



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE POSTGRADO

**“ESTRÉS OXIDATIVO Y APOPTOSIS DE LOS
TELOCITOS Y MIOFIBROBLASTOS EN LA
PLACENTA DE MUJERES CON PREECLAMPSIA”**

MIRNA ABIGAIL LETELIER DURÁN

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN FISIOLÓGÍA

**Directora de Tesis
Prof. Dra. Cleofina Bosco Becerra.**

2016

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por la candidata

MIRNA ABIGAIL LETELIER DURÁN

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Fisiología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 04 de noviembre de 2016.

Prof. Dra. Cleofina Bosco B.

Directora de Tesis

Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo, ICBM

Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr. Héctor Contreras.

Prof. Dra. Gloria Riquelme.

Prof. Dra. Julia Guerrero.

Presidente Comisión

AGRADECIMIENTOS

A Dios por su infinita ayuda prestada en cada uno de mis procesos y proyectos, desde el inicio a final de cada uno de ellos.

A mi padre por heredarme ese espíritu de luchador que plasmó en mí desde pequeña, vi su ejemplo y lo hice mío, cada uno de sus consejos me acompañaron hasta hoy y sin duda él es mi motivación cuando de cumplir metas se trata.

A mi familia, fueron quienes conocieron cada uno de mis fracasos y triunfos que demandó el trabajo de esta tesis y estuvieron siempre con una palabra de aliento.

A Eugenio, por su amor, compañía y ayuda en esos momentos en que todo se veía cuesta arriba.

A mi profesora Cleofina Bosco, sus enseñanzas, explicaciones y consejos permitieron que me aficionara y deseara cada día averiguar más del tema de esta tesis.

A don Ricardo, su ayuda y buena voluntad en el laboratorio fue útil para aprender una técnica nueva en mis conocimientos de dentista.

Gracias a todos.

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Placenta	6
1.2 Vellosidades coriónicas	6
1.3 Estroma	8
1.4 Telocitos	9
1.5 Miofibroblastos	12
1.6 Preeclampsia	14
1.6.1 Definición y epidemiología	14
1.6.2 Patogénesis	16
1.6.3 Factores de riesgo	17
1.7 Estrés oxidativo	18
1.8 Apoptosis	20
1.9 Importancia fisiológica de los TC	22
1.10 Características de los datos clínicos	23
2. HIPÓTESIS	25
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivos generales	26
3.2 Objetivos Específicos	26
4. MATERIALES Y MÉTODOS	27
4.1 Antecedentes Generales	27

4.2 Grupos en estudio	27
4.3 Inmunohistoquímica	29
4.3.1 Criterios de Evaluación	31
4.4 Análisis Estadístico	34
5. RESULTADOS	35
5.1 Características clínicas de las pacientes	35
5.2 Expresión de los marcadores de residuos de nitrotirosina y caspasa 3 activada.	35
5.3 Expresión relativa de residuos de nitrotirosina, caspasa 3 activada y características clínicas.	38
5.4 Relación entre los porcentajes de intensidad IHQ agrupados (positivo y negativo) de residuos de nitrotirosina, características clínicas.	41
5.5 Resumen de los resultados	43
6. DISCUSIÓN	44
7. CONCLUSIONES	54
8. PROYECCIONES FUTURAS	55
9. BIBLIOGRAFÍA	56
10. ANEXOS	66

ABREVIACIONES

CML: Células musculares lisas.

CTB: Citotrofoblasto

EO: Estrés oxidativo.

HTA: Hipertensión arterial

IHQ: Inmunohistoquímica

MEC: Matriz extracelular

MET: Microscopio electrónico de transmisión.

MF: Miofibroblastos.

MO: Microscopio óptico.

NO: del inglés, Nitric oxide. Óxido nítrico.

iNOS: del inglés, inducible Nitric oxide synthase. Óxido nítrico sintasa inducible.

PE: Preeclampsia.

RL: Radicales libres.

RN: Recién nacido.

ROS: del inglés, reactive oxygen species. Especies reactivas del oxígeno.

SOD: Súper óxido dismutasa.

STB: Sinciotrofoblasto.

TC: Telocitos.

TEV: Trofoblasto Extravellositario

Tps: Telópodos.

RESUMEN

La preeclampsia (PE) es una alteración multisistémica específica del embarazo, asociada a hipertensión, proteinuria y edema. Su etiología es aún desconocida, aunque se relaciona con una placentación deficiente que conlleva al desarrollo de un estrés oxidativo (EO) exagerado en el órgano, acompañado de una mayor apoptosis.

A la fecha y en relación a la placenta, es importante destacar que los estudios de PE han sido enfocados exclusivamente al efecto del EO y de la apoptosis que experimenta el trofoblasto, sin embargo actualmente se ha descrito un nuevo tipo celular en el estroma de las vellosidades coriónicas y se les ha denominado Telocitos (TC). Sobre la base de esto último, esta investigación se enfoca en el estudio de estas nuevas células en los casos de PE. Los TC presentan una ubicación estratégica entre los miofibroblastos (MF) y la capa muscular de los grandes vasos sanguíneos de las vellosidades coriónicas, postulándose que intervienen como una tríada funcional en la regulación del tono vascular fetal y de la contracción-relajación de las vellosidades en cámara hemática, por ende regulan el intercambio metabólico madre/feto. Al ser la placenta un órgano no innervado, se postula que los TC actuarían como marcapaso o transductor de señales tanto para las células musculares lisas de los vasos sanguíneos fetales como para los MF, ambos presentes en el estroma vellositario.

Bajo la hipótesis que placentas provenientes de mujeres con PE presentan mayor EO y apoptosis evidenciado por marcadores inmunohistoquímicos, el objetivo del estudio fue determinar inmunohistoquímicamente en TC y MF la presencia de residuos de nitrotirosina como marcador de EO y de caspasa 3 activada como marcador del grado de apoptosis en estas células, posteriormente se analizó la relación existente entre estos parámetros inmunohistoquímicos con la edad gestacional, peso del recién nacido (RN) y edad

materna. Se reunieron muestras de placenta (lado fetal) de madres preeclámpticas (n=12) y normotensas (n=11). La aplicó la inmunoperoxidasa individualmente en las secciones de tejido. La inmunotinción se realizó utilizando un kit de estraptividina (DAKO) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Se utilizó el Ac anti-nitrotirosina A (Ac policlonal de conejo AB5411 Chemicon) en dilución 1:100 y el Ac anti-caspasa 3 activada Ab (Ac monoclonal CPP32 Novocastra), dilución 1:50, usando diaminobenzidina como cromógeno. La intensidad inmunohistoquímica de la reacción fue evaluada al microscopio óptico (Axiolab, Zeiss). La intensidad de la tinción inmunohistoquímica se midió utilizando un score semi cuantitativo. Se seleccionaron dos campos aleatoriamente de cada paciente, fueron evaluados por dos examinadores diferentes que fueron cegados a la información clínica. El puntaje semi cuantitativo de la intensidad de inmunotinción se evaluó mediante la prueba de Chi- cuadrado de Pearson para los diferentes grupos. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un $p < 0,05$.

Como resultados se observó que los TC y MF de los casos de PE aunque si bien mostraron una mayor expresión de residuos de nitrotirosina y caspasa 3 activada respecto al grupo control, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. A excepción de caspasa 3 activada para MF, único parámetro que presentó diferencias significativas entre los grupos.

Al relacionar la expresión de residuos de nitrotirosina y caspasa 3 activada con las variables edad gestacional y peso del RN los resultados no mostraron diferencias significativas entre los grupos, pero independiente de la característica clínica, todas las placentas fueron positivas a los anticuerpos inmunohistoquímicos utilizados Proyecto Fondecyt 1090245.

ABSTRACT

Preeclampsia (PE) is a specific multisystemic alteration of pregnancy, associated with hypertension, proteinuria and edema. Its etiology is still unknown, although it is related to a deficient placentation that leads to the development of exaggerated oxidative stress (OE) in the organ, accompanied by a greater apoptosis.

To date and in relation to the placenta, it is important to emphasize that PE studies have been exclusively focused on the effect of OE and the apoptosis that the trophoblast undergoes, nevertheless a new cellular type in the stroma of the chorionic villi and have been termed Telocytes (TC). On the basis of the latter, this research focuses on the study of these new cells in cases of PE. The TCs present a strategic location between the myofibroblasts (MF) and the muscular layer of the great blood vessels of the chorionic villi, postulating that they operate as a functional triade in the regulation of the fetal vascular tone and the contraction-relaxation of the villi in the blood chamber, therefore they regulate the mother / fetus metabolic exchange. Since the placenta is a non-innervated organ, it is postulated that TC would act as a pacemaker or signal transducer for both the smooth muscle cells of fetal blood vessels and MF, both present in the villous stroma.

Under the hypothesis that placentas from women with PE present higher OE and apoptosis evidenced by immunohistochemical markers, the objective of the study was to determine immunohistochemically in TC and MF the presence of nitrotyrosine residues as an OE marker and activated caspase 3 as a marker of the degree of apoptosis in these cells. Subsequently we analyze the relationship between these immunohistochemical cells parameters with gestational age, newborn weight (NB) and maternal age. Placenta samples (fetal side) were collected from preeclamptic (n=12) and normotensive patients (n=11).

Standard immunoperoxidase techniques were individually applied in the tissue sections. Immunostaining was performed using streptavidin biotin kit (DAKO) according to manufacturer's directions. The anti-nitrotyrosine A (Rabbit polyclonal Ab AB5411 Chemicon) was used in a 1: 100 dilution and the activated anti-caspase 3 Ab (monoclonal Ac CPP32 Novocastra), dilution 1:50, using diaminobenzidine as the chromogen. The immunohistochemical intensity of the reaction was evaluated by light microscopy (Zeiss Axioplan 2). The intensity of the immunohistochemical staining was measured using semi quantitative scores. Two randomly selected fields from each patient were evaluated by two different examiners who were blinded to the clinical information. The semi quantitative scoring of immunostaining intensity were assessed by the Pearson chi 2 test for differences between groups. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. Chi-square statistic with $p < 0.05$.

As results it was observed that the TC and MF of the PE cases although they showed a greater expression of nitrotyrosine residues and activated caspase 3 than the control group, the differences were not statistically significant. Except for caspase 3 activated for MF, the only parameter that presented significant differences between groups.

When the expression of nitrotyrosine and caspase 3 activated residues was related to the variables gestational age and NB, the results did not show significant differences between the groups, but independent of the clinical characteristic, all placentas were positive to the immunohistochemical antibodies used. Project Fondecyt 1090245

1. INTRODUCCIÓN

La placenta regula el crecimiento y desarrollo del feto a través del transporte de nutrientes, gases, síntesis de proteínas, secreción de esteroides y hormonas peptídicas. Estas funciones son dependientes del desarrollo vascular y flujo sanguíneo que se realice en los capilares de las vellosidades coriónicas sumergidas en cámara hemática, zona por la cual circula sangre materna (Myatt, 2010). Las vellosidades coriónicas constituyen el corion frondoso o cara fetal de la placenta y se distribuyen en 3 tipos: vellosidades troncales, de intercambio o libres y de anclaje. Las diferencias entre ellas radican en el tipo de vaso sanguíneo que presenten y la estructura de la cual emergen o con la que finalmente contactan. Todas ellas están revestidas de trofoblasto (CTB y STB) y presentan al centro un estroma placentario de tejido tipo conectivo (Huppertz y Martin, 2011).

Se ha comprobado que alteraciones en la función placentaria pueden ser producidas por factores externos tales como la hipoxia y la producción de ROS, factores que conducen a un aumento del EO con el consecuente aumento significativo de la apoptosis en este órgano (Negi y col., 2011), lo que estaría relacionado con una de las causas subyacentes de la PE (Longtine y Nelson, 2011).

Respecto a esta última patología, la PE se define como una alteración multisistémica específica del embarazo humano, que afecta en forma adversa a la madre, a partir de la vigésima semana de gestación, produciendo en ella una disfunción vascular, y en el feto, un crecimiento intrauterino inadecuado (Longtine y Nelson, 2011).

Por otro lado, en los últimos años se han descrito nuevas células en el estroma placentario, células denominadas TC, las que presentan una ubicación estratégica entre los MF y la capa muscular de los vasos sanguíneos de las vellosidades coriónicas, postulándose que intervienen en la regulación del intercambio metabólico madre/feto, constituyendo una tríada funcional en el órgano (Bosco y Díaz, 2016). Al ser la placenta un órgano no inervado, los TC actuarían como marcapaso para las células musculares lisas tanto de los vasos sanguíneos como para los MF (Suciu, 2010).

1.1 Placenta.

La placenta es un órgano transitorio que resulta de la asociación del corion frondoso de origen fetal y la decidua basal de origen materno (Longtine, y Nelson, 2011). En ella se ancla el producto de la concepción, siendo esta una interfaz para el intercambio de los nutrientes y gases, se sintetizan y secreta una serie de esteroides y hormonas peptídicas, y además proporcionar una barrera inmunológica entre la madre y el feto (Myatt, 2010).

1.2. Vellosidades coriónicas.

Estas estructuras de origen fetal son las unidades donde se realiza el intercambio metabólico madre-feto y viceversa. En conjunto constituyen el corion frondoso o cara fetal de la placenta, y se distribuyen en 3 tipos: vellosidades troncales, de intercambio o libres y de anclaje (Figura 1- A) (Huppertz y Martin, 2011).

Todas ellas muestran una estructura básica en común, cubiertas por STB, tejido epitelial que entra en contacto directo con la sangre materna de cámara hemática. Este

STB se apoya sobre otra capa epitelial denominada CTB, las que corresponden a las células madres del STB, apoyando su crecimiento y regeneración, además de secretar MEC como lámina basal del trofoblasto, lámina que separa al epitelio del estroma vellositario (Figura 1-B), (Cantelluci y col., 2000). Durante los inicios de la 3ª semana de gestación, hay abundantes vellosidades primarias constituidas exclusivamente por STB y CTB. Luego cuando el mesoderma extraembrionario se introduce para constituir el centro de estas vellosidades pasan a denominarse las vellosidades secundarias. Para finales de la 3ª semana, cuando los vasos sanguíneos nazcan en el mesoderma de las vellosidades se originan las vellosidades terciarias. Se han constituido así, durante la 4ª semana, las vellosidades que constituyen el corion frondoso. Los capilares de las vellosidades se ponen en contacto con el sistema circulatorio intraembrionario, conectando así la placenta y el embrión a través del cordón umbilical. El corazón empieza a latir en la 4ª semana y el sistema de vellosidades está preparado para proporcionar al embrión los nutrientes y el oxígeno necesario (Demir y col., 1997). El transporte metabólico se lleva a cabo debido a los gradientes de concentración que surgen entre la superficie externa del trofoblasto y la superficie interna del endotelio del capilar fetal (Plitman y col., 2016).

En vellosidades terciarias tipo troncales es factible encontrar grandes vasos rodeados por su endotelio y capas de CML con orientación circular. La adventicia se continúa con tejido conectivo sin una línea clara de demarcación (Figura 1-C) (Demir y col., 1997).

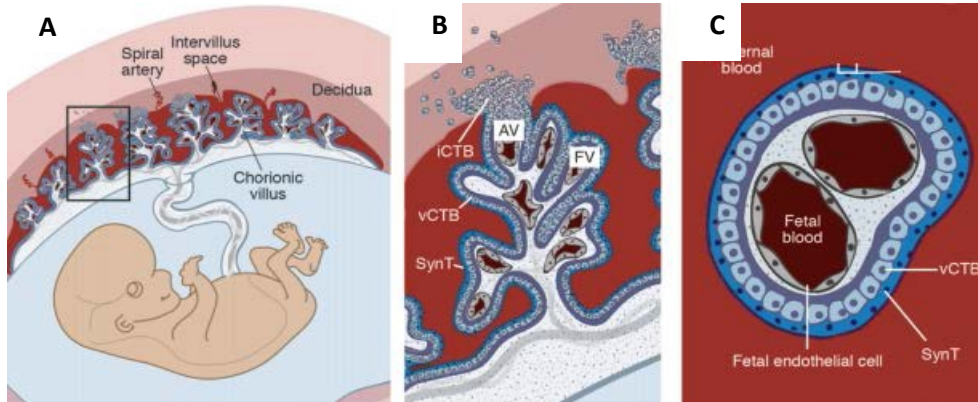


Figura 1: Representación gráfica de la zona de intercambio madre-feto. **A.** Placenta constituida por corion frondoso de origen fetal y decidua basal de origen materno. **B.** Vellosidades terciaria sumergida en cámara hemática y rodeada de sangre materna, se distingue: FV: vellosidad flotante o de intercambio, SynT: Sincitiotrofoblasto, vCTB: Citotrofoblasto. **C.** Corte transversal de una vellosidad terciaria, se muestra vaso sanguíneo fetal, trofoblasto (SynT + vCTB) y estroma placentario (Maltepe y col., 2010).

1.3. Estroma

El estroma placentario corresponde principalmente a fibras de colágeno tipo 1, las células son de origen mesenquimático, MF, TC células Hofbauer, las que por ser macrófagos presentan un citoplasma vacuolado y los fibroblastos son responsables de la secreción de la MEC (Sati, 2007).

Se considera que las células del estroma es una población heterogénea principalmente de MF que muestran inmunoreactividad positiva a α -actina, miosina (Farley y col., 2004). Sati y col., (2007) realizaron la identificación celular del estroma a través

de IHQ, concluyendo que los MF se localizan en abundancia en la zona central del estroma y cercanos a los grandes vasos. Los mismos autores a través de microscopía electrónica de barrido demostraron la forma estrellada de los MF y su tendencia a establecer redes tridimensionales (Sati y col., 2007).

1.4. Telocitos

Un nuevo tipo de células de origen mesodérmico han sido descritas por Popescu y col., (2010) en el estroma vellositario y las denominaron “Telocitos”. Estas células se disponen estratégicamente en las vellosidades coriónicas entre las CML de las paredes de los vasos sanguíneos fetales y los MF (Suciu y col., 2010; Popescu y col., 2010; Bosco y col., 2015).

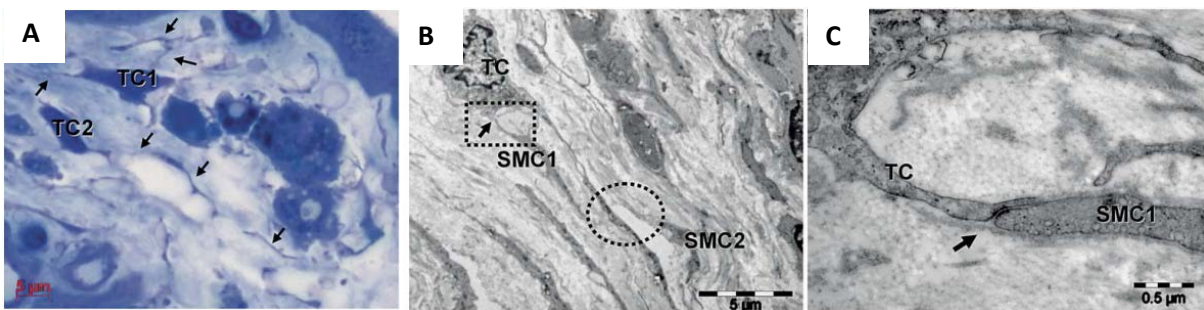


Figura 2: A. Placenta humana de término teñidas con azul de toluidina, por microscopía de luz son visible 2 TC (TC 1, TC 2), con sus procesos (flechas negras) los TCs muestran una apariencia dendrítica. B. Micrografías electrónicas de transmisión donde el TC presenta contacto (flecha negra) con 2 células musculares lisas (cuadrado y círculo punteado). C. Mayor aumento de los contactos heterocelulares (flecha negra) entre TC y células musculares lisas (Suciu L y col., 2010).

Los TC se encontraron en diferentes órganos: páncreas (Suciu y col., 2010), corazón (Faussone- Pellegrini y Popescu, 2011), tráquea (Zheng y col., 2012), pulmones (Popescu y col., 2011), glándula parótida (El-Bassouny, 2012), ganglio trigeminal (Rusu y col., 2016), entre otros.

Estos TC se caracterizan por presentar un cuerpo celular pequeño de morfología triangular, escasos organelos y 2 a 5 prolongaciones que emergen del cuerpo celular, las cuales son muy delgadas y extremadamente largas, Popescu y Fausson- Pellegrini (2010) las denominaron Telópodos (Tps). En estos Tps destacan segmentos muy finos llamados “Podomeros” y zonas más gruesas o dilatadas denominadas “Podomos”. A través del uso del MET ha sido posible observar la presencia de mitocondrias en el interior de los podomos (Cretoiu y col., 2013).

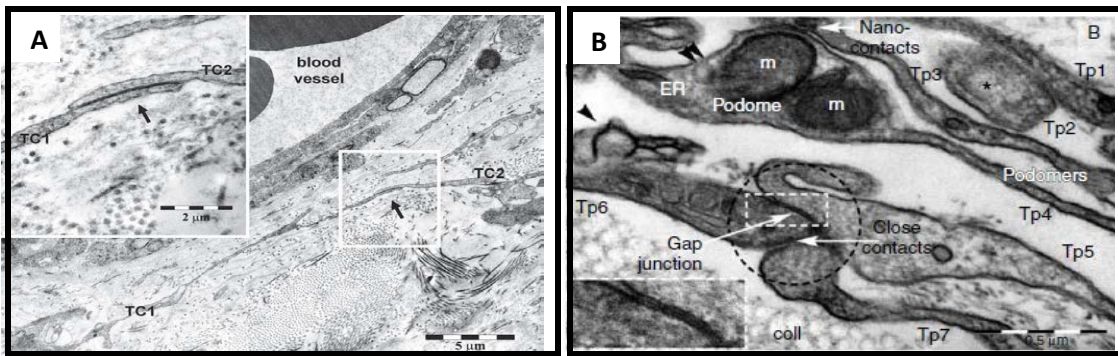


Figura 3. A. Microfotografía de microscopía electrónica de placenta humana de término, donde se muestra la unión gap conectando los Tps de 2 TC (TC1, TC2) muy cercanos al vaso sanguíneo de la vellosidad coriónica. (Suciu y col., 2010). B. Por microfotografía de microscopía electrónica de placenta humana de término, se destacan los numerosos Tps en una región de estrecha interrelación, en la parte superior media de la imagen se puede observar un nanocontacto entre Tp3 y el podom de Tp4, rico en mitocondrias (m). Las puntas de flecha señalan las caveolas y retículo endoplásmico (ER). En el círculo punteado los contactos “gap junction” (Cretoiu y col., 2013).

En virtud de estos tipos de uniones entre los Tps (Figura 3-B) se ha propuesto que en las vellosidades coriónicas los TC tienen por función establecer conexiones tipo sinápticas entre las CML de los vasos sanguíneos y los MF del estroma, para de esta forma modular la traducción de señales entre estos dos tipos celulares y así regular el tono del vaso y la contracción / relajación de estas vellosidades (Suciu y col., 2010; Bosco y col., 2015). Cretoiu y col., (2013) estudiaron en útero grávido y no grávido la presencia de TC, y postularon que los TC al ubicarse en las fronteras de las fibras miométriales y

también entre ellas, podrían ser capaces de detectar y traducir la información al núcleo de las células musculares y activar así los genes responsables de la síntesis de proteínas. Este mismo grupo de investigadores plantea que el control miogénico uterino está bajo control hormonal ya que dichas células presentarían receptores de hormonas esteroidales (Cretoiu y col., 2013).

Los TC se diferencian durante la embriogénesis en el estroma de las vellosidades coriónicas terciarias a partir de las células mesenquimáticas del mesoderma extraembrionario. Esto se ha evidenciado por estudios con MET, IHQ con reacción positiva a vimentina y CD34, así como por inmunofluorescencia a c-kit / CD117 (Figura 4). Todos estos estudios han permitido identificar en placenta humana la presencia de estos TC, los que cumplen con el patrón estructural de presentar 2-3 Tps, retículo endoplásmico, caveolas y mitocondrias (Suciu y col., 2010).

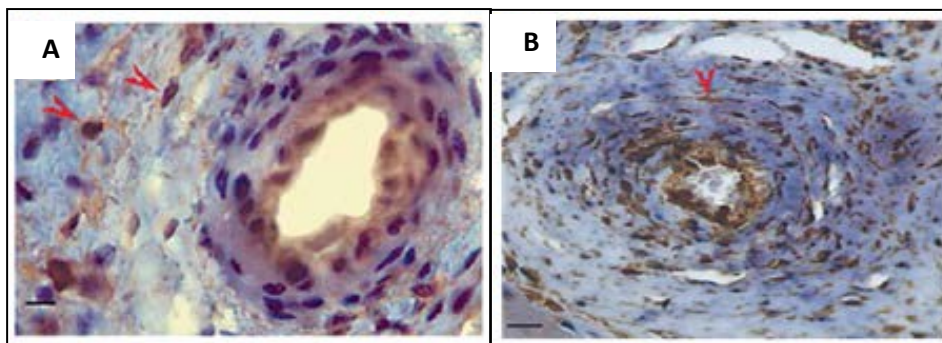


Figura 4. Inmunohistoquímica en placenta humana de término. Los TC con sus telópodos delgados y largos en una disposición circular a la arteria fetal están indicados con flecha roja **A.** Tinción con c-kit positivo. **B.** vimentina positivo. Largas prolongaciones concéntricas a la arteria (Suciu y col., 2010).

1.5. Miofibroblastos.

Desde 1916 que se ha estudiado los MF, en sus inicios siendo confundidos con CML, pero curiosamente tenían una ubicación alejada del vaso sanguíneo, presentándose en mayor concentración en el centro del estroma, lo cual hizo dudar a los investigadores sobre el tipo de células que estaban analizando (Farley y col., 2004). Graf., y col. confirman la presencia de MF en las vellosidades coriónicas al demostrar la inmunolocalización por vimentina, desmina, α y γ actina, y miosina, concluyendo que la capacidad de contracción en sentido longitudinal que presentan las vellosidades se le atribuye a la presencia de estas células quienes se disponen paralelos al eje longitudinal de las vellosidades, por contracción pueden acortar las vellosidades y aumentar el flujo sanguíneo siendo este un proceso activo en el cual participan los MF regulando el flujo de la sangre fetoplacentaria, así como también la estabilidad mecánica del árbol veloso (Farley y col., 2004; Demir y col., 1997; Graf y col., 1996).

Farley y col., (2004) demostraron que las vellosidades coriónicas tienen la capacidad de contraerse y relajarse longitudinalmente. Esto lo comprobaron trabajando en placenta humana de término proveniente de embarazos normales; a este tejido se le añadió KCl (cloruro de potasio), agente que despolariza la célula y provoca la liberación de calcio intracelular a través de un mecanismo receptor independiente produciendo contracción reversible y L-NAME (L- arginina metil éster), que es un antagonista de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), expresada en las vellosidades, bloqueando así la producción de NO, con los cuales se lograron un aumento de la contracción de las vellosidades de un 62,3% y un 74,3% respectivamente, sobre el tono de reposo. En contraste, se agrega SNP (nitroprusiato de sodio) donador de óxido nítrico y GTN (trinitrato glicerol) causando la relajación de las vellosidades pre- contraídas. Por IHQ de las secciones longitudinales de las vellosidades estudiadas, se confirmó la presencia de α -actina en células del espacio extravascular, confirmando así la presencia de los MF en el tejido placentario. Dicha

investigación sugiere que la contracción de las vellosidades puede ser un mecanismo importante mediante el cual la placenta puede regular el volumen intraplacentario, donde además se ha determinado que el estroma extravascular presenta células que son inmunorreactivas para las cinco proteínas características del citoesqueleto (vimentina, desmina, α y γ actina, miosina) (Farley y col., 2004; Demir y col., 1997).

1.6 Preeclampsia.

1.6.1 Definición y Epidemiología.

La PE se define como una alteración multisistémica específica del embarazo humano asociada a una disfunción endotelial, hipertensión y proteinuria (Sela y col., 2008). Sigue siendo una complicación frecuente y potencialmente peligrosa, la causa es desconocida, pero el EO y un estado inflamatorio generalizado son las características del síndrome materno (Raijmakers, 2004).

La prevalencia de esta patología es del 4-6%, con una incidencia 3 veces mayor en mujeres primíparas que en mujeres multíparas (Belkacemi y col., 2007; George y Granger, 2012).

La PE constituye la mayor causa de morbimortalidad materno/fetal en los países desarrollados, y aumenta hasta 5 veces las cifras habituales de mortalidad perinatal. Hasta el 15% de los nacimientos prematuros son debido a PE (Hubel, 1999; Parra y col., 2007; Rodríguez y col., 2012). En Chile el último reporte oficial del 2011 cataloga a la PE como la primera causa de muerte materna, con un 30,4% del total de muertes (Donoso, 2014).

De acuerdo al Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos (ACOG por su sigla en inglés), la PE corresponde a una Presión arterial sistólica \geq a 140 mmHg y/o diastólica \geq a 90 mmHg en al menos dos tomas con 6 horas de separación. La embarazada además presenta proteinuria \geq a 300mg/ 24hrs con edad gestacional de al menos 20 semanas, la

severidad de dicha patología y sus criterios están explicitados en la revista del Hospital Clínico de la Universidad de Chile (Tabla 1) (Sepúlveda-Martínez y col., 2013).

Tabla 1. Criterios de severidad de preeclampsia.

	Preeclampsia moderada	Preeclampsia severa
Presión arterial	PAS <160 y/o PAD <110	PAS ≥160 y/o PAD ≥110
Proteinuria	>300mg y < 5g / día ó RPC >0,3	≥ 5g / día
Diuresis	> 500ml / día	≤500ml / día
Compromiso sistémico	No	Edema pulmonar, insuf renal aguda, hematoma subcapsular hepático, dolor epigástrico, náuseas o vómitos.
Compromiso neurológico	No	Convulsiones, cefalea, fotopsia, ceguera, visión borrosa, alteración estado mental.
Compromiso laboratorio	No	Plaquetas <100.000, GOT >70, LDH >2v V.R., ácido úrico >5mg/dl
Edad gestacional inicio	>34 semanas	≤34 semanas
Compromiso fetal	No	RCF

V.R.= valor de referencia laboratorio local; RPC= relación proteinuria:creatininuria en muestra de orina aislada.

Tabla 1: Criterios de severidad que permiten clasificar preeclampsia moderada y preeclampsia severa (Sepúlveda- Martínez y col., 2013).

Últimamente la PE ya no se considera sólo una enfermedad del embarazo, sino mas bien una enfermedad con consecuencias de por vida para la embarazada y el RN. La embarazada es vulnerable a enfermedades cardiovasculares, insuficiencia renal, defectos cognitivos, entre otros, y los RN son más propensos a lo largo de su vida a presentar HTA, resistencia a la insulina, diabetes mellitus, problemas neurológicos y/o accidentes cerebrovasculares (Belkacemi y col., 2007; Tranquilli y col., 2012).

El riesgo de PE aumenta notablemente en mujeres con PE anterior y en aquellos con enfermedad vascular preexistente o condiciones asociadas con un mayor riesgo cardiovascular, enfermedad renal, HTA, diabetes, trombofilia, y la obesidad (índice de masa corporal > 29). Además, ocurrencia en familiares de primer grado aumenta el riesgo (Contreras y col., 2002).

1.6.2 Patogénesis

Numerosos autores consideran la PE como la “Enfermedad de las Teorías” por las múltiples hipótesis que han surgido respecto a su etiología, pero ninguna ha logrado explicar el cuadro en su totalidad, se cree que actúa en tres niveles: placentación defectuosa, isquemia placentaria y disfunción endotelial (Roberts y Lay, 2002).

El acontecimiento más importante durante el desarrollo normal de la placenta es el establecimiento de una circulación materna eficaz, en esto juega un rol muy importante el endotelio vascular donde se producen diversas sustancias vasoactivas, sustancias con acción enzimática e inmunológica, este ejerce la función de barrera permeable altamente selectiva, regulando el paso de iones y macromoléculas desde y hacia el espacio extravascular, desempeña un papel determinante en la detección de cambios bioquímicos en la sangre, detecta cambios en el pH, concentración de CO₂ y O₂ y de esa manera interviene en la homeostasis cardiovascular. Libera sustancias vasoactivas que regulan el tono vascular: NO, prostaciclina, endotelina, tromboxano A₂ (TXA₂), Angiotensina-I y angiotensina-II. Garantiza un flujo sanguíneo constante y vasos sanguíneos permeables, a través de las propiedades anticoagulantes, antiplaquetaria y fibrinolítica, por lo tanto una disfunción endotelial significaría la alteración de las funciones básicas de la pared vascular, tales como las relacionadas con la modulación del flujo sanguíneo, relajación y contracción del músculo liso, entre otras (Contreras y col., 2002).

Durante la placentación, las arterias espiraladas se transforman en vasos de baja resistencia y alta capacitancia, donde las paredes musculares y el endotelio de estas arterias son invadidas y reemplazadas por células del trofoblasto extravelositario (TEV) convirtiendo a estas arterias vasos con mayor lumen, las cuales drenan libremente su sangre en los espacios intervillosos; este cambio, ocurre en dos fases: la primera,

durante el primer trimestre del embarazo (invasión de la decidua) y la segunda, durante el segundo trimestre, entre las semanas 16 y 20 (invasión intramiometrial). En la PE no ocurre la segunda fase, por lo que los vasos miometriales permanecen menos dilatados generando disminución de la perfusión placentaria (Figura 5) (Contreras y col, 2002).

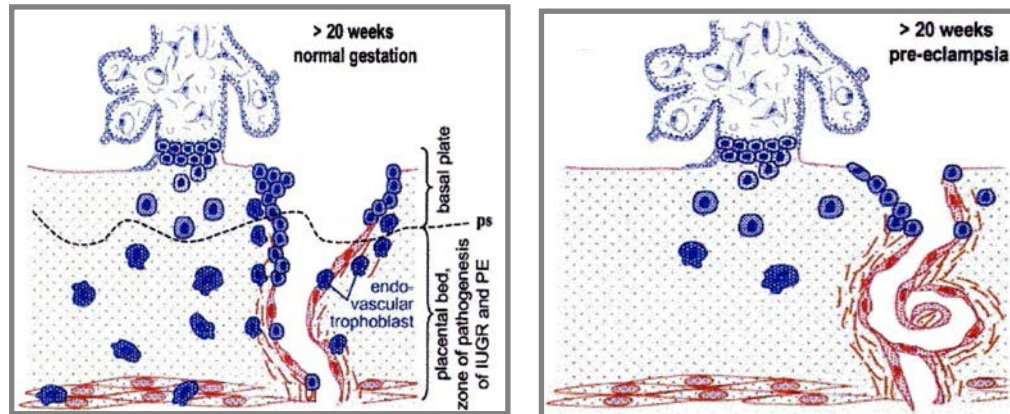


Figura 5: Representación esquemática de la invasión trofoblástica intersticial y endovascular en un embarazo de menos de 6 semanas. **A)** después de las 20 semanas en una gestación normal. **B)** después de las 20 semanas de gestación en la PE.

Azul: tejidos fetales. Rojo: tejidos maternos. Ps: zona donde la placa basal se separa del lecho placentario (Kaufmann y col., 2003).

1.6.3 Factores de riesgo

Se han identificado una serie de factores de riesgo, entre los cuales se citan: 1) Primigesta (susceptibilidad 6-8 veces mayor que las multíparas), las mujeres multíparas que cambian de pareja tienen mayor riesgo que aquellas que no lo hacen. 2) Hija de madre pre- ecláptica. 3) Edad menor de 20 años y mayor de 35 años y 4) pertenecer a un estrato socioeconómico bajo. 5) Factores Predisponentes: Se han relacionado innumerables patologías con el desarrollo de PE, tanto genéticas, ambientales o relacionadas con el comportamiento. Entre ellas se incluyen: Diabetes, HTA, aumento

en la resistencia a la insulina, las hiperlipidemias, sobre todo en las mujeres con edades maternas avanzadas. El uso de bebidas alcohólicas y de cigarrillo durante el embarazo, aumenta el riesgo de padecerla. Además de condiciones obstétricas que aumentan la masa placentaria como la mola hidatidiforme y el embarazo múltiple también elevan el riesgo de PE (Sepúlveda-Martínez y col, 2013; Contreras y col. 2002).

1.7 Estrés oxidativo.

El EO corresponde al desbalance entre la producción de radicales libre (RL) y las sustancias antioxidantes, donde la sobreproducción de estos puede resultar en numerosos problemas de salud humana, siendo los RL los posibles promotores de la disfunción vascular materna (Rodríguez y col., 2012).

El embarazo normal es un estado de EO debido al aumento de la actividad mitocondrial de la placenta, donde el primer trimestre se asocia con una explosión de EO en el espacio intervelloso, en el que las enzimas antioxidantes son capaces de contrarrestar tal reacción (Myatt y Cui. 2004).

Se sabe que la placenta con PE se ve afectada por EO, lo que aún no está bien claro es, cómo se produce, se postulan 2 procesos de cómo se iniciaría, el primero es que sería secundario a la reducción del flujo arterial útero-placentaria cuando ocurre la remodelación de las arterias espiraladas durante la placentación, y lo segundo es que la razón no sería el volumen del flujo sanguíneo lo anormal, sino su intermitencia lo que crea las condiciones de isquemia- reperfusión, el primer punto llevaría a una placenta hipóxica y el segundo punto, el paso de un flujo de alta velocidad a un flujo intermitente que conduce a una oxigenación variable en el espacio intervelloso, ambiente ideal para que se

produzca EO y RL (Raijmakers y col, 2004).

En estado de hipoxia placentaria, como es en el caso de PE, se produce la disminución de las defensas antioxidantes del órgano, lo cual se explica por la activación de enzimas que generan ROS, tales como la NADPH y xantino oxidasa, lo cual conlleva a un aumento significativo de lipoperóxidos como malondialdehído (MDA) y F2-isoprostano, en comparación a pacientes con gestación normal (Negi, y col., 2011; Rodríguez y col., 2012). Esta disminución en la concentración de antioxidantes en pacientes con PE y el aumento de ROS sugiere la mantención de un estado de EO (Chekir y col., 2006; Laresgoiti-Servitje, 2013).

La evidencia de este EO incluye el aumento de lipoperóxidos e isoprostanos que se liberan a la circulación materna, también se produce la activación de neutrófilos que secretan citoquinas proinflamatorias produciendo así un cuadro de inflamación sistémico, característico de la PE (Chekir y col., 2006; Laresgoiti-Servitje, 2013).

El RL más común es el anión superóxido (O_2^-), que es generado por un sistema enzimático especializado (NADPH-oxidasa) localizado en la membrana plasmática y en las vacuolas de fagocitosis. La interacción de las moléculas de O_2^- con NO conduce a la formación de peroxinitrito ($ONOO^-$) potente oxidante, que además es citotóxico ya que inhibe el transporte de electrones mitocondriales, lo cual resulta en la inhibición de la respiración celular. Oxida grupos sulfhidrilos de proteínas e inicia la peroxidación lipídica, lo que afecta la transducción de señales (Myatt, 2010).

La presencia de $ONOO^-$ es localizada de manera indirecta por la presencia de residuos de nitrotirosina, producidos por la nitración de proteínas, incluyendo p38 MAP

quinasa, la cual tiene un papel importante en el desarrollo de la vasculatura en las vellosidades, esto lo demostró Myatt (2010), trabajando en placentas de embarazos complicados por PE quien detectó por inmunotinción, mayor depósito de residuos de nitrotirosina, especialmente en el endotelio vascular en comparación con embarazos normotensos, y también se descubrió un aumento en la expresión de la enzima NADPH oxidasa, como una fuente generadora de O_2^- (Myatt y Cui., 2004; Myatt, 2010).

También en las placentas de mujeres con PE se ha encontrado una significativa disminución de la protección anti-oxidante que se correlaciona con niveles bajos de la enzima SOD, la que cataliza la transformación de O_2^- en $ONOO^-$ que a su vez es sustrato de la catalasa que a partir de éste produce oxígeno y agua, (Raijmakers y col., 2004).

1.8 Apoptosis.

El desarrollo y funcionamiento normal de la placenta se logra por la orquestación precisa de los diferentes procesos y etapas de la cascada de apoptosis, proceso celular muy estudiado en el trofoblasto (Huppertz, 2009). Durante el proceso apoptótico en el CTB se activan diferentes vías intracelulares, las que se inician cuando por activación de caspasa 8 se produce la fusión del CTB al STB y posteriormente finaliza cuando en el STB se activa caspasa 3 efectora produciendo el desprendimiento de los nodos sinciciales, a la sangre materna. Estos nodos abandonan cámara hemática a través de las venas uterinas endometriales, lo que permite mantener así una superficie estable del STB. De acuerdo a lo anterior, la mantención y expansión del STB dependerá de la incorporación continua de CTB que se divide por mitosis y seguida de la apoptosis de estas células al incorporarse al STB, (Nadeem y col., 2011; Huppertz y Martin, 2011).

Los nodos viajan por las venas maternas hasta alcanzar el pulmón, donde son digeridos por los macrófagos pulmonares, reduciendo sustancialmente la concentración de nodos apoptóticos en la sangre periférica materna (Van Parijs y Abbas, 1998).

La cubierta completa de membrana plasmática en estos nodos impide el desarrollo de un proceso inflamatorio por efecto del contacto entre células de órganos materno con desechos intracelulares fetales que presentan estos nodos (Kutteh y col., 1999).

La apoptosis en la placenta es un proceso fisiológico normal a lo largo de la gestación, pero se sabe que alteraciones en la función placentaria por factores externos tales como la hipoxia y las presencia de ROS pueden conducir a un aumento significativo de la apoptosis en el órgano, lo cual ocurre en cuadros de PE, donde hay un incremento en la proliferación y fusión sincicial del CTB, por lo que la maquinaria apoptótica se encuentra sobre-exigida. Esto conduce a que se produzca el fenómeno de “Aponecrosis”, donde partes necróticas del STB y componentes intracelulares parcialmente degradados, con enzimas activadas y sin una cubierta completa de membrana se desprenden como nodos inmaduros hacia los compartimientos maternos. En estas circunstancias, estos nodos no son reconocidos por los macrófagos pulmonares y por tanto pueden continuar viajando por el torrente sanguíneo materno y de esta forma llegar al riñón donde producen daño tisular (Smith, Baker y Symonds, 1997; Longtine y Nelson, 2011).

Como se expresa en el párrafo anterior, estos nodos sinciciales inmaduros (Longtine y col., 2012), alteran el comportamiento de los macrófagos, produciendo la activación de neutrófilos y disrupción de células endoteliales, lo que se relaciona con PE. Este hallazgo es reproducible bajo condiciones hipóxicas in vitro, apoyando aún más la hipótesis de que la hipoxia y las ROS son el gatillo subyacente en la formación de

residuos sinciciales inmaduros o aponecrosis del STB (Scifres y Michael, 2009; Messerli y col., 2010; Sharp y col., 2010; Huppertz, 2009).

La apoptosis total del CTB ha sido ampliamente estudiada y abarca un período de aproximadamente 25 días (Castellucci y col., 2000; Goldman-Wohl, 2002).

Este amplio período se explica porque una vez completada la fusión sincicial, el proceso de apoptosis entra en un período de latencia debido a que durante la fusión al STB también se incorporan altas concentraciones de enzimas antiapoptóticas del CTB, tales como Bcl-2 (Takahashi y col., 1994). De esta forma, la cascada apoptótica sufre una detención por 3 o 4 semanas (De Falco y col., 2004). Luego, el proceso se reinicia con la activación de caspasa efectora 3, conduciendo a la degradación de proteínas y ácidos nucleicos para constituir los nodos sinciciales que serán liberados a la sangre materna.

1.9 Importancia fisiológica de los TC.

A continuación se relacionó algunas funciones de los TC con los diferentes órganos humanos, entendiendo que los TC han provisto de nuevas áreas en el conocimiento de la fisiopatología de múltiples enfermedades.

Los TC son un tipo de célula intersticial localizadas en el tejido conectivo de muchos órganos de los seres humanos, comunicadas por medio de contactos homocelulares, algunas de las funciones que se les ha atribuido son:

1. Red mecánica: Los TC presentan homocontactos como heterocontactos, pudiendo formar redes mecánicas con células vecinas, ayudando por ejemplo a evitar colapso de bronquiolos y de vasos sanguíneos

respiratorios, actúan como sitios de comunicación intercelular que permiten el intercambio de información y difusión de señales (Faussone-Pellegrini, Gherghiceanu, 2016).

2. Stem cell: Varios estudios proporcionan evidencia convincente que los TC es posible encontrarlos en tejido de pulmón, corazón, páncreas, glándula parótida, riñón, etc. En cuyos órganos se ha destacado la capacidad de estas células de actuar como stem cell, las cuales podría contribuir en los procesos de regeneración y reparación, al modular la actividad de células madre o actuando como precursoras de otras células presentes en el tejido normal (Rusu y col., 2016). Se les ha relacionado con la regeneración en el corazón, músculo esquelético, piel, árbol respiratorio, el hígado, sistema urinario y el ojo. Además, se encontrarían asociados a procesos de hiperplasia, incluyendo la hiperplasia neurógena, hiperplasia de las células de Leydig en los testículos no descendidos (criptorquidia), y vinculados con procesos inflamatorios / reparación tisular en la enfermedad de Crohn (Rusu y col., 2016).

1.10 Características de los datos clínicos.

Los datos clínicos tanto maternos como del RN resultan interesantes de considerar, ya que algunos de ellos se ven implicados en dicha patología, como es (Abarzúa, Burgos, Clavero y col. 2015; Bosco y col., 2010; Sepúlveda – Martínez y col., 2013):

- a) **La edad gestacional**, donde según la Organización mundial de Salud, un embarazo de pretérmino será aquel con una edad gestacional menor de 37 semanas, embarazo a término 37 a menos de 42 semanas de gestación y post-término de 42 semanas o más.

- b) **Pesos de los RN:** se pueden clasificar en peso normal mayor o igual 2500g, peso bajo al nacer cuando su peso es menor de 2500g, un peso muy bajo al nacer aquel menor de 1500g y peso extremadamente bajo al nacer, menor de 1000g.
- c) **La edad materna:** es otro factor que podría influir en la PE, específicamente menores o iguales a 20 años y mayores o igual a 35 años.

Frente a estas características, vimos la importancia de realizar una asociación entre las intensidades de reacción Ag/Ac de las células del estroma vellositario y los datos clínicos ya mencionados.

Por lo tanto, el propósito de este trabajo fue estudiar si el aumento de la apoptosis por efecto del mayor EO que experimentan las placentas de mujeres con PE afecta a los TC y MF del estroma vellositario, lo que podría tener implicancia en el intercambio metabólico que desarrolla el órgano.

Además, al no existir en la literatura un reporte detallado que postule el funcionamiento de los TC en placentas de un embarazo normal versus uno con PE, se considera interesante hacer este estudio inmunohistoquímico como aporte para entender el funcionamiento de estas estructuras en este único órgano no innervado.

2. HIPOTESIS

Los telocitos y miofibroblastos de placenta de mujeres con preeclampsia, presentan altos niveles de estrés oxidativo y apoptosis.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Caracterizar inmunohistoquímicamente marcadores de estrés oxidativo y de apoptosis en telocitos y miofibroblastos de vellosidades coriónicas troncales de placentas de término, provenientes de mujeres con embarazo normal y mujeres con PE.

3.2. Objetivos Específicos

- Describir la expresión Inmunohistoquímica de residuos de nitrotirosina como uno de los marcadores de estrés oxidativo en telocitos y miofibroblastos de vellosidades coriónicas troncales de placentas de término, provenientes de mujeres con embarazo normal y mujeres con PE.

- Describir la expresión Inmunohistoquímica de caspasa 3 activada como uno de los marcadores de apoptosis en telocitos y miofibroblastos de vellosidades coriónicas troncales de placentas de término, provenientes de mujeres con embarazo normal y mujeres con PE.

- Determinar la asociación de estrés oxidativo y apoptosis en telocitos y miofibroblastos de vellosidades coriónicas troncales de placentas de término, con los datos clínicos: edad gestacional y peso del recién nacido, del grupo control y grupo PE.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Antecedentes Generales.

Esta investigación es la continuación de un estudio retrospectivo descrito en el Proyecto Fondecyt 1090245, liderado por el Dr. Mauro Parra y que contó con la aprobación de los Comités de Ética de la Facultad de Medicina y del Hospital Clínico de la Universidad de Chile (Anexo 1), y con el consentimiento informado (Anexo 2) de las pacientes que participaron en él, pacientes que recibieron un protocolo clínico estandarizado.

Cada taco de parafina contenía muestras de placentas correspondientes a pacientes enroladas y estudiadas previamente bajo otros parámetros (Bosco y col., 2005; Parra y col., 2011) los que han sido mantenidos a 4°C para su preservación, lo que permite en la actualidad continuar analizando en estos grupos aquellos nuevos parámetros que la literatura informa como interesantes. De esta forma, en el presente trabajo de investigación se realizó un estudio inmunohistoquímico de vellosidades coriónicas troncales para analizar el grado de EO y de apoptosis que se expresa en 12 placentas de término de mujeres con embarazo normal y 11 placentas de mujeres que desarrollaron PE durante su embarazo.

4.2 Grupos en estudio.

El universo del estudio correspondió a la población total de mujeres embarazadas, atendidas en el Departamento de Obstetricia y Ginecología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile durante 2 años calendario.

Cada caso que ingresó al estudio contó con: Antecedentes clínicos de la embarazada, principalmente historia familiar o anterior de PE. Examen ecográfico con estudio Doppler de arteria uterina (predictor de PE). Examen histológico de rutina de placenta para la determinación de parámetros de conservación del tejido.

4.2.1. Grupo control (Grupo 1).

Corresponde a placentas de mujeres normotensas durante todo su embarazo. Criterios de inclusión para pacientes del grupo control: embarazos de término de gestación y con una gestación normotensa.

4.2.2. Grupo PE (Grupo 2).

Fue constituido por las placentas de aquellas mujeres que clínicamente desarrollaron signos de PE.

La PE moderada se definió con una presión sistólica > a 140 mmHg y/o una presión diastólica > a 90 mmHg, en mujeres gestantes durante el segundo tercio de la gestación. O bien con un incremento de más de 30 mmHg en la presión sistólica o 15 mmHg en la presión diastólica, en relación a la presión basal medida en las primeras 20 semanas de gestación. Además de presentar proteinuria con más de 300 mg/L en la orina colectada en 24 horas (Bosco y col., 2010; Sepúlveda – Martínez y col., 2013).

Criterios de inclusión: mujeres sanas antes del embarazo y que durante el embarazo presentaron una $PA \geq 140/90$ mmHg (PE moderada)

Criterios de exclusión para grupo control y PE: todas las pacientes con enfermedades previas como hipertensión crónica, nefropatía, enfermedad cardiovascular, diabetes mellitus, coagulopatías, lupus eritematoso sistémico, embarazo con malformaciones fetales mayores, embarazo múltiple, pacientes con dificultad del aprendizaje, inconscientes o severamente enfermos, enfermos mentales y obesidad.

4.3 Inmunohistoquímica

El estudio se realizó en el laboratorio de Placenta y Desarrollo Fetal perteneciente al Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo del ICBM, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Grupo 1: control n=12

Grupo 2: preeclampsia n=11

Las muestras de placenta fueron fijadas en formalina tamponada por 24 hrs, luego con técnicas histológicas de rutina se incluyeron en parafina 60° para poder realizar cortes de 5 micrones.

Para el estudio de EO a los cortes de las muestras se les aplicó como Ac primario el Ac Policlonal de conejo anti-nitrotirosina (AB5411 Chemicon) Dilución 1:100 (v/v) e incubación de 1 hr a T° ambiente. Cada Ac primario se aplicó en cortes individuales de las muestras de cada grupo en estudio. Como Ac secundario y conjugado estreptavidina-HRP se usó el kit R.T.U Vectastain, el revelado se realizó con el cromógeno diamino bencidina (DAB) (Kit DAKO), y contraste nuclear con Hematoxilina de Mayer (Marca DAKO). Se cubrieron los especímenes con el adhesivo Entellan (Merck). El control

negativo se obtuvo mediante la omisión en la muestra del Ac primario.

Los mismos pasos se realizaron para el estudio de la apoptosis, pero en este caso el Ac primario a usar correspondió a anti caspasa 3 activada (CPP32, Novocastra), Ac monoclonal en dilución 1:50 e incubación de 1 hora a T° ambiente.

Como control positivo de ambos Ac primarios se utilizaron cortes de tejido cardiaco humano sometido a hipoxia – reperfusión.

El grado de reacción Ag/Ac fue analizado con el uso de Microscopio Óptico modelo Axiolab (marca Zeiss) con técnica doble ciego, analizándose en cada una de las muestras la existencia de vellosidades troncales con vasos arteriales y venosos que aseguraban la presencia de TC y MF (Bosco y col., 2005; 2010).

4.3.1 Criterios de Evaluación.

Para el análisis de cada una de las muestras por parte de los evaluadores se constituyeron 2 criterios, según lo descrito previamente para estudios similares en placenta.

Primer criterio.

Localización de las células en la inmunotinción: Los TC se ubican externamente circundante a la capa muscular lisa del vaso sanguíneo fetal, o sea en disposición perivascular. Estos TC presentan múltiples Tps conectados por gap junctions con los TC vecinos (homocontactos), formando una red en torno a los vasos sanguíneos y en estrecha comunicación con las CML de la capa muscular del vaso fetal y los MF del estroma. Los MF es posible ubicarlos alejados de la zona perivascular, hacia el estroma placentario, tomando contacto con los TC (heterocontactos) (Suciu, 2010; Graf y col., 1995). A continuación se presentan una serie de microfotografías de placenta humana, con distintos marcadores inmunohistoquímicos e histoquímica no específicos de TC y MF (excepto S-100 para TC y α - actina para MF), que permiten identificar la morfología y ubicación de las células en estudio (Figura 6 y 7).

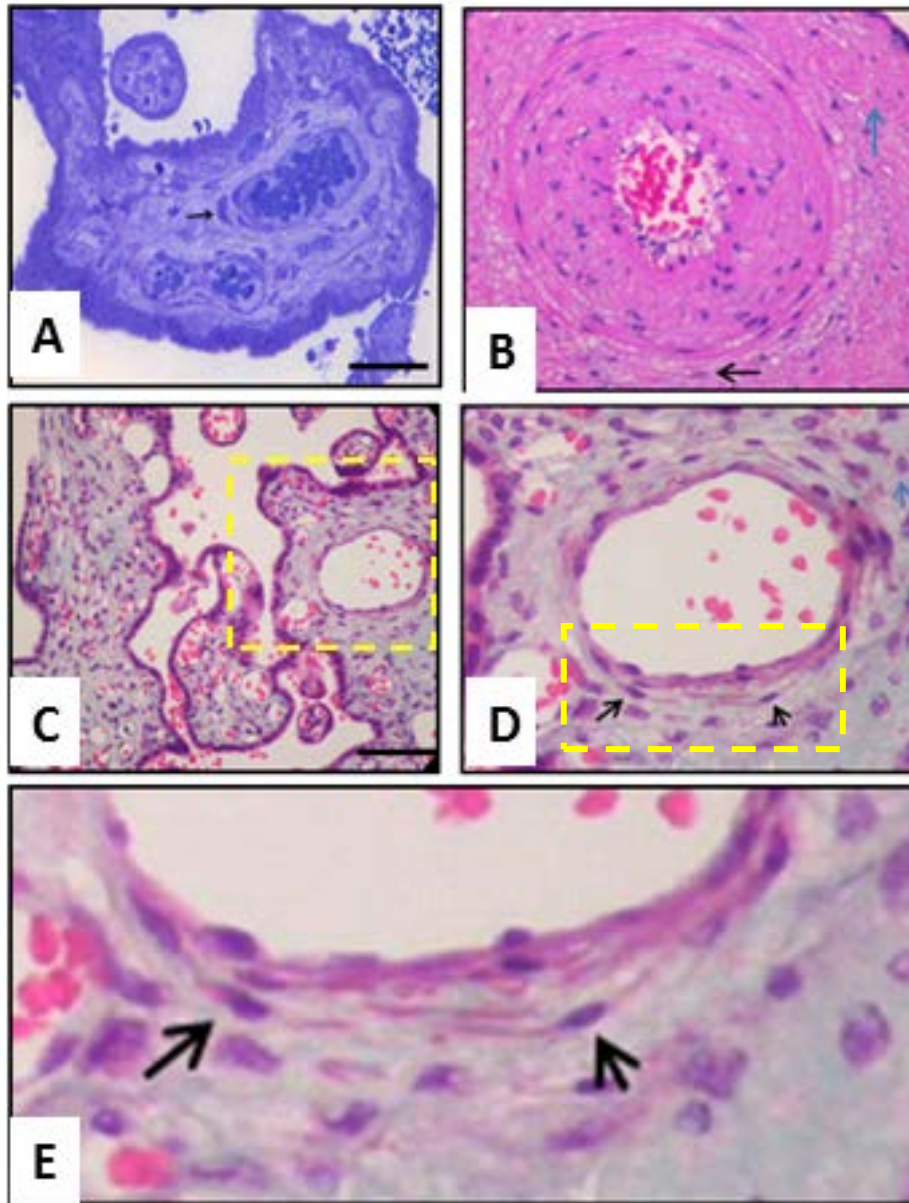


Figura 6: **A.** Corte semifino de placenta de término, tinción azul de toluidina. Flechas negras señalan TC rodeando los vasos sanguíneos. **B.** Tinción Hematoxilina/ Eosina. Placenta de término, ampliación de la zona de una arteria fetal, se observa adyacente a la capa muscular un TC (flecha negra) y MF (flecha azul). **C.** Histoquímica con PAP en placenta de término, 20x. **D.** Se amplifica una zona de la microfotografía C, en esta se señala con flechas negra TC cercanos al vaso sanguíneo y flecha azul un MF. **E.** Ampliación de la ubicación de los TC (flecha negra) en la imagen D.

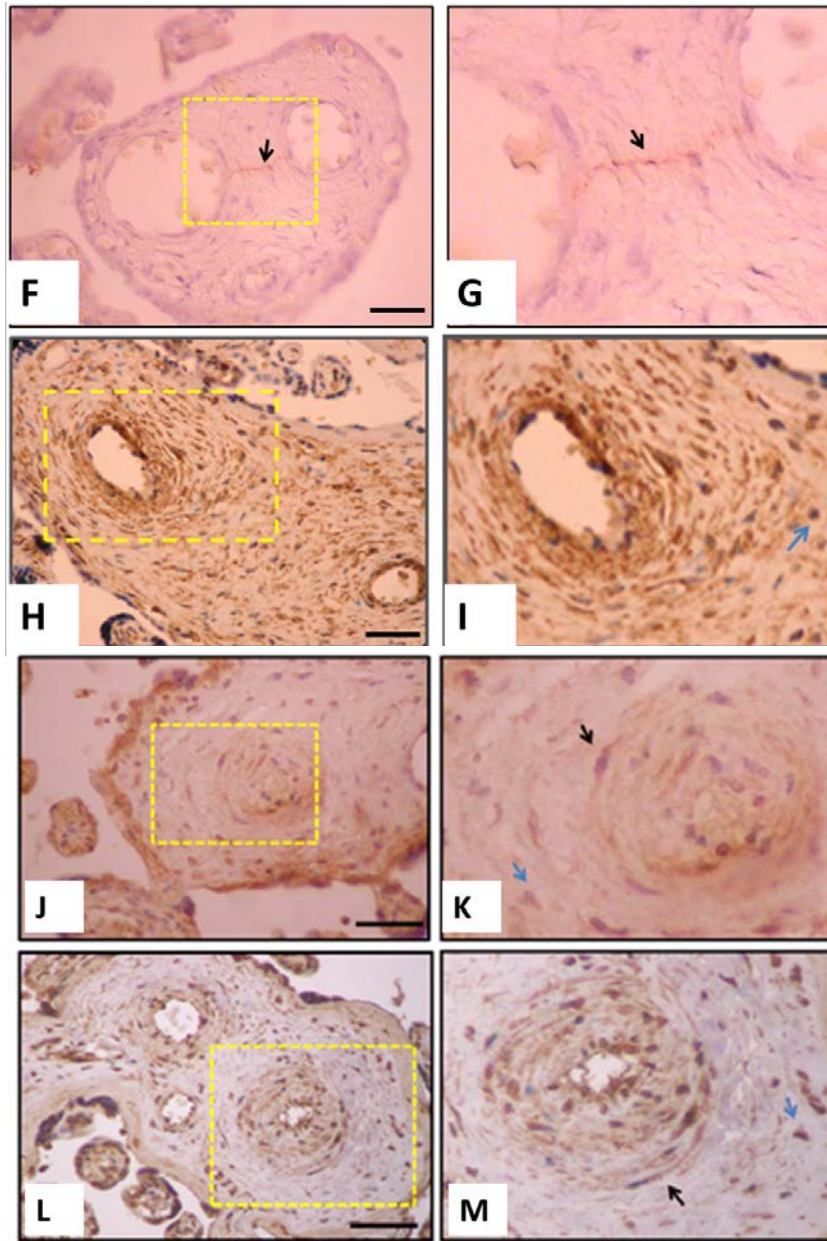


Figura 7: **F.** IHQ para S-100 (anti-glía) marcador específico para TC aplicado a placenta humana de término. Con flecha negra se señala TC interpuesto entre dos vasos sanguíneos. **G.** ampliación de una zona de la microfotografía F, con flecha negra se destaca TC y sus prolongaciones Tps. **H.** IHQ para Actina en placenta de término, 20x. **I.** Se amplifica una zona de la microfotografía H, en esta se señala con flecha negra TC y flecha azul MF. **J.** IHQ para caspasa 3 activada en placenta humana de término, se selecciona una zona a analizar. **K.** Amplificación de la zona seleccionada en J, en esta se señala con flecha negra TC y con flecha azul MF. **L.** IHQ para residuos de nitrotirosina en placenta humana de término, se selecciona una zona. **M.** Amplificación de la zona seleccionada en L, en esta se señala con flecha negra TC y con flecha azul MF.

Segundo Criterio.

Intensidad de la reacción: para determinar el grado de intensidad Ag/Ac de cada célula en estudio, se utilizó un método no paramétrico, semicuantitativo, método ya aplicado y aceptado por la literatura científica mundial (Bosco y col., 2005, 2010). Además se presenta una serie de microfotografías de IHQ en placenta humana que representa la escala utilizada (Figura 8).

Reacción intensa	+++
Reacción moderada	++
Reacción tenue	+
Reacción negativa	0

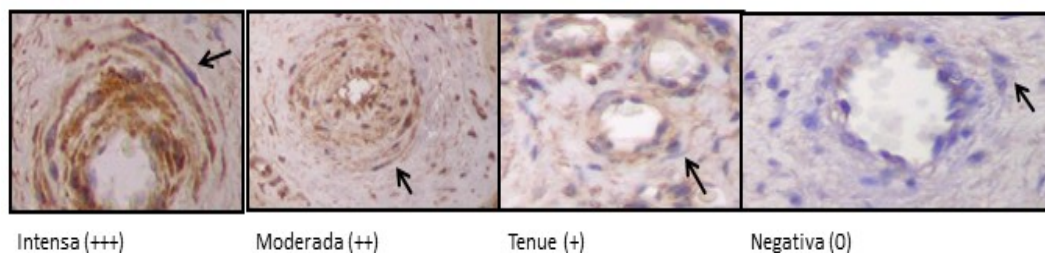


Figura 8: Microfotografía de placenta humana de término, IHQ para caspasa 3 activada, cada una de ellas se clasificó según el grado de intensidad de reacción Ag/Ac que presentaron los TC (flecha negra).

4.4 Análisis Estadístico.

Los resultados inmunohistoquímicos en placenta se analizaron mediante el uso de tablas de contingencia, donde estos resultados no paramétricos fueron expresados como porcentaje en cada categoría y utilizando como método estadístico la prueba de Chi cuadrado de Pearson, para comparar las frecuencias obtenidas en los grupos Control y PE (software SPSS Statistics 23) con una significancia estadística ≤ 0.05 .

5. RESULTADOS

5.1 Características clínicas y de laboratorio de las pacientes.

En la Tabla 2 se resumen las características clínicas de un total de 23 pacientes estudiadas, los valores representan la media y desviación estándar. La edad gestacional medida en semanas, peso RN medido en gramos y edad materna en años. Para edad gestacional y peso RN $p < 0,05^*$ versus control por prueba T de Student.

Tabla 2: Características clínicas y de laboratorio

	CONTROL (n=12)	PREECLAMPSIA (n=11)
EDAD GESTACIONAL (semanas)	37,10 ± 1,162*	33,43 ± 1,0*
PESO RN (gramos)	2817 ± 266,7 *	1930 ± 254,8*
EDAD MATERNA (años)	35,92 ± 2,09	30,00 ± 2,0
PROTEINURIA	-	3,6 g/día

5.2 Expresión de los marcadores residuos de nitrotirosina y caspasa 3 activada.

En las Figuras 9 y 10 se visualiza la expresión IHQ de residuos de nitrotirosina y caspasa 3 activada como marcador de EO y apoptosis respectivamente, en TC y MF de vellosidades coriónicas troncales de placentas de término, provenientes de mujeres con embarazo normal y mujeres con PE. Destacándose el grado de intensidad a la reacción.

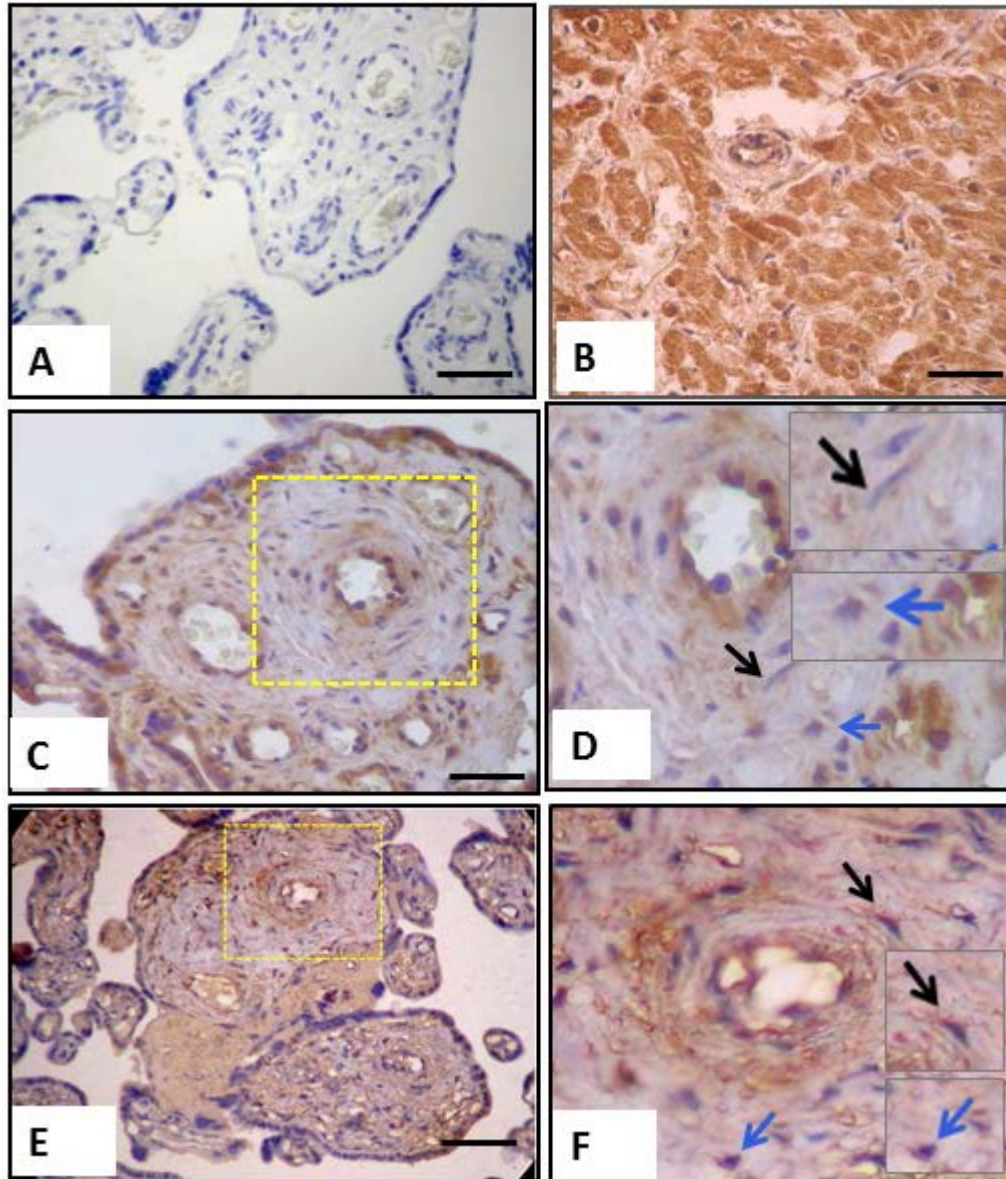


Figura 9: Expresión IHQ para el marcador de residuos de nitrotirosina en grupo control y PE.

A. Control negativo de placenta en la que se omitió el Ac primario. **B.** Control positivo en corte transversal de corazón humano con hipoxia-reperfusión y aplicación del Ac anti-nitrotirosina. **C.** Microfotografía de placenta de caso control que muestra la expresión IHQ de residuos de nitrotirosina con el uso de Ac policlonal anti-nitrotirosina. **D.** representa un mayor aumento de la zona analizada en C y se puede observar expresión tenue en TC (flecha negra) y expresión tenue en MF (flecha azul). **E.** Placenta de caso PE que muestra la expresión IHQ de residuos de nitrotirosina. **F.** representa un mayor aumento de la zona analizada en E y se puede observar expresión moderada en TC (flecha negra) y expresión tenue en MF (flecha azul). Barra de calibración 50μm. Original 400X. Microfotografías D y F presentan insertos donde se observa con mayor aumento TC y MF.

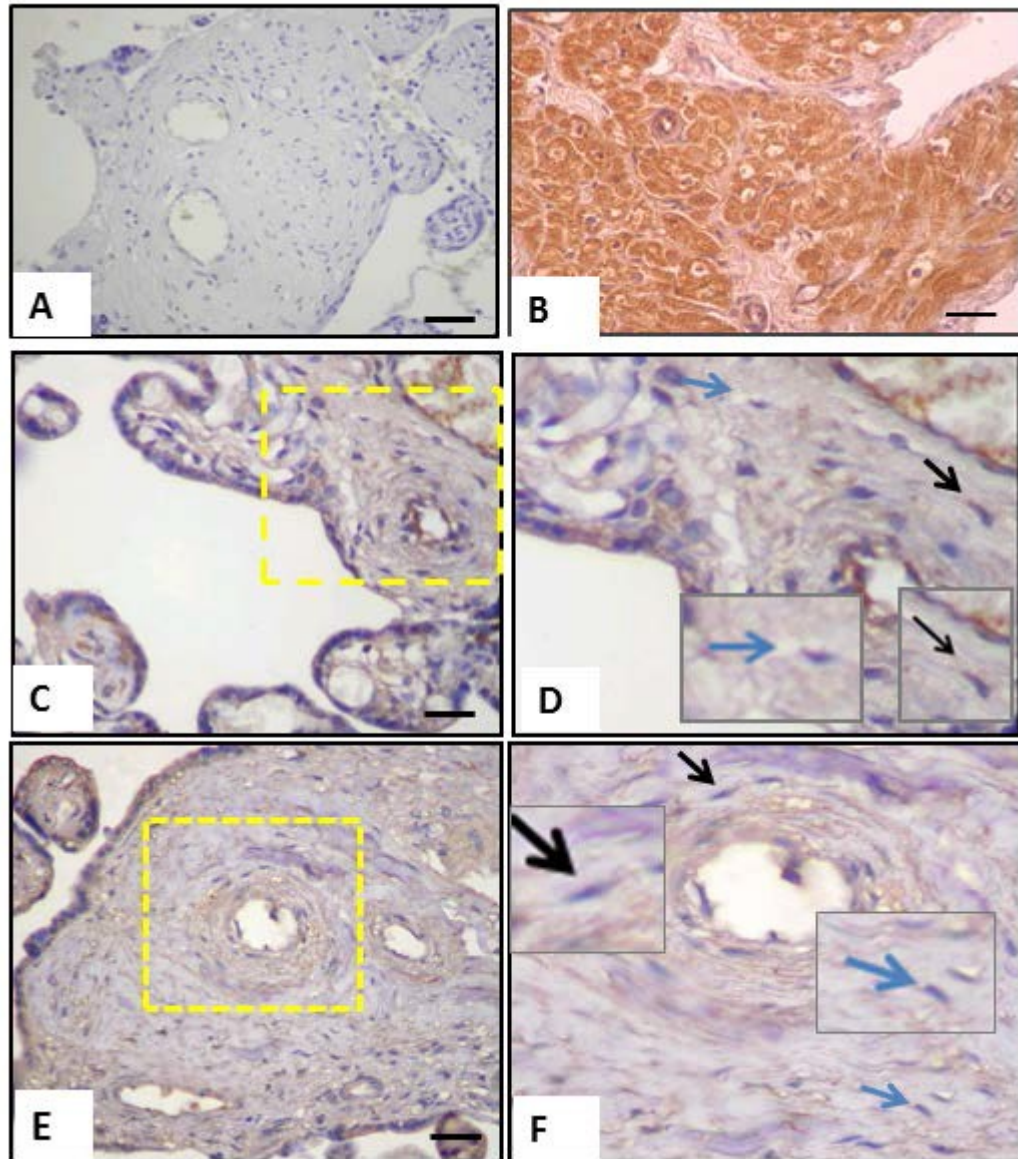


Figura 10: Expresión IHQ del marcador caspasa 3 activada en grupo control y PE.

A. Control negativo de una placenta del grupo control en la que se omitió el Ac primario. **B.** Control positivo en corte transversal de corazón humano que presentó hipoxia/ reperfusión, con aplicación del Ac anti-caspasa 3 activada. **C.** Microfotografía de placenta de caso control que muestra la expresión IHQ de caspasa 3 con el uso de Ac policlonal anti-caspasa 3 activada. **D.** representa un mayor aumento de la zona analizada en C y se puede observar expresión tenue en TC (flecha negra) y expresión tenue en MF (flecha azul). **E.** Placenta de caso PE que muestra la expresión IHQ de caspasa 3 activada. **F.** representa un mayor aumento de la zona analizada en E y se puede observar expresión moderada en TC (flecha negra) y expresión tenue en MF (flecha azul). Barra de calibración 50 μ m. Original 400X. Microfotografías D y F presentan insertos donde se observa con mayor aumento TC y MF.

5.3 Expresión relativa de residuos de nitrotirosina, caspasa 3 activada y características clínicas.

Tabla 3: Expresión relativa de Estrés Oxidativo en TC y MF.

	Telocitos		Miofibroblastos	
	Control (n=12)	Preeclampsia (n=11)	Control (n=12)	Preeclampsia (n=11)
Intensa	0% (n=0)	9,1% (n=1)	0% (n=0)	0% (n=0)
Moderada	58,3% (n=7)	63,6% (n=7)	41,7% (n=5)	45,5% (n=5)
Tenue	33,3% (n=4)	27,3% (n=3)	50% (n=6)	54,5% (n=6)
Negativa	8,3% (n=1)	0% (n=0)	8,3% (n=1)	0% (n=0)

La intensidad de la reacción IHQ para residuos de nitrotirosina fue medida a través de un score semicuantitativo. Los campos seleccionados al azar y en doble ciego fueron evaluados por el siguiente score: Intensa (+++), moderada (++) , tenue (+) y negativa (0). Grupo control (n=12) y Grupo PE (n=11). Valor $p > 0,05$ por Test Chi-cuadrado de Pearson.

Tabla 4: Expresión relativa de Apoptosis en TC y MF.

	Telocitos		Miofibroblastos	
	Control (n=12)	Preeclampsia (n=11)	Control (n=12)	Preeclampsia (n=11)
Intensa	0% (n=0)	9,1% (n=1)	0% (n=0)	9,1% (n=1)
Moderada	25% (n=3)	36,4% (n=4)	0% (n=0)	18,2% (n=2)
Tenue	41,7% (n=5)	54,5% (n=6)	50% (n=6)	72,2% (n=8)
Negativa	33,3% (n=4)	0% (n=0)	50% (n=6)	0% (n=0)

La intensidad de la reacción IHQ para caspasa 3 activada fue medida a través de un score semicuantitativo. Los campos seleccionados al azar y en doble ciego fueron evaluados por el siguiente score: Intensa (+++), moderada (++) , tenue (+) y negativa (0). Grupo control (n=12) y Grupo PE (n=11). Para los TC el valor $p > 0,05$ por Test Chi-cuadrado de Pearson y para los MF el valor $p < 0,05$ por Test Chi-cuadrado.

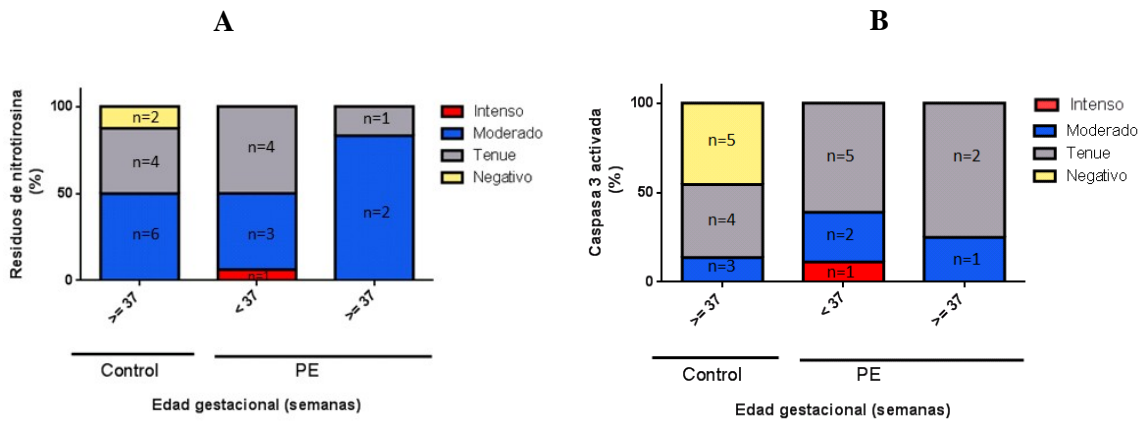


Figura 11: **A.** Porcentajes de intensidad de residuos de nitrotirosina en TC y MF versus edad gestacional (semanas) en grupo control y PE. **B.** Porcentajes de intensidad de caspasa 3 activada en TC y MF versus edad gestacional (semanas) en grupo control y PE. De un total de 12 placentas control y 11 placentas con PE. Valor $p > 0,05$ por Chi cuadrado de Pearson entre grupo control y PE.

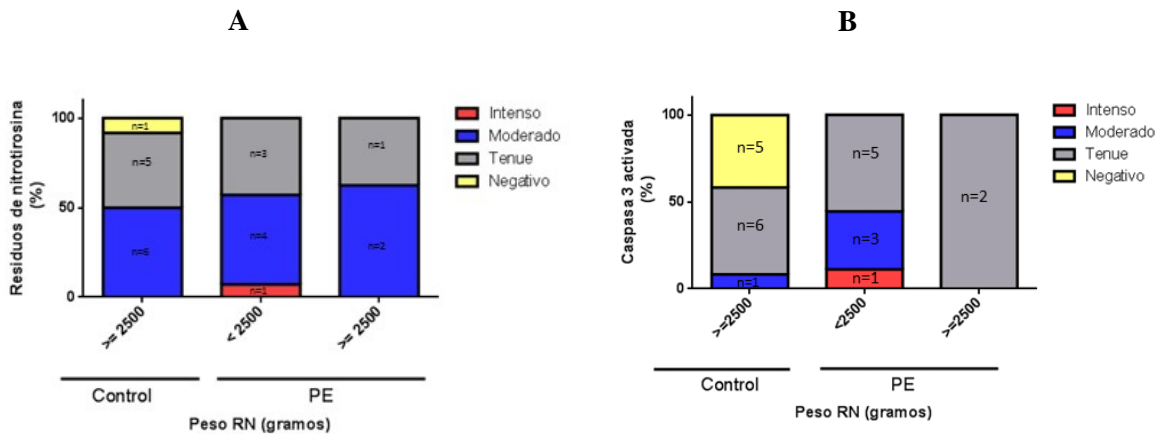


Figura 12: **A.** Porcentajes de intensidad a residuos de nitrotirosina en TC y MF y peso del RN (gramos) en grupo control y PE. **B.** Porcentajes de intensidad de caspasa 3 activada en TC y MF y peso del RN (gramos) en grupo control y PE, de un total de 12 placentas control y 11 placentas con PE. Valor $p > 0,05$ por Chi cuadrado de Pearson.

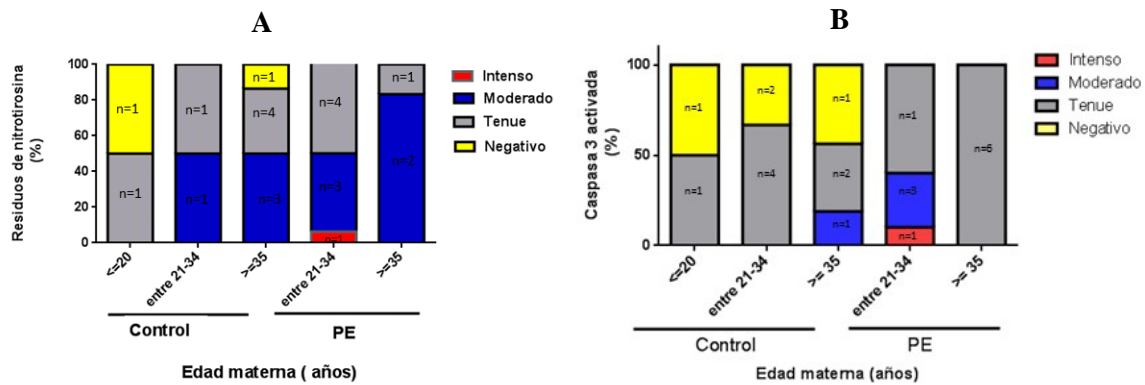


Figura 13: A. Porcentajes de intensidad a nitrotirosina en TC y MF y edad materna (años) en grupo control y PE, B. Porcentajes de intensidad de caspasa 3 activada en TC y MF y edad materna (años) en grupo control y PE de un total de 12 placentas control y 11 placentas con PE. Valor $p > 0,05$ por Chi cuadrado de Pearson.

Tabla 5: Expresión Inmunohistoquímica Positiva y Negativa de EO en TC y MF.

	Telocitos		Miofibroblastos	
	Control (n=12)	Preeclampsia (n=11)	Control (n=12)	Preeclampsia (n=11)
Positiva	91,7% (n=11)	100% (n=11)	91,7% (n=11)	100%(n=11)
Negativa	8,3 % (n=1)	0%(n=0)	8,3% (n=1)	0%(n=0)

Las intensidades de reacción (%) a residuos de nitrotirosina se agruparon en positiva (intensa, moderada y tenue) y negativa del grupo control y grupo PE en TC y MF. Valor $p > 0,05$ determinado por Chi cuadrado de Pearson.

Tabla 6: Expresión Inmunohistoquímica Positiva y Negativa de Apoptosis en TC y MF.

	Telocitos		Miofibroblastos	
	Control (n=12)	Preeclampsia (n=11)	Control (n=12)	Preeclampsia (n=11)
Positiva	66,7% (n=8)	100%(n=11)	50% (n=6)	100% (n=11)
Negativa	33,3% (n=4)	0%(n=0)	50% (n=6)	0%(n=0)

Las intensidades de reacción (%) a caspasa 3 activada se agruparon en positiva (intensa, moderada y tenue) y negativa del grupo control y grupo PE en TC y MF. Valor $p > 0,05$ para TC y valor $p < 0,05$ para MF, determinado por Chi cuadrado de Pearson.

5.4 Relación entre los porcentajes de intensidad IHQ agrupados (positivo y negativo) de residuos de nitrotirosina, caspasa 3 activada y características clínicas.

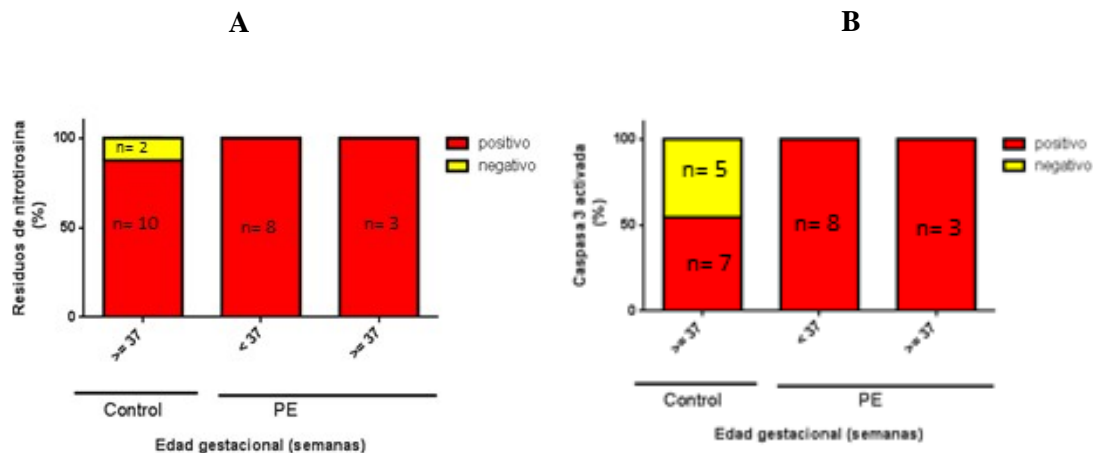


Figura 14: A. Porcentajes de Intensidad a residuos de nitrotirosina en TC y MF agrupados en positivo (intensa, moderada y tenue) y negativo versus edad gestacional. **B.** Porcentajes de Intensidad a caspasa 3 activada en TC y MF agrupados en positivo (intensa, moderada y tenue) y negativo versus edad gestacional. En grupo control y PE. 12 placentas control y 11 placentas con PE. Valor $p > 0,05$ por Chi cuadrado de Pearson entre grupo control y PE.

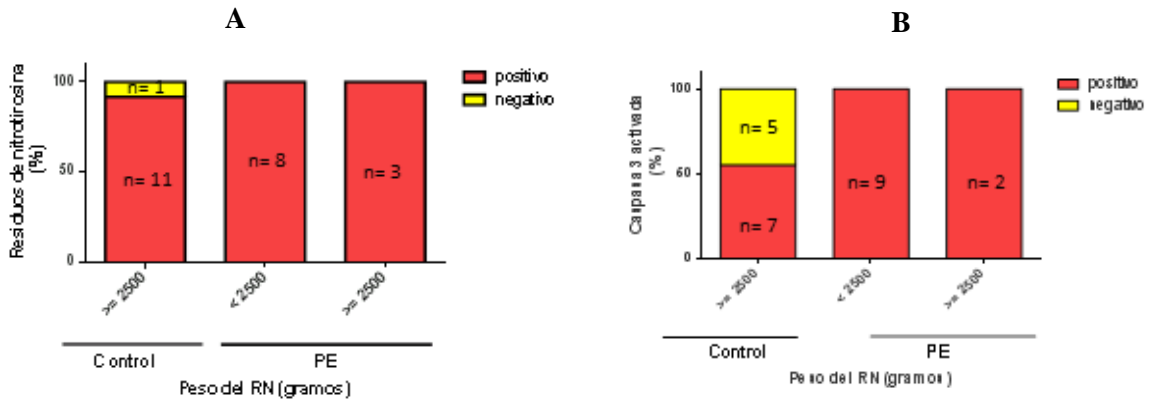


Figura 15: **A.** Porcentajes de Intensidad a residuos de nitrotirosina en TC y MF agrupados en positivo (intensa, moderada y tenue) y negativo versus peso del RN (gramos). **B.** Porcentajes de Intensidad a caspasa 3 activada en TC y MF agrupados en positivo (intensa, moderada y tenue) y negativo versus peso del RN (gramos). En grupo control y PE. 12 placentas control y 11 placentas con PE. Valor $p > 0,05$ por Chi cuadrado de Pearson entre grupo control y PE.

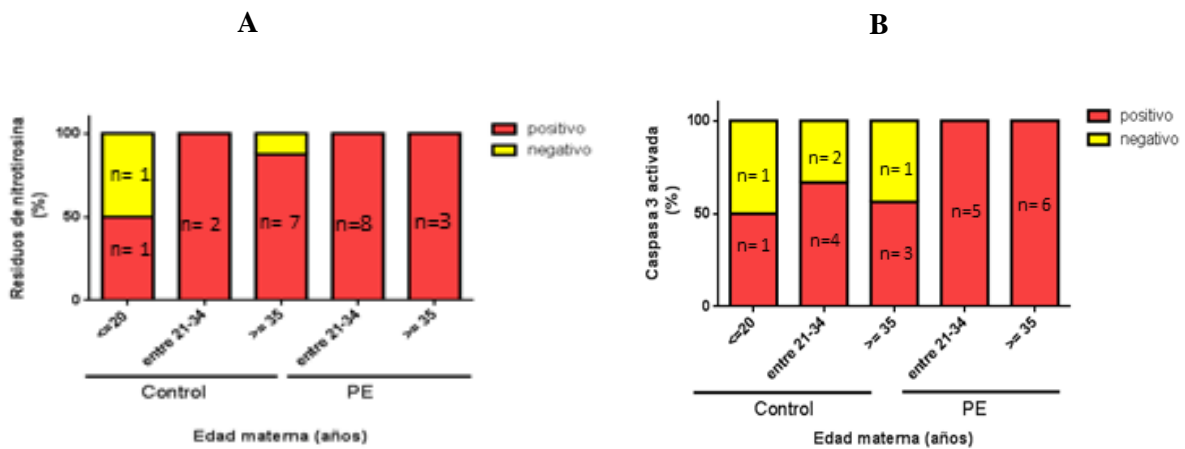


Figura 16: **A.** Porcentajes de Intensidad a residuos de nitrotirosina en TC y MF agrupados en positivo (intensa, moderada y tenue) y negativo versus edad edad materna. **B.** Porcentajes de Intensidad a caspasa 3 activada en TC y MF agrupados en positivo (intensa, moderada y tenue) y negativo versus edad materna. En grupo control y PE. 12 placentas control y 11 placentas con PE. Valor $p > 0,05$ por Chi cuadrado de Pearson entre grupo control y PE.

5.5 Resumen de los resultados.

1. Los porcentajes relativos de EO entre ambos grupos analizados, no fueron significativos para TC y MF, sin embargo en el grupo PE se observó una tendencia de mayor positividad del marcador utilizado, respecto al grupo control.

2. En la placenta de mujeres con preeclampsia, en relación a los controles, solo en miofibroblastos se observó aumento significativo de caspasa 3 activada, marcador de apoptosis.

3. Al relacionar la expresión de residuos de nitrotirosina y caspasa 3 activada con las variables edad gestacional, peso del RN y edad materna, los resultados no fueron significativo. En el grupo control los casos se encontraban dentro de los rangos de normalidad. En el grupo PE el mayor “n” se agrupó en edades gestaciones de pretérmino y bajos peso al nacer, y la edad materna se agrupó principalmente en sobre los 21 años de edad.

6. DISCUSIÓN

El presente estudio ha logrado diferenciar por primera vez a través de la IHQ y con el uso de MO, a los TC de los MF en el estroma placentario, y a la vez ha evaluado en estas células los depósitos de nitrotirosina como índice de EO (Figura 9) y la actividad de caspasa 3 activada como índice de apoptosis (Figura 10).

En este trabajo se comprobó lo descrito por Wisdom y col., (1991), en relación a los embarazos normales, los cuales desarrollan un estado de EO. En los casos controles se encontró que tanto TC como MF presentaron una alta respuesta positiva a residuos de nitrotirosina (91,7%), pero sin diferencias significativas con relación al grupo PE (Tabla 3 y 5), resultados confirmados también por Herrera y col. 2014, quienes afirmaron que el embarazo en sí es un estado de EO producido por el aumento de la actividad mitocondrial de la placenta, situación exacerbada en los casos de PE (Myatt y Cui, 2004; Herrera y col., 2014). Este EO corresponde entonces a un desbalance entre la producción de RL y la baja capacidad de los antioxidantes para eliminarlos. Donde se ha informado que la placenta de mujeres con PE presentan una disminución significativa de la actividad de la enzima SOD no logrando ser eliminada la excesiva producción de RL (Bosco y col., 2010), situación que se demuestra para TC y MF del grupo PE en la Tabla 5 (100% positividad).

Cabe destacar que en la placenta se produce en el marco del EO la variante de estrés nitrosativo, siendo este último producido por efecto del anión superóxido (O_2^-), poderoso agente pro-oxidante. A consecuencia de lo anterior, en el EO se incrementa la liberación del anión O_2^- y cuando el O_2^- y NO coexisten reaccionan originando el anión peroxinitrito ($ONOO^-$) (Myatt. 2010), molécula de vida media corta, por lo que su producción se debe determinar de manera indirecta por la nitración que experimenta el aminoácido tirosina de las proteínas, a través de la modificación covalente de éstas

con producción de depósitos de nitrotirosina (Beckman y Koppenol, 1996; Kossenjans y col., 2000; Webster y col., 2008). Con la producción de ONOO⁻ se produce una disminución del NO disponible para ejercer su acción vasodilatadora en este órgano no innervado (Myatt, 1992; Myatt, 2010), en cambio la enzima SOD protege la actividad del NO eliminando los aniones O₂⁻ (Myatt y col., 1996). En este contexto los autores Webster y col. (2008), además describen que la nitración de proteínas está presente en los estados de embarazo normal, lo cual se asocia con una modificación post traduccional de las proteínas, donde el porcentaje de la nitración puede no provocar efectos celulares adversos. Sin embargo, cuando este proceso aumenta como lo observado en PE, afecta la función celular. Myatt., 2010, refiriéndose al poderoso daño que se produce producto del estrés nitrosativo, postula la hipótesis “la nitración de proteínas en la placenta, lo cual incluye receptores, transportadores, enzimas y proteínas estructurales, puede alterar la función placentaria y esto influir en el crecimiento y desarrollo del feto”, cuya idea la resume en la Figura 17, donde la alteración de la función de las proteínas traerá como consecuencia daño en el desarrollo fetal.

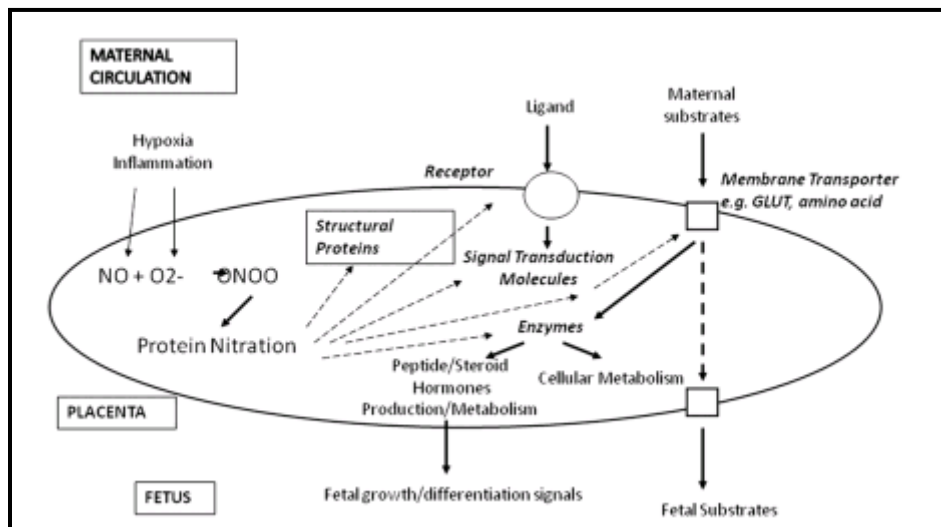


Figura 17: Efecto de la nitración de proteínas en la placenta y luego en el feto. Myatt., 2010.

Es importante agregar que Myatt y col., (1997) encontraron que células del estroma vellositario expresaban isoformas de SOD tanto en los casos control como PE, y actualmente al observar las fotografías del estudio de estos últimos autores podemos confirmar que las células del estroma que ellos identificaron corresponden actualmente a TC y MF (Figura 18). La expresión de esta enzima antioxidante en este tipo de células podría explicarnos la razón del porqué nosotros no encontramos diferencias significativas en los depósitos de nitrotirosina entre ambos grupos.

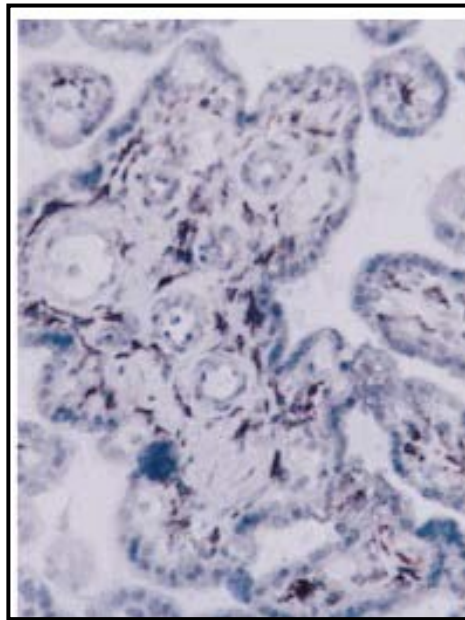


Figura 18: Inmunotinción en vellosidad placentaria humana normotensas con anticuerpo primario Cu / Zn SOD. Microfotografía tomada de Myatt y col.1997. Células del estroma muestran respuesta positiva a la isoforma de SOD (Myatt., y col. 1997).

Según nuestra hipótesis, las células estromales aquí estudiadas en mujeres con PE, desarrollarían además un alto nivel de apoptosis, por lo tanto en este contexto, se hace necesario resaltar que el normal funcionamiento de la placenta depende del adecuado balance entre la proliferación, diferenciación y apoptosis, como a la vez de la apropiada arquitectura morfológica de ésta. Por consiguiente, mantener la homeostasis de estos tres

procesos básicos es fundamental para el correcto desarrollo del feto. En la placenta la apoptosis aumenta significativamente a medida que avanza el embarazo, lo que sugiere un rol en el desarrollo y envejecimiento de la placenta (Smith y col., 1997).

Está demostrado que el EO observado en las placentas con PE conlleva a apoptosis de células del trofoblasto (Tjoa y col., 2006), por lo que nuestro estudio viene a ampliar los conocimientos en esta área, ya que presentamos resultados que muestran EO y apoptosis en células del estroma, células no estudiadas hasta ahora. Otro ejemplo son los estudios de Kadyrov y col., (2001) quienes demostraron la actividad de caspasa 3 en células del sincicio/citotrofoblasto a través del uso de Ac M30, el que reconoce el clivaje de CK18, filamento intermedio del citoesqueleto de una célula epitelial. Cabe señalar que el trofoblasto como célula epitelial proviene del embrión bilaminar, por tanto de origen ectodérmico y los TC y MF son de origen mesodérmico (Bosco y col., 2016), lo que justifica la razón de no usar Ac M30 en el actual estudio para medir apoptosis, a diferencia del Ac. CPP-32 que reconoce caspasa 3 activada tanto en el trofoblasto como en células del estroma (Austgulen y col., 2002).

En relación a la actividad de caspasa 3 activada, se obtuvieron diferencias significativas en MF entre grupo control y PE, con un alto porcentaje de respuesta negativa a apoptosis en el grupo control (Tabla 4 y 6), para lo cual, lo que nosotros postulamos es que probablemente las células tomen una vía apoptótica distinta a caspasa 3, como por ejemplo vía Bax, proteína pro- apoptótica, descrito así en los estudios de Ratts y col. (2000), los cuales manifiestan que la expresión de esta proteína es elevada en tejido conectivo y perivascular placentario. Por su parte Smith y col. 1997 señalan que en cuadros de PE, el EO se ve exageradamente aumentado, llevando con ello a un descontrol en el fenómeno normal de apoptosis, pudiendo por lo tanto alterar el correcto y continuo proceso de apoptosis y además alterar el desarrollo y crecimiento del feto.

Sobre la base de los estudios de Suciú y col., (2007, 2010) quienes describieron que el estroma placentario presentaba un nuevo tipo celular que habían sido previamente descrito en intestino y que denominaron TC, y luego Popescu y col. (2010) al postular que estos TC placentarios tenían por función ser el marcapaso que mantenía el tono de las CML de los vasos sanguíneos, en concomitancia con los estudios previos de Farley y col.,(2004), quienes demostraron que los MF eran el esqueleto de las vellosidades coriónicas y que participaban en la contracción/relajación de éstas vellosidades regulando así el volumen intraplacentario, dieron las bases que permitieron a Bosco y col., (2015, 2016) postular que dada la estratégica posición de los TC entre las CML de los vasos sanguíneos y los MF, estos serían los moduladores de la contracción/relajación tanto de las CML como de los MF, constituyendo una tríada funcional placentaria: CML-TC-MF (Bosco y col., 2016), reguladora del intercambio metabólico madre/feto.

Es importante destacar que nuestro estudio se realizó con el uso de MO, sin embargo Suciú y col. (2007) postularon que con el uso de MET la apoptosis de los TC se expresaría con la pérdida de las conexiones tipo sinápticas existentes entre sus Tps y los MF y entre sus Tps y las CML de los vasos sanguíneos fetales, conexiones que modularían como hemos dicho previamente, la traducción de señales entre estos dos tipos celulares, para de esta forma regular el tono de los vasos sanguíneos y la contracción / relajación de las vellosidades coriónicas humanas sumergidas en cámara hemática. Nuestros resultados son concordantes con la hipótesis de Suciú y col., (2007) y Bosco y col., (2015, 2016), al igual que con Kostin (2010) quien replicó este fenómeno pero en TC cardiacos de ratón y humano utilizando MET, dichos tejidos fueron sometidos a hipoxia, sugiriendo que este fenómeno llevó al aumento del EO y consecuentemente a la apoptosis.

La función de marcapaso de los TC placentarios propuesta por Suciú y col (2007) y por Bosco y col., (2015) se basa en los estudios de Gherghiceanu y Popescu (2011) en

corazón de ratón. En este estudio los citados autores encontraron con el uso de MET que los TC cardíacos presentaban nanocontactos (10-15nm) con cardiomiocitos y stem cells del órgano, constituyendo una red en el intersticio del miocardio que se relacionaría con la señalización y coordinación cardíaca. A través del análisis ultraestructural se demostró que estas células formaban un sistema intersticial entre todas las células cardíacas conformando una red integradora, afirmando que los TC cardíacos cumplirían una función estructural, de soporte y señalización a larga distancia, ya que están situados muy cerca de los cardiomiocitos, capilares sanguíneos y terminaciones nerviosas, esencial en la fisiología cardíaca. También se les atribuyó una función reparadora y de renovación cardíaca, ya que estas células estarían también en estrecho contacto con cardiomioblastos inmaduros (Gherghiceanu y Popescu., 2012). En casos de infartos al miocardio se ha visto en ratón que al realizar un trasplante de TC cardíacos en la zona infartada, el corazón puede disminuir el tamaño de la zona infartada cardíaca (Gherghiceanu y Popescu, 2012), es decir actuaría como stem cells regenerativa, lo que confirma que la apoptosis de los TC puede alterar de gran manera el funcionamiento del corazón, lo que sería concluyente también para placenta.

Cabe destacar también que la placenta actúa como pulmón para el feto, pudiendo extrapolar esta información y asociarla con los estudios de Popescu y col. (2011) realizados en pulmón de ratón, los TC actuarían en el árbol respiratorio a manera de una red mecánica que impediría el colapso de los bronquiólos y de los vasos sanguíneos respiratorios, siendo esto último lo mismo que proponemos nosotros como rol de los TC para las CML de los vasos sanguíneos de las vellosidades coriónicas, por tanto su daño por EO y/o por apoptosis alteraría el normal intercambio gaseoso madre/feto. Además, Zheng y col. (2012) describió TC en el pulmón humano, dispuestos vecinos a la capa del músculo liso o músculo de Reisensen que existe en los bronquiolos respiratorios y también en el espacio intersticial de los alvéolos, formando conexiones directas con las células musculares lisas tanto en los vasos sanguíneos del alvéolo como con el músculo de Reisensen en los bronquiolos, sumado a conexiones con células inmunes del

intersticio (Zheng y col. 2012). Lo expuesto es concordante con la función de tríada funcional de estas células en el funcionamiento de la placenta (Bosco y Díaz, 2016).

Recientemente Li y col. (2014), estudiaron en rata la función de regeneración en los túbulos renales, después de una lesión isquemia-reperfusión in vivo, los resultados demostraron un efecto protector de los TC contra la isquemia-reperfusión, el cual se producía a través de un mecanismo de inflamación independiente (Li y col, 2014).

Considerando que la placenta actúa como riñón para el feto este efecto podría ser análogo a lo que ocurriría con los TC placentarios, es decir estarían también involucrados en un efecto protector contra la isquemia-reperfusión que experimenta la placenta en PE.

Es importante hacer referencia que la placenta funciona también como intestino en relación a absorber metabolitos. Por lo tanto, sería interesante comparar dicha información con la fisiología del sistema digestivo, ya que si se analizan las vellosidades intestinales es posible identificar haces de células musculares lisas provenientes de la muscular de la mucosa cuya función es acortar y elongar las vellosidades intestinales para que tengan mayor contacto con el bolo alimenticio, de acuerdo a lo anterior, los MF ejercerían la misma función pero en las vellosidades coriónicas sumergidas en sangre materna (Bosco y Díaz, 2016), función que se vería afectada por una exacerbación de la apoptosis de estas células.

Por último, es interesante destacar que en relación a la función de intestino que realiza la placenta y citada en el párrafo anterior, se ha demostrado en la enfermedad de Crohn el notable efecto recuperativo que produce en estos pacientes la administración

endovenosa de células estromales provenientes de placentas de término de embarazos normales, células que podemos afirmar ahora que están representadas en gran parte por TC y MF. La enfermedad de Crohn es una enfermedad inflamatoria crónica del tracto gastrointestinal, de compleja patogénesis, y con las siguientes características clínicas: diarrea, dolor, estrechamiento de la luz intestinal que conduce a estenosis y obstrucción intestinal, formación de abscesos, etc (Mayer y col., 2013). Lo anterior se justifica porque estudios recientes han demostrado que los TC intestinales sufren una disminución significativa tanto en pacientes con enfermedad de Crohn, como con colitis ulcerosa, debido a la desorganización celular que sufre la arquitectura intestinal y la pérdida de la motilidad (Milia y col., 2013).

La PE es un síndrome materno que se define en términos de su función cardiovascular y renal (HTA y proteinuria), lo cual se resuelve con el parto, es decir la expulsión de la placenta es la medida clínica indicada en estos casos (Raijmakers y col., 2004). Como lo describíamos anteriormente, una placenta sana será quien desempeñe las funciones de órganos previa formación de ellos en el feto, por lo tanto, una placenta enferma, se podría ver reflejada con fallas orgánicas en un RN que se formó con una placenta dañada (Bosco y col., 2012).

Si bien este estudio se centra en los TC y MF placentarios, se debe considerar que su función es destacada para los otros tejidos previamente citados, por lo tanto sería un gran aporte a la fisiopatología si se continuara con las investigaciones de esta triada funcional cuando está sometida a EO y apoptosis.

Considerando que el feto depende de nutrientes y gases para el normal desarrollo y crecimiento, y la placenta media la transferencia de estos hasta el parto, Jansson y Powell (2007) afirman que el óptimo aporte de nutrientes para el normal crecimiento fetal,

es dependiente del flujo sanguíneo en la placenta, por lo tanto creemos que este estudio preliminar de efecto del EO y la apoptosis en los TC y MF sometidos a hipoxia por reperfusión como lo que ocurre en los casos de PE, también es un aporte al quehacer del clínico, por ello realizamos un análisis de los resultados inmunohistoquímicos aquí obtenidos y los datos clínicos de las pacientes y del RN. Concluyendo que si bien los datos no fueron significativos ($p > 0,05$), al analizar cada gráfico, se puede observar que tanto para EO como apoptosis en PE las placentas presentaron completa positividad, no así en el grupo control, el cual presentó respuestas negativas a EO y apoptosis, además todas las placentas controles pertenecían a edades ≥ 37 semanas de gestación, es decir, esto se puede explicar por los factores protectores que presenta la placenta frente al EO en embarazos normales, siendo las enzimas antioxidantes (SOD, catalasa, glutatión peroxidasa) las que actuarían como barreras fisiológicas para eliminar RL, para proteger a la placenta y evitan la consecuente alteración en el normal desarrollo de la apoptosis, permitiendo que el embarazo llegue a su término adecuadamente (Figura 14, 15, y 16) (Bosco y col., 2010). En el grupo PE, las placentas pertenecían principalmente a embarazos menores a 37 semanas de edad gestacional, lo que se clasifica según la Organización Mundial de la Salud, como un embarazo de pre-término (Figura 11), esto dice relación principalmente con el manejo clínico de la PE, debiendo ser interrumpido el embarazo antes de las semanas correspondientes (≥ 37 semanas), en el grupo PE todas presentaron respuesta positiva 100% (Figura 14). En relación al peso del RN de mujeres con PE, se vio un mayor “n” en el grupo de pesos de RN < 2500 gramos (Figura 12), mismo grupo presentó completa positividad a residuos de nitrotirosina y caspasa 3 activada a diferencia del grupo control (Figura 15), lo cual se puede relacionar con la menor edad gestacional que presentaron los embarazos, y por lo tanto los RN no alcanzaron el peso idóneo al nacer (≥ 2500 gramos). Para explicar dicho fenómeno, Bosco y col. 2010, informaron que en patologías del embarazo como la PE, aumentaría la acción de los lipoperóxidos debido a la disminuida acción antioxidante de enzimas como SOD, y, afectando la función de lípidos y de proteínas debido al estrés nitrosativo alterando el normal intercambio de los nutrientes hacia el feto, generando que el RN nazca con bajos pesos al nacer.

Además Bosco y col. 2012 postulan el concepto de hipercoagulación materna en placentas que han presentado PE, lo cual conduciría a una disminución en la circulación útero placentaria, es decir la hipercoagulabilidad de la sangre en cámara hemática lo que haría más difícil la contracción /relajación de las vellosidades coriónicas, y por ende disminución en el transporte de nutrientes y gases al feto.

Por lo demás, la edad materna podría conducir a cuadros de PE en casos de edades extremas, es decir en madres con menos de 20 años y más de 35 años, nuestros resultados en esta variable no fueron significativos, pero si resultó que el grupo de mujeres con PE se agrupaba mayoritariamente en el grupo mayor de 21 años, cuyas placentas además entregaron completa positividad al marcador de EO y apoptosis (Figura 13 y 16). Aún no se tiene claro cuál podría ser la causa, lo que sí se sabe es que en edades mayores de 35 años existe una mayor probabilidad de PE, atribuible a la presencia de enfermedades preexistentes como DM, HTA, enfermedades renales crónicas, patologías que contribuyen o aumentan la posibilidades de presentar PE.

7. CONCLUSIONES

En la placenta de mujeres con preeclampsia se observó que en relación a los controles, no hubo aumento significativo de residuos de nitrotirosina, marcador de estrés oxidativo, en telocitos y miofibroblastos.

En la placenta de mujeres con preeclampsia, en relación a los controles, solo en miofibroblastos se observó aumento significativo de caspasa 3 activada, marcador de apoptosis.

8. PROYECCIONES FUTURAS

1. El lograr distinguir por IHQ y MO en el estroma placentario estos 2 tipos celulares, permite diseñar nuevos estudios enfocados a explicar la relación PE/placenta.
2. Proponemos continuar con este estudio utilizando ahora MET.
3. Creemos también importante realizar una investigación que analice enzimas antioxidantes, como la actividad de SOD en TC y MF de placentas de mujeres con PE vs. control.
4. Proponemos también continuar con el estudio de apoptosis en TC y MF, determinando otras proteínas y otras vías que podrían activarse cuando ocurre un aumento de EO en placenta.
5. Dado que nuestro estudio corresponde a casos de PE moderada, proponemos que sería interesante repetir este estudio con casos de PE severa y PE+HELLP, para comprobar si los parámetros estudiados presentan alguna diferencia.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abarzúa F., Burgos S., Clavero M.y col. Guía perinatal. Ministerio de Salud. Santiago de Chile. 2015.
- Austgulen R, Chedwick L, Vogt Isaksen C, Vatten L, Craven C. Trophoblast Apoptosis in Human Placenta at Term as Detected by Expression of a Cytokeratin 18 Degradation Product of Caspase. Arch Pathol Lab Med. 126: 1480-1486. 2002.
- Beckman J, Koppenol W. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. Am J Physiol. 271:C1424–C1437. 1996.
- Belkacemi L, Bainbridge S, Dickinson M, Smith G y Graham CH. Glyceryl Trinitrate Inhibits Hypoxia/Reoxygenation - Induced Apoptosis in the Syncytiotrophoblast of the Human Placenta. Therapeutic Implications for Preeclampsia. The American Journal of Pathology. 3: 909- 920. 2007.
- Bosco C, Parra M, Barja P, Rodrigo R, Fernández V, Suarez M y Muñoz H. Increased immunohistochemical expression of thrombomodulin at placental perivascular myofibroblast in severe preeclampsia (PE). Histol Histopathol. 20: 1045-1055. 2005.
- Bosco C, Buffet C, Díaz E, Rodrigo R, Morales P, Barja P, Terra R, Parra M. VEGF in the muscular layer of placental blood vessels: Immuno-Expression in Preeclampsia and intrauterine growth restriction and its association with the antioxidant status. Cardiovascular, Hematologia Agents in Medicinal Chemistry. 8:87-95. 2010.
- Bosco C, González J, Gutiérrez R, Parra-Cordero M, Barja P, Rodrigo R. Oxidative damage to pre-eclamptic placenta: immunohistochemical expression

- of VEGF, nitrotyrosine residues and von Willebrand factor. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 25:2339-2345. 2012.
- Bosco C, Díaz E, Gutiérrez R, González J, Parra-Cordero M, Rodrigo R, Barja P. A putative role for telocytes in placental barrier impairment during preeclampsia. *Medical Hypotheses*, 84: 72-77. 2015.
 - Bosco C y Diaz E. Presence of telocytes in a non- innervated organ: the placenta. In *Telocytes, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Eds. Wang X. and D. Cretoiu D. Springer Science, Singapore. En prensa. 2016.
 - Castellucci M, Kosanke G, Verdenelli F, Huppertz B y Kaufmann P. Villous sprouting: fundamental mechanisms of human placental development. *Human Reproduction*, 6: 485-494. 2000.
 - Contreras, F; Fouillioux, C; Betancourt, M; Colmenares, Y; Guevarra, E; Torres, D; Magaldi, L; Jiménez, S; Velasco, M. Endotelio y trastornos hipertensivos en el embarazo. *Rev Fac Med Caracas* 25:121-129. 2002.
 - Cretoiu S, Cretoiu D, Marin A, Radu B y Popescu L. Telocytes: ultrastructural, immunohistochemical and electrophysiological characteristics in human myometrium. *Reproduction*. 145: 357–370. 2013.
 - Chekir C, Nakatsuka M, Noguchi S, Konishi H, Kamada Y, Sasaki A, Hao L, Hiramatsu, Y. Accumulation of advanced glycation end products in women with preeclampsia: Possible involvement of placental oxidative and nitrative stress. *Placenta*, 27, 225–233. 2006.
 - Demir R., Kosanke G., Kohnen G., Kertschanska S. y Kaufmann P. Classification of Human Placental Stem Villi: Review of Structural and Functional

Aspects. *Microscopy Research and technique*. 38: 29-41. 1997.

- De Falco M, Fedele V, Cobellis L, Mastrogiacomo A, Giraldi D, Leone S, De Luca L, Laforgia V, De Luca A. Pattern of expression of cyclin D1/CDK4 complex in human placenta during gestation. *Cell Tissue*, 317: 187-194. 2004.
- Donoso E. Tras el cumplimiento del 5º Objetivo del milenio: mortalidad materna, Chile 2011. *Rev Chil Obstet Ginecol*, 79: 5-8. 2014.
- El-Bassouny D. Ultrastructural study of the adult albino rat parotid gland with special reference to the role of stromal telocytes. *Egyptian Journal of Histology* 35:761–772. 2012.
- Farley A, Graham Ch, Smith G. Contractile properties of human placental anchoring villi. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: 680-684. 2004.
- Faussonne-Pellegrini M., Gherghiceanu M. Telocyte's contacts. Elsevier. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. En prensa. 2016.
- Faussonne-Pellegrini M y Popescu L. Telocytes. *Biomolecular Concepts* 2: 481–489. 2011.
- George E. y Granger J. Linking Placental Ischemia and Hypertension in Preeclampsia. Rol of Endothelin 1. *Hypertension*, 60: 507-511. 2012.
- Gherghiceanu M, Popescu L. Heterocellular communication in the heart: electron tomography of telocyte-myocyte junctions. *J Cell Mol Med*. 15:1005-1011. 2011.
- Gherghiceanu M, Popescu L. Cardiac telocytes - their junctions and

functional implications. *Cell Tissue Res.* 348:265–279. 2012.

- Graf R, Schonfelder G, Muhlberger M, Gutschmann M. The perivascular contractile sheath of human placental stem villi: its isolation and characterization. *Placenta*, 16: 57–66. 1995.
- Graf R, Neudeck H, Gossrau R, y Vetter K. Elastic fibres are an essential component of human placental stem villous stroma and an integrated part of the perivascular contractile sheath. *Cell Tissue Res.* 283: 133–141. 1996.
- Goldman-Wohl. Regulation of trophoblastic invasion: from normal implantation to pre-eclampsia. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187: 233-238. 2002.
- Herrera E, Krause B, Ebensperger G, Reyes R, Casanello P, Parra-Cordero M. y Llanos A. The placental pursuit for an adequate oxidant balance between the mother and the fetus. *Frontiers in Pharmacology.* 5: 1-10. 2014.
- Hubel C. Oxidative Stress in the pathogenesis of Preeclampsia. *Proc Soc Exp Biol Med*, 222: 222-235. 1999.
- Huppertz B. IFPA Award in Placentology Lecture: Biology of the placental syncytiotrophoblast – Myths and facts. *Trophoblast Research*, 24: S75–S81. 2009.
- Huppertz B, Martin G. Trophoblast Fusion. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 713: 81-95. 2011.
- Jansson T, Powell T. Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. *Clin Sci (Lond)*. 113:1-13. 2007.

- Kadyrov M, Kaufmann P y Huppertz B. Expression of a Cytokeratin 18 Neo-epitope is a Specific Marker for Trophoblast Apoptosis in Human Placenta. *Placenta* 22: 44 - 48. 2001.
- Kaufmann P, Black S, y Huppertz B. Endovascular Trophoblast Invasion: Implications for the Pathogenesis of Intrauterine Growth Retardation and Preeclampsia. *Biology of reproduction* 69: 1-7. 2003.
- Kossenjans W, Eis A, Sahay R, Brockman D. y Myatt L. Role of peroxynitrite in altered fetal-placental vascular reactivity in diabetes or preeclampsia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H1311-H1319. 2000.
- Kostin S. Myocardial telocytes: a specific new cellular entity. *J Cell Mol Med.*, 14: 1917-1921. 2010.
- Kutteh W, Rote N, Silver R. Antiphospholipid antibodies and reproduction: the antiphospholipid antibody syndrome. *American Reproduction Immunology*, 42: 133- 152. 1999.
- Laresgoiti - Servitje, E. A leading role for the immune system in the pathophysiology of preeclampsia *J. Leukoc. Biol.*, 94: 247–257. 2013.
- Li L, Lin M, Li L, Wang R, Zhang Ch, Qi G, Xu M, Rong R, Zhu T. Renal telocytes contribute to the repair of ischemically injured renal tubules. *J. Cell. Mol. Med.*18: 1144-1156. 2014.
- Longtine M, Nelson M. Placental Dysfunction and Fetal Programming: the Importance of Placental Size, Shape, Histopathology, and Molecular Composition. *Seminars in Reproductive Medicine*, 29: 187-196. 2011.

- Longtine M, Chen B, Odibo A, Zhong Y, Nelson D. Villous trophoblast apoptosis is elevated and restricted to cytotrophoblasts in pregnancies complicated by preeclampsia, IUGR, or preeclampsia with IUGR. *Placenta*, 33: 352-359. 2012.
- Maltepe E., Bakardjiev A., Fisher S. The placenta: transcriptional, epigenetic, and physiological integration during development. *J Clin Invest.*120:1016–1025. 2010.
- Mayer L, Pandak W, Gil M, Hanauer S, Johnson K, Payne D, Faleck,H, Hariri R, y Fischkoff S. Safety and Tolerability of Human Placenta-Derived Cells (PDA001) in Treatment-Resistant Crohn’s Disease: A Phase 1 Study. *Inflamm Bowel Dis.* 19: 754 - 760. 2013.
- Messerli M, May K, Hansson S, Schneider H, Holzgreve W, Hahn S, Rusterholz C. Fetomaternal interactions in pregnancies: placental microparticles activate peripheral blood monocytes. *Placenta*, 31: 106-112. 2010.
- Milia A, Ruffo M, Manetti M, Rosa I, Conte D, Fazi M, Messerini L, Ibba-Manneschi L. Telocytes in Crohn's disease. *J Cell Mol Med.* 17:1525-1536. 2013.
- Myatt, L. Control of vascular resistance in the human placenta. *Placenta.* 13: 329-341. 1992.
- Myatt L. Review: Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Placenta.* 31:S66–S69. 2010.
- Myatt L, Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol.* 122: 369-382. 2004.

- Myatt L, Eis A, Brockman D, Kossenjans W, Greer I, Lyall F. Differential localization of superoxide dismutase isoforms in placental villous tissue of normotensive, pre- eclamptic, and intrauterine growth-restricted pregnancies. *JHistochem Cytochem.* 45:1433-1438. 1997.
- Myatt L, Rosenfield R, Eis A, Brockman D, Geer I, Lyall F. Nitrotyrosine residues in placenta. Evidence of peroxynitrite formation and action. *Hypertension.* 28. 488-493. 1996.
- Nadeem L, Munir S, Fu G, Dunk C, Baczyk D, Caniggia I, Lye S, Peng Ch. Nodal Signals through Activin Receptor-Like Kinase 7 to Inhibit Trophoblast Migration and Invasion. Implication in the Pathogenesis of Preeclampsia. *Am J Pathol.* 178: 1177–1189. 2011.
- Negi R, Pande D, Karki K, Khanna R, Khanna H. Oxidative Stress and Preeclampsia. *Advances in Life Sciences.* 1: 20-23. 2011.
- Parra M, San Martín A, Valdes E, Hasbún J, Quiroz L, Schepeler M, Pérez S, Rau C, Miranda J. Espectro Clínico de la Preeclampsia; Estudio comparativo de sus diversos grados de severidad. *Rev Chil Obstet Ginecol* 72: 169-175. 2007.
- Parra-Cordero M, Bosco C, González J, Gutiérrez R, Barja P, Rodrigo R. Immunohistochemical expression of von Willebrand factor in the preeclamptic placenta. *J Mol Histol.* 42:459-465. 2011.
- Plitman R., Charnock-Jones S., Burton G., Oyen M. Three-dimensional modeling of human placental terminal villi. Elsevier. *Placenta.* 43: 54-60. 2016.
- Popescu L, Faussone-Pellegrini M. Telocytes - a case of serendipity: the winding way from Interstitial Cells of Cajal (ICC), via Interstitial Cajal-Like Cells (ICLC) to

Telocytes. *J Cell Mol Med.*14:729 - 740. 2010.

- Popescu L, Gherghiceanu M, Suciu L, Manole C y Hinescu M. Telocytes and putative stem cells in the lungs: electron microscopy, electron tomography and laser scanning microscopy. *Cell and Tissue Research.* 345: 391–403. 2011.
- Rajmakers, M; Dechend, R; Poston, L. Oxidative stress and preeclampsia: rationale for antioxidant clinical trials. *Hypertension.* 44: 374-380. 2004.
- Ratts V, Tao X, Webster C, y col. Expression of BCL-2, BAX and BAK trophoblast layer of the term human placenta: a unique model of apoptosis within a syncytium. *Placenta.* 21:361 - 366. 2000.
- Roberts J, Lay K. Recent insights into the pathogenesis of preeclampsia. *Placenta,* 23: 359-372. 2002.
- Rodríguez M, Egaña G, Márquez R, Bachmann M, Soto A. Preeclampsia: mediadores moleculares del daño placentario. *Rev Chil Obstet Ginecol,* 77:72-78. 2012.
- Rusu M., Cretoiu D., Vrapciu A., y col. Telocytes of the human adult trigeminal ganglion. *Cell Biol Toxicol.* 1-9. 2016.
- Sati L., Sevala Y., Demirb Y., Kosankec G.,y col. Cellular diversity of human placental stem villi: An ultrastructural and immunohistochemical study. Elsevier, *Acta histochemical.* 109: 468 - 479. 2007.
- Sela S, Itin A, Natanson-Yaron S, Greenfield C, Goldman-Wohl D, Yagel S, Keshet E. A novel human specific soluble vascular endothelial growth factor receptor 1. *Circulation Res.* 102: 1566-1584. 2008.

- Scifres Ch, Michael N. Intrauterine growth restriction, human placental development and trophoblast cell death. *The Journal Physiology*, 15: 3453-3458. 2009.
- Sepúlveda- Martínez A, Hasbún J, Salinas H, Valdés E, Parra M. Serie guías clínicas: Manejo de la preeclampsia. *Rev Hosp Clin Univ Chile*. 24: 246-260. 2013.
- Sharp A, Heazell A, Crocker I, Mor G. Placental apoptosis in health and disease. *Am J Reprod Immunol*. 64:159-169. 2010.
- Smith S, Baker P, Symonds E. Placental apoptosis in normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 177:57-65. 1997.
- Suciú L, Popescu LM, Gherghiceanu M. Human placenta: de visu demonstration of interstitial Cajal-like cells. *J Cell Mol Med*. 11: 590-507. 2007.
- Suciú L, Popescu LM, Gherghiceanu M, y col. Telocytes in human term placenta: morphology and phenotype. *Cells Tissues Organs*. 192: 325-339. 2010.
- Takahashi T, Tanaka M, Brannan C. Generalised lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell*, 75: 969-976. 1994.
- Tjoa M, Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O, Bianchi D, Burton G. Trophoblastic oxidative stress and the release of cell-free feto-placental DNA. *Am J Pathol*. 169: 400-404. 2006.
- Tranquilli A, Landi B, Giannubilo S, Sibai B. Preeclampsia: No longer solely a pregnancy disease. *Elsevier*, 2: 350-357. 2012.

- Van Parijs L, Abbas A. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science*, 280: 243-248. 1998.
- Webster R, Roberts V, Myatt L. Protein Nitration in Placenta – Functional Significance. *Placenta*. 29. 985 - 994. 2008.
- Wisdom S., Wilson R., McKillop J. y Walker J. Antioxidant systems in normal pregnancy and in pregnancy-induced hypertension. *Am J Obstet Gynecol* 165: 1701– 1704. 1991.
- Zheng Y, Bai C, Wang X. Potential significance of telocytes in the pathogenesis of lung diseases. *Expert Rev Respir Med*. 6: 45-49. 2012.

10. ANEXOS

ANEXO 1

UNIVERSIDAD DE CHILE
HOSPITAL CLINICO
Comité de Etica

MEMO N° :

:

MAT. :

Aprobación

SANTIAGO :

07 JUL. 2004

Señor
Dr. Mauro Parra C.
Departamento de Obstetricia y Ginecología
Presente.

Estimado Dr. Parra:

En el Comité de Etica del Hospital Clínico de la Universidad de Chile hemos revisado su trabajo de Investigación **"Estudio multicéntrico nacional para determinar el papel de las vitaminas antioxidantes en la profilaxis de preeclampsia severa y restricción de crecimiento fetal"**, el cual ha sido aprobado.

Saluda atentamente a Usted.,



PROF.DR. CAMILO LARRAIN AGUIRRE
PRESIDENTE COMITÉ DE ETICA

Distribución

ANEXO 2

Apéndice 4: Consentimiento informado de toma de muestra de sangre para estudios bioquímicos y/o genéticos
(Versión 1)
15 Mayo 2001

Unidad de Medicina Fetal
Hospital Clínico Universidad de Chile

ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL EFECTO DEL TROFOBLASTO HIPÓXICO SOBRE LA FUNCIÓN DEL ENDOTELIO VASCULAR

Consentimiento informado

Solicitamos su permiso para obtener muestras de la placenta y el cordón umbilical posterior al parto. Estos tejidos serán cultivados en medios especiales y posteriormente se realizarán estudios especiales para determinar el efecto cultivo de la placenta bajo condiciones hipóxicas sobre la función del endotelio vascular proveniente de cordones umbilicales. Estos estudios nos permitirán conocer algo más sobre la etiopatogenia de estas enfermedades de alta morbi-mortalidad perinatal y materna.

A las muestras de placenta y cordón se le asignará un número y examinada posteriormente por investigadores quienes no sabrán el origen de ésta. La información recabada de estos estudios estará bajo estricta confidencialidad y sólo los coordinadores de este estudio tendrán acceso a ella.

Todos los estudios serán anónimos, por lo que no podremos dar información individual de los resultados.

3. Confirmando que he leído y entendido la información arriba detallada y que he tenido la oportunidad de aclarar mis dudas

4. Acepto que se me toma una muestra de placenta y cordón umbilical posterior al parto

Nombre de la paciente..... Firma.....

Ficha clínica..... Fecha.....

Médico..... Firma.....

Si la paciente es menor de 18 años, se requiere la firma de los padres

Nombre..... Firma.....

Relación con paciente..... Fecha.....