



UNIVERSIDAD DE CHILE

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

Facultad de medicina

Departamento de Promoción de la Salud de la Mujer y el Recién Nacido

# **Exploración de presencia de hongos en placentas humanas de gestaciones de término mediante el cultivo de tejido placentario**

Tesis para optar al título de matrona

MACARENA PEDRAZA ROCA  
VERÓNICA VALENCIA YÁÑEZ

Profesores tutores:  
BIELKA CARVAJAL GUITIÉRREZ  
SERGIO VARGAS MUNITA

Santiago de Chile  
Noviembre 2017

# **Exploración de presencia de hongos en placentas humanas de gestaciones de término mediante el cultivo de tejido placentario.**

Macarena Pedraza Roca (1,2), Verónica Valencia Yáñez (1,2), Bielka Carvajal Gutiérrez (1,2), Sergio Vargas Munita (2,3).

1. Departamento de Promoción de la Salud de la Mujer y el Recién Nacido. 2. Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. 3. Programa de Microbiología y Micología, Instituto de Ciencias Biomédicas.

## **Número de palabras:**

Resumen: 237

Abstract: 212

Introducción: 1022

Material y método: 721

Resultados: 152

Discusión: 551

Limitaciones: 126

Conclusión 75

Total desde introducción hasta conclusión: 2766.

## AGRADECIMIENTOS

Macarena Pedraza: *Quiero partir diciendo que soy una agradecida de la vida, que con sus vueltas inesperadas y llenas de azar, más temprano que tarde nos lleva a todos al propio destino.*

*En primera instancia le agradezco a la Isa, mi mamá, por apoyarme en cada decisión, por alentarme siempre a ser mejor y por estar en todas conmigo, todos mis logros son también los suyos. Y por supuesto a mi abueli, por ser una segunda mamá, con todo lo que ello implica.*

*Le agradezco a mi compañera en esta aventura, la Vero, por toda su paciencia, comprensión, apoyo y confianza. Has sido la mejor partner para esta locura. Te admiro como persona y como profesional, sin duda eres una amiga del alma.*

*Y por supuesto debo agradecer a todos aquellos que son parte de mi vida: a mis amigos del colegio, por todo el apoyo y el cariño entregado durante estos años. A mis amigos de bachi, por haber mantenido mi fé intacta en aquellos tiempos donde todo se veía difícil. A mis amigos de esta carrera, por todo el apane en las alegrías y en las pellejerías que vivimos juntos durante estos 5 años, gracias a ustedes esto es posible y maravilloso de lograr. Y por último, quiero darle las gracias al Mati por su apoyo, su comprensión y por todo el cariño entregado en estos últimos meses, su compañía me ha hecho muy feliz.*

Verónica Valencia: Esta tesis refleja el trabajo de muchas personas además de las autoras que la han redactado es por esto que quiero agradecer a cada uno el granito de arena que aportó para que esto se pudiera hacer realidad y llegar a término.

*Empezare por los que hicieron que esto se pudiera realizar físicamente....*

*A la profesora Bielka gracias por acogernos a la Maca y a mí desde un principio, por siempre sacar la cara por nosotras las matronas, por confiar en que íbamos a lograr un buen resultado, por la paciencia y tiempo que dedico a nosotras y a nuestro trabajo. Al profesor Sergio por darnos la oportunidad a la Maca y a mí de emprender este viaje muy desconocido para nosotras. A la profesora Carola por abrirnos la puerta del laboratorio, explicarnos y enseñarnos lo que necesitábamos para nuestro trabajo y estar atenta frente a cualquier duda que quisiéramos resolver. A la profesora Rebeca por abrirnos la puerta del laboratorio y que al igual que la profe Carola nos explicó y enseñó todo lo que necesitábamos, además de responder nuestras dudas y algo que no se puede olvidar mencionar, muchísimas gracias por hacernos uno que otro favor durante la investigación. A Fabián por compartir su conocimiento y todas las carcajadas que nos hacían el día.*

*Seguiré con los que siempre han estado ahí antes que ingresara a la universidad y nunca han dejado de confiar en mí...*

*A mis padres por darme la vida, por quererme como lo han hecho toda la vida y por darme todas las herramientas necesarias para llegar hasta donde estoy hoy en día. A mi padre por enseñarme a nunca darme por vencida, que siempre se puede dar un poco más y que nunca es suficiente. Por mostrarme que siempre hay dos caras de la moneda. A mi madre por su amor incondicional frente a mí y mis hermanos, por su amistad de vez en cuando, sus abrazos, cariños y por su amor en general. A mi hermano "grande" por sus niñadas, abrazos apretados, de esos que te dejan sin aire, regalones post- trasnochada y peleas de niños chicos que nos han hecho crecer juntos y generar un lazo de hermandad indescriptible. A mi hermanita chica, sí, siempre será la chica.... Por sus locuras, ideas más locas aun, chistes, pesadeces que la hacen ser más ella que nada, por ser la regalona sin límites, por sacarme sonrisas aunque tenga pena, este enojada o cualquier emoción que se contraponga con la felicidad, porque si ella genera eso en mí y en todo el mundo. Sabes que te re-adoro y eso siempre será así. A mis amigos de la vida y la universidad, por despejarme cada vez que lo necesitaba, por compartir sus experiencias que me hacían saber que no era la única que pasaba por lo mismo, lo que hacía que la experiencia no fuera terrible si no que solo un momento intenso que iba a pasar.*

*Por último lo mejor para el final, mi compañera de trabajo, mi querida amiga Maca, gracias por todo, desde un principio nos prometimos que esto iba a salir bien y sin ningún problema, así fue, en las adversidades nos complementábamos, comíamos, hablábamos, las resolvíamos y salíamos adelante, has sido una excelente compañera de trabajo y amiga, sin ti claramente no hubiese resultado igual. Estoy muy orgullosa de lo que hemos logrado juntas y estoy segura que esta amistad no se quedará acá, te deseo lo mejor en tu futuro profesional, sé que serás una matrona excepcional.*

## RESUMEN

**Introducción:** El reciente descubrimiento de la existencia de un microbioma placentario en placentas humanas post-alumbramiento, ha puesto en entredicho, la creencia habitual de que el ambiente uterino durante la gestación es estéril. La documentación de ADN bacteriano en placentas humanas, además de ADN de hongos en modelos animales permite plantear la exploración de placentas humanas buscando hongos como parte del microbioma placentario humano.

**Material y método:** estudio de tipo descriptivo, exploratorio y cuantitativo, en el que se exploró la existencia de hongos en placentas humanas de gestaciones de término, mediante el cultivo de tejido en agar sabouraud. Se analizaron un total de 20 placentas, a las que mediante técnica estéril se les extrajo tejido bajo 2 mm de superficie por la cara materna, de 6 cotiledones distintos. Estas muestras fueron procesadas para posteriormente ser sembradas en las placas de cultivo estéril.

**Resultados:** las participantes del estudio se caracterizan por ser multíparas (65%) y sin patologías asociadas (60%). El tipo de parto predominante fue vaginal (65%). En cuanto al crecimiento de hongos en los cultivos, no se observó desarrollo de colonias en las placas de cultivo.

**Discusión:** Si bien en este estudio no se obtuvieron cultivos positivos no se puede descartar por completo la presencia de hongos a nivel placentario. Se recomienda realizar nuevas investigaciones que utilicen otras técnicas de detección de ADN fúngico, las cuales pudieran proveer mayor información frente a la determinación del microbioma placentario humano.

**Key words:** inmunomodulación, embarazo, placenta, hongos, microbioma, microbioma placentario.

## ABSTRACT

**Introduction:** The last finding shown a placental microbiome in human placentas after childbirth, it has called into question, the common belief that the uterine environment during gestation is sterile. The documentation of bacterial DNA in human placentas, as well as fungus DNA in animal models, allows to propose the possibility to explore human placentas looking for fungus as part of the human placental microbiome.

**Material and method:** descriptive, exploratory and quantitative study, which explored the existence of fungus in human placentas in term pregnancies, through the cultivation of tissue in sabouraud agar. A total of 20 placentas were analyzed. Using sterile technique was extracted tissue under 2 mm from maternal surface of 6 distinct cotyledons. These samples were processed to be shown in a sterile culture.

**Results:** The study participants were characterized as multiparous (65%) and with no pathology associated (60%). The predominant way of birth was vaginal (65%). Regarding the growth of fungus in cultures, there was no development of colonies in the culture plates.

**Discussion:** Although positive cultures weren't reached in this study, the presence of fungi in placenta can't be rejected at all. It is recommended to make new research using others techniques of fungal DNA, which could provide more information about the determination of the human placental microbiome.

**Key words:** immunomodulation, pregnancy, placenta, fungi, microbiome, placental microbiome.

## INTRODUCCIÓN

### **Sistema Inmune en el embarazo**

Durante el desarrollo de un embarazo se producen múltiples modificaciones en el cuerpo de la gestante (1), siendo una de las más importantes la que ocurre con el sistema inmune, el cual modula su respuesta para lograr el adecuado desarrollo fetal.

El sistema inmune es fundamental para la sobrevivencia humana, ya que es capaz de proteger al cuerpo de todo aquello que reconoce como ajeno (2). Desde la perspectiva inmunológica, el feto tiene la misma condición que la de un injerto semialogénico, debiendo entonces, ser reconocido por el sistema inmune materno como algo “no propio” y por ende, ser eliminado (3,4). A pesar de lo anterior, pareciera existir un estado de inmunomodulación materno, en donde la respuesta inmune adaptativa de los linfocitos B y T, a la estimulación antigénica por parte del feto, estaría disminuida o incluso inhibida, favoreciendo el estado de tolerancia inmunológica materno (3,5).

Para entender las alteraciones inmunológicas que ocurren en el embarazo y que permiten la tolerancia al embrión/feto (3), se han planteado dos teorías: la primera supone que existe una inmunosupresión general que reduce la posibilidad de una respuesta antígeno específica contra el feto semialogénico (6), y la segunda teoría, plantea un aumento de la actividad de linfocitos Th2, repercutiendo esto en un embarazo exitoso (7).

En modelos animales se ha observado que la acción de los Th2 en conjunto con otros linfocitos T encargados de la prevención de la autoinmunidad, son fundamentales para la progresión normal y el mantenimiento de las gestaciones (5,8). De la misma forma, la inhibición de la actividad citotóxica de las células natural killers uterinas (NKu), permite la correcta implantación y la placentación (5).

### **Placenta: características y su microbioma.**

Es un órgano desarrollado exclusivamente en el embarazo, que actúa de puente entre la madre y el feto, este se genera con la finalidad de cubrir las necesidades energéticas y de oxigenación fetal. Al terminar su desarrollo alcanza un peso promedio de 500 gramos y un número de 10 cotiledones aproximadamente (9). Se compone por dos tipos de células trofoblásticas, estas son: citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto (10).

Por ser un órgano altamente irrigado, es susceptible de ser colonizado por diversos microorganismos (MO) (10). Hasta el momento se plantean dos teorías de potenciales vías de colonización: la primera se llevaría a cabo por el sincitiotrofoblasto, en donde el flujo sanguíneo que proviene de las vellosidades coriónicas, podría transportar MO, los que dañan la capa celular continua, generando una pérdida de la barrera física y favoreciendo el ingreso de agentes a la placenta (11), la segunda propone que es a través del trofoblasto extraveloso, en donde las células pertenecientes al citotrofoblasto adquieren la capacidad de movimiento, y de esta manera logran la invasión y remodelación de las arterias uterinas espiraladas (9), una vez que el agente alcanza el trofoblasto extraveloso, por medio de la irrigación placentaria, este ingresa a un leucocito, el que migra hacia la decidua, es en este momento que el MO comienza su diseminación, viajando de célula en célula o bien generando lisis del leucocito, es decir, ruptura de la membrana celular, para luego ingresar a otra célula (11). (Ver imagen en anexo 1)

El reconocimiento de posibles vías de infección de la placenta y feto no sólo es relevante para evitar cuadros infecciosos como la corioamnionitis, sino que también es importante, ya que estudios recientes realizados en placentas post-alumbramiento, han demostrado la presencia de un microbioma placentario de tipo bacteriano(12–16).

Microbioma se define como un conjunto de genomas de simbioses microbianos presentes en un organismo (17), este estaría compuesto por bacterias entre las que predominantemente se encuentra *Firmicutes*, *Tenericutes*, *Proteobacterias*, *Bacteroides* y *Fusibacteria* (12).

Algunos modelos animales muestran que además del microbioma bacteriano se ha encontrado material genético proveniente de hongos, como se ve reflejado en los estudios de Clothier (18) y Sanchez (19), los cuales estudiaron tejidos fetales, en los que se observó que el segundo MO más prevalente en los abortos bovinos fue la *Neospora caninum* y que la transferencia de la madre al feto de *Pneumocystis oryctolagi* era favorecida a mayor número de gestaciones maternas en conejas respectivamente. Estos indicios presentes en otros mamíferos permiten cuestionarse si existe otro tipo de MO, por ejemplo hongos, como parte del microbioma placentario humano y que hasta el momento no han sido detectados (12–19).

### **Hongos y su relación con los humanos.**

A diferencia de otros agentes microbiológicos, el impacto de los hongos en la salud de las personas aún no ha sido completamente explorado (20), a pesar de que se sabe que en el ser humano habitan normalmente especies como *Candida albicans*, *Saccharomyces spp* y *Malassezia spp* (21,22), y que en condiciones de inmunocompetencia no causan perjuicio a la salud (20,22).

Parte de esta situación se debe a la dificultad que existe para realizar el diagnóstico de micosis, ya que las técnicas que se disponen para la detección de hongos varían en costo y efectividad; por ejemplo la reacción en cadena de polimerasa (PCR) posee una alta especificidad (23), pero tiene un alto costo económico y no está disponible en todos los laboratorios (24).

Actualmente, el cultivo se considera el método de elección y de mayor sensibilidad para el diagnóstico de micosis en la clínica (24,25), ya que permite identificar al agente en la mayoría de los casos. Dentro de los medios de cultivo más recomendables se encuentra el agar Sabouraud, ya que se considera como el más adecuado para el aislamiento, esporulación y conservación de hongos tipo levaduras y mohos. Su pH y la concentración de glucosa favorecen la esporulación y al mismo tiempo inhiben el desarrollo de otros microorganismos, principalmente bacterias (26). Es de bajo costo económico y además está disponible en todos los laboratorios, por lo que es el de mejor costo-efectividad (24).

Considerando los recientes hallazgos en materia de microbioma placentario humano y el potencial impacto que los hongos pudieran tener sobre la placenta, parece pertinente explorar y documentar presencia de hongos en placentas humanas de gestaciones de término, mediante el cultivo de tejido placentario de partos ocurridos durante el año 2017 en los hospitales *Luis Tisné* y *San José*.

## MATERIAL Y MÉTODO

Estudio de tipo descriptivo, exploratorio, transversal y cuantitativo, en el que se exploró la presencia de hongos en placentas de recién nacidos de término, durante el año 2017.

Como parte del proyecto Fondecyt 1140412 y Proyecto ERANet LAC HID0254 Capri-Pc., en el que se estudia mediante técnica de PCR la presencia de *Pneumocystis Jirovecci* en placentas de gestaciones de término, se realizó este estudio a fin de complementar la información existente sobre el microbioma placentario.

Dado el carácter exploratorio de esta investigación, se consideró que las primeras 20 muestras del proyecto principal serían analizadas mediante cultivo en agar sabouraud para determinar la presencia de hongos en el tejido; en el caso de encontrar un resultado positivo, el equipo procedería a extender la búsqueda en la totalidad de las placentas del estudio.

El muestreo se realizó por conveniencia en las dependencias de los hospitales *Luis Tisné* (Peñalolén) y *San José* (Independencia). Se incluyeron aquellas gestantes que cursaron un embarazo de término (37 - 42 semanas). Se excluyeron a todas las gestantes con patología mental que les impidió comprender el consentimiento informado; aquellas con embarazo múltiple; aquellas con trabajo de parto sugerente de cuadro infeccioso y con rotura prematura de membranas mayor a 18 horas, y por último a las que recibieron tratamiento con antifúngicos durante el embarazo.

Para caracterizar a las gestantes participantes, se utilizó una encuesta que contenía las variables: paridad, patologías durante el embarazo, antibióticos utilizados durante la gestación, tipo de parto y edad gestacional al momento del parto, y las variables sociodemográficas: país de origen y etnia. Todos los datos recogidos fueron ingresados a una máscara realizada con el programa EpiData®, el cual permitió disminuir los errores en el traspaso de los mismos, previo a su análisis.

### **Recolección de muestras biológicas:**

Para asegurar la calidad de la muestra, la recolección de cada placenta se realizó en una bolsa plástica limpia dentro del pabellón de parto, rotulada con un número correlativo único correspondiente a cada participante. Dicha bolsa fue transportada dentro de un contenedor hermético hasta el laboratorio ubicado en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

El protocolo utilizado para la extracción de muestra de tejido placentario, consideró la extracción de tejido por la cara materna de la placenta, bajo 2 mm de superficie a modo de controlar posible colonización por manipulación de la placenta y/o su paso a través del canal vaginal. Se tomaron muestras de 0,4 g por cotiledón, considerando una línea imaginaria a través del diámetro mayor de la placenta (incluyendo 6 cotiledones en total). Un conjunto de muestra de tres cotiledones (1,2 g en total) se depositaron sobre una placa estéril, en donde se seccionaron en pequeños trozos, se mezclaron y se obtuvo una muestra Mix de 0,5 g. De cada paciente se obtuvieron dos muestras Mix, las que fueron recolectadas en un frasco Duran-Schott con un magneto previamente esterilizado y 20 ml de PBS pH=7,2 estéril. Posteriormente, se ubicaron sobre una placa agitadora durante 30 minutos, para luego ser filtradas y centrifugadas por 10 min a 2.900g a 4°C.

Para el cultivo del tejido, se utilizaron placas de petri en las que se agregó la mezcla de medio de cultivo agar sabouraud con cloranfenicol, previamente esterilizado. Todas las placas fueron sometidas a un control de calidad en un incubador a 37°C durante 24 horas, para verificar que no se encontraran contaminadas. Una vez comprobada la esterilidad del medio, se procedió a sembrar 100 microlitros de mix de tejido placentario de cada donante en dos placas, rotuladas con los respectivos números. Las placas sembradas fueron dejadas en el incubador a 37°C durante un plazo de 48 horas y durante 5 días a t° ambiente (21°C-28°C), tras el cual se verificó el crecimiento de colonias. La elección del medio y del esquema de incubación de la muestra se realizó en base al costo-efectividad y a la disponibilidad de éste.

Para el cultivo de tejido placentario se determinó que este sería positivo si al menos presentaba crecimiento de una colonia de hongos, mientras que si no había crecimiento, sería considerado como negativo.

## ASPECTOS ÉTICOS

La realización de este estudio fue aprobada por el Comité de Ética Científico Adultos del Servicio Metropolitano Oriente y por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Todas las gestantes que participaron firmaron el consentimiento informado.

## RESULTADOS

De las gestantes que participaron en este estudio 4 pertenecieron al Hospital *Luis Tisne* y 16 al Hospital San José. Éstas se caracterizan por ser multíparas, sin patologías asociadas y que la vía parto predominante fue vaginal. En la tabla 1 se presentan las variables y los resultados obtenidos para cada una de ellas.

Tabla 1: Caracterización por variables obstétricas.

<b>Variable</b>	<b>N (%)</b>
Patología	
Asociada	8 (40)
No asociada	12 (60)
Tipo de parto	
Vaginal	13 (65)
Cesárea	7 (35)
Paridad	
Multípara	13 (65)
Primípara	7 (35)

En cuanto al crecimiento de hongos en los cultivos, se puede observar en la tabla 2 que no hubo presencia de colonias en ninguna placa, por lo que todas resultaron negativas. Es necesario mencionar que dos placas resultaron contaminadas, mix 1 correspondiente a BPLA 001 y mix 1 correspondiente a BPLA 012, ya que en ambas hubo crecimiento de microorganismos no correspondientes a hongos, sin embargo las placas correspondientes

al mix 2 de las respectivas muestras resultaron negativas. Esta situación pudo estar dada por una mala manipulación en el material al momento de sembrar el tejido.

Tabla 2: Resultados del cultivo del tejido placentario en las placas con agar sabouraud.

<b>Cultivo de tejido placentario</b>	<b>Placa mix 1</b>	<b>Placa mix 2</b>
Positivas	0%	0%
Negativos	100%	100%
Contaminadas	10%	0%

## DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados de este estudio, pareciera que la vía de parto ya sea vaginal o cesárea, no condiciona la colonización del tejido placentario, ya que en ambos casos los cultivos resultaron negativos para crecimiento de hongos. Situación que se contrapone a lo observado en el estudio realizado por Doyle, donde se comparan nacimientos de término por vía vaginal y por cesáreas, en el que se observa una diferencia en la cantidad de lactobacilos presentes en las membranas placentarias, los que se encuentran en mayor cantidad en partos por vía vaginal (27), lo que evidencia que existe una contaminación de tejido influenciada por la vía del parto, y que los microorganismos encontrados no necesariamente están asociados a una colonización durante el desarrollo del embarazo.

En relación a la paridad, pareciera que ésta no influye en la posibilidad de colonización placentaria por hongos, ya que tanto en primíparas como en múltiparas no se obtuvieron cultivos positivos, a diferencia de lo observado en el estudio de Sánchez (19) en donde a mayor paridad se produce mayor transmisión vertical de *Pneumocystis oryctolagi*. De todos modos, cabe destacar que en este proyecto se utilizó otra técnica de detección de hongos (PCR), lo que pudiera tener relación con la diferencia observada entre ambas investigaciones.

En cuanto a la presencia de patologías concomitantes en las participantes, tampoco parecieran afectar la presencia o ausencia de hongos a nivel placentario, puesto que los resultados no variaron con respecto a las gestantes sanas.

Si bien en este estudio no se obtuvieron cultivos positivos no se puede descartar por completo la presencia de hongos a nivel placentario, ya que el medio utilizado permite el desarrollo preferentemente de levaduras y mohos (26), lo cual podría sugerir que existen otros tipos de hongos en la placenta que no son capaces de desarrollarse de forma óptima en este medio, ya sea por las condiciones que éste ofrece o por las características del propio hongo (28). Hasta el momento los hallazgos realizados en cuanto a bacterias presentes en el microbioma placentario se han hecho mediante análisis por el método de PCR con amplificaciones de ácido ribonucleico (ARN) ribosomal de la subunidad 16 (ARNr 16S), el cual es característico de bacterias (29). Al emplear esta técnica es posible determinar la existencia de una secuencia de ADN correspondiente a un microorganismo específico, sin embargo no se da cuenta de la presencia física del mismo. De toda la evidencia que respalda la presencia de bacterias en el microbioma placentario, en ningún

estudio se ha realizado cultivo de tejido para determinar la presencia del microorganismo, probablemente por la baja especificidad y sensibilidad que el medio ofrece (24).

Otra consideración frente a este resultado, es que no exista presencia del microorganismo en sí en la placenta humana, pero que sí podría existir ADN fúngico inserto en el ADN celular, teoría apoyada con el estudio de Crisp, en donde se establece como un hecho la transmisión horizontal de genes, desde bacterias y hongos hacia los seres humanos, determinando que actualmente el genoma humano cuenta con 143 genes provenientes de otros microorganismos (30). Por lo tanto, para comprobar la presencia de ADN fúngico en tejido placentario, sería necesario analizar mediante PCR otros tipos de ARN ribosomal, como lo es la subunidad 18 (ARNr 18S) característico de los hongos (23).

## **LIMITACIONES**

Como limitación de este estudio se puede mencionar el muestreo utilizado, ya que al ser por conveniencia no permite asegurar un alto nivel de confianza de los resultados obtenidos, por lo que tampoco se puede extrapolar lo hallado a otras poblaciones (31). No obstante lo anterior, este estudio puede servir de base para la construcción de un estudio de prevalencia y de esta manera corroborar la veracidad de los resultados.

Otra limitación presente es el tiempo de incubación de la muestra sembrada, ya que las recomendaciones técnicas sugieren mantener las muestras por un periodo de entre 7 y 28 días en incubación para permitir el crecimiento adecuado de colonias (26). Para efectos de un estudio posterior, tal vez sería conveniente ampliar el plazo de incubación.

## **CONCLUSIONES**

Actualmente existe evidencia científica que respalda la presencia de un microbioma placentario humano, lo que podría constituir un gran avance para la medicina. Si bien este estudio no encontró hongos cultivables en placentas de gestaciones de término, para corroborar este hallazgo, es necesario el desarrollo de estudios que consideren otras técnicas de detección con mayor sensibilidad y especificidad, además de otros grupos objetivo como por ejemplo, placentas de aborto o de partos de pretérmino.

## REFERENCIAS

1. Ricardo Schwarcz, Ricardo Fescina CD. *Obstetricia*. 6th ed. Buenos Aires: Editorial el ateneo.; 2005.
2. Toche. P. Visión panorámica del sistema inmune. *Rev medica Clin las condes*. 2012;23(4):446–57.
3. Pazos M, Sperling RS, Moran TM, Kraus TA. The influence of pregnancy on systemic immunity. *Immunol Res*. 2012;
4. Rico-Rosillo MG, Vega-Robledo GB. Mecanismos inmunológicos involucrados en el embarazo. *Ginecol Obstet Mex*. 2012;
5. Vázquez-Rodríguez S, Bouchan-Valencia P, González-Jiménez MA, Yuriria Paredes-Vivas L, Calixto-González R, Cébulo-Vázquez A, et al. Mecanismos de tolerancia inmunológica en el embarazo. *Número*. 2011;25(1):39–45.
6. Erlebacher A. Why isn ' t the fetus rejected ? *Semin Cell Dev Biol*. 2005;590–3.
7. Cardenas GM and I. The immune system in pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2011;63(6):425–33.
8. C UV. Linfocitos T reguladores y respuesta inmune. *Av Cs Vet*. 2009;24:72–9.
9. Desarrollo B, Rojas DM, Montenegro DMA, Drs P, Domínguez S, Concha M, et al. *Embriología humana*. 2007. 1-98 p.
10. CunninghamF Gary, Norman F. Gant, Kenneth Leveno, Larry Gilstrap, John Hauth KW. *Williams Obstetricia*. 21st ed. Buenos Aires.: Editorial Médica Panamericana; 2002.
11. Robbins JR, Bakardjiev AI. Pathogens and the placental fortress. *Current Opinion in Microbiology*. 2012.
12. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The Placenta Harbors a Unique Microbiome. *Sci Transl Med*. 2014;6.
13. Prince AL, Ma J, Kannan PS, Alvarez M, Gisslen T, Harris RA, et al. The placental membrane microbiome is altered among subjects with spontaneous preterm birth with and without chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol*. 2016;
14. Collado MC, Rautava S, Aakko J, Isolauri E, Salminen S. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Nat Publ Gr*. 2016;
15. Prince AL, Antony KM, Chu DM, Aagaard KM. The microbiome, parturition, and timing of birth: more questions than answers. *J Reprod Immunol*. 2014;104–105:12–9.
16. Amarasekara R, Jayasekara RW, Senanayake H, Dissanayake VHW. Microbiome of the placenta in pre-eclampsia supports the role of bacteria in the multifactorial

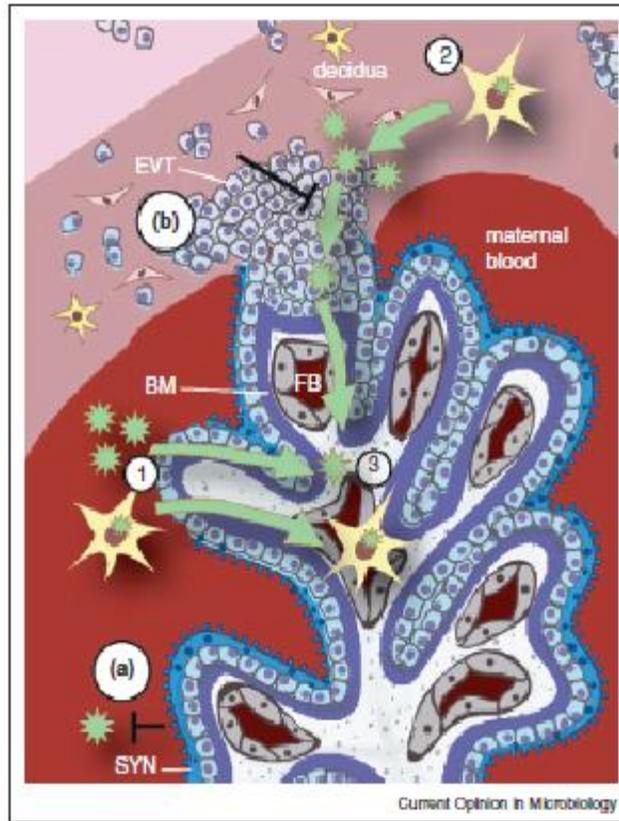
cause of pre-eclampsia. *J Obstet Gynaecol Res*. 2015;

17. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-liggett C, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world. *Nature*. 2007;449(7164):804–10.
18. Clothier K, Anderson M. Evaluation of bovine abortion cases and tissue suitability for identification of infectious agents in California diagnostic laboratory cases from 2007 to 2012. *Theriogenology*. 2016;
19. Sanchez C a, Chabé M, Aliouat EM, Durand-Joly I, Gantois N, Conseil V, et al. Exploring transplacental transmission of *Pneumocystis oryctolagi* in first-time pregnant and multiparous rabbit does. *Med Mycol [Internet]*. 2007;45(8):701–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18027254>
20. Brown GD, Denning DW, Gow NAR, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden Killers: Human Fungal Infections.
21. Sokol H, Leducq V, Aschard H, Pham H-P, Jegou S, Landman C, et al. Fungal microbiota dysbiosis in IBD. Available from: <http://dx.doi.org/10.1136/>
22. Gubelin W, Giesen L. Micosis superficiales Superficial mycoses. 2011;22(6):804–12.
23. Ruhnke M, Böhme A, Buchheidt D, Donhuijsen K, Einsele H, Enzensberger R, et al. Diagnosis of invasive fungal infections in hematology and oncology--guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO). *AnnHematol [Internet]*. 2003;82 Suppl 2(0939–5555 (Print)):S141–8. Available from: <c:%5CKARSTEN%5CPDFs%5CMykologie-PDFs%5CMyk-2003%5CRuhnke et al.-Diagnosis of invasive fungal infections in hematology and oncology.pdf>
24. Murray Patrick, Rosenthal ken PM. *Microbiología médica*. 7th ed. Barcelona: Elsevier; 2014.
25. Rampini SK, Zbinden A, Speck RF, Bloemberg G V. Similar efficacy of broad-range ITS PCR and conventional fungal culture for diagnosing fungal infections in non-immunocompromised patients. *BMC Microbiol [Internet]*. 2016;16(1):132. Available from: <http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-016-0752-1>
26. Gadea I, Cuenca-Estrella M, Martín E, Pemán J, Pontón J, Luis Rodríguez-Tudela J. Procedimientos de diagnóstico microbiológico de las micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos [Internet]. Vol. 25, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2007. 336-340 p. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X07742969>
27. Doyle RM, Alber DG, Jones HE, Harris K, Fitzgerald F, Peebles D, et al. Term and preterm labour are associated with distinct microbial community structures in placental membranes which are independent of mode of delivery. *Placenta [Internet]*. 2014;35(12):1099–101. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2014.10.007>
28. González H, Fierro R. ¿Sabías que existen microorganismos que no hemos podido

cultivar? [cited 2017 Nov 9]; Available from:  
file:///C:/Users/Alberto/Pictures/Verito/Universidad/Tesis/Paper tesis/organismos.pdf

29. Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods*. 2007;69(2):330–9.
30. Crisp A, Boschetti C, Perry M, Tunnacliffe A, Micklem G. Expression of multiple horizontally acquired genes is a hallmark of both vertebrate and invertebrate genomes. 2015;1–13.
31. Hernández Sampieri R, Fernández Collado P. C y BL. Metodología de la Investigación. 3rd ed. Martínez. A, editor. México.: Mc Graw-Hill.; 2003.

**ANEXO 1:** Placental colonization by pathogens / Colonización placentaria por patógenos.



Extraída de: Robbins JR, Bakardjiev AI. Pathogens and the placental fortress. *Current Opinion in Microbiology*. 2012.

Descripción original.

A schematic depiction of the human maternal–fetal interface is used to illustrate the barriers and possible pathways for pathogen transmission. The two sites of direct contact between maternal and fetal cells are the blood– syncytiotrophoblast (SYN) (a) and the uterus–extravillous trophoblast (EVT) (b) interfaces. Both of these trophoblast subpopulations have defense mechanisms against infection, and underneath the trophoblast barrier, the basement membrane (BM) presents an additional physical barrier. Failure of the placental barrier can occur in the presence of high pathogen titers or multiple infections. Damage of the syncytiotrophoblast enables pathogens (green stars) that are free in maternal blood or inside of maternal leukocytes (yellow cells with green stars) to cross into fetal tissues (1). However, animal and organ culture models agree that most placental infections originate in the uterine decidua (2), which is minimally accessible from the maternal blood. Pathogens can reach the decidua only by dissemination in maternal cells, most likely leukocytes. If the defense mechanisms of the EVT are overcome, the infection may spread to the fetal blood (FB) (3), act as a nidus for maternal reinfection, and/or cause trophoblast death resulting in placental insufficiency or spontaneous

abortion. Finally, some pathogens may reach the fetus by traveling within maternal leukocytes on their natural way to the fetus.

Traducción realizada por autores.

Es una representación esquemática de la interface materno-fetal, utilizada para ilustrar las barreras y posibles vías de transmisión de patógenos. Los dos sitios de contacto directo entre la madre y las células fetales son las siguientes interfaces: sangre materna con sincitiotrofoblasto (SYN) (a) y útero con trofoblasto extraveloso (EVT) (b). Estas dos subpoblaciones de trofoblastos son un mecanismo de defensa contra las infecciones, además de presentar una barrera física adicional por debajo de la barrera trofoblástica que se denomina membrana basal (BM). Esta barrera puede fallar frente a altos títulos de patógenos como a múltiples infecciones. El daño del sincitiotrofoblasto permite que los patógenos (estrellas verdes) libres en la sangre materna o que se encuentran dentro de los leucocitos maternos (células amarillas con estrellas verdes) atraviesen la barrera alcanzando los tejidos fetales (1). Sin embargo, los medios de cultivos realizados en animales y órganos concuerdan que la mayoría de las infecciones placentarias se originan en la decidua uterina (2), la que es mínimamente accesible desde la sangre materna. Los patógenos logran alcanzar la decidua solo a través de la diseminación en células maternas, generalmente protagonizada por leucocitos. En el caso que el mecanismo de defensa de la EVT se vea superado, la infección puede diseminarse hacia la sangre fetal (FB) (3), actuando como nido para la reinfección materna y/o generar muerte del trofoblasto, provocando una insuficiencia placentaria o aborto espontáneo. Finalmente algunos patógenos pueden alcanzar al feto viajando dentro de los leucocitos maternos que siguen su vía natural hacia el feto.

## **ANEXO 2: Consentimiento informado.**

“Presencia de *Pneumocystis jirovecii* en gestantes durante el pre-parto y sus recién nacidos”

Responsable del Estudio en el centro:

Dr

Hospital .....

Responsable de la línea de investigación:

Dr Sergio Vargas

Universidad de Chile

Teléfono +562 2 9786557

Estimada Sra/Srta, antes de proceder a la firma de este consentimiento informado, lea atentamente la información que a continuación se le facilita y realice las preguntas que considere oportunas.

*Pneumocystis jirovecii* es un hongo atípico que se encuentra muy extendido entre los humanos y otras especies de mamíferos a lo largo del mundo. Este microorganismo puede producir una infección respiratoria a pacientes que, por diferentes causas, padecen alteraciones de su sistema inmunológico, el cual es el encargado de la defensa frente a las infecciones. Sin embargo, en los últimos años se ha comprobado que personas sanas, sin alteración de su sistema inmunológico, pueden ser portadoras de este agente sin llegar a padecer neumonía. Esto se ha observado en dos estudios: uno en donde el 15% de las mujeres en el tercer trimestre de la gestación lo portaban en sus secreciones respiratorias y otro, en el que se diagnosticó que en 35% de los abortos espontáneos se encuentra *Pneumocystis* en el tejido fetal. El objetivo de este estudio es documentar el momento en que los recién nacidos adquieren *Pneumocystis* con la idea de lograr prevenir el contagio si se justificara hacerlo.

Para lograr el objetivo del estudio, durante su trabajo de parto se le tomará un:

- Lavado orofaríngeo a Ud, para ello tendrá que hacer gárgaras con suero fisiológico estéril durante un minuto
- Hisopado nasofaríngeo (introducción de un hisopo por la nariz para recolectar mocos)
- Hisopado vaginal, este último procedimiento, consiste en la introducción de un hisopo (similar a los objetos con que se limpia el pabellón de a oreja) en la vagina para la toma de secreción (moco) en ese lugar
- Hisopado rectal, con el fin de obtener una muestra de sus heces.
- Estos cuatro procedimientos no representan riesgo alguno para Ud o su embarazo.

En el momento del parto, o lo antes posible tras el mismo, se obtendrá una muestra de:

- Sangre de cordón y su placenta para buscar la presencia de *Pneumocystis* mediante técnicas de laboratorio.

Una vez que Ud y su recién nacido/a estén listos para recibir el alta médica, se le realizará a su hijo/a un:

- Aspirado nasal (consiste en sacarle el moco del nariz y la parte posterior de la boca a su hijo/a)
- Hisopado rectal al recién nacido/a (introducción de un hisopo por el ano, para tomar muestra de meconio).

En el estado actual del conocimiento, la portación de Pneumocystis sólo debe tratarse cuando el paciente se encuentra inmunocomprometido, lo cual no es el caso de su hijo/a y por ende, no recibirá medicamentos. No obstante lo anterior, si ud lo desea, puede avisar al teléfono: \_\_\_\_\_ y retirar el resultado del examen cuando esté disponible en \_\_\_\_\_ o consultar el resultado del mismo.

La invitación a participar en este estudio es voluntaria, y sólo si Ud. accede se realizarán los procedimientos mencionados a ud y su hijo/a. Por otra parte, Ud puede retirar su participación en cualquier momento del estudio, sin que esto signifique perjuicio para ud en su atención actual o posterior, en este recinto hospitalario. Toda la información obtenida de este estudio, será utilizada únicamente con el fin de conocer la interacción del Pneumocystis y del microbioma en el organismo de la madre y el niño/a. Sus datos personales serán siempre de carácter confidencial.

Si necesita hacer alguna pregunta adicional acerca del estudio, Ud puede comunicarse con

\_\_\_\_\_ quien se encuentra \_\_\_\_\_, al teléfono \_\_\_\_\_ o bien con \_\_\_\_\_ quien se encuentra en \_\_\_\_\_, al teléfono \_\_\_\_\_.

La información que se obtenga de este estudio estará disponible para su consulta si Ud. así lo desea. Para ello, debe solicitarla a la persona que actualmente está invitándola a participar en el estudio.

**ACEPTACIÓN A PARTICIPAR**

“Presencia de Pneumocystis jirovecii en gestantes durante el pre-parto y sus recién nacidos”

Yo (Nombre y Apellidos):

....., he leído el documento informativo que acompaña a este consentimiento y he entendido claramente la importancia que tiene este estudio, además he podido hacer todas las preguntas sobre el estudio “Presencia de Pneumocystis jirovecii en gestantes durante el pre-parto y sus recién nacidos” que he estimado oportunas y se me ha respondido de manera satisfactoria cada una de ellas.

Declaro libremente mi conformidad para participar en el proyecto titulado “Presencia de Pneumocystis jirovecii en gestantes durante el pre-parto y sus recién recién nacidos”

Yo he recibido una copia de este consentimiento.

\_\_\_\_\_  
Firma de la madre

\_\_\_\_\_  
Firma del profesional de salud que toma el consentimiento

Nombre y apellidos:

Nombre y apellidos:

.....

.....

.....

.....

Fecha: .....

---

Firma del tutor legal o uno de sus padres en el caso de ser menor de edad

Nombre y apellidos:

.....

.....

Fecha: .....

### **ANEXO 3: Journal: Placenta.**

#### Types of papers

*Original articles:* a full-length report of original basic or clinical investigation that provides novel insight and places the findings in a mechanistic, functional, or evolutionary context (2000-3000 words, up to 50 references, and up to 6 tables and/or figures). A structured abstract of no more than 250 words with the following sections (Introduction, Methods, Results, Discussion) is required. The rest of the paper should be structured as follows: Introduction, Methods, Results, Discussion, References.

#### NOTE

Original (full length) articles must be approximately 2000-3000 words (includes the abstract, introduction, methods, results and discussion), excluding up to fifty (50) references