Rare Autoimmune Diseases. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(12):3314-3323.
55. Engel SA, Erichsen HC, Savitz DA, Thorp J, Chanock SJ, Olshan AF. Risk of spontaneous preterm birth is associated with common proinflammatory cytokine polymorphisms. *Epidemiology.* 2005;16(4):469-477.
56. Check JH, Lee G. Untreated luteal phase deficiency as another possible risk factor for preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 1991;165(2):485-486.
57. Snegovskikh V, Park JS, Norwitz ER. Endocrinology of parturition. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2006;35(1):173-viii.
58. Shynlova O, Tsui P, Jaffer S, Lye SJ. Integration of endocrine and mechanical signals in the regulation of myometrial functions during pregnancy and labour. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009;144 Suppl. 1:S2-S10.
59. Terzidou V, Sooranna SR, Kim LU, Thornton S, Bennett PR, Johnson MR. Mechanical stretch up-regulates the human oxytocin receptor in primary human uterine myocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(1):237-246.
60. Ou CW, Orsino A, Lye SJ. Expression of connexin-43 and connexin-26 in the rat myometrium during pregnancy and labor is differentially regulated by mechanical and hormonal signals. *Endocrinology.* 1997;138(12):5398-5407.
61. Sooranna SR, Lee Y, Kim LU, Mohan AR, Bennett PR, Johnson MR. Mechanical stretch activates type 2 cyclooxygenase via activator protein-1 transcription factor in human myometrial cells. *Mol Hum Reprod.* 2004;10(2):109-113.
62. Loudon JA, Sooranna SR, Bennett PR, Johnson MR. Mechanical stretch of human uterine smooth muscle cells increases IL-8 mRNA expression and peptide synthesis. *Mol Hum Reprod.* 2004;10(12):895-899.

63. Adams Waldorf KM, Singh N, Mohan AR, Young RC, Ngo L, Das A, et al. Uterine overdistention induces preterm labor mediated by inflammation: observations in pregnant women and nonhuman primates. *Am J Obstet Gynecol.* 2015;213(6):830.e1-830.e19.
64. Arias F, Rodriguez L, Rayne SC, Kraus FT. Maternal placental vasculopathy and infection: two distinct subgroups among patients with preterm labor and preterm ruptured membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 1993;168(2):585-591.
65. Kelly R, Holzman C, Senagore P, Wang J, Tian Y, Rahbar MH, et al. Placental vascular pathology findings and pathways to preterm delivery. *Am J Epidemiol.* 2009;170(2):148-158.
66. Kim YM, Bujold E, Chaiworapongsa T, Gomez R, Yoon BH, Thaler HT, et al. Failure of physiologic transformation of the spiral arteries in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;189(4):1063-1069.
67. Kim YM, Chaiworapongsa T, Gomez R, Bujold E, Yoon BH, Rotmensch S, et al. Failure of physiologic transformation of the spiral arteries in the placental bed in preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;187(5):1137-1142.
68. Fonseca E, Yu CK, Singh M, Papageorghiou AT, Nicolaides KH. Relationship between second-trimester uterine artery Doppler and spontaneous early preterm delivery. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2006;27(3):301-305.
69. Morken NH, Källen K, Jacobsson B. Fetal growth and onset of delivery: a nationwide population-based study of preterm infants. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;195(1):154-161.
70. Van Vliet EOG, Askie LA, Mol BWJ, Oudijk MA. Antiplatelet Agents and the Prevention of Spontaneous Preterm Birth: A Systematic Review and Meta-analysis. *Obstet Gynecol.* 2017;129(2):327-336.
71. Romero R, Kusanovic JP, Chaiworapongsa T, Hassan SS. Placental bed disorders in preterm labor, preterm PROM, spontaneous abortion and abruptio placentae. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2011;25(3):313-327.
72. Romero R, Miranda J, Chaiworapongsa T, Korzeniewski SJ, Chaemsaihong P, Gotsch F, et al. Prevalence and clinical significance of sterile intra-amniotic inflammation in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Reprod Immunol.* 2014;72(5):458-474.
73. Romero R, Miranda J, Chaemsaihong P, Chaiworapongsa T, Kusanovic JP, Dong Z, et al. Sterile and microbial-associated intra-amniotic inflammation in preterm prelabor rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2015;28(12):1394-1409.
74. Peng CC, Chang JH, Lin HY, Cheng PJ, Su BH. Intrauterine inflammation, infection, or both (Triple I): A new concept for chorioamnionitis. *Pediatr Neonatol.* 2018;59(3):231-237
75. Gonçalves LF, Chaiworapongsa T, Romero R. Intrauterine infection and prematurity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2002;8(1):3-13.

76. Palacio M, Cobo T, Bosch J, Filella X, Navarro-Sastre A, Ribes A, et al. Cervical length and gestational age at admission as predictors of intra-amniotic inflammation in preterm labor with intact membranes. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009;34(4):441-447.
77. Rodríguez-Trujillo A, Cobo T, Vives I, Bosch J, Kacerovsky M, Posadas DE, et al. Gestational age is more important for short-term neonatal outcome than microbial invasion of the amniotic cavity or intra-amniotic inflammation in preterm prelabor rupture of membranes *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2016;95(8):926-933.
78. Mendz GL, Kaakoush NO, Quinlivan JA. Bacterial aetiological agents of intra-amniotic infections and preterm birth in pregnant women. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013;3:58.
79. Chaim W, Mazor M, Wiznitzer A. The prevalence and clinical significance of intraamniotic infection with *Candida* species in women with preterm labor. *Arch Gynecol Obstet.* 1992;251(1):9-15.
80. DiGiulio DB, Romero R, Kusanovic JP, Gómez R, Kim CJ, Seok KS, et al. Prevalence and diversity of microbes in the amniotic fluid, the fetal inflammatory response, and pregnancy outcome in women with preterm pre-labor rupture of membranes. *Am J Reprod Immunol.* 2010;64(1):38-57.
81. DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, Kusanovic JP, Bik EM, Gotsch F, et al. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PLoS One.* 2008;3(8):e3056.
82. Romero R, Gomez-Lopez N, Winters AD, Jung E, Shaman M, Bieda J, et al. Evidence that intra-amniotic infections are often the result of an ascending invasion - a molecular microbiological study. *J Perinat Med.* 2019;47(9):915-931.
83. Bearfield C, Davenport ES, Sivapathasundaram V, Allaker RP. Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *BJOG.* 2002;109(5):527-533.
84. Espinoza J, Chaiworapongsa T, Romero R, Edwin S, Rathnasabapathy C, Gomez R, et al. Antimicrobial peptides in amniotic fluid: defensins, calprotectin and bacterial/permeability-increasing protein in patients with microbial invasion of the amniotic cavity, intra-amniotic inflammation, preterm labor and premature rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2003;13(1):2-21.
85. Pacora P, Maymon E, Gervasi MT, Gomez R, Edwin SS, Yoon BH, et al. Lactoferrin in intrauterine infection, human parturition, and rupture of fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;183(4):904-910.
86. Gravett MG, Novy MJ, Rosenfeld RG, Reddy AP, Jacob T, Turner M, et al. Diagnosis of intra-amniotic infection by proteomic profiling and identification of novel biomarkers [published correction appears in *JAMA.* 2004;292(19):2340]. *JAMA.* 2004;292(4):462-469.

87. Galaz J, Romero R, Slutsky R, Xu Y, Motomura K, Para R, et al. Cellular immune responses in amniotic fluid of women with preterm prelabor rupture of membranes. *J Perinat Med*. 2020;48(3):222-233.
88. Khan RN, Hay DP. A clear and present danger: inflammasomes DAMPING down disorders of pregnancy. *Hum Reprod Update*. 2015;21(3):388-405.
89. Galaz J, Romero R, Xu Y, Miller D, Slutsky R, Levenson D, et al. Cellular immune responses in amniotic fluid of women with preterm clinical chorioamnionitis. *Inflamm Res*. 2020;69(2):203-216.
90. Romero R, Sirtori M, Oyarzun E, Avila C, Mazor M, Callahan R, et al. Infection and labor. V. Prevalence, microbiology, and clinical significance of intraamniotic infection in women with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol*. 1989;161(3):817-824.
91. Gravett MG, Witkin SS, Haluska GJ, Edwards JL, Cook MJ, Novy MJ. An experimental model for intraamniotic infection and preterm labor in rhesus monkeys. *Am J Obstet Gynecol*. 1994;171(6):1660-1667.
92. Motomura K, Romero R, Xu Y, Theis KR, Galaz J, Winters AD, et al. Intra-Amniotic Infection with *Ureaplasma parvum* Causes Preterm Birth and Neonatal Mortality That Are Prevented by Treatment with Clarithromycin. *mBio*. 2020;11(3):e00797-20.
93. Cappelletti M, Presicce P, Feiyang M, Senthamaraikannan P, Miller LA, Pellegrini M, et al. The induction of preterm labor in rhesus macaques is determined by the strength of immune response to intrauterine infection. *PLoS Biol*. 2021;19(9):e3001385.
94. Cobo T, Vives I, Rodríguez-Trujillo A, Murillo C, Ángeles MA, Bosch J, et al. Impact of microbial invasion of amniotic cavity and the type of microorganisms on short-term neonatal outcome in women with preterm labor and intact membranes. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2017;96(5):570-579.
95. BCNatal. Hospital Clinic-Hospital Sant Joan de Déu. Protocolo: amenaza de parto pretérmino. [Internet]. [citado 1 de julio de 2024]. Recuperado de: https://fetalmedicinebarcelona.org/wp-content/uploads/2024/02/amenaza_de_parto_pretermino_hcp_hsjd.pdf.
96. Cobo T, Palacio M, Martínez-Terrón M, Navarro-Sastre A, Bosch J, Filella X, et al. Clinical and inflammatory markers in amniotic fluid as predictors of adverse outcomes in preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol*. 2011;205(2):126.e1-126.e8.
97. Cobo T, Palacio M, Navarro-Sastre A, Ribes A, Bosch J, Filella X, et al. Predictive value of combined amniotic fluid proteomic biomarkers and interleukin-6 in preterm labor with intact membranes. *Am J Obstet Gynecol*. 2009;200(5):499.e1-499.e6.
98. Rider P, Voronov E, Dinarello CA, Apte RN, Cohen I. Alarmins: Feel the Stress. *J Immunol*. 2017;198(4):1395-1402.

99. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol.* 2007;81(1):1-5.
100. Cha JM, Aronoff DM. A role for cellular senescence in birth timing. *Cell Cycle.* 2017;16(21):2023-2031.
101. Gomez-Lopez N, Romero R, Plazyo O, Schwenkel G, Garcia-Flores V, Unkel R, et al. Preterm labor in the absence of acute histologic chorioamnionitis is characterized by cellular senescence of the chorioamniotic membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2017;217(5):592.e1-592.e17.
102. Behnia F, Taylor BD, Woodson M, Kacerovsky M, Hawkins H, Fortunato SJ, et al. Chorioamniotic membrane senescence: a signal for parturition?. *Am J Obstet Gynecol.* 2015;213(3):359.e1-359.e16.
103. Smith R. Parturition. *N Engl J Med.* 2007;356(3):271-283.
104. Plazyo O, Romero R, Unkel R, Balancio A, Mial TN, Xu Y, et al. HMGB1 Induces an Inflammatory Response in the Chorioamniotic Membranes That Is Partially Mediated by the Inflammasome. *Biol Reprod.* 2016;95(6):130.
105. Motomura K, Romero R, Plazyo O, Garcia-Flores V, Gershater M, Galaz J, et al. The alarmin S100A12 causes sterile inflammation of the human chorioamniotic membranes as well as preterm birth and neonatal mortality in mice†. *Biol Reprod.* 2021;105(6):1494-1509.
106. Romero R, Grivel JC, Tarca AL, Chaemsaitong P, Xu Z, Fitzgerald W, et al. Evidence of perturbations of the cytokine network in preterm labor. *Am J Obstet Gynecol.* 2015;213(6):836.e1-836.e18.
107. Romero R, Tartakovsky B. The natural interleukin-1 receptor antagonist prevents interleukin-1-induced preterm delivery in mice. *Am J Obstet Gynecol.* 1992;167(4 Pt 1):1041-1045.
108. Gomez-Lopez N, Romero R, Plazyo O, Panaitescu B, Furcron AE, Miller D, et al. Intra-Amniotic Administration of HMGB1 Induces Spontaneous Preterm Labor and Birth. *Am J Reprod Immunol.* 2016;75(1):3-7.
109. Kallapur SG, Kramer BW, Nitsos I, Pillow JJ, Collins JJ, Polglase GR, et al. Pulmonary and systemic inflammatory responses to intra-amniotic IL-1 α in fetal sheep. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2011;301(3):L285-L295.
110. Sadowsky DW, Haluska GJ, Gravett MG, Witkin SS, Novy MJ. Indomethacin blocks interleukin 1 β -induced myometrial contractions in pregnant rhesus monkeys. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;183(1):173-180.
111. Sadowsky DW, Novy MJ, Witkin SS, Gravett MG. Dexamethasone or interleukin-10 blocks interleukin-1 β -induced uterine contractions in pregnant rhesus monkeys. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188(1):252-263.

112. Galaz J, Romero R, Arenas-Hernandez M, Panaitescu B, Para R, Gomez-Lopez N. Betamethasone as a potential treatment for preterm birth associated with sterile intra-amniotic inflammation: a murine study. *J Perinat Med*. 2021;49(7):897-906.
113. Galaz J, Romero R, Arenas-Hernandez M, Farias-Jofre M, Motomura K, Liu Z, et al. Clarithromycin prevents preterm birth and neonatal mortality by dampening alarmin-induced maternal-fetal inflammation in mice. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2022;22(1):503.
114. Kacerovsky M, Romero R, Stepan M, Stranik J, Maly J, Pliskova L, et al. Antibiotic administration reduces the rate of intraamniotic inflammation in preterm prelabor rupture of the membranes. *Am J Obstet Gynecol*. 2020;223(1):114.e1-114.e20.
115. Jung E, Romero R, Suksai M, Gotsch F, Chaemsaitong P, Erez O, et al. Clinical chorioamnionitis at term: definition, pathogenesis, microbiology, diagnosis, and treatment. *Am J Obstet Gynecol*. 2024;230(3S):S807-S840.
116. Conde-Agudelo A, Romero R, Jung EJ, Garcia Sánchez ÁJ. Management of clinical chorioamnionitis: an evidence-based approach. *Am J Obstet Gynecol*. 2020;223(6):848-869.
117. Perry AK, Rossi RM, DeFranco EA. Severe adverse maternal outcomes associated with chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol MFM*. 2019;1(3):100027.
118. Johnson CT, Adami RR, Farzin A. Antibiotic Therapy for Chorioamnionitis to Reduce the Global Burden of Associated Disease. *Front Pharmacol*. 2017;8:97.
119. Been J, Degraeuwe P, Kramer B, Zimmermann L. Antenatal steroids and neonatal outcome after chorioamnionitis: a meta-analysis. *BJOG*. 2011;118:113–122.
120. Kamyar M, Manuck TA, Stoddard GJ, Varner MW, Clark EAS. Magnesium sulfate, chorioamnionitis, and neurodevelopment after preterm birth. *BJOG*. 2016;123:1161–1166.
121. Impey L, Greenwood C, MacQuillan K, Reynolds M, Sheil, O. Fever in labour and neonatal encephalopathy: a prospective cohort study. *BJOG*. 2001;108:594–597.
122. McGoldrick E, Stewart F, Parker R, Dalziel SR. Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020;12(12):CD004454.
123. Cobo T, Diago V. Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia. Guías de asistencia práctica. Medicina perinatal. Parto pretérmino. [Internet]. [citado 1 de julio de 2024]. Recuperado de: https://sego.es/Guias_de_Asiencia_Practica#perinatal.
124. Norman M, Piedvache A, Børch K, Huusom LD, Bonamy AE, Howell EA, et al. Association of Short Antenatal Corticosteroid Administration-to-Birth Intervals With Survival and Morbidity Among Very Preterm Infants: Results From the EPICE Cohort. *JAMA Pediatr*. 2017;171(7):678-686.

125. Ninan K, Liyanage SK, Murphy KE, Asztalos EV, McDonald SD. Evaluation of Long-term Outcomes Associated With Preterm Exposure to Antenatal Corticosteroids: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Pediatr.* 2022;176(6):e220483.
126. Chollat C, Marret S. Magnesium sulfate and fetal neuroprotection: overview of clinical evidence. *Neural Regen Res.* 2018;13:2044-2049.
127. BCNatal. Hospital Clínic-Hospital Sant Joan de Déu. Protocolo: Neuroprotección con SO4Mg. [Internet]. [citado 1 de julio de 2024]. Recuperado de: <https://fetalmedicinebarcelona.org/wp-content/uploads/2024/02/neuroprofilaxis.pdf>.
128. Kenyon S, Boulvain M, Neilson JP. Antibiotics for preterm rupture of membranes. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;(12):CD001058.
129. Yoon BH, Romero R, Park JY, Oh KJ, Lee J, Conde-Agudelo A, et al. Antibiotic administration can eradicate intra-amniotic infection or intra-amniotic inflammation in a subset of patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2019;221(2):142.e1-142.e22.
130. Siegler Y, Weiner Z, Solt I. ACOG Practice Bulletin No. 217: Prelabor Rupture of Membranes. *Obstet Gynecol.* 2020;136(5):1061.
131. Kenyon SL, Taylor DJ, Tarnow-Mordi W; ORACLE Collaborative Group. Broad-spectrum antibiotics for preterm, prelabour rupture of fetal membranes: the ORACLE I randomised trial. ORACLE Collaborative Group [published correction appears in *Lancet.* 2001;358(9276):156]. *Lancet.* 2001;357(9261):979-988.
132. Park HS, Ahn BJ, Jun JK. Placental transfer of clarithromycin in human pregnancies with preterm premature rupture of membranes. *J Perinat Med.* 2012;40(6):641-646.
133. Lamb HM, Ormrod D, Scott LJ, Figgitt DP. Ceftriaxone: an update of its use in the management of community-acquired and nosocomial infections. *Drugs.* 2002;62(7):1041-1089.
134. Brook I, Wexler HM, Goldstein EJ. Antianaerobic antimicrobials: spectrum and susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(3):526-546.
135. Matsuda S, Suzuki M, Shimizu T, Ishikawa M, Souma A, Fujimoto S, et al. Pharmacokinetic and clinical evaluations of ceftriaxone in perinatal infections in obstetrics and gynecology. *Jpn J Antibiot.* 1988;41(9):1251-1260.
136. Amon I. Placental transfer of metronidazole. *J Perinat Med.* 1985;13(2):97-98.
137. Dotters-Katz S. Antibiotics for Prophylaxis in the Setting of Preterm Prelabor Rupture of Membranes. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2020;47(4):595-603.

138. Lin LL, Hung JN, Shiu SI, Su YH, Chen WC, Tseng JJ. Efficacy of prophylactic antibiotics for preterm premature rupture of membranes: a systematic review and network meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol MFM*. 2023;5(7):100978.
139. Haas DM, Caldwell DM, Kirkpatrick P, McIntosh JJ, Welton NJ. Tocolytic therapy for preterm delivery: systematic review and network meta-analysis. *BMJ*. 2012;345:e6226.
140. Haas DM, Imperiale TF, Kirkpatrick PR, Klein RW, Zollinger TW, Golichowski AM. Tocolytic therapy: a meta-analysis and decision analysis. *Obstet Gynecol*. 2009;113(3):585-594.
141. Mackeen AD, Seibel-Seamon J, Muhammad J, Baxter JK, Berghella V. Tocolytics for preterm premature rupture of membranes. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;2014(2):CD007062.
142. Van Vliet EOG, Nijman TAJ, Schuit E, Heida KY, Opmeer BC, Kok M, et al. Nifedipine versus atosiban for threatened preterm birth (APOSTEL III): A multicentre, randomised controlled trial. *Lancet*. 2016;387:2117-2124.
143. Van Winden TMS, Nijman TAJ, Kleinrouweler CE, Salim R, Kashanian M, Al-Omari WR, et al. Tocolysis with nifedipine versus atosiban and perinatal outcome: an individual participant data meta-analysis. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2022;22(1):567.
144. Naik Gaunekar N, Raman P, Bain E, Crowther CA. Maintenance therapy with calcium channel blockers for preventing preterm birth after threatened preterm labour. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;(10):CD004071.
145. Valenzuela GJ, Sanchez-Ramos L, Romero R, Silver HM, Koltun WD, Millar L, et al. Maintenance treatment of preterm labor with the oxytocin antagonist atosiban. The Atosiban PTL-098 Study Group. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;182(5):1184-1190.
146. Morris JM, Roberts CL, Bowen JR, Patterson JA, Bond DM, Algert CS, et al. Immediate delivery compared with expectant management after preterm pre-labour rupture of the membranes close to term (PPROMT trial): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2016;387(10017):444-452.
147. Van der Ham DP, Vijgen SM, Nijhuis JG, van Beek JJ, Opmeer BC, Mulder AL, et al. Induction of labor versus expectant management in women with preterm prelabor rupture of membranes between 34 and 37 weeks: a randomized controlled trial. *PLoS Med*. 2012;9(4):e1001208.
148. Simons NE, de Ruigh AA, van 't Hooft J, Aarnoudse-Moens CSH, van Wely M, van der Ham DP, et al. Childhood outcomes after induction of labor or expectant management for preterm prelabor rupture of membranes: a 10-year follow-up of the PPROMEXIL trials. *Am J Obstet Gynecol*. 2023;228(5):588.e1-588.e13.
149. The United Nations Inter-agency Group for Child Mortality Estimation (UN IGME). Levels and trends in child mortality: report 2023. United Nations Children's Fund. [Internet].

[citado 1 de julio de 2024]. Recuperado de: <https://childmortality.org/wp-content/uploads/2024/03/UNIGME-2023-Child-Mortality-Report.pdf>.

150. Ray JG, Park AL, Fell DB. Mortality in infants affected by preterm birth and severe small-for-gestational age birth weight. *Pediatrics*. 2017;140(6):e20171881.
151. Harrison MS, Goldenberg RL. Global burden of prematurity. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2016;21(2):74-79.
152. De Luca D. Respiratory distress syndrome in preterm neonates in the era of precision medicine: A modern critical care-based approach. *Pediatr Neonatol*. 2021;62 Suppl. 1:S3-S9.
153. Gilfillan M, Bhandari A, Bhandari V. Diagnosis and management of bronchopulmonary dysplasia. *BMJ*. 2021;375:n1974.
154. Abiramalatha T, Ramaswamy VV, Bandyopadhyay T, Somanath SH, Shaik NB, Pullattayil AK, et al. Interventions to Prevent Bronchopulmonary Dysplasia in Preterm Neonates: An Umbrella Review of Systematic Reviews and Meta-analyses. *JAMA Pediatr*. 2022;176(5):502-516.
155. Pammi M, Lal CV, Wagner BD, Mourani PM, Lohmann P, Luna RA, et al. Airway Microbiome and Development of Bronchopulmonary Dysplasia in Preterm Infants: A Systematic Review. *J Pediatr*. 2019;204:126-133.e2.
156. Yamamoto T, Nomiyama M, Oshima Y, Ono T, Kozuma Y, Nakura Y, et al. Prenatal exposure to intra-amniotic infection with *Ureaplasma* species increases the prevalence of bronchopulmonary dysplasia. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2024;37(1):2320670.
157. Staude B, Gschwendtner S, Frodermann T, Oehmke F, Kohl T, Kublik S, et al. Microbial signatures in amniotic fluid at preterm birth and association with bronchopulmonary dysplasia. *Respir Res*. 2023;24(1):248.
158. Meister AL, Doheny KK, Travagli RA. Necrotizing enterocolitis: It's not all in the gut. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2020;245(2):85-95.
159. Glaser MA, Hughes LM, Jnah A, Newberry D. Neonatal Sepsis: A Review of Pathophysiology and Current Management Strategies. *Adv Neonatal Care*. 2021;21(1):49-60.
160. Hamrick SEG, Sallmon H, Rose AT, Porras D, Shelton EL, Reese J, et al. Patent Ductus Arteriosus of the Preterm Infant. *Pediatrics*. 2020;146(5):e20201209.
161. Lewandowski AJ, Augustine D, Lamata P, Davis EF, Lazdam M, Francis J, et al. Preterm heart in adult life: cardiovascular magnetic resonance reveals distinct differences in left ventricular mass, geometry, and function. *Circulation*. 2013;127(2):197-206.
162. Mohlkert LA, Hallberg J, Broberg O, Rydberg A, Halvorsen CP, Liuba P, et al. The Preterm Heart in Childhood: Left Ventricular Structure, Geometry, and Function Assessed by

- Echocardiography in 6-Year-Old Survivors of Periviable Births. *J Am Heart Assoc.* 2018;7(2):e007742.
163. Lewandowski AJ, Bradlow WM, Augustine D, Davis EF, Francis J, Singhal A, et al. Right ventricular systolic dysfunction in young adults born preterm. *Circulation.* 2013;128(7):713-720.
164. Boardman H, Birse K, Davis EF, Whitworth P, Aggarwal V, Lewandowski AJ, et al. Comprehensive multi-modality assessment of regional and global arterial structure and function in adults born preterm [published correction appears in *Hypertens Res.* 2016 Aug;39(8):620]. *Hypertens Res.* 2016;39(1):39-45.
165. Lewandowski AJ, Leeson P. Preeclampsia, prematurity and cardiovascular health in adult life. *Early Hum Dev.* 2014;90(11):725-729.
166. Cheung YF, Wong KY, Lam BC, Tsoi NS. Relation of arterial stiffness with gestational age and birth weight. *Arch Dis Child.* 2004;89(3):217-221.
167. Goss KN, Beshish AG, Barton GP, Haraldsdottir K, Levin TS, Tetri LH, et al. Early pulmonary vascular disease in young adults born preterm. *Am J Respir Crit Care Med.* 2018;198(12):1549–1558.
168. Lewandowski AJ, Davis EF, Yu G, Digby JE, Boardman H, Whitworth P, et al. Elevated blood pressure in preterm-born offspring associates with a distinct antiangiogenic state and microvascular abnormalities in adult life. *Hypertension.* 2015;65(3):607-614.
169. Lazdam M, de la Horra A, Pitcher A, Mannie Z, Diesch J, Trevitt C, et al. Elevated blood pressure in offspring born premature to hypertensive pregnancy: is endothelial dysfunction the underlying vascular mechanism?. *Hypertension.* 2010;56(1):159-165.
170. Zivanovic S, Pushparajah K, Calvert S, Marlow N, Razavi R, Peacock JL, et al. Pulmonary artery pressures in school-age children born prematurely. *J Pediatr.* 2017;191:42–49.e3.
171. Carr H, Cnattingius S, Granath F, Ludvigsson JF, Edstedt Bonamy AK. Preterm Birth and Risk of Heart Failure Up to Early Adulthood. *J Am Coll Cardiol.* 2017;69(21):2634-2642.
172. Crump C, Howell EA, Stroustrup A, McLaughlin MA, Sundquist J, Sundquist K. Association of preterm birth with risk of ischemic heart disease in adulthood. *JAMA Pediatr.* 2019;173(8):736–743.
173. Lewandowski AJ, Levy PT, Bates ML, McNamara PJ, Nuyt AM, Goss KN. Impact of the Vulnerable Preterm Heart and Circulation on Adult Cardiovascular Disease Risk. *Hypertension.* 2020;76(4):1028-1037.
174. Jain VG, Willis KA, Jobe A, Ambalavanan N. Chorioamnionitis and neonatal outcomes. *Pediatr Res.* 2022;91(2):289-296.

175. Pierrat V, Marchand-Martin L, Arnaud C, Kaminski M, Resche-Rigon M, Lebeaux C, et al. Neurodevelopmental outcome at 2 years for preterm children born at 22 to 34 weeks' gestation in France in 2011: EPIPAGE-2 cohort study. *BMJ*. 2017;358:j3448.
176. Meyer U, Feldon J, Dammann O. Schizophrenia and autism: both shared and disorder-specific pathogenesis via perinatal inflammation?. *Pediatr Res*. 2011;69(5 Pt. 2):26R-33R.
177. Cerisola A, Baltar F. Complicaciones neurológicas de la prematuridad [Neurological consequences of prematurity]. *Medicina (B Aires)*. 2023;83 Suppl. 4:18-24.
178. Hinojosa-Rodríguez M, Harmony T, Carrillo-Prado C, Van Horn JD, Irimia A, Torgerson C, et al. Clinical neuroimaging in the preterm infant: Diagnosis and prognosis. *Neuroimage Clin*. 2017;16:355-368.
179. Hart AR, Whitby EW, Griffiths PD, Smith MF. Magnetic resonance imaging and developmental outcome following preterm birth: review of current evidence. *Dev Med Child Neurol*. 2008;50(9):655-663.
180. Engelhardt E, Inder TE, Alexopoulos D, Dierker DL, Hill J, Van Essen D, et al. Regional impairments of cortical folding in premature infants. *Ann Neurol*. 2015;77(1):154-162.
181. Glover V, O'Connor TG, O'Donnell KJ. Fetal Programming and Public Policy. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2023;62(6):618-620.
182. Crovetto F, Crispi F, Casas R, Martín-Asuero A, Borràs R, Vieta E, et al. Effects of Mediterranean Diet or Mindfulness-Based Stress Reduction on Prevention of Small-for-Gestational Age Birth Weights in Newborns Born to At-Risk Pregnant Individuals: The IMPACT BCN Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2021;326(21):2150-2160.
183. Crovetto F, Nakaki A, Arranz A, Borràs R, Vellvé K, Paules C, et al. Effect of a Mediterranean Diet or Mindfulness-Based Stress Reduction During Pregnancy on Child Neurodevelopment: A Prespecified Analysis of the IMPACT BCN Randomized Clinical Trial. *JAMA Netw Open*. 2023;6(8):e2330255.
184. Crispi F, Sepúlveda-Martínez Á, Crovetto F, Gómez O, Bijnsens B, Gratacós E. Main Patterns of Fetal Cardiac Remodeling. *Fetal Diagn Ther*. 2020;47(5):337-344.
185. Pérez-Cruz M, Cruz-Lemini M, Fernández MT, Parra JA, Bartrons J, Gómez-Roig MD, et al. Fetal cardiac function in late-onset intrauterine growth restriction vs small-for-gestational age, as defined by estimated fetal weight, cerebroplacental ratio and uterine artery Doppler. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015;46(4):465-471.
186. Rodríguez-López M, Cruz-Lemini M, Valenzuela-Alcaraz B, Garcia-Otero L, Sitges M, et al. Descriptive analysis of different phenotypes of cardiac remodeling in fetal growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2017;50(2):207-214.

187. Crispi F, Bijmens B, Figueras F, Bartrons J, Eixarch E, Le Noble F, et al. Fetal growth restriction results in remodeled and less efficient hearts in children. *Circulation*. 2010;121(22):2427-2436.
188. Sarvari SI, Rodriguez-Lopez M, Nuñez-Garcia M, Sitges M, Sepulveda-Martinez A, et al. Persistence of Cardiac Remodeling in Preadolescents With Fetal Growth Restriction. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2017;10(1):e005270.
189. Cruz-Lemini M, Crispi F, Valenzuela-Alcaraz B, Figueras F, Gómez O, Sitges M, et al. A fetal cardiovascular score to predict infant hypertension and arterial remodeling in intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol*. 2014;210(6):552.e1-552.e22.
190. Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth ME. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ*. 1989;298(6673):564-567.
191. Demicheva E, Crispi F. Long-term follow-up of intrauterine growth restriction: cardiovascular disorders. *Fetal Diagn Ther*. 2014;36(2):143-153.
192. Valenzuela-Alcaraz B, Crispi F, Bijmens B, Cruz-Lemini M, Creus M, Sitges M, et al. Assisted reproductive technologies are associated with cardiovascular remodeling in utero that persists postnatally. *Circulation*. 2013;128(13):1442-1450.
193. Valenzuela-Alcaraz B, Serafini A, Sepulveda-Martínez A, Casals G, Rodríguez-López M, García-Otero L, et al. Postnatal persistence of fetal cardiovascular remodelling associated with assisted reproductive technologies: a cohort study. *BJOG*. 2019;126(2):291-298.
194. Guirado L, Crispi F, Masoller N, Bennasar M, Marimon E, Carretero J, et al. Biventricular impact of mild to moderate fetal pulmonary valve stenosis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2018;51(3):349-356.
195. Scherrer U, Rimoldi SF, Rexhaj E, Stuber T, Duplain H, Garcin S, et al. Systemic and pulmonary vascular dysfunction in children conceived by assisted reproductive technologies. *Circulation*. 2012;125(15):1890-1896.
196. Depla AL, De Wit L, Steenhuis TJ, Slieker MG, Voormolen DN, Scheffer PG, et al. Effect of maternal diabetes on fetal heart function on echocardiography: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2021;57(4):539-550.
197. García-Otero L, López M, Gómez O, Goncé A, Bennasar M, Martínez JM, et al. Zidovudine treatment in HIV-infected pregnant women is associated with fetal cardiac remodelling. *AIDS*. 2016;30(9):1393-1401.
198. Aguilera J, Semmler J, Anzoategui S, Zhang H, Nicolaidis KH, Charakida M. Cardiac function in gestational diabetes mellitus: A longitudinal study from fetal life to infancy. *BJOG*. 2021;128(2):272-279.

199. Lipshultz SE, Williams PL, Zeldow B, Wilkinson JD, Rich KC, van Dyke RB, et al. Cardiac effects of in-utero exposure to antiretroviral therapy in HIV-uninfected children born to HIV-infected mothers. *AIDS*. 2015;29(1):91-100.
200. Yu Y, Arah OA, Liew Z, Cnattingius S, Olsen J, Sørensen HT, et al. Maternal diabetes during pregnancy and early onset of cardiovascular disease in offspring: population based cohort study with 40 years of follow-up. *BMJ*. 2019;367:l6398.
201. Mitchell T, MacDonald JW, Srinouanpranchanh S, Bammler TK, Merillat S, Boldenow E, et al. Evidence of cardiac involvement in the fetal inflammatory response syndrome: disruption of gene networks programming cardiac development in nonhuman primates. *Am J Obstet Gynecol*. 2018;218(4):438.e1-438.e16.
202. Rounioja S, Räsänen J, Ojaniemi M, Glumoff V, Autio-Harmainen H, Hallman M. Mechanism of acute fetal cardiovascular depression after maternal inflammatory challenge in mouse. *Am J Pathol*. 2005;166(6):1585-1592.
203. Tare M, Bensley JG, Moss TJ, Lingwood BE, Kim MY, Barton SK, et al. Exposure to intrauterine inflammation leads to impaired function and altered structure in the preterm heart of fetal sheep. *Clin Sci (Lond)*. 2014;127(9):559-569.
204. Stock SJ, Patey O, Thilaganathan B, White S, Furfaro LL, Payne MS, et al. Intrauterine *Candida albicans* Infection Causes Systemic Fetal Candidiasis With Progressive Cardiac Dysfunction in a Sheep Model of Early Pregnancy. *Reprod Sci*. 2017;24(1):77-84.
205. Mäkilä K, Rounioja S, Vuolteenaho O, Paakkari J, Hallman M, Räsänen J. Fetal cardiac natriuretic peptide expression and cardiovascular hemodynamics in endotoxin-induced acute cardiac dysfunction in mouse. *Pediatr Res*. 2006;59(2):180-184.
206. Seehase M, Gantert M, Ladenburger A, Garnier Y, Kunzmann S, Thomas W, et al. Myocardial response in preterm fetal sheep exposed to systemic endotoxaemia. *Pediatr Res*. 2011;70(3):242-246.
207. Polglase GR, Hooper SB, Gill AW, Allison BJ, Crossley KJ, Moss TJ, et al. Intrauterine inflammation causes pulmonary hypertension and cardiovascular sequelae in preterm lambs. *J Appl Physiol* (1985). 2010;108(6):1757-1765.
208. Vrselja A, Pillow JJ, Bensley JG, Ellery SJ, Ahmadi-Noorbakhsh S, Moss TJ, et al. Intrauterine inflammation exacerbates maladaptive remodeling of the immature myocardium after preterm birth in lambs. *Pediatr Res*. 2022;92(6):1555-1565.
209. Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF, Gomez R, Medina L, Silva M, et al. Fetal cardiac dysfunction in preterm premature rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2004;16(3):146-157.

210. Di Naro E, Cromi A, Ghezzi F, Giocolano A, Caringella A, Loverro G. Myocardial dysfunction in fetuses exposed to intraamniotic infection: new insights from tissue Doppler and strain imaging. *Am J Obstet Gynecol.* 2010;203(5):459.e1-459.e7.
211. Letti Müller AL, Barrios Pde M, Kliemann LM, Valério EG, Gasnier R, Magalhães JA. Tei index to assess fetal cardiac performance in fetuses at risk for fetal inflammatory response syndrome. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2010;36(1):26-31.
212. Aye CYL, Lewandowski AJ, Lamata P, Upton R, Davis E, Ohuma EO, et al. Disproportionate cardiac hypertrophy during early postnatal development in infants born preterm. *Pediatr Res.* 2017;82(1):36-46.
213. Mueller T, Gegenhuber A, Dieplinger B, Poelz W, Haltmayer M. Long-term stability of endogenous B-type natriuretic peptide (BNP) and amino terminal proBNP (NT-proBNP) in frozen plasma samples. *Clin Chem Lab Med.* 2004;42(8):942-944.
214. Carvajal JA, Ferrer FA, Araya FI, Delpiano AM. Normal amino-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) values in amniotic fluid. *Clin Biochem.* 2017;50(1-2):23-26.
215. Carvajal JA. The role of brain natriuretic peptide in maintaining myometrial quiescence during pregnancy. *Exp Physiol.* 2014;99(3):489-494.
216. Carvajal JA, Delpiano AM, Cuello MA, Poblete JA, Casanello PC, Sobrevia LA, et al. Brain natriuretic peptide (BNP) produced by the human chorioamnion may mediate pregnancy myometrial quiescence. *Reprod Sci.* 2009;16(1):32-42.
217. Hall C. Essential biochemistry and physiology of (NT-pro)BNP. *Eur J Heart Fail.* 2004;6(3):257-260.
218. Miyoshi T, Hosoda H, Umekawa T, Asada T, Fujiwara A, Kurosaki KI, et al. Amniotic Fluid Natriuretic Peptide Levels in Fetuses With Congenital Heart Defects or Arrhythmias [published correction appears in *Circ J.* 2018;82(12):3112]. *Circ J.* 2018;82(10):2619-2626.
219. Leufgen C, Gembruch U, Stoffel-Wagner B, Fimmers R, Merz WM. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in amniotic fluid of fetuses with known or suspected cardiac load. *PLoS One.* 2017;12(5):e0177253.
220. Takano M, Nagasaki S, Sakuma J, Shimabukuro M, Kotaki H, Nakata M. Association of amniotic fluid natriuretic peptide levels with ductus venosus Doppler flow in recipient twins with twin-to-twin transfusion syndrome : DV flow and NT-proBNP in TTTS recipient twins. *J Med Ultrason (2001).* 2022;49(4):703-708.
221. Irani RA, Buhimschi CS, Cross SN, Zhao G, Copel JA, Bhandari V, et al. Fetal Myocardial Function as Assessed by N-Terminal Fragment Brain Natriuretic Protein in Premature Fetuses Exposed to Intra-amniotic Inflammation. *Am J Perinatol.* 2020;37(7):745-753.
222. Katrukha IA. Human cardiac troponin complex. Structure and functions. *Biochemistry (Mosc).* 2013;78(13):1447-1465.

223. Thijssen VL, Ausma J, Gorza L, van der Velden HM, Allestie MA, Van Gelder IC, et al. Troponin I isoform expression in human and experimental atrial fibrillation. *Circulation*. 2004;110(7):770-775.
224. Blohm ME, Arndt F, Fröschle GM, Langenbach N, Sandig J, Vettorazzi E, et al. Cardiovascular Biomarkers in Amniotic Fluid, Umbilical Arterial Blood, Umbilical Venous Blood, and Maternal Blood at Delivery, and Their Reference Values for Full-Term, Singleton, Cesarean Deliveries. *Front Pediatr*. 2019;7:271.
225. Pacora P, Romero R, Jaiman S, Erez O, Bhatti G, Panaitescu B, et al. Mechanisms of death in structurally normal stillbirths. *J Perinat Med*. 2019;47(2):222-240.
226. Lee SM, Kwon JE, Song SH, Kim GB, Park JY, Kim BJ, et al. Prenatal prediction of neonatal death in single ventricle congenital heart disease. *Prenat Diagn*. 2016;36(4):346-352.
227. Alexandre SM, D'Almeida V, Guinsburg R, Nakamura MU, Tufik S, Moron A. Cord blood cardiac troponin I, fetal Doppler velocimetry, and acid base status at birth. *Int J Gynaecol Obstet*. 2008;100(2):136-140.
228. Perez-Cruz M, Crispi F, Fernández MT, Parra JA, Valls A, Gomez Roig MD, et al. Cord Blood Biomarkers of Cardiac Dysfunction and Damage in Term Growth-Restricted Fetuses Classified by Severity Criteria. *Fetal Diagn Ther*. 2018;44(4):271-276.
229. Engin Y, Ustün Y, Kurtay G. Cardiac troponin I levels in umbilical cord blood. *Int J Gynaecol Obstet*. 2002;77(3):239-241.
230. Iacovidou N, Boutsikou M, Gourgiotis D, Briana DD, Baka S, et al. Perinatal changes of cardiac troponin-I in normal and intrauterine growth-restricted pregnancies. *Mediators Inflamm*. 2007;2007:53921.
231. Zhou WJ, Yu F, Shi J, Yang H, Zou SJ, Jiang YM. Serum Levels of Cardiac Troponin I in Asphyxiated Neonates Predict Mortality. *Clin Lab*. 2016;62(8):1427-1434.
232. Shastri AT, Samarasekara S, Muniraman H, Clarke P. Cardiac troponin I concentrations in neonates with hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Acta Paediatr*. 2012;101(1):26-29.
233. Paules C, Miranda J, Policiano C, Crovetto F, Youssef L, Hahner N, et al. Fetal neurosonography detects differences in cortical development and corpus callosum in late-onset small fetuses. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2021;58(1):42-47.
234. Egaña-Ugrinovic G, Sanz-Cortes M, Figueras F, Bargalló N, Gratacós E. Differences in cortical development assessed by fetal MRI in late-onset intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol*. 2013;209(2):126.e1-126.e8.
235. Egaña-Ugrinovic G, Sanz-Cortés M, Couve-Pérez C, Figueras F, Gratacós E. Corpus callosum differences assessed by fetal MRI in late-onset intrauterine growth restriction and its association with neurobehavior. *Prenat Diagn*. 2014;34(9):843-849

236. Egaña-Ugrinovic G, Savchev S, Bazán-Arcos C, Puerto B, Gratacós E, Sanz-Cortés M. Neurosonographic assessment of the corpus callosum as imaging biomarker of abnormal neurodevelopment in late-onset fetal growth restriction. *Fetal Diagn Ther*. 2015;37(4):281-288.
237. Sanz-Cortés M, Figueras F, Bargalló N, Padilla N, Amat-Roldan I, Gratacós E. Abnormal brain microstructure and metabolism in small-for-gestational-age term fetuses with normal umbilical artery Doppler. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2010;36(2):159-165.
238. Batalle D, Eixarch E, Figueras F, Muñoz-Moreno E, Bargallo N, Illa M, et al. Altered small-world topology of structural brain networks in infants with intrauterine growth restriction and its association with later neurodevelopmental outcome. *Neuroimage*. 2012;60(2):1352-1366.
239. Basso A, Youssef L, Nakaki A, Paules C, Miranda J, Casu G, et al. Fetal neurosonography at 31-35 weeks reveals altered cortical development in pre-eclampsia with and without small-for-gestational-age fetus. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2022;59(6):737-746.
240. Miller SL, Huppi PS, Mallard C. The consequences of fetal growth restriction on brain structure and neurodevelopmental outcome. *J Physiol*. 2016;594(4):807-823.
241. Zhao J, Xia L. Association between hypertensive disorders of pregnancy and risk of attention-deficit/hyperactivity disorder in the offspring: a systematic review and meta-analysis. *Hypertens Pregnancy*. 2022;41(3-4):149-158.
242. Arcangeli T, Thilaganathan B, Hooper R, Khan KS, Bhide A. Neurodevelopmental delay in small babies at term: a systematic review. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2012;40(3):267-275.
243. Eixarch E, Meler E, Iraola A, Illa M, Crispi F, Hernandez-Andrade E, et al. Neurodevelopmental outcome in 2-year-old infants who were small-for-gestational age term fetuses with cerebral blood flow redistribution. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2008;32(7):894-899.
244. Boutet ML, Eixarch E, Ahumada-Droguett P, Nakaki A, Crovetto F, Cívico MS, et al. Fetal neurosonography and infant neurobehavior following conception by assisted reproductive technology with fresh or frozen embryo transfer. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2022;60(5):646-656.
245. Pinborg A, Wennerholm UB, Bergh C. Long-term outcomes for children conceived by assisted reproductive technology. *Fertil Steril*. 2023;120(3 Pt. 1):449-456.
246. Hansen T, Henriksen TB, Bach CC, Matthiesen NB. Congenital Heart Defects and Measures of Prenatal Brain Growth: A Systematic Review. *Pediatr Neurol*. 2017;72:7-18.e1.

247. Masoller N, Sanz-Cortés M, Crispi F, Gómez O, Bennasar M, Egaña-Ugrinovic G, et al. Severity of Fetal Brain Abnormalities in Congenital Heart Disease in Relation to the Main Expected Pattern of in utero Brain Blood Supply. *Fetal Diagn Ther*. 2016;39(4):269-278.
248. Ng IHX, Bonthron AF, Kelly CJ, Cordero-Grande L, Hughes EJ, Price AN, et al. Investigating altered brain development in infants with congenital heart disease using tensor-based morphometry. *Sci Rep*. 2020;10(1):14909.
249. Von Rhein M, Buchmann A, Hagmann C, Dave H, Bernet V, Scheer I, et al. Severe Congenital Heart Defects Are Associated with Global Reduction of Neonatal Brain Volumes. *J Pediatr*. 2015;167(6):1259-63.e1.
250. Khalil A, Suff N, Thilaganathan B, Hurrell A, Cooper D, Carvalho JS. Brain abnormalities and neurodevelopmental delay in congenital heart disease: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2014;43(1):14-24.
251. Yoon BH, Jun JK, Romero R, Park KH, Gomez R, Choi JH, et al. Amniotic fluid inflammatory cytokines (interleukin-6, interleukin-1beta, and tumor necrosis factor-alpha), neonatal brain white matter lesions, and cerebral palsy. *Am J Obstet Gynecol*. 1997;177(1):19-26.
252. Rodríguez-Trujillo A, Ríos J, Ángeles MA, Posadas DE, Murillo C, Rueda C, et al. Influence of perinatal inflammation on the neurodevelopmental outcome of premature infants. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2019;32(7):1069-1077.
253. Yoon BH, Romero R, Park JS, Kim CJ, Kim SH, Choi JH, et al. Fetal exposure to an intra-amniotic inflammation and the development of cerebral palsy at the age of three years. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;182(3):675-681.
254. Paules C, Pueyo V, Martí E, de Vilchez S, Burd I, Calvo P, et al. Threatened preterm labor is a risk factor for impaired cognitive development in early childhood. *Am J Obstet Gynecol*. 2017;216(2):157.e1-157.e7.
255. Campos-Berga L, Moreno-Giménez A, Sahuquillo-Leal R, Hervás D, Diago V, Navalón P, et al. Emotional regulation and psychomotor development after threatening preterm labor: a prospective study. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2022;31(3):473-481.
256. Story L, Davidson A, Patkee P, Fleiss B, Kyriakopoulou V, Colford K, et al. Brain volumetry in fetuses that deliver very preterm: An MRI pilot study. *Neuroimage Clin*. 2021;30:102650.
257. Thomason ME, Scheinost D, Manning JH, Grove LE, Hect J, Marshall N, et al. Weak functional connectivity in the human fetal brain prior to preterm birth. *Sci Rep*. 2017;7:39286.
258. Elimian A, Figueroa R, Patel K, Visintainer P, Sehgal PB, Tejani N. Reference values of amniotic fluid neuron-specific enolase. *J Matern Fetal Med*. 2001;10(3):155-158.

259. Zinsmeyer J, Marangos PJ, Issel EP, Gross J. Neuron specific enolase in amniotic fluid--a possible indicator for fetal distress and brain implication. *J Perinat Med.* 1987;15(2):199-202.
260. Wijnberger LD, Nikkels PG, van Dongen AJ, Noorlander CW, Mulder EJ, Schrama LH, et al. Expression in the placenta of neuronal markers for perinatal brain damage. *Pediatr Res.* 2002;51(4):492-496.
261. Elimian A, Figueroa R, Verma U, Visintainer P, Sehgal PB, Tejani N. Amniotic fluid neuron-specific enolase: a role in predicting neonatal neurologic injury?. *Obstet Gynecol.* 1998;92(4 Pt 1):546-550.
262. Annerén G, Esscher T, Larsson L, Olsen L, Pålman S. S-100 protein and neuron-specific enolase in amniotic fluid as markers of abdominal wall and neural tube defects in the fetus. *Prenat Diagn.* 1988;8(5):323-328.
263. Arca G, Arnaez J, Agut T, Núñez C, Stephan-Otto C, Valls A, et al. Neuron-specific enolase is correlated with lesion topology, relative infarct volume and outcome of symptomatic NAIS. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2020;105(2):132-137.
264. León-Lozano MZ, Arnaez J, Valls A, Arca G, Agut T, Alarcón A, et al. Cerebrospinal fluid levels of neuron-specific enolase predict the severity of brain damage in newborns with neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy treated with hypothermia. *PLoS One.* 2020;15(6):e0234082.
265. Michetti F, Gazzolo D. S100B protein in biological fluids: a tool for perinatal medicine. *Clin Chem.* 2002;48(12):2097-2104.
266. Tskitishvili E, Komoto Y, Temma-Asano K, Hayashi S, Kinugasa Y, Tsubouchi H, et al. S100B protein expression in the amnion and amniotic fluid in pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod.* 2006;12(12):755-761.
267. Friel LA, Romero R, Edwin S, Nien JK, Gomez R, Chaiworapongsa T, et al. The calcium binding protein, S100B, is increased in the amniotic fluid of women with intra-amniotic infection/inflammation and preterm labor with intact or ruptured membranes. *J Perinat Med.* 2007;35(5):385-393.
268. Florio P, Michetti F, Bruschettini M, Lituania M, Bruschettini P, Severi FM, et al. Amniotic fluid S100B protein in mid-gestation and intrauterine fetal death. *Lancet.* 2004;364(9430):270-272.
269. Gazzolo D, Marinoni E, Di Iorio R, Bruschettini M, Kornacka M, Lituania M, et al. Urinary S100B protein measurements: A tool for the early identification of hypoxic-ischemic encephalopathy in asphyxiated full-term infants. *Crit Care Med.* 2004;32(1):131-136.

270. Thorngren-Jerneck K, Alling C, Herbst A, Amer-Wahlin I, Marsal K. S100 protein in serum as a prognostic marker for cerebral injury in term newborn infants with hypoxic ischemic encephalopathy. *Pediatr Res*. 2004;55(3):406-412.
271. Gazzolo D, Marinoni E, Di Iorio R, Bruschettini M, Kornacka M, Lituanica M, et al. Measurement of urinary S100B protein concentrations for the early identification of brain damage in asphyxiated full-term infants. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2003;157(12):1163-1168.
272. Gazzolo D, Bruschettini M, Lituanica M, Serra G, Bonacci W, Michetti F. Increased urinary S100B protein as an early indicator of intraventricular hemorrhage in preterm infants: correlation with the grade of hemorrhage. *Clin Chem*. 2001;47(10):1836-1838.
273. Florio P, Marinoni E, Di Iorio R, Bashir M, Ciotti S, Sacchi R, et al. Urinary S100B protein concentrations are increased in intrauterine growth-retarded newborns. *Pediatrics*. 2006;118(3):e747-e754.
274. Undén J, Christensson B, Bellner J, Alling C, Romner B. Serum S100B levels in patients with cerebral and extracerebral infectious disease. *Scand J Infect Dis*. 2004;36(1):10-13.
275. Lopez J, Mikaelian I, Gonzalo P. Amniotic fluid glial fibrillary acidic protein (AF-GFAP), a biomarker of open neural tube defects. *Prenat Diagn*. 2013;33(10):990-995.
276. Metallinou D, Karampas G, Nyktari G, Iacovidou N, Lykeridou K, Rizos D. Serum glial fibrillary acidic protein as a biomarker of brain injury in premature neonates. *Bosn J Basic Med Sci*. 2022;22(1):46-53.
277. Ennen CS, Huisman TA, Savage WJ, Northington FJ, Jennings JM, Everett AD, et al. Glial fibrillary acidic protein as a biomarker for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy treated with whole-body cooling. *Am J Obstet Gynecol*. 2011;205(3):251.e1-251.e7.
278. Limperopoulos C, Soul JS, Gauvreau K, Huppi PS, Warfield SK, Bassan H, et al. Late gestation cerebellar growth is rapid and impeded by pre- mature birth. *Pediatrics*. 2005;115:688–695.
279. Dubois J, Lefèvre J, Angleys H, Leroy F, Fischer C, Lebenberg J, et al. The dynamics of cortical folding waves and prematurity-related deviations revealed by spatial and spectral analysis of gyrification. *Neuroimage*. 2019;185:934-946.
280. Shimony JS, Smyser CD, Wideman G, Alexopoulos D, Hill J, Harwell J, et al. Comparison of cortical folding measures for evaluation of developing human brain. *Neuroimage*. 2016;125:780-790.
281. Gasquoine PG. Contributions of the insula to cognition and emotion. *Neuropsychol Rev*. 2014;24(2):77-87.
282. Craig AD. Significance of the insula for the evolution of human awareness of feelings from the body. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1225:72-82.

283. Dean JM, van de Looij Y, Sizonenko SV, Lodygensky GA, Lazeyras F, Bolouri H, et al. Delayed cortical impairment following lipopolysaccharide exposure in preterm fetal sheep. *Ann Neurol*. 2011;70(5):846-56.
284. Van de Looij Y, Lodygensky GA, Dean J, Lazeyras F, Hagberg H, Kjellmer I, et al. High-field diffusion tensor imaging characterization of cerebral white matter injury in lipopolysaccharide-exposed fetal sheep. *Pediatr Res*. 2012;72(3):285-92.
285. Liu F, Cao S, Liu J, Du Z, Guo Z, Ren C. Ultrasound measurement of the corpus callosum and neural development of premature infants. *Neural Regen Res*. 2013;8(26):2432-2440.
286. Nosarti C, Rushe TM, Woodruff PWR, Stewart AL, Rifkin L, Murray RM. Corpus callosum size and very preterm birth: Relationship to neuropsychological outcome. *Brain*. 2004;127:2080–2089.
287. De León Reyes NS, Bragg-Gonzalo L, Nieto M. Development and plasticity of the corpus callosum. *Development*. 2020;147(18):dev189738.
288. Moses P, Courchesne E, Stiles J, Trauner D, Egañas B, Edwards E. Regional size reduction in the human corpus callosum following preand perinatal brain injury. *Cereb Cortex*. 2000;10:1200–1210
289. Paul LK: Developmental malformation of the corpus callosum: a review of typical callosal development and examples of developmental disorders with callosal involvement. *J Neurodev Disord*. 2011;3: 3–27.
290. Mazarico E, Llorba E, Cumplido R, Valls A, Melchor JC, Iglesias M, et al. Neural injury markers in intrauterine growth restriction and their relation to perinatal outcomes. *Pediatr Res*. 2017;82(3):452-457.
291. Agnew EJ, Ivy JR, Stock SJ, Chapman KE. Glucocorticoids, antenatal corticosteroid therapy and fetal heart maturation. *J Mol Endocrinol*. 2018;61(1):R61-R73.
292. Knaven O, Ganzevoort W, de Boer M, Wolf H. Fetal heart rate variation after corticosteroids for fetal maturation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2017;216:38-45.
293. Dean JM, Farrag D, Zahkhouk SA, El Zawahry EY, Hagberg H, Kjellmer I, et al. Cerebellar white matter injury following systemic endotoxemia in preterm fetal sheep. *Neuroscience*. 2009;160(3):606-615.
294. Murphy KE, Hannah ME, Willan AR, Hewson SA, Ohlsson A, Kelly EN, et al. Multiple courses of antenatal corticosteroids for preterm birth (MACS): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2008;372(9656):2143-2151.
295. Davis EP, Sandman CA, Buss C, Wing DA, Head K. Fetal glucocorticoid exposure is associated with preadolescent brain development. *Biol Psychiatry*. 2013;74(9):647-655.

296. Buss C, Davis EP, Shahbaba B, Pruessner JC, Head K, Sandman CA. Maternal cortisol over the course of pregnancy and subsequent child amygdala and hippocampus volumes and affective problems. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(20):E1312-E1319.
297. Huang WL, Beazley LD, Quinlivan JA, Evans SF, Newnham JP, Dunlop SA. Effect of corticosteroids on brain growth in fetal sheep. *Obstet Gynecol*. 1999;94(2):213-218.
298. Asztalos EV, Murphy KE, Matthews SG. A Growing Dilemma: Antenatal Corticosteroids and Long-Term Consequences. *Am J Perinatol*. 2022;39(6):592-600.
299. Fuma K, Kotani T, Ushida T, Imai K, Iitani Y, Nakamura N, et al. Antenatal corticosteroids-to-delivery interval associates cord blood S100B levels. *J Obstet Gynaecol Res*. 2023;49(4):1129-1136.
300. Quinlivan JA, Beazley LD, Archer M, Evans SF, Newnham JP, Dunlop SA. Repeated prenatal corticosteroids reduce glial fibrillary acidic protein in the ovine central nervous system. *J Perinat Med*. 2002;30(3):209-219.
301. Romero R, Miranda J, Chaiworapongsa T, Chaemsathong P, Gotsch F, Dong Z, et al. A novel molecular microbiologic technique for the rapid diagnosis of microbial invasion of the amniotic cavity and intra-amniotic infection in preterm labor with intact membranes. *Am J Reprod Immunol*. 2014;71(4):330-358.
302. Chaemsathong P, Romero R, Docheva N, Chaiyasit N, Bhatti G, Pacora P, et al. Comparison of rapid MMP-8 and interleukin-6 point-of-care tests to identify intra-amniotic inflammation/infection and impending preterm delivery in patients with preterm labor and intact membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2018;31(2):228-244.
303. Nien JK, Yoon BH, Espinoza J, Kusanovic JP, Erez O, Soto E, et al. A rapid MMP-8 bedside test for the detection of intra-amniotic inflammation identifies patients at risk for imminent preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;195(4):1025-1030.
304. Chen LW, Aubert AM, Shivappa N, Bernard JY, Mensink-Bout SM, Geraghty AA, et al. Maternal dietary quality, inflammatory potential and childhood adiposity: an individual participant data pooled analysis of seven European cohorts in the ALPHABET consortium. *BMC Med*. 2021;19(1):33.
305. Binns C, Lee M, Low WY. The long-term public health benefits of breastfeeding. *Asia Pac J Public Health*. 2016;28(1):7-14.
306. Zhang YB, Pan XF, Chen J, Cao A, Xia L, Zhang Y, et al. Combined lifestyle factors, all-cause mortality and cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *J Epidemiol Community Health*. 2021;75(1):92-99.
307. Nakaki A, Crovetto F, Urru A, Piella G, Borrás R, Comte V, et al. Effects of Mediterranean diet or mindfulness-based stress reduction on fetal and neonatal brain development: a

secondary analysis of a randomized clinical trial. *Am J Obstet Gynecol MFM*. 2023;5(12):101188.

308. Sutton PS, Darmstadt GL. Preterm birth and neurodevelopment: a review of outcomes and recommendations for early identification and cost-effective interventions. *J Trop Pediatr*. 2013;59(4):258-265.