UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

“Comparación de la morfología de vellosidades coriónicas y la distribución Inmunohistoquímica de FAT/CD36 y GPR120 entre placentas de mujeres normopeso sin suplementación de DHA y placentas de mujeres con obesidad pregestacional suplementadas con 200 y 800 mg/DHA al día, provenientes del Hospital Sótero del Río durante el año 2018”

Seminario de Grado presentado en conformidad a los requisitos para obtener el Grado Académico de “Licenciado en Tecnología Médica con mención en Morfofisiopatología y Citodiagnóstico”

Autor: María José Benavides Pradenas.

Profesor guía: Ivo Carrasco Wong, MSc.

Profesores co-guía: Cherie Hernández, Alejandra Moller, Juan Varas.

Año 2019

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar este proyecto quiero agradecer a mi familia por todo el apoyo brindado, y por acompañarme en este largo proceso universitario y por sobre todo el proceso de tesis. Además, agradecer a mi pareja y amigos por el apoyo incondicional y por ayudarme a no decaer en los momentos más complicados durante el proceso.

Agradecer también a mis profesores guía y co-guías por recibirme en este proyecto y por el tiempo que dedicaron a resolver mis dudas y colaborar en mi aprendizaje y en el buen desarrollo de mi seminario de grado.

Y, finalmente agradecer al Laboratorio de Programación y Epigenética Perinatal de la Pontificia Universidad Católica por la entrega de recursos y financiamiento, junto con el Laboratorio de Ciencias Morfológicas de la Universidad de Valparaíso por brindar el equipo técnico y los protocolos para la realización de este proyecto.

RESUMEN

La obesidad es la acumulación anormal o excesiva de grasa. Es considerada una patología crónica que presenta una alta tasa de morbilidad, afectando negativamente la salud del individuo, disminuyendo su calidad y expectativas de vida. Una gestación con obesidad incrementa los riesgos obstétricos de la madre, y aumenta la predisposición del recién nacido de padecer enfermedades cardiometabólicas en el futuro. Es así como la placenta, que juega un papel fundamental durante el desarrollo del feto, también se ve afectada por la obesidad, presentando cambios morfológicos importantes, como edema, hipercapilaridad e inmadurez vellositaria, que modifican la estructura y perjudican su funcionalidad. Lo anterior sugiere que pudiese existir un cambio a nivel del metabolismo placentario de los ácidos grasos que se ve reflejado en los transportadores y receptores de estas moléculas.

Actualmente, se realizan grandes esfuerzos para encontrar terapias que puedan mejorar la condición fisiológica de la madre, y sobre todo del feto en gestación. De esta forma ha surgido el DHA, un ácido graso OMEGA-3 actualmente utilizado como suplemento nutricional durante el embarazo, ya que facilita un buen desarrollo de la gestación mediante un efecto protector sobre la madre y el recién nacido. Además, tiene una influencia directa sobre el desarrollo cerebral y las capacidades cognitivas del feto. A pesar de existir un creciente conocimiento de los efectos de este ácido graso durante la gestación, no hay reportes que indiquen si la suplementación con DHA en mujeres embarazadas con obesidad pregestacional ejerce sus beneficios mediante cambios morfológicos en la placenta, o a través de la modulación en los niveles de expresión de la proteína de transportadores o receptores de ácidos grasos esenciales. Tampoco se sabe si un aumento en la dosis de suplementación recomendada incrementa la magnitud de los posibles cambios anteriormente descritos. Es así como el presente proyecto de tesis busca responder si distintas dosis de suplementación con DHA durante el embarazo provocan modificaciones en la morfología de las vellosidades coriónicas y/o a nivel de transportadores y receptores de ácidos grasos de placentas provenientes de madres con obesidad pregestacional.

Palabras clave: Obesidad materna, histología, placenta, edema, hipercapilaridad, inmadurez vellositaria, DHA, transportadores de ácidos grasos, FAT/CD36, GPR120.

ABSTRACT

Obesity is the abnormal or excessive accumulation of fat. It is considered a chronic pathology that presents a high morbidity rate, negatively affecting the health of the individual, decreasing their quality of life and life expectancy. An obese gestation increases the obstetric risks of the mother and increases the predisposition of the newborn to suffer cardiometabolic diseases in the future. Thus, the placenta, which plays a fundamental role during the development of the fetus, is also affected by obesity, presenting important morphological changes, such as edema, hypercapillarity and villous immaturity, which modify the structure and impair its functionality. This suggests that there may be a change in the placental metabolism of fatty acids that is reflected in the transporters and receptors of these molecules.

Currently, great efforts are being made to find therapies that can improve the physiological condition of the mother, and especially the fetus in gestation. In this way, DHA, an OMEGA-3 fatty acid currently used as a nutritional supplement during pregnancy, has emerged, as it facilitates a good development of the gestation through a protective effect on the mother and the newborn. In addition, it has a direct influence on the brain development and cognitive abilities of the fetus. Although there is increasing knowledge of the effects of this fatty acid during gestation, there are no reports indicating whether DHA supplementation in pregnant women with pregestational obesity exerts its benefits through morphological changes in the placenta, or through modulation in the protein expression levels of transporters or receptors of essential fatty acids. It is also not known whether an increase in the recommended supplementation dose increases the magnitude of the possible changes described above. Thus, this thesis project seeks to answer whether different doses of DHA supplementation during pregnancy cause changes in the morphology of the chorionic villi and/or at the level of transporters and receptors of placental fatty acids from mothers with pregestational obesity.

Keywords: Maternal obesity, histology, placenta, edema, hypercapillarity, villous immaturity, DHA, fatty acid transporters, FAT/CD36, GPR120.

LISTA DE ACRÓNIMOS

- OMS: Organización Mundial de la Salud
- IMC: Índice de masa corporal
- FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación
- ECNT: Enfermedades crónicas no transmisibles
- HTA: Hipertensión arterial
- AGL: Ácidos grasos libres
- DMG: Diabetes mellitus gestacional
- EG: Semana de gestación
- GCh: Gonadotropina coriónica humana
- LDL: Lipoproteína de baja densidad
- IgG: Inmunoglobulina G
- MIGHT: Maternal obesity control through healthy nutrition (Control de la obesidad materna a través de una nutrición saludable)
- DHA: Ácido docosahexaenoico
- EPA: Ácido eicosapentaenoico
- LC-PUFAS: Long Chain Poly-Unsaturated Fatty Acids (Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga)
- ISSFAL: International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids (Sociedad internacional para el estudio de ácidos grasos y lípidos)
- FABPpm: Proteína de unión de ácidos grasos de membrana plasmática
- FAT/CD36: Fatty acid translocase (Translocasa de ácidos grasos)
- CD36: Cluster of differentiation 36 (Grupo de diferenciación 36)
- FATP: Proteína de transporte de ácidos grasos
- FABP: Proteína de unión de ácidos grasos
- AA: Ácido araquidónico
- a-LA: Ácido alfa linolénico
- FFAR4: Free Fatty Acid Receptor 4 (Receptor de ácidos grasos libres 4)
- GPR120: G-protein coupled receptor 120 (Receptor acoplado a proteína G 120)

- TNF-a: Factor de necrosis tumoral alfa
- IL-6: Interleucina 6

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN 12
1.1 Obesidad 12
1.1.1 Definición y prevalencia 12
1.1.2 Enfermedades asociadas a obesidad 14
1.1.3 Consecuencias de la obesidad en el embarazo 17
1.1.4 Efectos de la obesidad en el feto y recién nacido 19
1.2 Placenta de término 20
1.2.1 Anatomía de la placenta 20
1.2.2 Desarrollo e histología de la placenta 22
1.2.3 Formación de las vellosidades coriónicas y sus tipos 27
1.2.4 Funciones de la placenta 32
1.3 Transporte de ácidos grasos en placenta 34
1.3.1 FAT/CD36: Transportador de ácidos grasos en placenta 35
1.3.2 GPR120: Receptor de ácidos grasos en placenta 36
1.4 Efectos de la obesidad en la placenta 37
1.5 Ácido docosahexaenoico (DHA) 41
1.5.1 Suplementación con DHA durante el embarazo 43
CAPÍTULO 2: PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA 45
2.1 Pregunta de investigación 46
2.2 Hipótesis 46
2.3 Relevancia 47
CAPÍTULO 3: OBJETIVOS 48
3.1 Objetivo General 48
3.2 Objetivos Específicos 48
CAPÍTULO 4: METODOLOGÍA 50
4.1 Tipo de estudio 50
4.2 Población en estudio 50
4.3 Muestra 50
4.4 Variables de estudio 51
4.5 Criterios de inclusión y exclusión 52
CAPÍTULO 5: MATERIALES Y MÉTODOS 53

5.1 Reclutamiento 53
5.2 Obtención, fijación y traslado de las muestras biológicas 53
5.3 Deshidratación, impregnación, inclusión y corte 53
5.4 Tinción con Hematoxilina-Eosina 54
5.5 Técnica de Inmunohistoquímica 54
5.6 Análisis morfológico 55
5.7 Análisis inmunohistoquímico 56
5.8 Consideraciones éticas 57
CAPÍTULO 6: RESULTADOS 58
6.1 Hematoxilina-Eosina 59
6.1.1 Edema 59
6.1.2 Hipercapilaridad 66
6.1.3 Inmadurez vellositaria 72
6.2 Inmunohistoquímica 79
6.2.1 FAT/CD36 79
6.2.2 GPR120 82
CAPÍTULO 7: DISCUSIÓN 86
CAPÍTULO 8: CONCLUSIÓN 98
8.1 Limitaciones 98
8.2 Proyecciones 99
CAPÍTULO 9: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 101
CAPÍTULO 10: APÉNDICE 113
Anexo 1: Toma de muestras 113
Anexo 2: Deshidratación, aclaramiento e impregnación 115
Anexo 3: Corte 116
Anexo 4: Tinción de rutina Hematoxilina-Eosina 117
Anexo 5: Protocolo inmunohistoquímica anti-CD36 118
Anexo 6: Protocolo inmunohistoquímica anti-GPR120 120
Anexo 7: Acta de aprobación comité de ética. 122

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Prevalencia de sobrepeso y obesidad en Chile 14
Figura 2: Representación de una placenta de término 21
Figura 3: Placenta de término 22
Figura 4: Formación del blastocisto 23
Figura 5: Blastocisto en su sitio de implantación 23
Figura 6: Proliferación del citotrofoblasto para formar el sincitiotrofoblasto multinucleado 24
Figura 7: Proliferación del sincitiotrofoblasto 25
Figura 8: Relaciones de las membranas fetales con la pared del útero 26
Figura 9: Desarrollo de una vellosidad 27
Figura 10: Estructura de las vellosidades en varias fases del desarrollo 29
Figura 11: Tipos de vellosidades placentarias 31
Figura 12: Representación esquemática del transporte de ácidos grasos 35
Figura 13: Peso de la placenta en gramos, en relación con los rangos de IMC 37
Figura 14: Vellosidad coriónica mostrando presencia de edema 38
Figura 15: Fibrinoide intravelloso 39
Figura 16: Vellosidades coriónicas mostrando aumento en el número y diámetro de los vasos fetales 39
Figura 17: Vellosidades coriónicas mostrando inmadurez vellositaria 40
Figura 18: Fórmula estructural del ácido docosahexaenoico (DHA) 41
Figura 19: Vellosidades terminales del grupo control (N) con presencia de edema 59
Figura 20: Vellosidades terminales del grupo suplementado con 200 mg de DHA, presentando edema 61
Figura 21: Vellosidades terminales del grupo suplementado con 800 mg de DHA, mostrando la presencia de edema 62
Figura 22: Frecuencia de edema en el grupo control y los grupos suplementados con 200 y 800 mg de DHA 64
Figura 23: Vellosidades terminales del grupo control mostrando hipercapilaridad: aumento en el número de capilares fetales 66

Figura 24: Vellosidades terminales del grupo suplementado con 200 mg de DHA mostrando hipercapilaridad 68
Figura 25: Vellosidades terminales del grupo suplementado con 800 mg de DHA mostrando hipercapilaridad 69
Figura 26: Frecuencia de hipercapilaridad en el grupo control y los grupos suplementados con DHA 71
Figura 27: Vellosidades terminales del grupo control mostrando inmadurez vellositaria ... 72
Figura 28: Vellosidades terminales del grupo suplementado con 200 mg de DHA, mostrando inmadurez vellositaria 74
Figura 29: Vellosidades terminales del grupo suplementado con 800 mg de DHA, mostrando inmadurez vellositaria 75
Figura 30: Frecuencia de inmadurez vellositaria en el grupo control y los grupos suplementados con DHA 77
Figura 31: Vellosidades terminales del grupo control (N) con inmunomarcación de FAT/CD36 80
Figura 32: Vellosidades terminales del grupo con suplementación de 200 mg de DHA con inmunomarcación de FAT/CD36 80
Figura 33: Vellosidades terminales del grupo con suplementación de 800 mg de DHA con inmunomarcación de FAT/CD36 81
Figura 34: Intensidad recíproca del transportador de ácidos grasos FAT/D36 en los grupos experimentales 82
Figura 35: Vellosidades terminales del grupo control (N), con inmunomarcación del receptor GPR120 83
Figura 36: Vellosidades terminales del grupo suplementado con 200 mg de DHA, con inmunomarcación del receptor GPR120 83
Figura 37: Vellosidades terminales del grupo suplementado con 800 mg de DHA, con inmunomarcación del receptor GPR120 84
Figura 38: Intensidad recíproca del receptor de ácidos GPR120 en los grupos experimentales 85

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación de la obesidad según la OMS. 12
Tabla 2: Características demográficas y antropométricas de las madres. 58
Tabla 3: Frecuencia de edema en el grupo control normopeso (N)..... 60
Tabla 4: Frecuencia de edema en el grupo suplementado con 200 mg de DHA/día (O13). 61
Tabla 5: Frecuencia de edema en el grupo suplementado con 800 mg de DHA/día (O12) . 63
Tabla 6: Descripción estadística de edema en los grupos experimentales 65
Tabla 7: Frecuencia de hipercapilaridad en el grupo control normopeso (N) 67
Tabla 8: Frecuencia de hipercapilaridad en el grupo suplementado con 200 mg de DHA/día (O13)..... 68
Tabla 9: Frecuencia de hipercapilaridad en el grupo suplementado con 800 mg de DHA/día (O12)..... 70
Tabla 10: Descripción estadística de hipercapilaridad en los grupos experimentales..... 71
Tabla 11: Frecuencia de inmadurez vellositaria en el grupo control normopeso (N) 73
Tabla 12: Frecuencia de inmadurez vellositaria en el grupo suplementado con 200 mg DHA/día (O13) 74
Tabla 13: Frecuencia de inmadurez vellositaria en el grupo suplementado con 800 mg de DHA/día (O12) 76
Tabla 14: Descripción estadística de inmadurez vellositaria en los grupos experimentales 78
Tabla 15: Descripción estadística de los datos obtenidos de la inmunomarcación del transportador de ácidos grasos FAT/CD36 81
Tabla 16: Descripción estadística de los datos obtenidos de la inmunomarcación del receptor de ácidos grasos GPR120 84

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Obesidad

1.1.1 Definición y prevalencia

Según describe la Organización mundial de la salud (OMS), "La obesidad y el sobrepeso se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud", lo cual va a determinar riesgos de salud que limitan las expectativas y calidad de vida (1). La obesidad puede llegar a reducir la esperanza de vida hasta en diez años, y representa una elevada carga económica para el individuo y la sociedad (2), convirtiéndose en un problema de salud pública (3).

La definición técnica de obesidad propuesta por la OMS está basada en el Índice de Masa Corporal (IMC), el cual corresponde a la razón entre el peso expresado en kilos y el cuadrado de la talla expresada en metros, estableciendo rangos para cada estado fisiológico (1) (Tabla 1).

Tabla 1: Clasificación de la obesidad según la OMS.

Clasificación	IMC (kg/m^2)
Normopeso	18.5 – 24.9
Exceso de peso	≥ 25
Sobrepeso o Preobeso	25 – 29.9
Obesidad grado I o moderada	30 – 34.9
Obesidad grado II o severa	35 – 39.9
Obesidad grado III o mórbida	≥ 40

La causa fundamental del sobrepeso y la obesidad es un desequilibrio energético entre calorías consumidas y calorías gastadas (1), y existe una fuerte vinculación entre el aumento del consumo de productos ultraprocesados y el aumento de peso corporal (3). La evidencia sugiere que la obesidad se relaciona directamente con cambios en el estilo de vida como la inactividad física, insuficientes horas de sueño, excesivo consumo de alcohol y el hábito de

fumar, aunque la implicancia de estos dos últimos aún no está muy clara (4). Además de la edad y el sexo, la genética, los factores fisiológicos, ambientales y socioeconómicos también han sido asociados con obesidad (4).

La mortalidad debido a diabetes y problemas cardiovasculares aumenta en forma más notoria a partir de un IMC mayor a 25 (5). De mantenerse la tendencia, para el año 2030 más de 40% de la población del planeta tendrá sobrepeso y más de la quinta parte será obesa (3).

Hasta el año 2017, a nivel mundial, más de 1.900 millones de adultos mayores de 18 años presentan sobrepeso, de los cuales, más de 600 millones son obesos. Esto implica una prevalencia de 39% de sobrepeso y 13% de obesidad en este grupo etáreo (3).

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO), en el año 2016, en el continente americano el 58% de los habitantes tiene sobrepeso y obesidad, siendo Chile uno de los países que presenta las tasas más elevadas (6).

Según evidencia la Encuesta Nacional de Salud informada el 2009-2010 (2) y el 2016-2017 (7), en Chile, en un rango de 7 años, la prevalencia de la obesidad en la población adulta aumentó de un 22% a un 32.1%, siendo las mujeres quienes presentaron una mayor prevalencia, 27,4% (2009-2010) y 33,7% (2016-2017) (Figura 1). Estos datos sitúan a nuestro país en la primera posición del ranking de obesidad en Latinoamérica (2). Es importante mencionar que, en nuestro país, una de cada cuatro mujeres es obesa al momento de embarazarse (8-10).

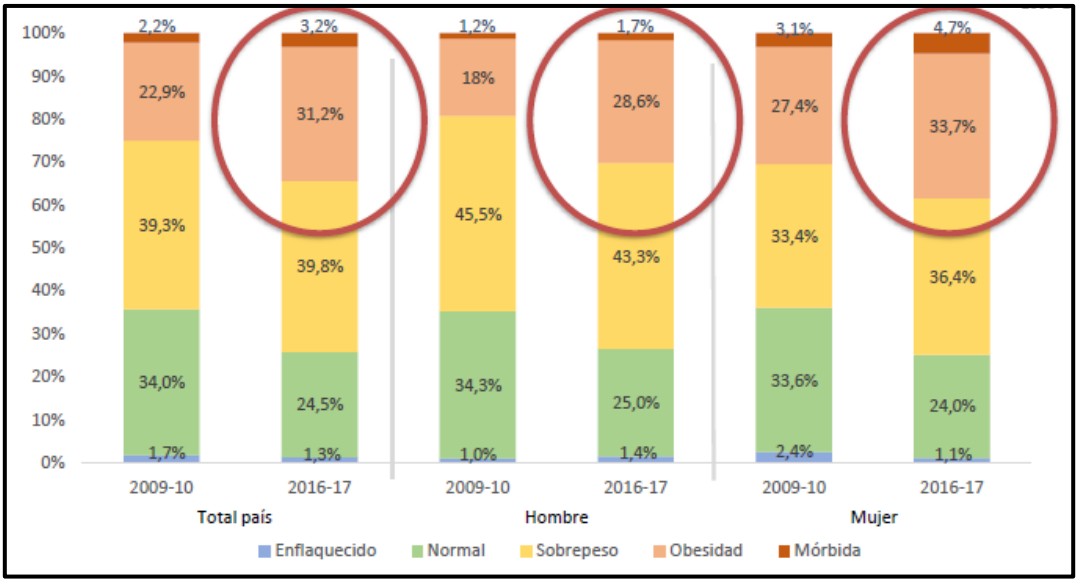


Figura 1: Prevalencia de sobrepeso y obesidad en Chile obtenido de la Encuesta nacional de salud 2016-2017 (7).

1.1.2 Enfermedades asociadas a obesidad

La preocupación por la obesidad radica no solo por sus efectos directos sobre la salud y calidad de vida de las personas (2), sino que también se considera un importante factor de riesgo para enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), tales como enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, trastornos del aparato locomotor y algunos cánceres (endometrio, mama y colon) (1).

Como se mencionó anteriormente, la obesidad está relacionada a hipertensión arterial (HTA), así como también a otros problemas cardiovasculares como isquemia e insuficiencia cardíaca (5). Tanto en adultos como en niños, la HTA ha aumentado en forma paralela al aumento de la obesidad (11). Adicionalmente, la obesidad de asocia a la Insuficiencia Cardiaca Congestiva, provocada por disminución de la capacidad contráctil (12); ya que el trabajo al que es sometido el miocardio es mayor en un sujeto obeso debido la excesiva masa de tejido adiposo que requiere un aumento en la vascularización, por lo que se necesita un mayor volumen sanguíneo circulante (5).

La obesidad favorece la formación de coágulos en los vasos sanguíneos (trombosis) y un bajo grado de inflamación crónica que acelera la aterosclerosis, es decir, el depósito de placas de ateromas en los vasos, lo que dificulta el flujo de sangre a los tejidos (12). Cuando este proceso ocurre en las arterias coronarias que irrigan al corazón se produce la cardiopatía isquémica, un estado en que disminuye el riego de sangre al propio corazón y produce la necrosis o muerte de las células cardíacas por falta de oxígeno y nutrientes, cuyos eventos más graves son la muerte súbita y el infarto del miocardio agudo, además de la angina de pecho (12).

En el caso de la diabetes mellitus tipo 2, ésta se asocia estrechamente con obesidad en ambos sexos y en todos los grupos étnicos, más del 80% de los casos de diabetes tipo 2 se pueden atribuir a la obesidad (13); existiendo una relación directa entre el riesgo de padecer diabetes y el IMC (5). En la medida en que el peso corporal aumenta, disminuye la sensibilidad a la insulina y la respuesta es un incremento en la secreción de insulina por un aumento en la masa de células beta del páncreas (12), que no pueden satisfacer las demandas impuestas por este incremento de la insulinorresistencia (13).

Otra patología frecuente son las dislipidemias, en las que hay una mayor prevalencia de hipercolesterolemia a medida que se incrementa el IMC, especialmente en mujeres (13); lo que ocurriría por una excesiva liberación de triglicéridos y ácidos grasos libres (AGL) que contribuyen a la dislipidemia (12).

El tejido adiposo es un activo órgano endocrino y metabólico que influye sobre la fisiología de otros órganos (12). La insulina como factor estimulante en la mitosis celular se ha considerado como la causa del mayor riesgo de cáncer en personas con obesidad. Sin embargo, factores nutricionales, medicamentos o el mismo ambiente hormonal podrían contribuir a la patogenia de la obesidad (5). En el caso de los varones aumenta la incidencia de carcinoma de colon, recto y próstata y en la mujer obesa el riesgo de carcinoma endometrial, mama, ovario, cérvix, vesícula y vías biliares está incrementado (13). En las mujeres postmenopáusicas la grasa es la principal fuente de estrógenos, el factor de riesgo modificable más importante para cáncer de mama (13) y además, la frecuencia de cáncer endometrial es casi el doble en mujeres obesas (IMC entre 25 y 29) comparada con mujeres normopeso, con edades entre los 60 y 69 años (5).

La mujer resulta particularmente vulnerable, debido a que el riesgo de sufrir sobrepeso u obesidad a lo largo de su vida está favorecido por razones de tipo hormonal/genético, por aumento progresivo de peso tanto en los embarazos como en la menopausia (14). Existen diferencias que explican la mayor prevalencia de obesidad en mujeres que en hombres, dentro de ellas encontramos que las mujeres tienen un mayor porcentaje de grasa corporal que los hombres y hay indicadores de que la oxidación basal de grasa es menor en ellas, lo que favorece la mayor acumulación de grasa (14). Además, la serotonina que modula la cantidad de ingesta de alimentos y a la conducta alimentaria, disminuye a medida que aumenta el IMC, siendo notorio en mujeres con IMC mayor a 30 (14). Por otra parte, las mujeres que toman anticonceptivos orales tricíclicos tienen una mayor ingesta de grasas durante todo el ciclo menstrual (15). Los cambios de las concentraciones de estrógenos y progesterona que se producen a lo largo del ciclo parecen afectar a la ingesta energética, a la preferencia por comidas ricas en grasas o en carbohidratos y al gasto energético (15).

En la mujer obesa la fisiología reproductiva se encuentra alterada en diferentes formas, el tejido adiposo es un órgano endocrino, el más grande del organismo, almacena y libera esteroides ahí preformados, por lo que la obesidad no sólo las predispone a enfrentar una mayor prevalencia de enfermedades crónicas, también incrementa el riesgo de infertilidad, el desarrollo de complicaciones en el embarazo y de alteraciones en el desarrollo fetal (16). Debido a todo lo anterior, existe una asociación entre el IMC e infertilidad demostrada en estudios epidemiológicos, con un riesgo relativo de infertilidad por anovulación cuando se tiene un IMC superior o igual a 32 kg/m2 a los 18 años (13). Además, la frecuencia de oligomenorrea o amenorrea está en relación directa con el peso corporal y la presencia de diabetes mellitus tipo 2 (5). El síndrome del ovario poliquístico y la obesidad también se asocian frecuentemente (13) siendo el trastorno endocrino más frecuente en mujeres en edad reproductiva (12).

Se ha visto que más del 50% de las embarazadas chilenas presenta algún grado de sobrepeso u obesidad, lo que ha generado gran preocupación (4), ya que en mujeres embarazadas la obesidad se asocia a un incremento en la frecuencia de hipertensión, diabetes

gestacional, embarazo múltiple, anemia y muerte fetal. Además, las mayores dificultades en el manejo del parto llevan a mayores tasas de inducción y cesáreas (13).

1.1.3 Consecuencias de la obesidad en el embarazo

El embarazo es un estado de modificaciones fisiológicas causadas por la gestación, la lactancia, y un intenso crecimiento y desarrollo fetal (17).

Algunos factores de riesgo que favorecen una ganancia excesiva de peso durante el embarazo son la nuliparidad, IMC elevado antes del embarazo, bajo nivel socioeconómico, embarazo precoz, ingesta de energía total, el consumo de lácteos y las comidas fritas (14). Otros factores implicados en la obesidad materna son el consumo bajo de calcio previo y durante el embarazo, estrés crónico y edades maternas extremas (18).

La ganancia excesiva de peso durante el embarazo constituye un importante factor de predicción de obesidad materna, desarrollo de obesidad en la vida futura y de complicaciones obstétricas. Más del 40% de las mujeres que inician un embarazo tienen sobrepeso o son obesas y complica el 28% de los embarazos (14). La obesidad aumenta el riesgo de complicaciones obstétricas en la etapa prenatal, durante el parto y en el puerperio; además, contribuye a que existan dificultades técnicas durante la evaluación intrauterina del feto (17).

Las mujeres embarazadas con obesidad tienen mayor riesgo de complicaciones materno–fetales, principalmente un incremento de problemas perinatales, como el aumento de riesgo de parto pretérmino, aumento de riesgo de distocia de hombros, traumas al nacer, hemorragias posparto, entre otros (14). Un ejemplo claro, es el incremento en la tasa de **abortos espontáneos** conforme aumenta el índice de masa corporal, acercándose a 40% cuando dicho índice es mayor a 30 (16). También, en mujeres con obesidad, se ha visto un mayor riesgo de que sean sometidas a inducción del parto y a **intervenciones obstétricas** en el parto, especialmente la realización de **cesáreas** (17). También son comunes las **complicaciones infecciosas** en las pacientes obesas, como: infección de herida quirúrgica, endometritis e infección de vías urinarias (19). Un aumento significativo de infección de la

herida quirúrgica en la post-cesárea se observa en mujeres con sobrepeso, y el riesgo se concentra entre las pacientes obesas clase III (con un IMC>40 kg/m2). Otros estudios revelan datos sobre prevalencia aumentada de infección de vías urinarias, vaginitis e infecciones por Streptococcus en pacientes obesas (18).

No solo el riesgo de sufrir problemas perinatales se encuentra incrementado, sino que también un aumento de adquirir enfermedades metabólicas. La **diabetes gestacional** definida como intolerancia a la glucosa cuando es identificada por primera vez en el embarazo (17), es más frecuente en las gestantes con sobrepeso y obesidad pregestacional que en las de peso adecuado (20). La gestación como tal se puede considerar diabetogénica, por lo tanto, el sobrepeso y la obesidad durante este período produce aumento de la resistencia a la insulina, llegando a incrementarse 2,6 veces más en mujeres obesas respecto de mujeres con IMC adecuado. En mujeres con obesidad de clase III (IMC mayor a 40 kg/m2) el riesgo aumenta 4 veces (21). Esta DMG se asocia a consecuencias adversas en las mujeres y sus hijos, en el corto y largo plazo (17).

La obesidad materna posee una fuerte asociación con la **hipertensión gestacional,** viéndose que un incremento del IMC por sobre 25 kg/m2 aumenta la prevalencia de hipertensión en mujeres en edad reproductiva (18). Adicionalmente, en las gestantes con obesidad hay un incremento entre un 10% y un 15% en el riesgo de desarrollar **preeclampsia** (14). Otra consecuencia importante de la obesidad es la **dislipidemia,** ya que conforme el embarazo avanza hay un marcado incremento en las concentraciones de lípidos, y este aumento es mayor cuando los embarazos cursan con obesidad (19).

Agregando a las complicaciones, las gestantes pueden presentar asociación con hemorragia postparto y falta de lactancia materna, así como mayor incidencia de depresión postparto (19).

1.1.4 Efectos de la obesidad en el feto y recién nacido

La obesidad materna y la excesiva ganancia de peso gestacional han sido reconocidas como factores de riesgo independientes para complicaciones fetales durante el embarazo y el parto (22). Esto abarca el síndrome de distress respiratorio, malformaciones genéticas, aumento de riesgo de muerte fetal (18) y distocia de hombros (17). Además, se ha asociado con nacer pretérmino (< 37 EG) (4), grande para la edad gestacional (peso >percentil 90) (23), o con macrosomía (23) (peso > 4.000 gr al nacer) (20). Estas complicaciones aumentan conforme la ganancia del peso (17).

En el feto es conocido que la macrosomía y las malformaciones congénitas son la principal causa de morbimortalidad debida a la obesidad, afectan principalmente los sistemas cardiovasculares, sistema nervioso central, genitourinario y esquelético y tienen mayor predisposición a riesgos metabólicos como la hipoglicemia, hiperbilirrubinemia, hipocalcemia, hipomagnesemia, síndrome de dificultad respiratoria, muerte neonatal y prematurez (18) al menos 1,5 veces más frecuente en gestantes obesas (21). La obesidad materna es determinante en la salud de la descendencia durante la infancia y posterior vida adulta, incluyendo un peor rendimiento cognitivo y mayor riesgo de trastornos del desarrollo neurológico en el niño, incluyendo la parálisis cerebral (17). Además, se asocia con un mayor riesgo de nacer grande para la edad gestacional y un incremento de tejido adiposo durante la vida fetal (24).

Un estudio comprobó que las mujeres obesas tienen una menor probabilidad de dar lactancia materna exclusiva y duradera, debido al retraso de la lactogénesis y a los problemas del parto (25). Adicionalmente, la depresión posparto es más común entre madres obesas, lo cual también se asocia con una lactancia reducida (26).

El estado nutricional materno, así como otros factores del ambiente intrauterino, generan un proceso de adaptación del feto el cual modifica su funcionamiento metabólico, induciendo con ello cambios a futuro, los que aumentan su susceptibilidad de desarrollar enfermedades crónicas, proceso definido como programación fetal (27). Por lo tanto, un ambiente obesogénico durante los períodos pre-concepcional y gestacional, incrementará en el niño el riesgo de desarrollar en el largo plazo obesidad y enfermedades crónicas no

transmisibles del adulto como síndrome metabólico, hipertensión, riesgo cardiovascular y diabetes mellitus (17, 23). La programación de la obesidad puede venir determinada de forma directa por los genes maternos (transferencia genética) y de forma indirecta por la influencia ambiental, a través de la calidad y cantidad de nutrientes aportados al feto (epigenética) (25). Algunos estudios apuntan que la nutrición durante el periodo fetal, así como en los primeros años de vida, puede tener efectos a largo plazo, y convertirse en un factor etiológico de la obesidad (25).

La placenta juega un rol importante en la adaptación y el desarrollo del feto, no solo por su función de transporte de nutrientes y eliminación de desechos, hacia y desde el feto respectivamente, sino también por su rol de secreción hormonas (28). Por lo tanto su estudio, en el escenario de la obesidad materna, debe ser considerado como crucial para el entendimiento de la patología, sus efectos en la salud de la madre y el feto, y la modulación de su función en procesos terapéuticos.

1.2 Placenta de término

1.2.1 Anatomía de la placenta

La placenta es el órgano fetal que facilita el intercambio materno-fetal de gases, nutrientes y eliminación de desechos fetales. Además, posee una función endocrina e inmunológica. Se desarrolla después de la concepción, al tiempo en que el blastocisto se implanta en el útero, y es eliminada del útero luego del nacimiento (29). La placenta humana de un embarazo fisiológico, único y de término posee una forma circular-discoidal, con un diámetro de alrededor de 22 cm y un grosor de 2,5 cm. Su peso promedio es de 470 g (30) con un volumen de 497 ml (31), siendo directamente proporcional al peso del feto (32).

El órgano presenta dos superficies:

1) Placa basal, por el lado materno, que corresponde al sitio donde el trofoblasto invade la decidua (endometrio modificado para recibir al embrión) (29). En el útero, este sitio

de implantación recibe el nombre de decidua basal (32). La superficie de la placa basal está segmentada por la septa placentaria (29), que corresponden a invaginaciones de la decidua materna en el disco placentario (30); y que forma hendiduras profundas que subdividen la cara materna en 10-30 regiones llamadas cotiledones (29) (Figura 2B y 3B). Los cotiledones contienen el árbol vellositario que está bañado de sangre materna, de ahí la denominación de placenta vellosa hemocorial (32).

2) Placa coriónica, por la cara fetal, está cubierta por el amnios y el mesénquima amniótico (Figura 2A y 3A). Estos tejidos forman el saco amniótico, la bolsa en la cual el feto se desarrolla y vive durante su vida intrauterina (29). El cordón umbilical se inserta en la porción central o cerca del centro en la placa coriónica y transporta la sangre fetal hacia la placenta y viceversa (29). El mesénquima coriónico contiene los vasos coriónicos que están continuos a los vasos del cordón umbilical. Derivadas de 2 arterias umbilicales, las arterias coriónicas se ramifican en un patrón centrífugo hasta las ramas finales que alimentan el árbol vellositario. Las venas coriónicas dan origen a una sola vena umbilical (30).

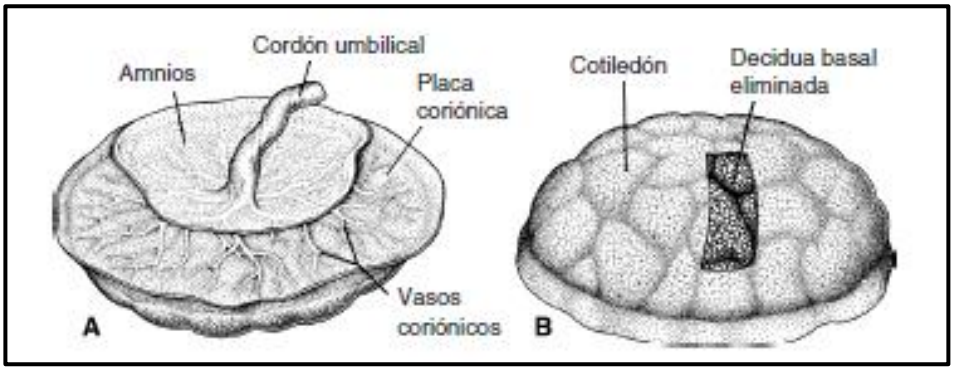


Figura 2: Representación de una placenta de término. A. Lado fetal: la placa coriónica y el cordón umbilical están cubiertos por el amnios. B. Lado materno que muestra los cotiledones: en un área se eliminó la decidua (37).

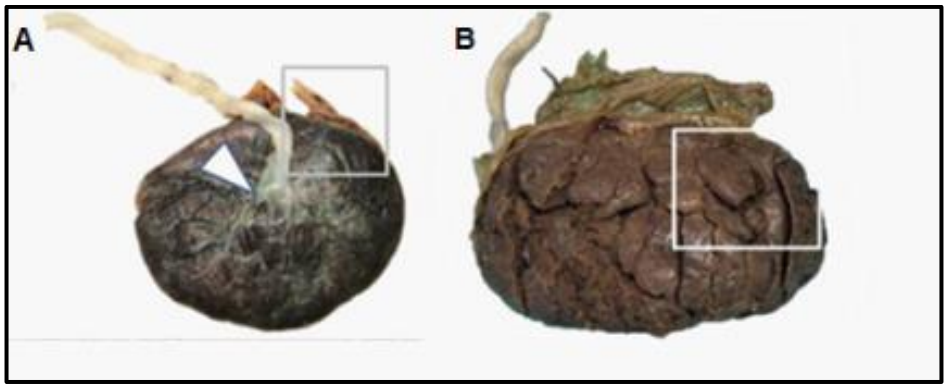


Figura 3: Placenta de término. A: Lado fetal: la placa coriónica y el cordón umbilical están cubiertos por el amnios. B: Lado materno que muestra los cotiledones (29).

1.2.2 Desarrollo e histología de la placenta

La fusión del espermatozoide con el óvulo recibe el nombre de fecundación, proceso en el que se forma el cigoto, esto suele ocurrir en la ampolla de la trompa uterina. A medida que el cigoto se traslada por la trompa uterina sufre divisiones mitóticas para formar la mórula que luego de 2-3 días se introduce en la luz del útero (33). Alrededor del día 4 luego de la concepción, durante el desarrollo entre las etapas de mórula y blastocisto, el trofoblasto es la primera línea celular en diferenciarse (30). Estas capas mononucleares de células en la periferia circunscriben al perímetro del blastocisto, y formarán la placenta y las membranas extraembrionarias; el grupo de células dentro del blastocisto forman el macizo celular interne, que desarrolla al feto; y, esta próximo al sitio de implantación del blastocisto en el epitelio uterino (32) (Figura 4). Las células trofoblásticas próximas a la macizo celular interno empiezan a desarrollar el saco coriónico (34).

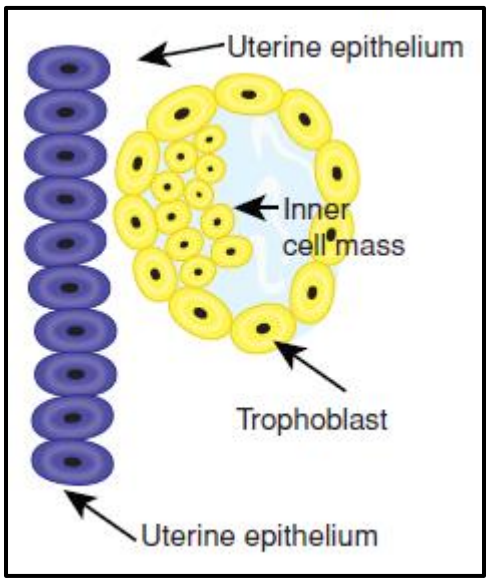


Figura 4: Formación del blastocisto. En azul células del epitelio uterino. En amarillo, el blastocisto en el que las células periféricas se denominan trofoblasto y las células internas forman la masa celular interna que da origen al feto (32).

La localización de la masa celular interna define la parte del trofoblasto que realiza el vínculo del blastocisto en el epitelio uterino. Solo el trofoblasto yuxtapuesto a la masa celular interna (trofoblasto polar) parece ser capaz de dirigir la implantación (30); y representa al tejido de blastocisto que se adhiere, une e implanta en la pared uterina (29) (Figura 5).

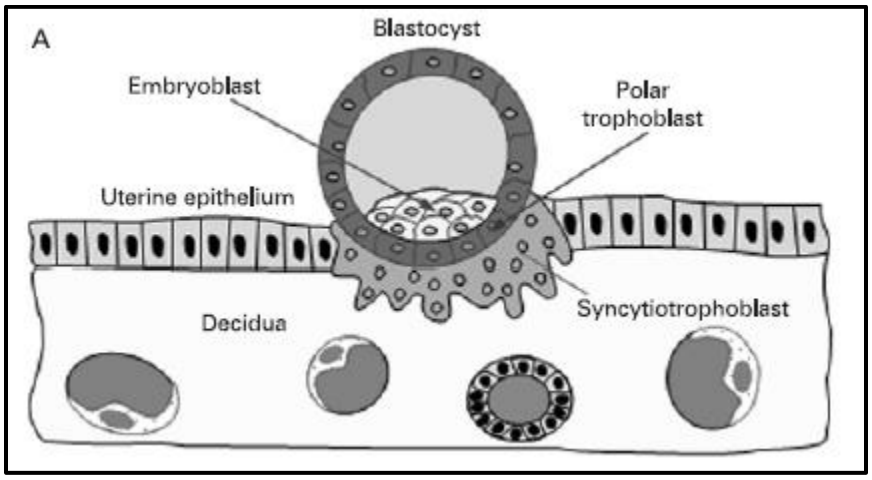


Figura 5: Blastocisto en su sitio de implantación, el trofoblasto polar (que rodea la masa celular interna) representa el tejido que se adhiere a la pared uterina (30).

Tan pronto como el blastocisto está firmemente atado al epitelio uterino (30), después de unirse a la decidua uterina (29), el trofoblasto polar sufre el siguiente paso de diferenciación: La fusión sincitial de células mononucleadas (30), la que conduce a la formación de un verdadero sincitio (32) multinucleado continuo en el que no existen límites citoplasmáticos definidos por membranas plasmáticas (35) (Figura 6). Luego se diferencia en sincitiotrofoblasto (32), el cual no experimenta mitosis (36) y entra en contacto directo con el tejido materno (32). En esta etapa el sincitiotrofoblasto posee un fenotipo invasivo y por esto el blastocisto es capaz de penetrar el epitelio uterino (30). Finalmente, la masa de sincitiotrofoblasto invade el endometrio (formado por glándulas, estroma y vasos sanguíneos) y rodea con rapidez todo el embrión (34).

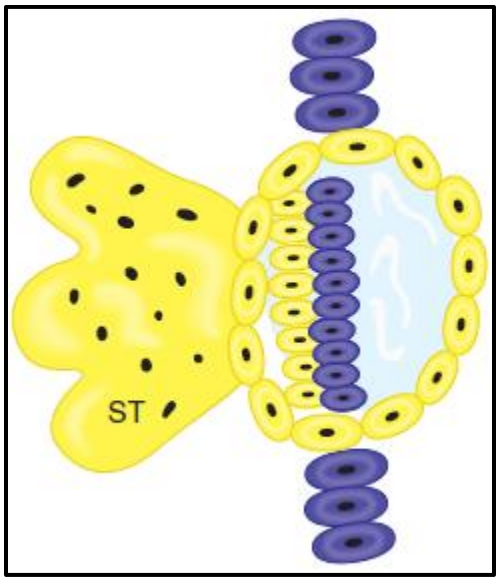


Figura 6: Proliferación del citotrofoblasto para formar el sincitiotrofoblasto multinucleado (ST) (32).

Al mismo tiempo se forma una segunda línea de células mononucleadas, el citotrofoblasto, ubicada directamente debajo del sincitiotrofoblasto (29), sin contactar con tejidos maternos (30). El citotrofoblasto actúa como células madre, las que se dividen rápidamente (30) y activamente mediante mitosis (34) y se fusionan con el sincitiotrofoblasto, resultando en una expansión continua de este último (30).

Cerca de los 8 días después de la concepción (29), en la etapa lagunar, sigue en curso la proliferación y fusión del citotrofoblasto que produce abundantes sincitiotrofoblastos que rodean la mayoría del blastocisto implantado y que desarrollan espacios dentro del sincitio (32). Aparecen espacios irregulares llamados lagunas, que están llenos de fluidos originados de las secreciones uterinas y se une para formar el espacio intervelloso precursor (29) (Figura 7). Las lagunas son la forma primitiva de lo que se convertirá en el espacio intervelloso en la placenta donde circulará la sangre materna. El espacio intervelloso está llenos de fluido sin sangre materna hasta las 10-12 semanas de gestación, cuando las arteriolas espirales se conectan con el citotrofoblasto, endovascular especializado (32).

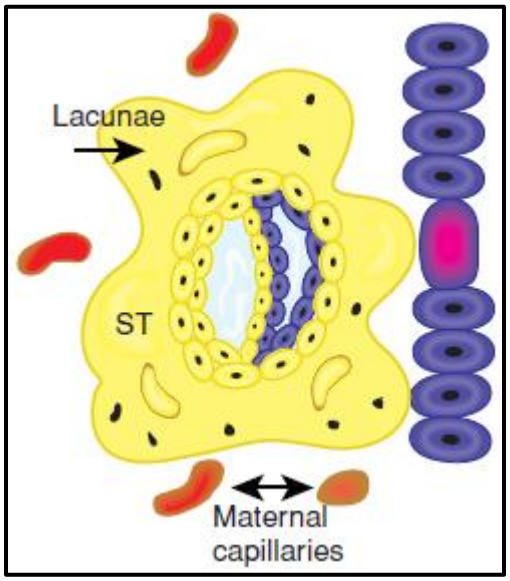


Figura 7: Proliferación del sincitiotrofoblasto (ST) que rodea al blastocisto. Dentro del ST se forman vacuolas que dan origen a la laguna que es el espacio intervelloso primitivo que más adelante será llenado con sangre materna con la erosión de los capilares maternos (en rojo) (32).

Comenzando el día 12 después de la concepción el citotrofoblasto de la placa coriónica penetra hacia el sincitiotrofoblasto de las trabéculas siguiendo su curso y alcanzando el lado materno de la placenta para el día 15 (30) El sincitiotrofoblasto iniciará la formación de la porción embrionaria o fetal de la placenta y en respuesta a la invasión de este, el endometrio formará la porción materna de la placenta (33).

El componente fetal corresponde al corion frondoso, el cual se desarrolla a partir de las células del trofoblasto restantes y evoluciona a la placa coriónica, que da lugar a las vellosidades coriónicas (36). La decidua (capa funcional del endometrio modificado) situada sobre el corion frondoso, llamada decidua basal (37), es el componente materno de la placenta (34) (Figura 8A) y consta de una capa compacta de células grandes, las células deciduales, con abundantes lípidos y glucógeno. La capa decidual situada sobre el polo abembrionario es la decidua capsular, y las vellosidades del polo abembrionario degeneran; a la tercera semana, este lado del corion recibe el nombre de corion liso (37) (Figura 8A).

Más tarde, el corion liso entra en contacto con la pared uterina (decidua parietal) en el lado opuesto del útero, de modo que ambas se fusionan (Figura 8B). Por tanto, la única parte del corion que participa en el proceso de intercambio es el corion frondoso que, junto con la decidua basal, constituye la placenta (37).

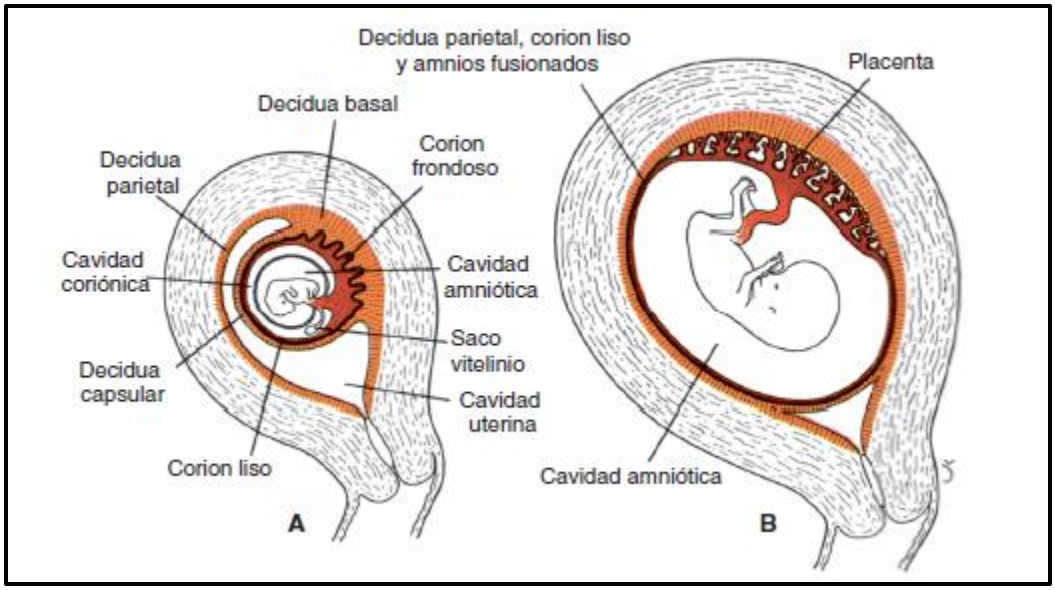


Figura 8: Relaciones de las membranas fetales con la pared del útero. A: Final del segundo mes, mostrando corion frondoso y su relación con la decidua basal, y en el polo abembrionario el corion liso. B: Final del tercer mes: Amnios, corion liso y decidua parietal fusionados (37).

1.2.3 Formación de las vellosidades coriónicas y sus tipos

Como se mencionó anteriormente la placa coriónica en contacto con la decidua basal forma el corion frondoso, ya que en esta zona se forman vellosidades coriónicas extensas, llamadas vellosidades primarias (36). Estas ramificaciones son proyecciones del sincitiotrofoblasto (34), que constan de un núcleo citotrofoblástico recubierta por una capa sincitial (37) (Figura 9A).

Durante las fases posteriores las células del citotrofoblasto proliferan bajo la influencia del mesodermo extraembrionario y se extienden hacia la masa de sincitiotrofoblasto (34), estas células mesenquimatosas extraembrionarias penetran (33) en la vellosidad primaria, formando un centro mesenquimal que la transforma en vellosidad secundaria (29) (Figura 9B).

Al final de la tercera semana, en el núcleo de la vellosidad algunas células mesodérmicas empiezan a diferenciarse convirtiéndose en pequeños vasos sanguíneos, lo que da origen al sistema capilar velloso (37) (Figura 9C). El desarrollo de los primeros vasos de la placenta la transforman en vellosidad terciaria (30).

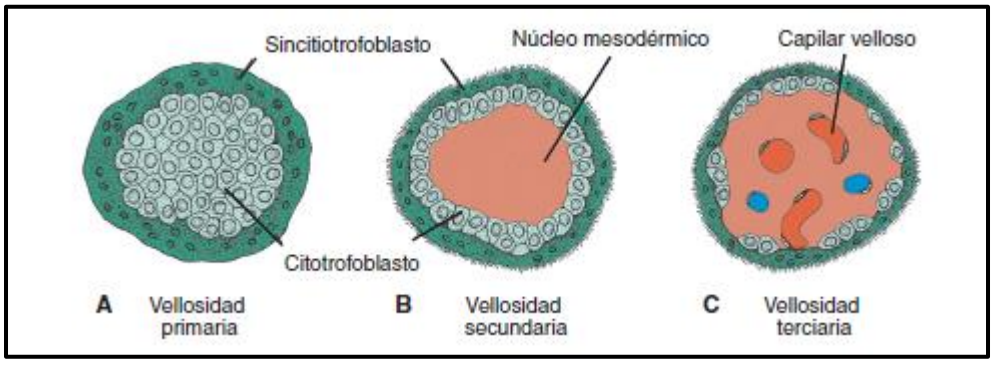


Figura 9: Desarrollo de una vellosidad. A: vellosidad primaria que muestra un núcleo de células citotrofoblásticas recubierta por una capa de sincitio. B: Vellosidad secundaria con un núcleo de mesodermo recubierto por una capa de células citotrofoblásticas, que a su vez está revestida por el sincitio. C: Mesodermo de la vellosidad que muestra capilares (37).

Al final de esta etapa de desarrollo la vellosidades placentarias emergen hacia la sangre materna que baña el espacio intervelloso y es donde ocurre el intercambio de gases y nutrientes materno-fetal (37), formando la barrera placentaria (29) (Figura 10A y 10B). Esta barrera, son las capas de tejido que debe atravesar una molécula para llegar a la sangre fetal desde la sangre materna, y viceversa, e impide que estas se mezclen. Durante el primer trimestre de gestación esta barrera está compuesta por el sincitiotrofoblasto, citotrofoblasto, tejido conjuntivo y endotelio del capilar fetal (29). A medida que el embarazo avanza, el citotrofoblasto va desapareciendo, el tejido conjuntivo disminuye, y los vasos capilares fetales aumentan su número y desplazan su disposición hacia la periferia de la vellosidad. De esta forma, ya al tercer trimestre de gestación la barrera placentaria disminuye y sólo se encuentra el sincitiotrofoblasto y el endotelio fetal. Este adelgazamiento progresivo va desde 10 micras hasta 1 a 2 micras hacia el final del embarazo (38) (Figura 10C y 10D).

Con frecuencia el sincitio se adelgaza mucho y grandes fragmentos que contienen varios núcleos pueden romperse para caer en las lagunas sanguíneas Inter vellosas. Estos fragmentos, llamados nódulos sincitiales, entran en la circulación materna y normalmente degeneran sin causar síntomas (37).

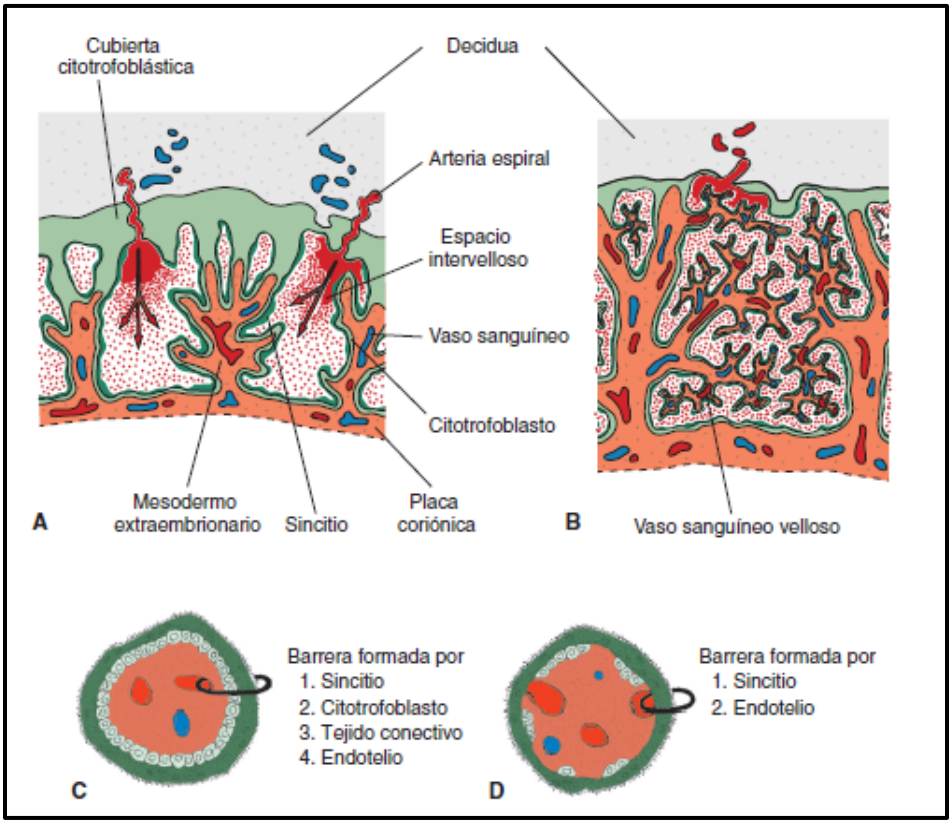


Figura 10: Estructura de las vellosidades en varias fases del desarrollo. A: Cuarta semana: el mesodermo embrionario penetra en las vellosidades troncales y se dirige hacia la placa decidual. B: Cuarta semana: en muchas vellosidades pequeñas la pared de los capilares está en contacto directo con el sincitio. C y D: Amplificación de las vellosidades que se muestran en las figuras A y B (37).

Terminado este proceso, al final del embarazo cinco tipos de vellosidades han formado la placenta (29):

Vellosidad mesenquimal: Son el tipo de vellosidad más primitivos (29), son las precursoras de las vellosidades intermedias y pueden ser encontradas en las primeras etapas del embarazo (30). Miden entre 100-250 µm de diámetro (29) y su estroma esta poco organizado y contiene un gran número de células mesenquimales y vasos en desarrollo. Las vellosidades mesenquimales persisten hasta el nacimiento, pero debido a que se diferencian en vellosidades intermedias su número es extremadamente bajo después del primer trimestre de

embarazo (30). El estroma está rodeado de 2 capas, interiormente el citotrofoblasto y por fuera el sincitiotrofoblasto (29) (Figura 11A).

Vellosidad intermedia inmadura: Miden entre 100-400 μm de diámetro (29), tienen abundante mesénquima, edema y canales (32). Estos canales estromales contienen grandes números de macrófagos placentarios llamados células de Hofbauer (29). Las vellosidades intermedias inmaduras solo contienen pequeñas arteriolas y vénulas y capilares. Luego se desarrollan en vellosidades madres por fibrosis del estroma desde el centro hacia la periferia (30). La capa de citotrofoblasto es discontinua mientras que la capa externa de sincitiotrofoblasto permanece gruesa y continua (29). Después de la mitad de la gestación el número de estas vellosidades decrece y sólo unas pocas pueden ser encontradas al término (30) (Figura 11B).

Vellosidad madre: Deriva de la diferenciación de las vellosidades intermedias inmaduras y son las vellosidades con el mayor diámetro de entre 100-3000 μm (30), están caracterizadas por un estroma fibroso que contiene arterias y venas centrales con una gruesa pared de musculo liso (29). Sirven para dar un soporte mecánico al árbol velloso (30) y debido a sus características histológicas (como el bajo grado de capilares fetales) contribuyen mínimamente al intercambio materno-fetal (29) (Figura 11C).

Vellosidad intermedia madura: Son largas y delgadas vellosidades diferenciadas desde las ramificaciones periféricas de la vellosidad madre desde la mitad de la gestación. Tienen un diámetro entre 80-150 μm y consisten en un estroma suelto que contiene pequeños vasos y capilares periféricos (29). Dan origen a las vellosidades terminales (30) y gracias a su intensa vascularización fetal son consideradas la primera estructura importante para el intercambio materno-fetal (29) (Figura 11D).

Vellosidad terminal: La vellosidad terminal es desarrollada desde la vellosidad intermedia madura (29) y son las ramificaciones finales del árbol velloso placentario (30). Miden entre 30-80 μm de diámetro y 100 μm de longitud (29). Unas de sus características más importantes es su alto grado de capilarización (30). Los capilares fetales de la vellosidad terminal enfrentan una capa muy delgada de sincitiotrofoblasto formando las membranas vasculo-sincitiales (29). Esta membrana consiste en el sincitiotrofoblasto y el endotelio del capilar, separados por una membrana basal (30) (Figura 11E).

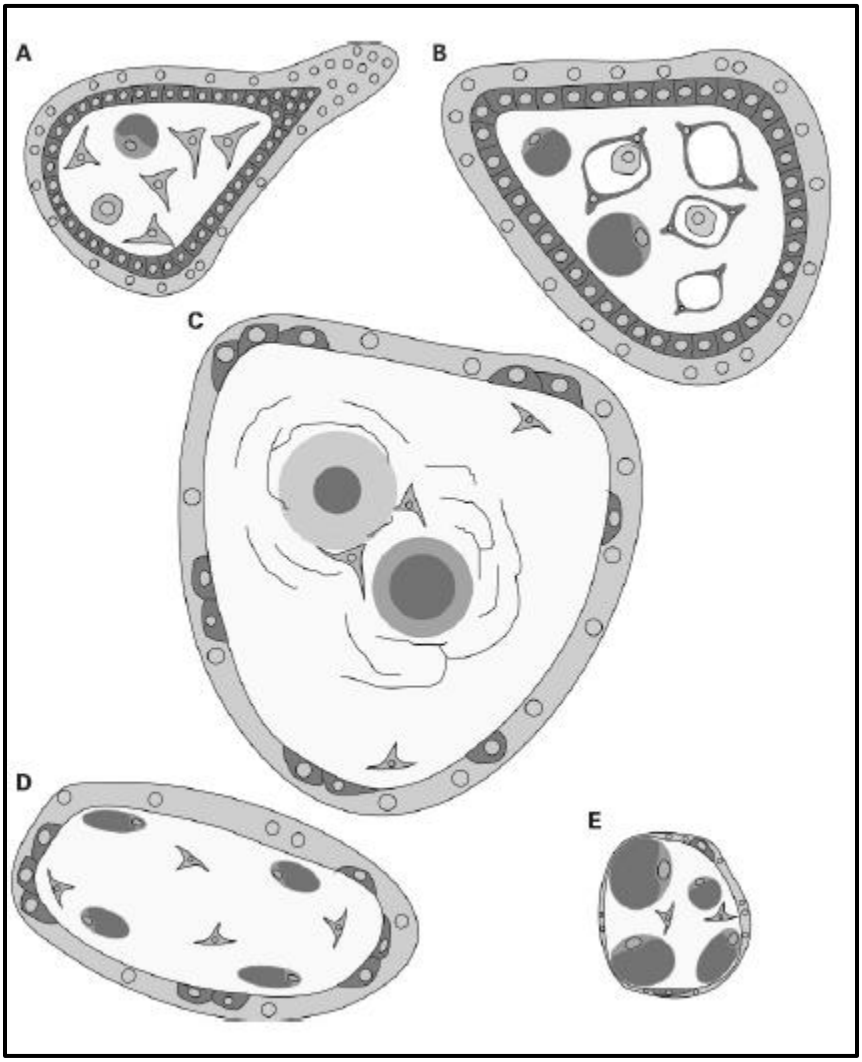


Figura 11: Tipos de vellosidades placentarias. A: Vellosidad mesenquimal con abundantes células mesenquimales B: Vellosidad intermedia inmadura con presencia de células de Hofbauer. C: Vellosidad madre con vasos centrales D: Vellosidad intermedia madura con poco estroma y pequeños vasos. E: Vellosidad terminal con una delgada membrana vasculo-sincitial (30).

1.2.4 Funciones de la placenta

Este órgano transitorio presenta múltiples funciones que permiten el desarrollo fetal:

Transporte:

El transporte placentario es llevado a cabo por el sincitiotrofoblasto multinucleado (39) y las sustancias son transferidas a través de la placenta por medio de varios mecanismos (40):

Transporte pasivo, que depende de la concentración y diferencias electroquímicas a través de la membrana, peso molecular, solubilidad lipídica, nivel de ionización y grosor del área de intercambio (40). Pasan por difusión simple, el cloro, sodio, potasio, yodo, hierro y fósforo (38). Así como también los ácidos grasos que cruzan las microvellosidades y las membranas basales por este mecanismo (41). El oxígeno, el dióxido de carbono y el monóxido de carbono se intercambian a través de la placenta mediante este tipo de transporte (34) que no requiere gasto energético y ocurre a favor de la gradiente (40).

Difusión facilitada, es un tipo de transporte mediado por moléculas portadoras relativamente insolubles en lípidos, a favor de una gradiente de concentración (40). La glucosa pasa a través de la placenta por medio de este mecanismo (41), y los transportadores de glucosa se encuentran tanto en las microvellosidades como en la membrana basal y son sodio independientes (38).

Transporte activo, implica el movimiento de cualquier sustancia a través de la membrana con actividad metabólica (40). Esta transferencia se realiza en contra de una gradiente de concentración y es un evento sodio dependiente (38). Este tipo de transporte juega un papel importante en la protección del feto de componentes externos potencialmente teratogénicos (40). Así, los aminoácidos, que se encuentran en mayor concentración en la sangre fetal, deben pasar desde la sangre materna en contra de esta gradiente ya que el feto utilizará los aminoácidos de la madre no solo para la síntesis de proteínas, sino también para su metabolismo oxidativo (38).

Pinocitosis, grandes moléculas pueden cruzar la membrana por esta vía que es un tipo de endocitosis. Es un proceso que requiere energía por el cual la membrana celular se

invagina alrededor de la macromolécula (40). Las inmunoglobulinas G (IgG) empiezan a ser transportadas de la madre al feto aproximadamente a las 14 semanas (37) por este tipo de mecanismo (38).

Función endocrina:

El sincitiotrofoblasto secreta numerosas hormonas relacionadas con el embarazo, tales como progesterona, estrógenos, gonadotropina coriónica humana, leptina y oxitocina (39). Esta habilidad de producir hormonas proteicas y esteroidales permite a la placenta influenciar y regular el ambiente materno-fetal (40).

La placenta, al actuar como un órgano endocrino forma diferentes hormonas que guardan similitud con hormonas hipofisiarias y también hormonas similares a las hormonas hipotalámicas (38). Además de producir las hormonas esteroideas 17-β estradiol, estriol y progesterona (38), la placenta produce progesterona en cantidades suficientes para mantener el embarazo. Aparte de progesterona, la placenta también produce cantidades crecientes de hormonas estrogénicas, niveles altos de estas hormonas estimulan el crecimiento del útero y el desarrollo de las glándulas mamarias (37). Durante los 2 primeros meses del embarazo, el sincitiotrofoblasto produce además gonadotropina coriónica humana (GCh) que mantiene el cuerpo amarillo, esta hormona la excreta la madre en la orina. Otra hormona proveniente de la placenta es la somatomamotropina (antaño lactógeno placentario) y es parecida a la hormona del crecimiento que da al feto prioridad sobre la glucosa sanguínea materna y en cierto modo tiene un efecto diabetógeno. Además, favorece el desarrollo de las mamas para que produzcan leche (37).

Función metabólica

La placenta no es un simple transportador de gases, nutrientes y desechos, también requiere oxígeno, nutrientes y produce metabolitos (42). En el sincitiotrofoblasto la glucosa puede ser convertida en glicógeno (42), sin embargo, ésta es convertida principalmente en lactato (41) que también es transportado por la placenta. El feto es un productor de lactato y la placenta juega un rol removiéndolo (42).

En el caso de los aminoácidos, estos son esenciales para el crecimiento fetal (41) y son requeridos por el feto para la síntesis de proteínas, pero también pueden ser

metabolizados por el feto (42). El metabolismo ocurre a través de tres mecanismos, los cuales son: 1) Incorporación de carbono y nitrógeno en el feto, 2) Interconversión a otros sustratos que pueden ser usados para esta incorporación y 3) Utilización como combustible oxidativo para la placenta y el feto (41). El trofoblasto puede captar un aminoácido de la circulación fetal, transformarlo en otro y regresarlo a la misma circulación (41).

Los lípidos, son una importante fuente de energía en la placenta y, dado que el feto no es capaz de producir lípidos, la ingesta y transferencia de estos por la madre es fundamental para el adecuado aporte (41). La cara materna de la placenta tiene una enzima lipasa que libera "ácidos grasos libres" de los complejos lipoproteicos circulantes en el plasma materno (42). Debido a que esta enzima no se encuentra en la cara fetal, los ácidos grasos que se esterifican en la circulación fetal no tienen la posibilidad de regresar a la circulación materna (41). Además, la placenta puede sintetizar colesterol el cual, bajo circunstancias normales es derivado de la sangre materna vía interacción de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) con receptores LDL en la microvellosidad del sincitiotrofoblasto, seguido de la internalización de LDL por endocitosis (42).

1.3 Transporte de ácidos grasos en placenta

Los ácidos grasos transportados por la placenta desde la circulación materna se originan a partir de dos fuentes principales: ácidos grasos no esterificados y ácidos grasos esterificados en triglicéridos. Estos últimos deben sufrir un proceso de hidrólisis a no esterificados para facilitar su transporte por el sincitiotrofoblasto (43). Este transporte es regulado por varias proteínas claves para facilitar el traspaso hacia el feto (44): la proteína de unión a ácidos grasos de la membrana plasmática (FABPpm), la translocasa de ácidos grasos (FAT/CD36) y la proteína transportadora de ácidos grasos (FATP) (28). Una vez dentro de la célula se unen a las proteínas de unión a ácidos grasos citoplasmáticos (FABP) donde pueden transferirse a través de FATPs o FAT/CD36 en la cara baso-lateral del sincitiotrofoblasto para ser liberados a la circulación fetal (43, 45) (Figura 12).

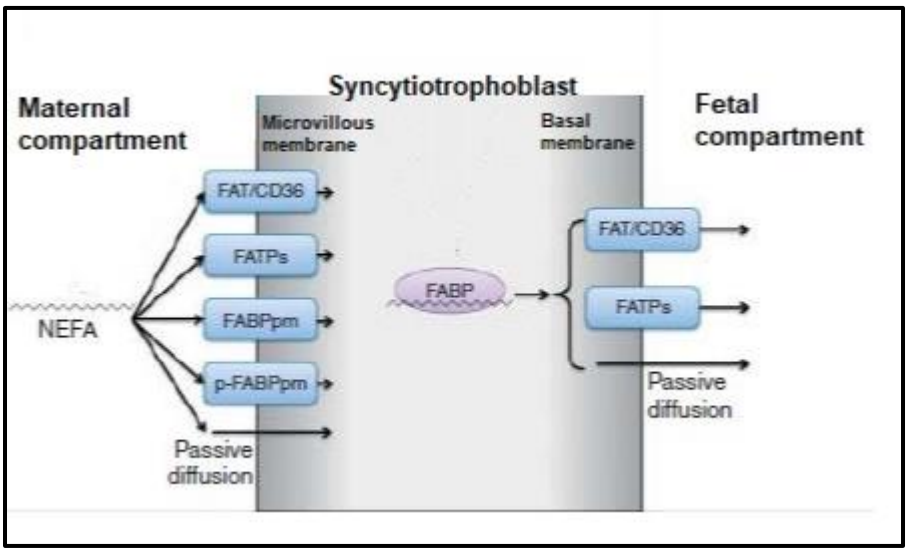


Figura 12: Representación esquemática del transporte de ácidos grasos (Modificado de Jones et al.).

1.3.1 FAT/CD36: Transportador de ácidos grasos en placenta

FAT/CD36 es una proteína de membrana integral de 80 kD con dos dominios transmembrana, y un gran bucle extracelular glicosilado (46). Posee una alta afinidad por ácidos grasos de cadena larga, especialmente ácido araquidónico (AA) y DHA (47), y contribuye, bajo un suministro excesivo de grasa, a la acumulación de lípidos y la disfunción metabólica (48). Como resultado de sus múltiples ligandos y capacidad de señales de transducción, FAT/CD36 tiene también funciones relacionadas a respuesta inmune, inflamación, angiogénesis, aterogénesis y trombosis (48).

FAT/CD36 se encuentra extensamente expresada en plaquetas, células inmunes, adipocitos, miocitos, enterocitos, células enteroendocrinas, células de retina y en células endoteliales (48). Además, se ha demostrado que está presente en el sincitiotrofoblasto, encontrándose tanto en la membrana microvellositaria o zona apical (en contacto con la circulación materna) como en la membrana basal (frente al capilar fetal) (49).

1.3.2 GPR120: Receptor de ácidos grasos en placenta

Los ácidos grasos también tienen funciones como moléculas de señalización a través de receptores en el citosol o sobre la superficie celular (50). Los ácidos a-Linolénico (a-LA), Docosahexaenoico (DHA) y Eicosapentaeónico (EPA) han demostrado ser ligandos endógenos del receptor de membrana asociado a proteína G 120 (GPR120), también llamado FFAR4 (Free fatty acid receptor 4) Receptor 4 de ácidos grasos libres (51).

Los receptores de membrana acoplados a proteína G (GPCRs) tienen un dominio extracelular N-terminal, 7 dominios transmembrana y un dominio intracelular C-terminal (52). Participan en la señalización de muchas funciones celulares (53), tales como diferenciación, proliferación, metabolismo de la glucosa y respuesta inmune (54). Particularmente, GPR120 se encuentra implicado en diversos procesos que incluyen antiinflamación, sensibilización a la insulina y liberación de péptidos intestinales (50). Además, participa en adipogénesis, regulación del apetito, preferencia alimenticia (55), y regulación de la secreción de hormonas en el sistema gastrointestinal y en islotes pancreáticos (56). También se ha asociado con la patogénesis del cáncer (54). Es posible encontrarlo en pulmón, colon y tejido adiposo (56). De igual manera, se expresa en macrófagos, donde se ha observado por medio de Inmunofluorescencia, que, en ratones con una dieta alta en ácidos grasos, aumenta sus niveles, sugiriendo que este receptor controla señales de inflamación (53). Apoyando estos hallazgos, sobre estas mismas células, se ha evidenciado su función como mediador de los efectos antiinflamatorios asociados al DHA (50), ya que, al ser activado por este, se ve involucrado en la inhibición en la expresión de citocinas inflamatorias como el TNFα e IL-6 (57). En el caso de la placenta, Lager *et al*. determinaron su presencia predominantemente en la zona apical del sincitiotrofoblasto (50).

Estudios en ratones, donde se analizaron adipocitos, macrófagos y hepatocitos, han demostrado que alteraciones en la función de este receptor están asociados a obesidad (55, 58).

1.4 Efectos de la obesidad en la placenta

Se ha reportado que la obesidad altera la función placentaria al término de la gestación a través de la reducción de mediadores como la apelina y la leptina que regulan el tono vascular placentario; además de una disminución de los reguladores de la angiogénesis, y aumento de los marcadores de inflamación y de estrés oxidativo (59). Estos cambios podrían afectar adversamente la función placentaria de intercambio de oxígeno y de transporte de nutrientes y podrían estar relacionados con inadecuado crecimiento fetal y con los resultados adversos presentes en la embarazada con obesidad (59).

En mujeres embarazadas con obesidad, el IMC se encuentra positivamente relacionado con la frecuencia de hipertrofia placentaria, esto se refiere a un peso mayor al percentil 90 del peso de la placenta (60) (Figura 13), observándose mayor aumento a medida que el IMC aumenta (60).

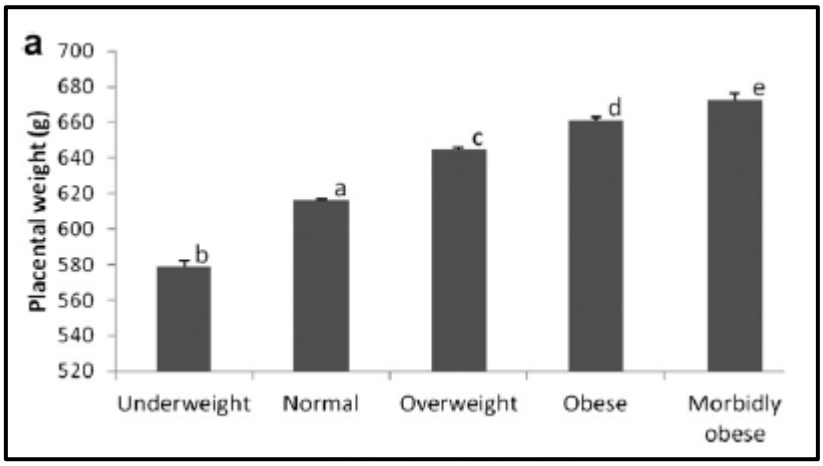


Figura 13: Peso de la placenta en gramos, en relación con los rangos de IMC (60).

En cuanto a los cambios morfológicos de la placenta en obesidad, un hallazgo frecuente es el edema en el parénquima vellositario, que se describe como una acumulación de fluido en el intersticio de las vellosidades con ruptura y reemplazo de la arquitectura intravellosa (61) (Figura 14). También se ha reportado la presencia de material fibrinoide (61), que es un elemento no celular, eosinofílico y homogéneo (62), tanto dentro como fuera

de las vellosidades (61) (Figura 15). Además, es común encontrar un menor número de vellosidades en total, con un mayor diámetro (63) y elevado número de capilares (corangiosis) (62) (Figura 16). También se puede apreciar inmadurez vellositaria, definida como placentas de tercer trimestre que muestran vellosidades amplias con numerosas células estromales, capilares más centrales que periféricos, y con numerosos nódulos sincitiales (62) (Figura 17). Junto a esto, es posible encontrar un engrosamiento de la membrana del sincitiotrofoblasto (61). También existe evidencia de hiperplasia del tejido muscular de la túnica media de los vasos placentarios (43).

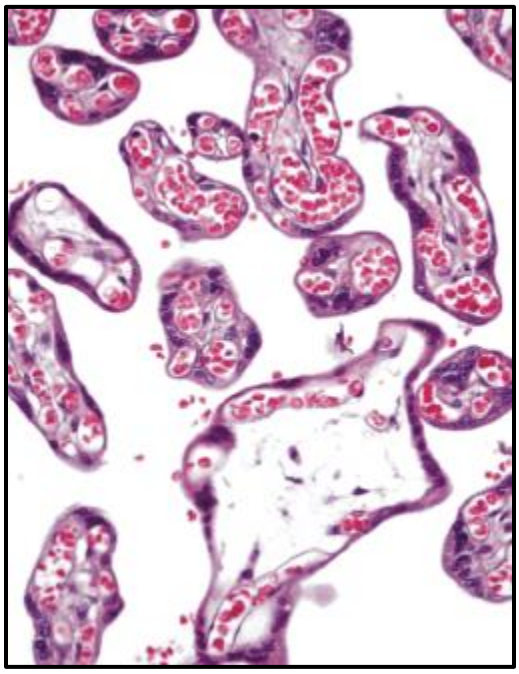


Figura 14: Vellosidad coriónica mostrando presencia de edema, visualizados como espacios en blanco interrumpiendo la arquitectura vellositaria, en placentas de madres con diabetes gestacional (62).

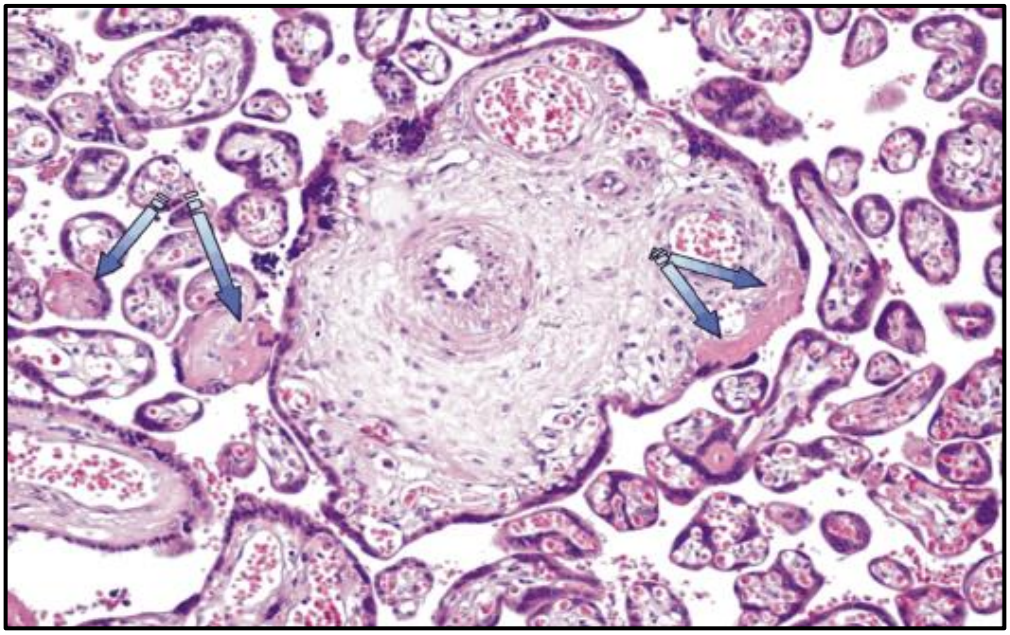


Figura 15: Fibrinoide intravelloso en vellosidad madre terminal (derecha) y en vellosidad terminal (izquierda), en placentas de madres con diabetes gestacional (62).

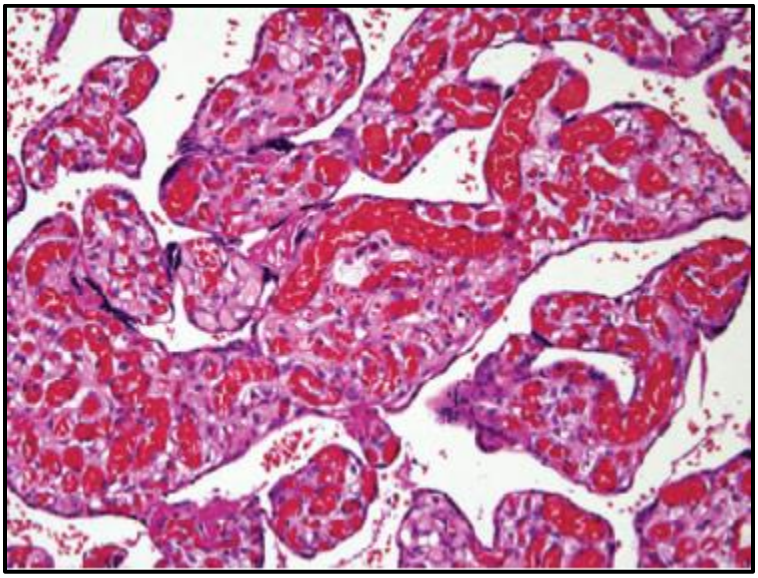


Figura 16: Vellosidades coriónicas mostrando aumento en el número y diámetro de los vasos fetales posicionados centralmente (63).

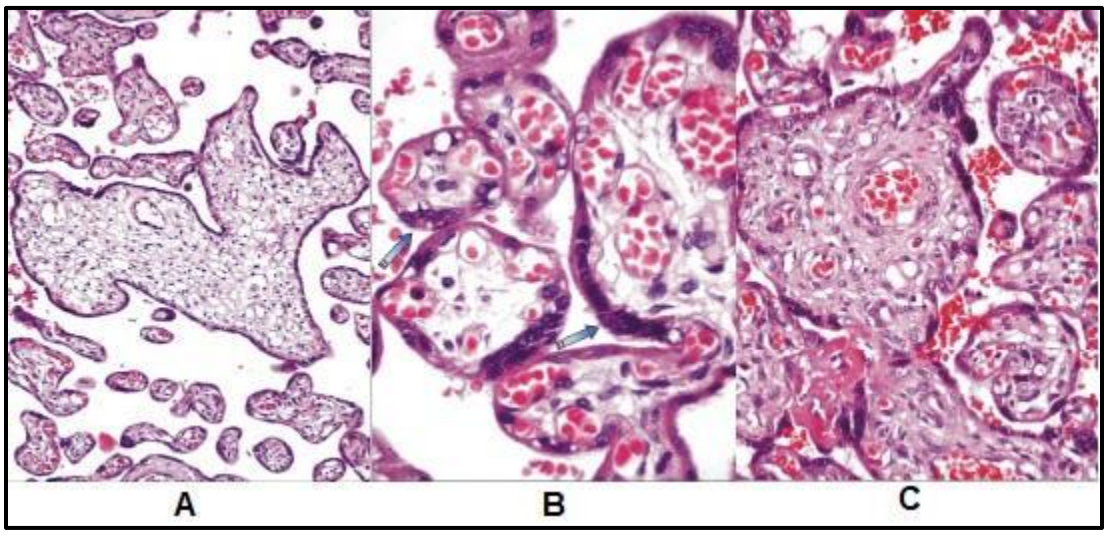


Figura 17: Vellosidades coriónicas mostrando inmadurez vellositaria en placentas de mujeres con diabetes. A: Vellosidad con abundante estroma y aumento de la población de células estromales. B: Vellosidad mostrando aumento de los nódulos sincitiales (flechas azules) C: Vellosidad con abundantes células estromales y vasos fetales centrales (Modificado de Gheorman et al.).

Actualmente, en biomedicina existe una búsqueda constante de tratamientos o paliativos, que permitan detener o aminorar el enorme efecto que ejerce la obesidad sobre el metabolismo de la madre gestante, del feto en desarrollo y de la placenta.

En los últimos años, se han atribuido a los ácidos grasos omega-3 muchos beneficios sobre el sistema cardiovascular, inflamatorio e inmunológico, por sus propiedades antiinflamatorias y disminución en el desarrollo de hipertensión (64). Por lo anterior, en el año 2015 comenzó un estudio clínico en el Servicio de Salud Metropolitano Sur Oriente, en Santiago, llamado MIGHT (Maternal obesIty control throuGh Healthy nuTrition, MIGHT study) (Fondecyt regular # 1150878; NCT02574767), y del cual esta tesis es parte, cuyo objetivo es evaluar la efectividad de una intervención nutricional, en base a una suplementación con diferentes dosis de ácido docosahexaenoico (DHA), en el control metabólico de mujeres con obesidad pregestacional y sus descendientes (65).

1.5 Ácido docosahexaenoico (DHA)

El DHA es un ácido graso esencial, altamente insaturado (66). Bioquímicamente es un ácido carboxílico de 22 carbonos, con seis dobles enlaces de inicio en el carbono 3, lo que le da su nomenclatura 22:6, n-3 (67) (Figura 18).

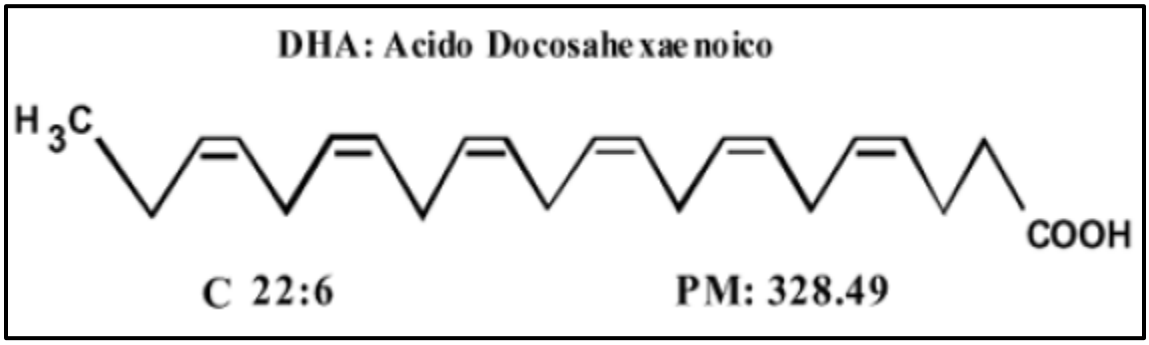


Figura 18: Fórmula estructural del ácido docosahexaenoico (DHA) (69).

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga son componentes fundamentales de los fosfolípidos presentes en todos nuestros tejidos, y participan activamente en la regulación funcional de las membranas celulares y subcelulares (68). El DHA se almacena en grandes cantidades en las membranas de los tejidos (69). En la corteza cerebral y en la retina, constituye un gran porcentaje de ácidos grasos en forma de fosfolípidos (70). Se han identificado muchos efectos biológicos del DHA, entre los que destacan su influencia sobre el crecimiento celular, el metabolismo intracelular, la comunicación intercelular, y la expresión de diversos genes que hoy son reconocidos como relevantes para la fisiopatología de enfermedades metabólicas y cardiovasculares (68), incluyendo en el control del sistema inmunológico (66).

Debido a que el ser humano no posee enzimas desaturasas que sean capaces de insertar el doble enlace n-3, el DHA debe ser adquirido preformado o mediante su precursor, el ácido alfa linolénico (ácido graso esencial), a través de la dieta (71). Aun así, la

contribución de este ácido a la síntesis de DHA es limitado por lo que su ingesta preformado es trascendental para mantener el correcto funcionamiento de los tejidos (72). Las fuentes más importantes de omega-3 son organismos vegetales y animales de origen marino, los componentes del fitoplancton, especialmente aquellos fotosintéticos, que lo sintetizan con mucha eficiencia (66). Además, es posible obtenerlo a través de los aceites de pescado comercialmente disponibles, aunque en general contienen mayores cantidades de ácido eicosapentaenoico (EPA) que DHA (67).

Los ácidos grasos omega-3 se incorporan en tejidos con diferentes eficiencias, posiblemente debido a la variabilidad interindividuos en la capacidad de convertir el ácido alfa linolénico en ácidos grasos omega-3, o afinidades diferentes de las vías enzimáticas involucradas (73). Un ejemplo, son los polimorfismos de los genes de las desaturasas delta 5 y delta 6, FADS1 y FADS2 (70), donde pacientes con estas alteraciones mostraron una mejoría en esta regulación al ser suplementados con ácidos grasos omega-3 (57). En la placenta, no se ha detectado actividad de estas enzimas, lo que sugiere que ésta no sintetiza DHA, por lo tanto, su capacidad de transferirlo desde la circulación materna al feto es un determinante crítico durante el desarrollo fetal (72). Todo esto indica, que, si bien los niveles de DHA en el feto dependen de las concentraciones plasmáticas de la madre en relación con su nutrición durante el embarazo, también otros factores son muy importantes como el metabolismo y función de la placenta, y la síntesis endógena fetal (74-75).

Las necesidades de DHA en el embarazo se incrementan debido a las demandas adicionales del feto y la placenta (76). El desarrollo del sistema nervioso, y en especial del cerebro y retina, ocurre principalmente durante el tercer trimestre de gestación, etapa en la cual comienza en forma activa la formación de las neuronas, por lo que el requerimiento de DHA aumenta considerablemente (65). Por otra parte, existen varios estudios que asocian la suplementación con DHA con un efecto protector sobre la placenta, facilitando un buen desarrollo de la gestación, disminuyendo el riesgo de desarrollar preeclampsia (75) o de tener un parto prematuro antes de las 34 semanas (69). Además, se propone que mejoraría la lactancia materna, el desarrollo neurológico infantil, y evitaría la depresión materna durante la última mitad del embarazo (77). El significado del aporte de DHA durante el período de gestación y después del nacimiento es considerado importante por algunos especialistas,

quienes plantean que su deficiencia durante el período más crítico del desarrollo puede resultar en diferencias significativas en el proceso de evolución intelectual del individuo (67).

1.5.1 Suplementación con DHA durante el embarazo

En los últimos años, también se han atribuido a los ácidos grasos omega-3 beneficios sobre la obesidad al reducir los niveles de triglicéridos (78). Sin embargo, su efecto más importante se ha observado al disminuir la inflamación crónica de bajo grado, condición central que se produce en la obesidad (79), gracias a sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, a través de diferentes mecanismos (80). Algunos estudios han demostrado, que la suplementación a largo plazo con aceite de pescado o una combinación de EPA/DHA retrasaría la progresión de síndrome metabólico a diabetes tipo 2, y reduciría la resistencia a la insulina (81-82). Todas estas observaciones han alcanzado gran interés debido a que la obesidad aumentaría el estado fisiológico de inflamación de bajo grado producido por el embarazo (83-84); así como el riesgo de padecer enfermedades como resistencia a la insulina, diabetes e hipertensión arterial, entre otras (85). Además, observaciones indican que en mujeres con obesidad pregestacional existiría una disrupción en la "biomagnificación" (captación selectiva y acumulación de LC-PUFAs para transferirlos al compartimiento fetal), llevando a una disminución de la disponibilidad de DHA para el feto en desarrollo (85). Es por esto por lo que han surgido múltiples cohortes con el fin de estudiar la suplementación con DHA en mujeres embarazadas con obesidad, sin embargo, aún no se ha llegado a un consenso de si esta estrategia es efectiva, siendo particularmente necesario información más clara que defina la dosis y el tiempo de administración más eficaz (64, 70, 71, 77, 78, 79, 86, 87).

La recomendación actual, establecida por el Consenso Europeo, Sociedad Internacional para el Estudio de Ácidos Grasos y Lípidos (ISSFAL) y el Centro Omega-3, es que todas las mujeres embarazadas deben consumir al menos 200 mg/DHA al día (88-89). FAO/OMS recomienda al menos 500 mg/día de EPA + DHA en los adultos, y en el caso específico de mujeres embarazadas o en período de lactancia, se recomienda un consumo de DHA no menor a 300 mg/día (90). Este consumo se puede lograr a través de suplementos, de aceite de pescado o algas, o mediante la ingesta de 1 o 2 porciones de pescado graso por

semana (91). No obstante, también recomiendan no excederse de 3000 mg/día ya que podría tener algunos efectos adversos como incremento del tiempo de coagulación y elevación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (73). En ensayos clínicos se han utilizado dosis que van desde los 150 a 1.200 mg/día DHA (69, 70, 71, 86, 87) a partir de distintos momentos de la gestación, incluyendo semana 15 (86), semana 22 (87) y semana 30 de gestación (71, 86). Además, en algunos estudios, también se han utilizado en conjunto con EPA, otro ácido graso omega-3 (71, 86, 87).

Como se expuso anteriormente, la transferencia materno-fetal de ácidos grasos esenciales, como el DHA, es clave para el desarrollo del feto (92). Para llegar a éste, el omega-3 debe disociarse de la albúmina, a la cual generalmente se encuentra unida en circulación, para luego ser transportado a través de la membrana del sincitiotrofoblasto (92). En las células del trofoblasto, los ácidos grasos influencian respuestas inflamatorias, acumulación de lípidos y funciones de transporte a través de distintos mecanismos, incluyendo receptores en la superficie celular (50).

CAPÍTULO 2: PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA

Existen escasos reportes respecto a los efectos de la obesidad materna y la expresión o actividad de las proteínas transportadoras de ácido grasos libres en placentas humanas (49). Se ha observado que la expresión de FAT/CD36, tanto a nivel de ARNm como de proteínas, es significativamente mayor en embarazos que cursan con obesidad (93-94); así como también con diabetes mellitus gestacional (95). Los anteriores hallazgos, asociado a que tanto en obesidad como en diabetes mellitus, se produce una dislipidemia en la madre, junto con un aumento en el almacenamiento de triglicéridos en la placenta (92), se propone que la obesidad alteraría el transporte de los ácidos grasos de la placenta a través de cambios en los niveles de transportadores y no en la hidrólisis de triglicéridos (96).

En paralelo se ha demostrado que la expresión de GPR120 se incrementa en el tejido adiposo de individuos obesos comparado con el grupo control normopeso (55). Lager *et al*. (50) determinaron su presencia en placenta, predominantemente en la zona apical del sincitiotrofoblasto, pero no encontraron diferencias en la expresión de la proteína, tanto por Inmunohistoquímica como por Western Blot, al comparar placentas provenientes de mujeres con obesidad y mujeres control normopeso (50). Estos resultados se contrastan con los observados anteriormente por otro grupo de investigación donde sí encontraron diferencias, una disminución en los niveles de ARNm en placentas de fetos masculinos provenientes de mujeres con obesidad (97). Los resultados contrapuestos indican que aún falta desarrollar más estudios al respecto, para dilucidar el verdadero rol de la obesidad sobre la expresión del receptor.

No sólo los niveles del receptor se han visto desregulados por la obesidad, también se ha mostrado evidencia que indica que los ácidos grasos omega-3, juegan un rol importante en su funcionamiento. Lo anterior se ha observado en ratones con una dieta alta en ácidos grasos donde aumentan los niveles de proteína de GPR120 en el hígado, y se incrementaron más aún al incorporar una suplementación con omega-3 proveniente de aceite de linaza (98). También, otras investigaciones en tejido adiposo y macrófagos de ratones demuestran que disrupciones en el gen de este receptor suprime los beneficios de los ácidos grasos omega-3 en la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad de la insulina (53).

Los reportes indican que la obesidad materna induce cambios morfológicos en las vellosidades terminales de la placenta tales como edema, hipercapilaridad, inmadurez vellositaria, fibrosis, entre otros. Lo anterior, en concomitancia con modificaciones en la expresión de FAT/CD36 y GPR120 podrían estar relacionadas con las alteraciones metabólicas observadas en el recién nacido.

La suplementación con DHA, mejora aspectos metabólicos tanto en la embarazada con obesidad como en el recién nacido. Sin embargo, hasta el día de hoy, se desconoce si la dosis de suplementación recomendada en una embarazada con obesidad pregestacional induce cambios morfológicos en la placenta y/o puede tener algún efecto en los niveles de expresión de las proteínas de la translocasa FAT/CD36 y el receptor GPR120, tampoco si estos cambios son dependientes de la dosis de suplementación.

2.1 Pregunta de investigación

¿Existen diferencias en la morfología y los niveles de expresión inmunohistoquímica de FAT/CD36 y GPR120 de las vellosidades coriónicas entre placentas provenientes de mujeres normopeso sin suplementación de DHA versus placentas provenientes de mujeres con obesidad pregestacional suplementadas con 200 y 800 mg de DHA?

2.2 Hipótesis

En mujeres con obesidad pregestacional suplementadas con DHA existe una disminución de los cambios deletéreos producidos por la obesidad, por lo que la morfología y los niveles de expresión inmunohistoquímica de FAT/CD36 y GPR120 en placentas provenientes de mujeres con obesidad pregestacional y suplementadas con 800 mg de DHA deberían presentar características histológicas y de expresión de proteínas, más similares a las placentas provenientes de mujeres normopeso sin suplementación de DHA, en comparación a aquellas provenientes de mujeres con obesidad pregestacional suplementadas con 200 mg de DHA.

2.3 Relevancia

Los resultados que se obtendrán de este proyecto mostrarán por primera vez cuales son los efectos de la suplementación con DHA a diferentes dosis en las vellosidades coriónicas de placentas provenientes de mujeres con obesidad pregestacional, tanto en su morfología como en el nivel de expresión de FAT/CD36 y GPR120, ayudando así a mejorar el entendimiento de los posibles mecanismos por los que la suplementación con DHA produce sus efectos beneficiosos en el metabolismo de ácidos grasos en placenta.

CAPÍTULO 3: OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Comparar la morfología de vellosidades coriónicas y la expresión Inmunohistoquímica de FAT/CD36 y GPR120 entre placentas de mujeres normopeso sin suplementación de DHA versus placentas de mujeres con obesidad pregestacional suplementadas con 200 y 800 mg/DHA al día, que tuvieron su parto en el Hospital Sótero del Río durante el año 2018.

3.2 Objetivos Específicos

1. Describir la frecuencia relativa (%) de edema e hipercapilaridad en vellosidades coriónicas de placentas provenientes de mujeres normopeso y mujeres con obesidad pregestacional suplementadas con 200 y 800 mg de DHA.
2. Describir la frecuencia relativa (%) de la inmadurez vellositaria (abundante estroma, numerosas células estromales, numerosos nódulos sincitiales) en vellosidades coriónicas de placentas provenientes de mujeres normopeso y mujeres con obesidad pregestacional suplementadas con 200 y 800 mg de DHA.
3. Determinar los niveles de expresión inmunohistoquímica (intensidad de pixeles) del transportador FAT/CD36 y el receptor GPR120 en vellosidades coriónicas de placentas provenientes de mujeres normopeso y mujeres con obesidad pregestacional suplementadas con 200 y 800 mg de DHA.
4. Comparar la frecuencia relativa (%) de edema e hipercapilaridad entre el grupo control normopeso y los grupos con obesidad pregestacional suplementadas con 200 y 800 mg de DHA.
5. Comparar la frecuencia relativa (%) de la inmadurez vellositaria entre el grupo control normopeso y los grupos con obesidad pregestacional suplementados con 200 y 800 mg de DHA.

6. Comparar los niveles de expresión Inmunohistoquímica del transportador FAT/CD36 y el receptor GPR120 entre el grupo control normopeso y los grupos con obesidad pregestacional suplementados con 200 y 800 mg de DHA.

CAPÍTULO 4: METODOLOGÍA

4.1 Tipo de estudio

Este estudio, según la intervención del investigador, se caracteriza por ser de tipo experimental, donde se compara el efecto de la suplementación con diferentes dosis DHA en mujeres con obesidad pregestacional respecto a cambios morfológicos vellositarios y los niveles de expresión del transportador de ácidos grasos FAT/CD36 y el receptor GPR120, de manera prospectiva y de tipo transversal, ya que los datos se obtuvieron en un momento único.

4.2 Población en estudio

La población en estudio son voluntarias que han participado durante su embarazo en el estudio MIGHT (NCT 02574767) que se está llevando a cabo en el Servicio de Salud Metropolitano Sur Oriente. En este estudio, las voluntarias con obesidad (IMC >30) antes de las 14 semanas de gestación se aleatorizaron en dos grupos para recibir 200 u 800 mg/ día de DHA (según el aceite de Schizochytrium, 100% DHA, DSM) (estudio doble ciego). La suplementación constaba de la entrega de cápsulas de 200 mg de DHA puro y la adherencia al tratamiento se evalúo calculando la cantidad de cápsulas ingeridas durante la suplementación, ya que se le pidió a las madres regresar aquellas cápsulas que no fueron consumidas.

Además, se incluyeron voluntarias normopeso pregestacional (IMC entre 18.5 y 25) que tuvieron su parto en el Hospital Sótero del Río y fueron reclutadas para el Fondecyt regular #1171406.

4.3 Muestra

No se realizó un cálculo estadístico del tamaño muestral, ya que el muestreo fue realizado por conveniencia considerando la disponibilidad de muestras biológicas en el Hospital Sótero del Río. El grupo total fue de 30 placentas provenientes de tres grupos experimentales:

- 10 placentas provenientes de mujeres normopeso pregestacional (N) como control

- 10 placentas provenientes de mujeres con obesidad pregestacional suplementadas (doble ciego 200 mg/día de DHA).
- 10 placentas provenientes de mujeres con obesidad pregestacional suplementadas (doble ciego 800 mg/día de DHA).

4.4 Variables de estudio

Variable independiente: Dosis de suplementación con DHA

Variables dependientes en Morfología:

1. *Edema*: Acumulación de fluido en el intersticio de las vellosidades con ruptura y reemplazo de la arquitectura intravellosa.
2. *Hipercapilaridad*: Incremento en el número de capilares
3. Inmadurez Vellositaria: Placentas de tercer trimestre, que presentan vellosidades con las siguientes características:
   3.1 Estroma abundante
   3.2 Numerosas células estromales
   3.3 Numerosos nódulos sincitiales

Variable dependiente en Inmunohistoquímica:

1. Intensidad de la señalización del transportador de ácidos grasos CD36: Intensidad de píxel de la inmunomarcación.
2. Intensidad de la señalización del receptor GPR120: Intensidad de píxel de la inmunomarcación.

4.5 Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión	*Criterios de exclusión*
Voluntarias del estudio MIGTH con, IMC pregestacional (<14 semanas de gestación) > 30	Cualquier patología previa al embarazo y complicaciones perinatales este como, por ejemplo: diabetes preexistente, parto prematuro, preeclampsia, gestación múltiple, desorden crónico cardio-respiratorio.
Embarazadas con IMC entre 18,5-25 para voluntarias control (no parte del estudio MIGTH)	Complicaciones en el parto, o aquellos que necesitaron hospitalización de la madre y/o recién nacido.
Ser mayor de edad	Embarazos de alto riesgo
Partos a término (>37 semanas de gestación) que planificaron tener su parto en el Hospital Sótero del Río.	Bajo peso al nacer (<2500 g)
	Defectos genéticos neuronales del feto

CAPÍTULO 5: MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reclutamiento

Al momento de su llegada a la sala de maternidad en el Hospital Sótero del Río, las voluntarias que participaban activamente en el estudio MIGTH y mujeres sanas con peso pregestacional normal, fueron invitadas por las matronas a participar en el Fondecyt #1171406. Se les informó sobre los detalles del estudio, y se les solicitó que firmaran un consentimiento informado donde se específica la donación de las placentas.

5.2 Obtención, fijación y traslado de las muestras biológicas

Las placentas fueron obtenidas seguidas del alumbramiento, y procesadas dentro de un plazo máximo de 4 horas, dentro de las cuales fueron refrigeradas a 4ºC, medidas y pesadas. Además, se realizó un registro de las principales características anatómicas de la placenta.

Se dividió el órgano discoide de manera radial en 3 zonas y se obtuvieron muestras de la zona media. Se cortó transversalmente, abarcando la cara fetal y materna de la placenta, obteniéndose un corte de cada zona de aproximadamente 1 cm^2. Las muestras fueron fijadas en formalina tamponada al 10% en un volumen de 10:1 con respecto a la muestra, con un tiempo de fijación mínimo de 24 horas y máximo de 72 horas a 4ºC (Anexo 1).

El traslado de los ejemplares quedó a cargo de un profesional del Laboratorio de Ciencias Morfológicas de la Universidad de Valparaíso, en triple embalaje, a medida que se recolectaba cierta cantidad de muestras.

5.3 Deshidratación, impregnación, inclusión y corte

Se desechó el líquido fijador y se procedió a lavar las muestras en agua corriente para luego deshidratarlas en etanol con graduaciones ascendentes. Posterior a este paso, se utilizó xilol como líquido aclarante y se procedió a impregnar e incluir las muestras en parafina

líquida a 60ºC (Anexo 2). Al obtener los moldes de parafina, fueron cortados a 4 µm en un micrótomo (Leitz, Wetzlar).

Para la tinción de rutina de Hematoxilina-Eosina, los cortes fueron adheridos a portaobjetos tratados con polilisina mientras que para inmunohistoquímica se utilizaron portaobjetos con carga (Anexo 3).

5.4 Tinción con Hematoxilina-Eosina

Se realizó la tinción de rutina Hematoxilina-Eosina de las muestras de tejido placentario, con el fin de evaluar la conservación de la estructura de las vellosidades placentarias. Se evaluó que las vellosidades no estuvieran destruidas y existiera buena definición celular, además que el corte no estuviera excesivamente hemorrágico, y se logre observar la cara materna y fetal de la placenta. Posteriormente se escogió la que conservara mejor sus características para la realización de la técnica inmunohistoquímica.

Los cortes fueron desparafinados, rehidratados y teñidos según el protocolo de Tinción de Rutina del laboratorio de Ciencias Morfológicas de la Universidad de Valparaíso (Anexo 4).

5.5 Técnica de Inmunohistoquímica

Esta técnica fue utilizada para visualizar y cuantificar la expresión de los anticuerpos FAT/CD36 y GPR120, con el fin de comparar los niveles de expresión entre los grupos con obesidad pregestacional y el grupo control normopeso.

En primer lugar, se realizó la estandarización de los anticuerpos CD36 y GPR120, con el objetivo de establecer la concentración adecuada para la realización de la Inmunohistoquímica.

Los cortes fueron desparafinados y rehidratados, para luego pasar por el proceso de recuperación antigénica y bloqueo de la peroxidasa endógena. Para la estandarización se

utilizaron diferentes concentraciones del anticuerpo primario, las cuales fueron 1:50, 1:100, 1:250, 1:500 y 1:1000 en PBS/Tween20 y se incubaron durante toda la noche a 4ºC. Además, la placa tenía un segundo corte utilizado como control negativo, el cual no fue incubado con el anticuerpo primario, sino que fue incubado con PBS pH 7.2, para comprobar que el anticuerpo secundario no se una a sitios inespecíficos.

Al día siguiente, las placas se lavaron en PBS y se realizó la incubación del anticuerpo secundario anti-IgG de conejo hecho en cabra diluido 1:500 en PBS durante 1 hora. Luego de un nuevo lavado en PBS, se realizó el revelado cromogénico con Novared-kit (Vector, SK-4800) de acuerdo con los tiempos que requería cada anticuerpo. Posteriormente fueron lavados en agua destilada y se realizó el contraste nuclear con Hematoxilina de Harris. Luego del viraje en agua corriente, se realizó la deshidratación en una batería de alcoholes ascendentes (sólo dipping), y el aclaramiento en xiloles para cubrir con medio de montaje hidrófobo.

Para asegurar que la técnica haya funcionado correctamente se utilizaron controles para cada anticuerpo. Para CD36 se utilizó un control externo de placenta humana, y para GPR120 se utilizó un control externo de placenta humana y otro de duodeno, todos obtenidos del laboratorio de Ciencias Morfológicas de la Universidad de Valparaíso.

Luego de que las estandarizaciones estaban realizadas, se escogió la dilución de cada anticuerpo que demuestre una buena intensidad sin dejar fondo, y se procedió a realizar las inmunohistoquímicas para cada placenta del estudio (Anexos 5 y 6).

5.6 Análisis morfológico

Utilizando una cámara Olympus DP71 adosada a un microscopio óptico Olympus CX21 conectado a un computador, se tomaron las microfotografías necesarias para cada corte histológico de placenta, a un aumento de 40x, que asegurara la captura de 100 vellosidades terminales por cada placa histológica. En las microfotografías se evaluaron los cambios morfológicos más frecuentes y comunes causados por la obesidad materna: Edema, hipercapilaridad e inmadurez vellositaria.

Se contó con un segundo observador, el cual fue una mirada externa que evaluó la presencia de los hallazgos morfológicos, con el propósito de evaluar en ciego y corroborar los resultados.

Se estableció la frecuencia de las características histológicas a analizar (Edema, hipercapilaridad e inmadurez vellositaria), realizando una tabla en donde la presencia de la alteración se indicó como "1" y la ausencia como "0". Estos datos fueron tabulados en una planilla Excel por ambos observadores y se calculó el promedio de ambos por cada placenta.

En el caso de edema e hipercapilaridad, estos datos fueron analizados a través del test de Kruskal-Wallis y se aplicó la prueba comparativa de Dunn. En el caso de inmadurez vellositaria los datos se analizaron a través del test de Anova de una vía y se aplicó la prueba comparativa de Tukey.

5.7 Análisis inmunohistoquímico

Se realizó la captura de 10 microfotografías por cada corte con una cámara Leica 1CC50W adosada a un microscopio óptico Leica, conectado a un computador OptiPlex 7050. Las fotografías de cada grupo de estudio se tomaron bajo las mismas condiciones por un programa computacional LAS EZ (Leica), con aumento de 40x, y con un previo ajuste de objetivos, contraste, nitidez, designación de escala de medida y resolución de imágenes.

La cuantificación de las imágenes fue realizada usando el software ImageJ. Las imágenes fueron corregidas eliminando el fondo, la región de interés fue seleccionada usando la herramienta "Threshold color" (color de umbral). Luego, el complemento "H DAB deconvolución" fue utilizado para separar el color de la inmunotinción (café) del color de la hematoxilina (azul-violeta). La intensidad de la inmunotinción fue medida con las regiones de interés previamente seleccionadas. Con los datos de intensidad entregados por el programa se calculó posteriormente la intensidad recíproca.

Los datos obtenidos (intensidad recíproca) fueron tabulados en una planilla Excel y se analizaron en medianas y rangos, y se aplicó la prueba estadística de Anova de una vía,

con la prueba de comparación múltiple de Tukey. Se estableció un intervalo de confianza del 95% y un error alfa del 5%. Los análisis se realizaron mediante el software GraphPad Prism©.5.0.

5.8 Consideraciones éticas

El estudio fue realizado conforme a la declaración de Helsinki.

Este proyecto de tesis se encuentra enmarcada dentro del Fondecyt regular #1172406 titulado "Fetal programming of inflammatory responses and body fat by maternal obesity: Role of DHA in the modulation of epigenetic markers of obesity and metabolic disease" a cargo de la Doctora Paola Casanello de la Escuela de Medicina de la Pontificia Universidad Católica, como contribución y apoyo a los requerimientos y esclarecimientos de la investigación.

El consentimiento informado y el protocolo de obtención de muestras de la investigación que apoya este proyecto de tesis, fueron aprobados por el Comité Ético-Científico de la Escuela de Medicina de la Pontificia Universidad Católica, y del Servicio de Salud Metropolitano Sur Oriente (Anexo 7). Cada individuo que participó firmó un consentimiento informado para la entrega de muestras biológicas (placenta), los que actualmente se encuentran archivados en el Laboratorio de Programación y Epigenética Perinatal de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

CAPÍTULO 6: RESULTADOS

Al observar la tabla con las características materno-fetales se puede apreciar que sólo hubo diferencias en el peso materno, al inicio de la gestación, ya que fue el criterio para dividir los grupos experimentales de control normopeso y los grupos con obesidad pregestacional, y al momento del parto (Tabla 2).

Tabla 2: Características demográficas y antropométricas de las madres y recién nacido.

	Control (n=10)	**200 mg (n=10)**	**800 mg (n=10)**
Características maternas			
IMC pregestacional	22,6 ± 1,7	34 ± 3 *	32,8 ± 3,4 *
IMC al parto	27,5 ± 2,7	37,4 ± 3,2 *	35,9 ± 4,1 *
Ganancia de peso (kg)	12,4 ± 4,1	8,7 ± 4,8	8,2 ± 5
Parto por cesárea	60%	70%	20%
Adherencia a la suplementación (%)	NA	62,7 ± 18,8	61,8 ± 15,4
Características RN			
Peso al nacimiento (g)	3334 ± 490	3409 ± 373	3488 ± 425
Altura al nacimiento (cm)	49,7 ± 1,7	49,1 ± 1,5	49,7 ± 2,3
Índice ponderal	2,7 ± 0,2	2,8 ± 0,2	2,8 ± 0,2
Edad gestacional (semana)	38,9 ± 0,8	38,9 ± 1,5	39,4 ± 0,7
Género (%F)	50%	40%	80%
Peso de la placenta (g)	443 ± 144	440 ± 52	504 ± 77

Valores son el promedio ± desviación estándar o %. *p<0,05 vs control

6.1 Hematoxilina-Eosina

6.1.1 Edema

Se analizaron 100 vellosidades por cada placenta de los grupos experimentales. El grupo control (Figura 19) presentó una baja frecuencia de edema, ya que en 4 placentas no hubo presencia de este hallazgo. En 5 placentas la presencia de edema se identificó en un 5% o menos, es decir, en 5 o menos vellosidades, y en sólo 1 de las placentas se observó un 10% de edema (Tabla 3). En conjunto, estos resultados indican que en el grupo control hubo en promedio un 2% de edema.

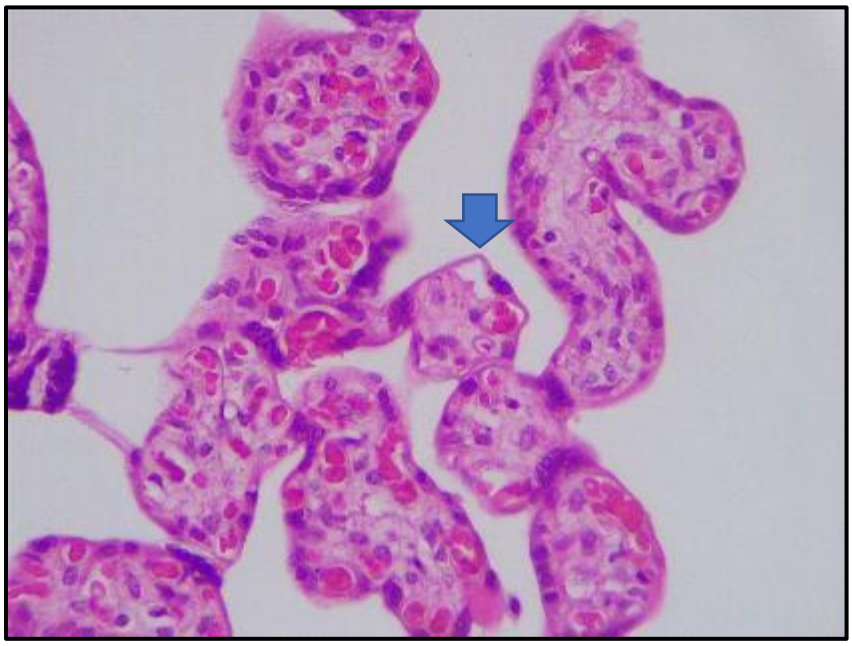


Figura 19: Vellosidades terminales del grupo control (N) con presencia de edema (flecha azul). H-E 40x.

Tabla 3: Frecuencia de edema en el grupo control normopeso (N). Obtenidos a través del promedio de los análisis de los 2 observadores.

Placenta	***Vellosidades observadas***	***Vellosidades con edema***	***% Vellosidades con edema***
N1	100	0	0%
N2	100	5	5%
N3	100	3	3%
N4	100	0	0%
N5	100	2	2%
N6	100	0	0%
N7	100	1	1%
N8	100	10	10%
N10	100	0	0%
N11	100	3	3%
		Porcentaje total	**2%**

En los grupos con suplementación de DHA se pudo observar un aumento en la frecuencia de edema. En el caso del grupo suplementado con 200 mg de DHA (Figura 20), 9 de las placentas presentaron 15% de edema o más, esto quiere decir que se identificó la presencia de este hallazgo en 15 o más vellosidades. En 1 de las placentas se identificó edema en menos de 15 vellosidades. En su conjunto, estos resultados indican que este grupo experimental presentó un 20% de edema (Tabla 4).

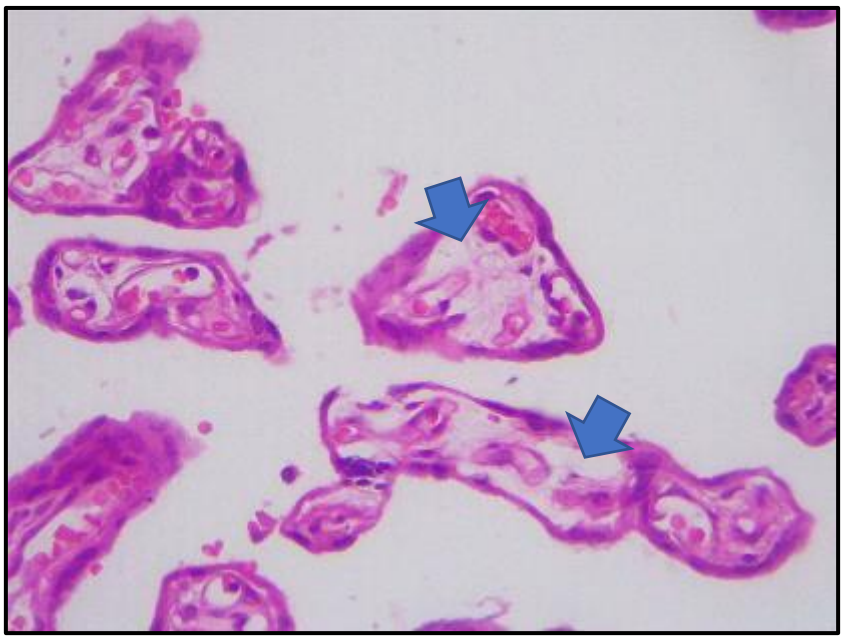


Figura 20: Vellosidades terminales del grupo suplementado con 200 mg de DHA, presentando edema (flechas azules). H-E 40x.

Tabla 4: Frecuencia de edema en el grupo suplementado con 200 mg de DHA/día (O13). Obtenidos a través del promedio de los análisis de los 2 observadores.

Placenta	**Vellosidades observadas**	**Vellosidades con edema**	**% Vellosidades con edema**
O13.1	100	26	26%
O13.2	100	28	28%
O13.3	100	16	16%
O13.4	100	15	15%
O13.5	100	19	19%
O13.6	100	17	17%
O13.7	100	19	19%
O13.8	100	21	21%
O13.9	100	24	24%
O13.10	100	14	14%
		Porcentaje total	**20%**

En el caso del grupo suplementado con 800 mg de DHA (Figura 21), 7 de las placentas presentaron 25% o más de edema, 2 de las placentas presentaron entre 14% y 18% de edema, y sólo en 1 de ellas se identificó menos de 10% de edema. En su conjunto, este grupo experimental presentó un 28% de edema (Tabla 5).

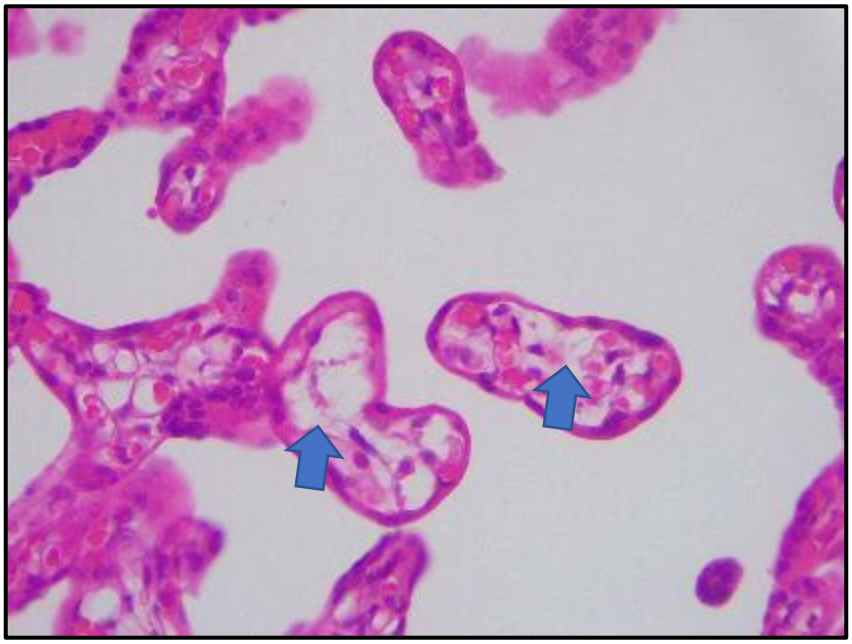


Figura 21: Vellosidades terminales del grupo suplementado con 800 mg de DHA, mostrando la presencia de edema (flechas azules). H-E 40x.

Tabla 5: Frecuencia de edema en el grupo suplementado con 800 mg de DHA/día (O12). Obtenidos a través del promedio de los análisis de los 2 observadores.

Placenta	Vellosidades observadas	Vellosidades con edema	% Vellosidades con edema
O12.1	100	25	25%
O12.2	100	34	34%
O12.3	100	27	27%
O12.4	100	40	40%
O12.5	100	35	35%
O12.6	100	51	51%
O12.7	100	7	7%
O12.9	100	18	18%
O12.10	100	29	29%
O12.11	100	14	14%
		Porcentaje total	**28%**

Al aplicar la prueba de Kruskal-Wallis y el Test de comparación múltiple de Dunn, los resultados indicaron que la frecuencia de edema es significativamente mayor en los grupos con suplementación de DHA al compararlos con el grupo control. Además la prueba indicó que los grupos con suplementación no son significativamente diferentes entre sí, por lo que no existe diferencia al aumentar la dosis de suplementación (Figura 22).

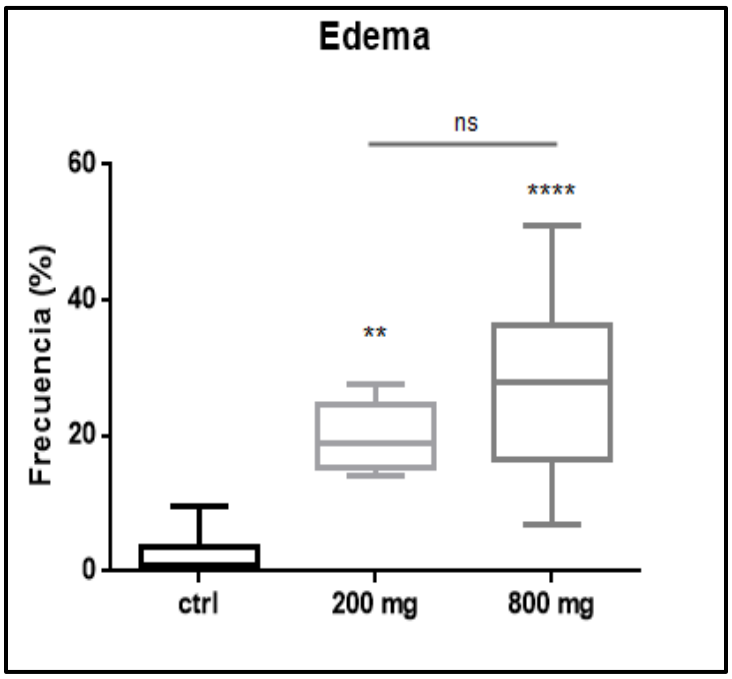


*Figura 22: Frecuencia de edema en el grupo control y los grupos suplementados con 200 y 800 mg de DHA. ns: no significativo. N control= 10; N 200 mg= 10; N 800 mg=10. ** <0,01; **** <0,0001. Test de Kruskal-Wallis y Test de comparación múltiple de Dunn.*

Tabla 6: Descripción estadística de edema en los grupos experimentales.

	Control	200 mg	800 mg
Número de valores	10	10	10
Mínimo	0,0	14,00	7,000
25% Percentil	0,0	15,38	16,63
Mediana	1,000	18,75	28,00
75% Percentil	3,500	24,50	36,25
Máximo	9,500	27,50	51,00
Promedio	2,200	19,75	27,90
Estándar. Desviación	3,066	4,739	12,95
Error estándar de media	0,9695	1,499	4,097
IC inferior del 95% de la media	0,006738	16,36	18,63
IC superior al 95% de la media	4,393	23,14	37,17
IC inferior del 95% de la mediana	0,0	15,00	14,00
IC superior del 95% de la mediana	5,000	26,00	40,00

** IC: intervalo de confianza*

6.1.2 Hipercapilaridad

Se analizaron 100 vellosidades por cada placenta de los grupos experimentales. En el grupo control (Figura 23), se pudo observar que 1 de las placentas presentó 17% de hipercapilaridad, es decir, en 17 vellosidades. En 3 de las placentas se observó un 1% de hipercapilaridad. Sin embargo, en 6 placentas no se identificó presencia de este hallazgo histológico. En conjunto, estos resultados indican en promedio un 2% de hipercapilaridad en este grupo (Tabla 7).

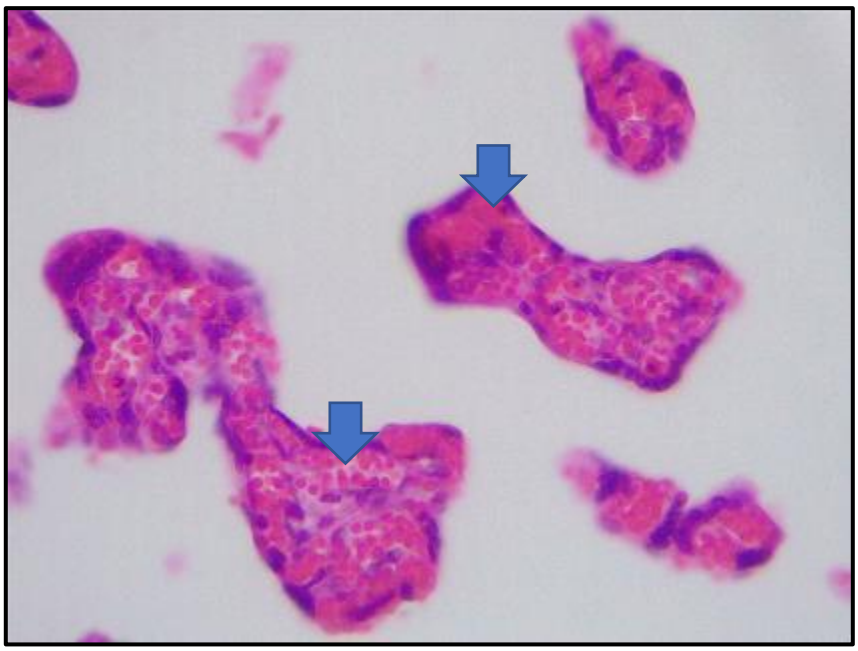


Figura 23: Vellosidades terminales del grupo control mostrando hipercapilaridad: aumento en el número de capilares fetales (flechas azules). H-E 40x.

Tabla 7: Frecuencia de hipercapilaridad en el grupo control normopeso (N). Obtenidos a través del promedio de los análisis de los 2 observadores.

Placenta	***Vellosidades observadas***	***Vellosidades con hipercapilaridad***	***% Vellosidades con hipercapilaridad***
N1	100	1	1%
N2	100	0	0%
N3	100	0	0%
N4	100	0	0%
N5	100	0	0%
N6	100	17	17%
N7	100	1	1%
N8	100	0	0%
N10	100	1	1%
N11	100	0	0%
		Porcentaje total	**2%**

En el caso del grupo suplementado con 200 mg de DHA (Figura 24), en 2 de las placentas no se observó presencia de hipercapilaridad. Sin embargo, 2 placentas presentaron menos de 10% de hipercapilaridad y 6 de las placentas presentaron 10% o más de hipercapilaridad. En conjunto, estos resultados indican un promedio de 12% de hipercapilaridad en este grupo (Tabla 8).

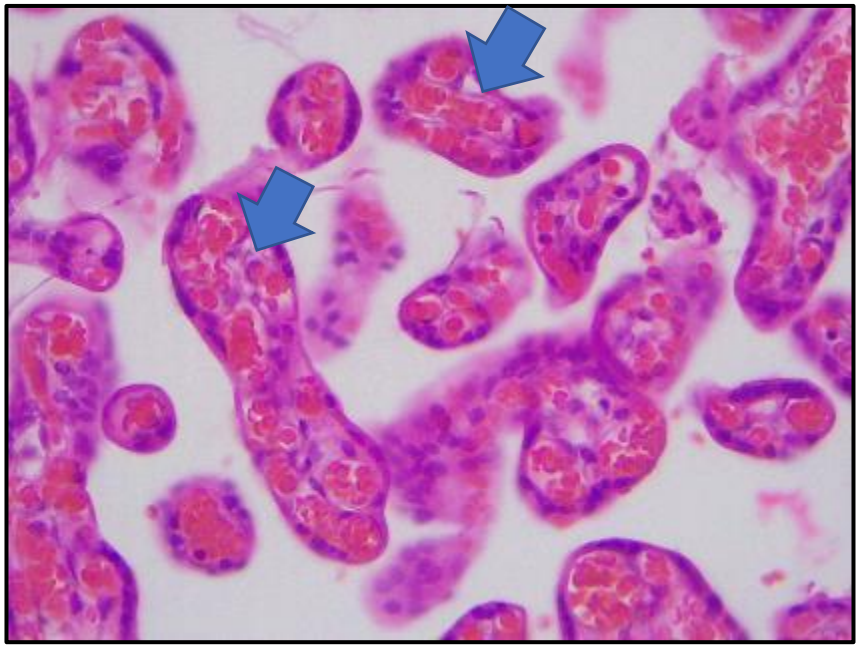


Figura 24: Vellosidades terminales del grupo suplementado con 200 mg de DHA mostrando hipercapilaridad observándose un aumento en el número de capilares fetales (flechas azules). H-E 40x.

Tabla 8: Frecuencia de hipercapilaridad en el grupo suplementado con 200 mg de DHA/día (O13). Obtenidos a través del promedio de los análisis de los 2 observadores.

Placenta	***Vellosidades observadas***	***Vellosidades con hipercapilaridad***	***% Vellosidades con hipercapilaridad***
O13.1	100	30	30%
O13.2	100	14	14%
O13.3	100	19	19%
O13.4	100	25	25%
O13.5	100	11	11%
O13.6	100	1	1%
O13.7	100	12	12%
O13.8	100	5	5%
O13.9	100	0	0%
O13.10	100	0	0%
		Porcentaje total	**12%**

Finalmente, en el grupo suplementado con 800 mg de DHA (Figura 25), en 1 placenta no se observó hipercapilaridad. En 5 placentas se observó un 5% o menos de hipercapilaridad y, las 4 placentas restantes presentaron un 40% o más de hipercapilaridad, es decir, en 40 o más vellosidades. En su conjunto, estos resultados en promedio indican la presencia de un 20% de hipercapilaridad en este grupo (Tabla 9).

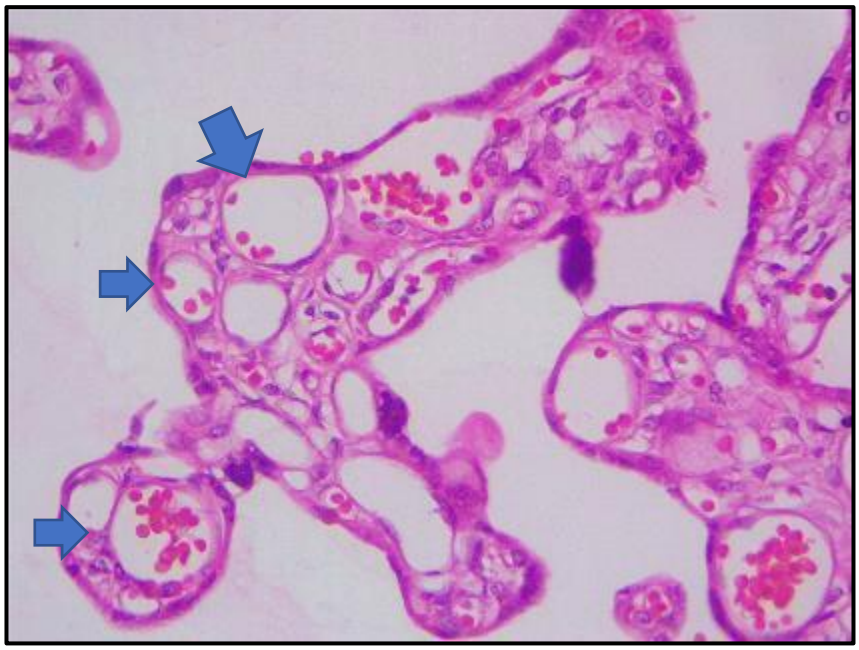


Figura 25: Vellosidades terminales del grupo suplementado con 800 mg de DHA mostrando hipercapilaridad, observándose una mayor dilatación de los capilares (flechas azules). H-E 40x.

Tabla 9: Frecuencia de hipercapilaridad en el grupo suplementado con 800 mg de DHA/día (O12). Obtenidos a través de los promedios de los análisis de los 2 observadores.

Placenta	***Vellosidades observadas***	***Vellosidades con hipercapilaridad***	***% Vellosidades con hipercapilaridad***
O12.1	100	1	1%
O12.2	100	1	1%
O12.3	100	48	48%
O12.4	100	38	38%
O12.5	100	5	5%
O12.6	100	1	1%
O12.7	100	62	62%
O12.9	100	2	2%
O12.10	100	0	0%
O12.11	100	40	40%
		Porcentaje total	**20%**

Al aplicar la prueba de Kruskal-Wallis y el Test de comparación múltiple de Dunn, los resultados indicaron que la frecuencia de hipercapilaridad es significativamente mayor en el grupo suplementado con 800 mg de DHA al compararlo con el grupo control. Además la prueba indicó que los grupos con suplementación no son significativamente diferentes entre sí, por lo que no existe diferencia al aumentar la dosis de suplementación (Figura 26).

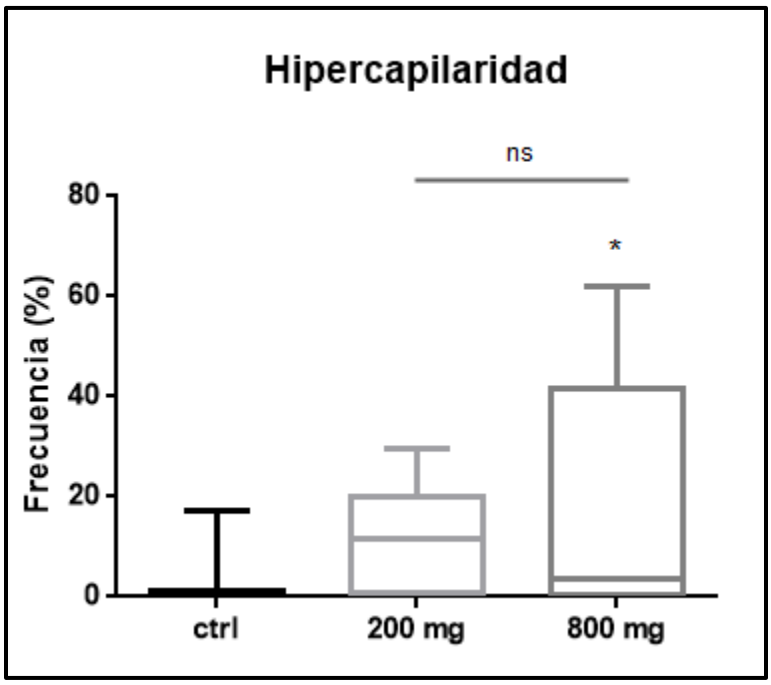


*Figura 26: Frecuencia de hipercapilaridad en el grupo control y los grupos suplementados con DHA. ns: no significativo. N control= 10; N 200 mg= 10; N 800 mg=10. * <0,05. Test de Kruskal-Wallis y Test de comparación múltiple de Dunn.*

Tabla 10: Descripción estadística de hipercapilaridad en los grupos experimentales.

	Control	200 mg	800 mg
Número de valores	10	10	10
Mínimo	0,0	0,0	0,0
25% Percentil	0,0	0,7500	0,5000
Mediana	0,0	11,50	3,500
75% Percentil	1,000	20,13	41,50
Máximo	17,00	29,50	62,00
Promedio	1,950	11,50	19,55
Estándar. Desviación	5,304	10,45	24,30
Error estándar de media	1,677	3,306	7,683
IC inferior del 95% de la media	-1,845	4,022	2,170
IC superior al 95% de la media	5,745	18,98	36,93
IC inferior del 95% de la mediana	0,0	0,0	0,5000
IC superior del 95% de la mediana	1,000	25,00	47,50

**IC: Intervalo de confianza*

6.1.3 Inmadurez vellositaria

Se visualizaron 100 vellosidades por cada placenta de los grupos experimentales. En el grupo control (Figura 27), 3 placentas no presentaron inmadurez vellositaria y en las 7 restantes se identificó un 3% o menos de inmadurez vellositaria, es decir, este hallazgo se encontró en 3 o menos vellosidades. En conjunto, estos resultados demostraron un promedio de un 1% de inmadurez vellositaria en este grupo control (Tabla 11).

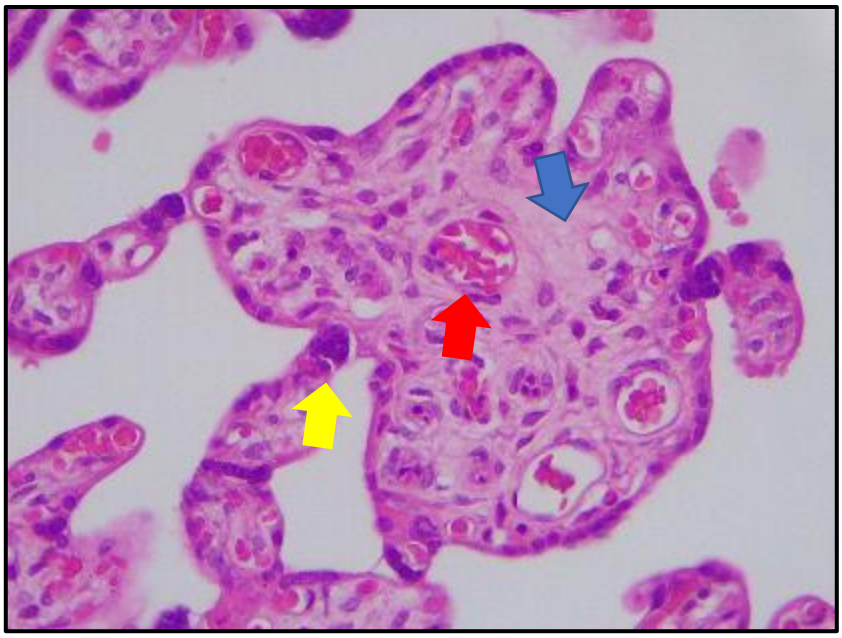


Figura 27: Vellosidades terminales del grupo control mostrando inmadurez vellositaria: Abundante estroma (flecha azul), vasos centrales (flecha roja), nódulos sincitiales (flecha amarilla). H-E 40x.

Tabla 11: Frecuencia de inmadurez vellositaria en el grupo control normopeso (N). Obtenidos a través del promedio de los análisis de los 2 observadores.

Placenta	***Vellosidades observadas***	***Vellosidades con inmadurez vellositaria***	***% Vellosidades con inmadurez vellositaria***
N1	100	2	2%
N2	100	2	2%
N3	100	3	3%
N4	100	0	0%
N5	100	1	1%
N6	100	2	2%
N7	100	0	0%
N8	100	2	2%
N10	100	1	1%
N11	100	0	0%
		Porcentaje total	**1%**

En el caso del grupo suplementado con 200 mg de DHA (Figura 28), 4 placentas presentaron 5% o menos de inmadurez vellositaria y en las 6 restantes se identificó más del 5% de la presencia de este hallazgo histológico. En su conjunto, estos resultados indican un promedio de 7% de inmadurez vellositaria en este grupo (Tabla 12).

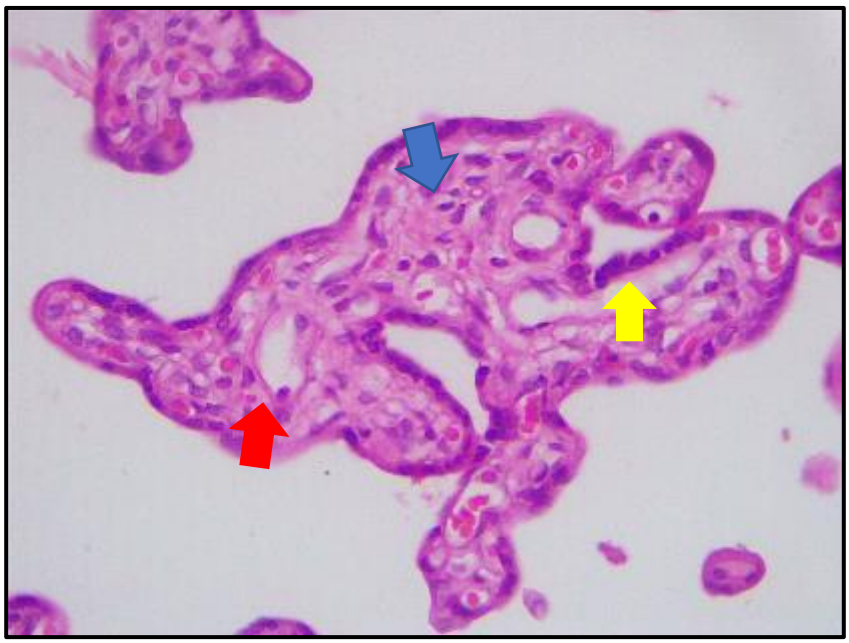


Figura 28: Vellosidades terminales del grupo suplementado con 200 mg de DHA, mostrando inmadurez vellositaria: Abundante estroma (flecha azul), vasos centrales (flecha roja), nódulos sincitiales (flecha amarilla). H-E 40x.

Tabla 12: Frecuencia de inmadurez vellositaria en el grupo suplementado con 200 mg DHA/día (O13). Obtenidos a través del promedio de los análisis de los 2 observadores.

Placenta	***Vellosidades observadas***	***Vellosidades con inmadurez vellositaria***	***% Vellosidades con inmadurez vellositaria***
O13.1	100	5	5%
O13.2	100	11	11%
O13.3	100	6	6%
O13.4	100	4	4%
O13.5	100	5	5%
O13.6	100	14	14%
O13.7	100	8	8%
O13.8	100	4	4%
O13.9	100	7	7%
O13.10	100	6	6%
		Porcentaje total	**7%**

Finalmente, en el grupo suplementado con 800 mg de DHA (Figura 29), 4 de las placentas presentaron menos de 10% de inmadurez vellositaria, en 2 placentas se observó entre un 10% y 14% de inmadurez. Y, en las 4 restantes se identificó más de 15% de la presencia de este hallazgo histológico. En conjunto, estos resultados indican en promedio un 13% de presencia de inmadurez vellositaria en este grupo (Tabla 13).

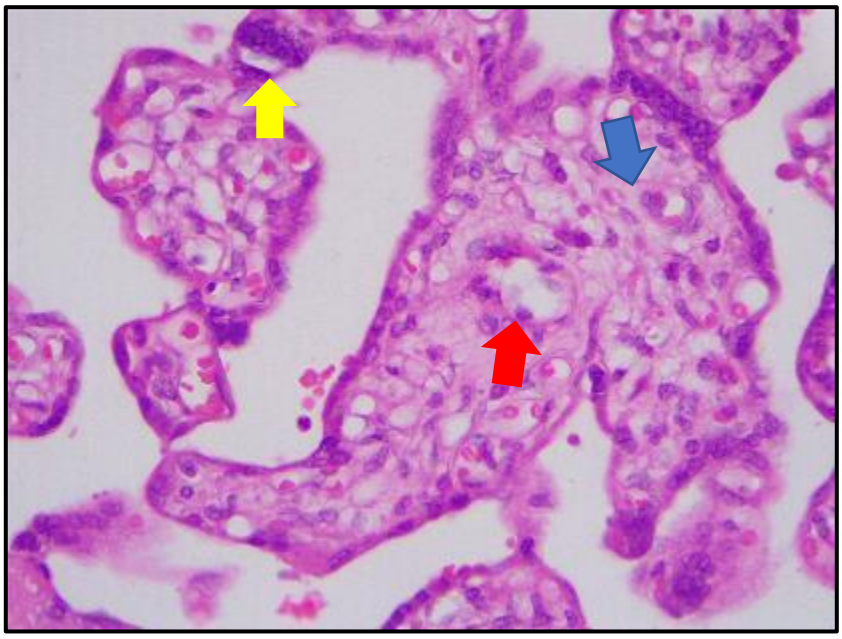


Figura 29: Vellosidades terminales del grupo suplementado con 800 mg de DHA, mostrando inmadurez vellositaria: Abundante estroma (flecha azul), vasos centrales (flecha roja), nódulos sincitiales (flecha amarilla). H-E 40x.

Tabla 13: Frecuencia de inmadurez vellositaria en el grupo suplementado con 800 mg de DHA/día (O12). Obtenidos a través del promedio de los análisis de los 2 observadores.

Placenta	***Vellosidades observadas***	***Vellosidades con inmadurez vellositaria***	***% Vellosidades con inmadurez vellositaria***
O12.1	100	10	10%
O12.2	100	22	22%
O12.3	100	20	20%
O12.4	100	6	6%
O12.5	100	15	15%
O12.6	100	20	20%
O12.7	100	3	3%
O12.9	100	14	14%
O12.10	100	8	8%
O12.11	100	7	7%
		Porcentaje total	**13%**

Al aplicar la prueba de Anova de una vía y el Test de comparación de Tukey, los resultados indicaron que la frecuencia de inmadurez vellositaria es significativamente mayor en los grupos suplementados con 200 y 800 mg de DHA al compararlos con el grupo control. Además la prueba indicó que los grupos con suplementación no son significativamente diferentes entre sí, por lo que no existe diferencia al aumentar la dosis de suplementación (Figura 30).

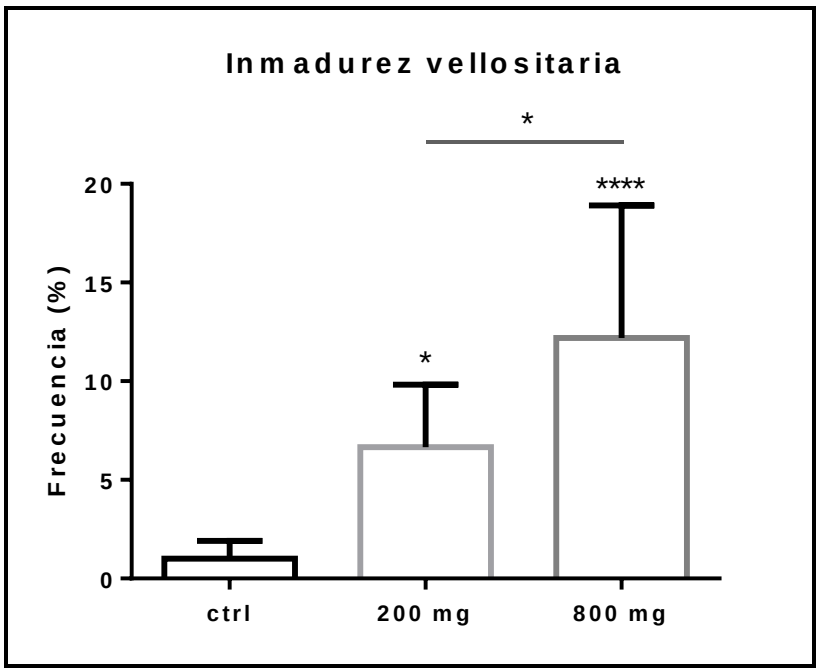


*Figura 30: Frecuencia de inmadurez vellositaria en el grupo control y los grupos suplementados con DHA. Mediana ctrl: 1, Mediana 200 mg: 6, Mediana 800 mg: 11,75. N control= 10; N 200 mg= 10; N 800 mg=10. * <0,05; **** <0,0001. Test de Anova de una vía y Test de Tukey.*

Tabla 14: Descripción estadística de inmadurez vellositaria en los grupos experimentales.

	Control	200 mg	800 mg
Número de valores	10	10	10
Mínimo	0,0	3,500	2,500
25% Percentil	0,0	4,250	6,250
Mediana	1,000	6,000	11,75
75% Percentil	1,625	8,250	19,63
Máximo	2,500	13,50	21,50
Promedio	1,000	6,650	12,20
Estándar. Desviación	0,9129	3,171	6,701
Error estándar de media	0,2887	1,003	2,119
IC inferior del 95% de la media	0,3470	4,381	7,407
IC superior al 95% de la media	1,653	8,919	16,99
IC inferior del 95% de la mediana	0,0	3,500	5,500
IC superior del 95% de la mediana	2,000	10,50	20,00

** IC: Intervalo de confianza*

6.2 Inmunohistoquímica

6.2.1 FAT/CD36

FAT/CD36 es una proteína transmembrana que funciona como transportador de ácidos grasos en la placenta. Se observó que su marcación es clara en células endoteliales de los capilares fetales dentro de las vellosidades coriónicas, pero también, aunque de menor intensidad, en la membrana microvellositaria del sincitiotrofoblasto, en contacto con la circulación materna (Figura 32), como en la zona basal, en contacto con el capilar fetal (Figura 31 y 33).

Se realizó la cuantificación de la inmunomarcación en 10 microfotografías por cada placenta de los grupos experimentales. Con los datos obtenidos (intensidad recíproca) se calculó la mediana, media e intervalos de confianza de cada grupo. Al comparar los datos entre los grupos, se observó que en el grupo suplementado con 200 mg de DHA la mediana se encuentra aumentada respecto al grupo control, y que el grupo suplementado con 800 mg de DHA presenta una leve disminución al compararla con el grupo suplementado con una menor dosis (Tabla 15). Al aplicar la prueba de Anova de una vía y el Test de comparación múltiple de Tukey, estos indicaron que no hay diferencia entre los grupos estudiados (Figura 34).

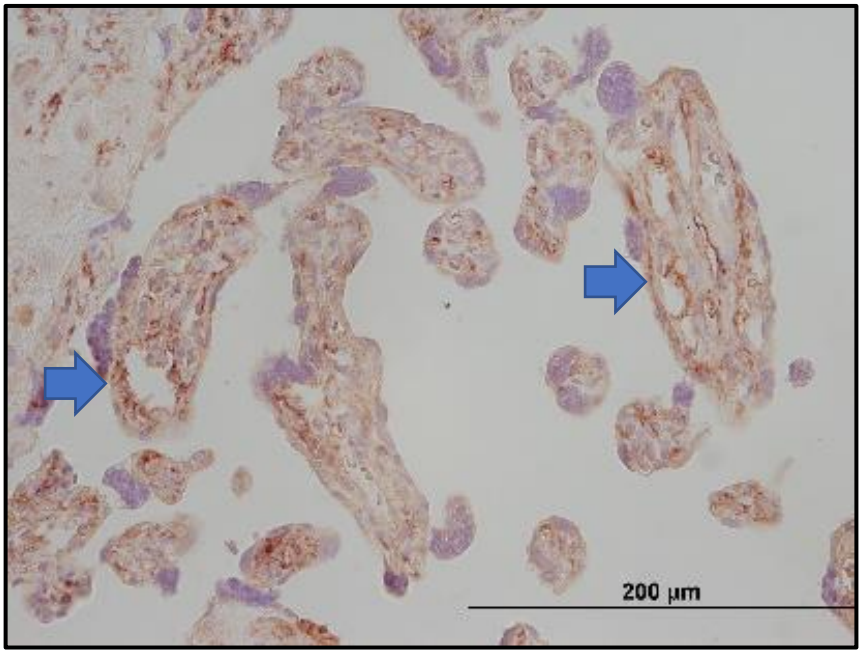


Figura 31: Vellosidades terminales del grupo control (N) con inmunomarcación de FAT/CD36 de color café rojizo, indicando la presencia del transportador en los capilares fetales (flechas azules). IHQ 40x.

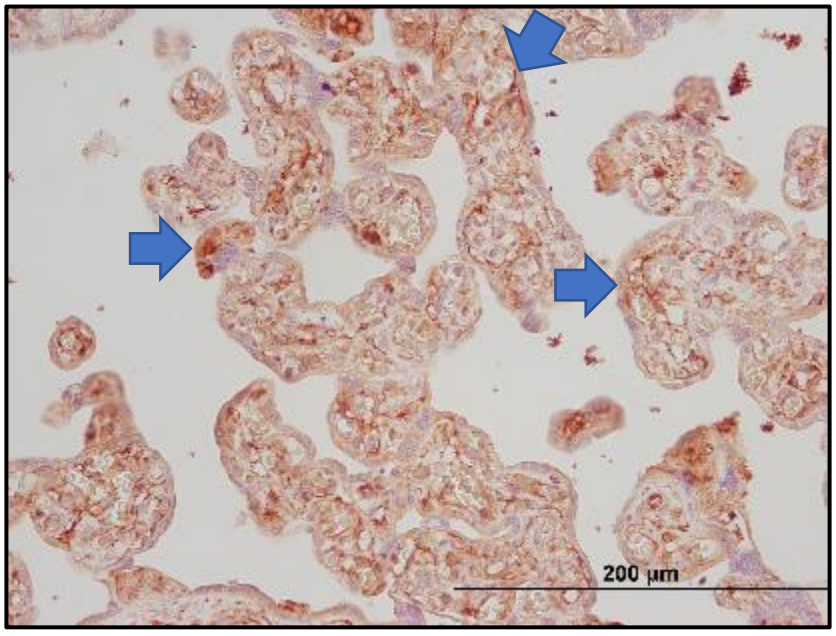


Figura 32: Vellosidades terminales del grupo con suplementación de 200 mg de DHA con inmunomarcación de FAT/CD36 de color café rojizo, indicando la presencia del transportador en los capilares fetales (flechas azules). IHQ 40x.

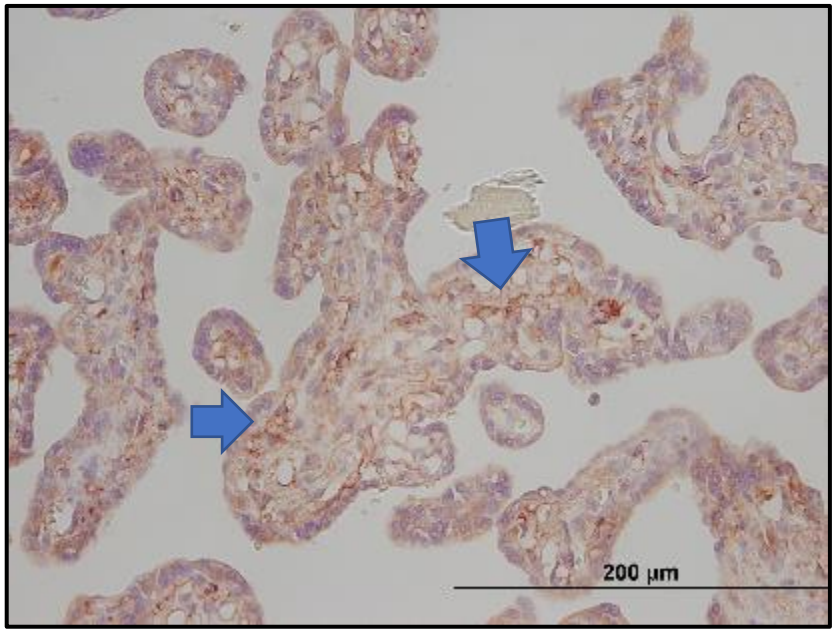


Figura 33: Vellosidades terminales del grupo con suplementación de 800 mg de DHA con inmunomarcación de FAT/CD36 de color café rojizo, indicando la presencia del transportador en los capilares fetales (flechas azules). IHQ 40x.

Tabla 15: Descripción estadística de los datos obtenidos de la inmunomarcación del transportador de ácidos grasos FAT/CD36, de los grupos experimentales.

	CTRL	**200 mg**	**800 mg**
Mediana	79,5	89,5	85,5
CI Mediana (5%-95%)	68 - 92	77 - 102	75 - 93
Media	79,8	91	84,6
CI Media (5%-95%)	71,7 – 87,8	82,7 – 99,2	78,2 – 90,9
Desviación estándar	11,2	11,5	8,8
Error medio estándar	3,5	3,6	2,8
N	10	10	10

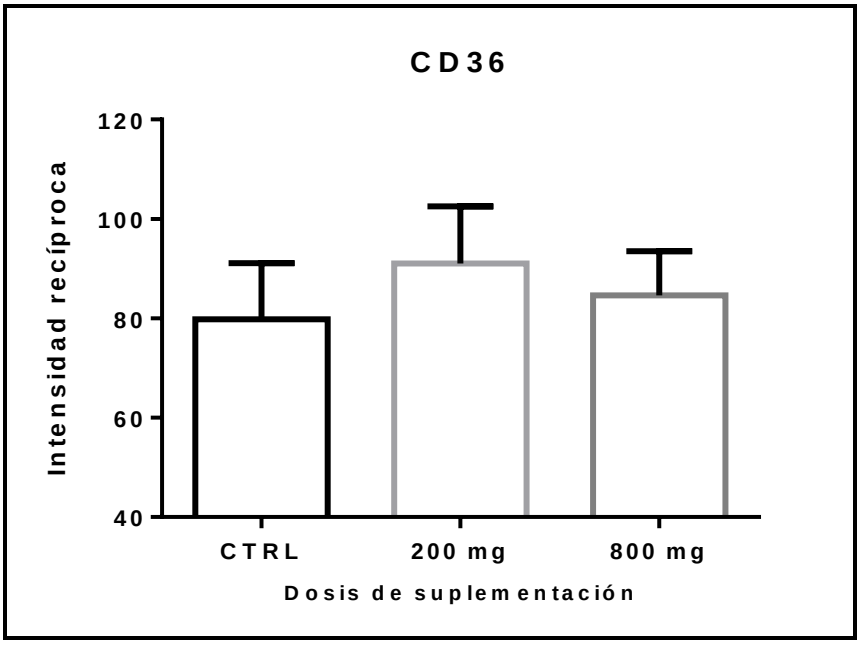


Figura 34: Intensidad recíproca del transportador de ácidos grasos FAT/D36 en los grupos experimentales. Prueba de Anova de una vía y Test de comparación múltiple de Tukey.

6.2.2 GPR120

GPR120 es un receptor de membrana asociado a la proteína G120 que tiene gran afinidad por el ácido graso omega-3 DHA. Se observó que su marcación se encuentra predominantemente en la zona apical de las células del sincitiotrofoblasto, es decir, en contacto con la sangre materna (Figuras 35, 36 y 37).

Se realizó la cuantificación de la inmunomarcación en 10 microfotografías por cada placenta de los grupos experimentales. Con los datos obtenidos se calculó la mediana, media e intervalos de confianza de cada grupo, donde se observó que en el grupo suplementado con 200 mg de DHA, la mediana se encuentra levemente disminuida al compararla con el grupo control. El grupo suplementado con 800 mg de DHA presentó una mínima disminución al compararla con el grupo suplementado con una menor dosis (Tabla 16). La prueba de Anova de una vía y el Test de comparación múltiple de Tukey, indicaron que no existen diferencias entre los grupos estudiados (Figura 38).

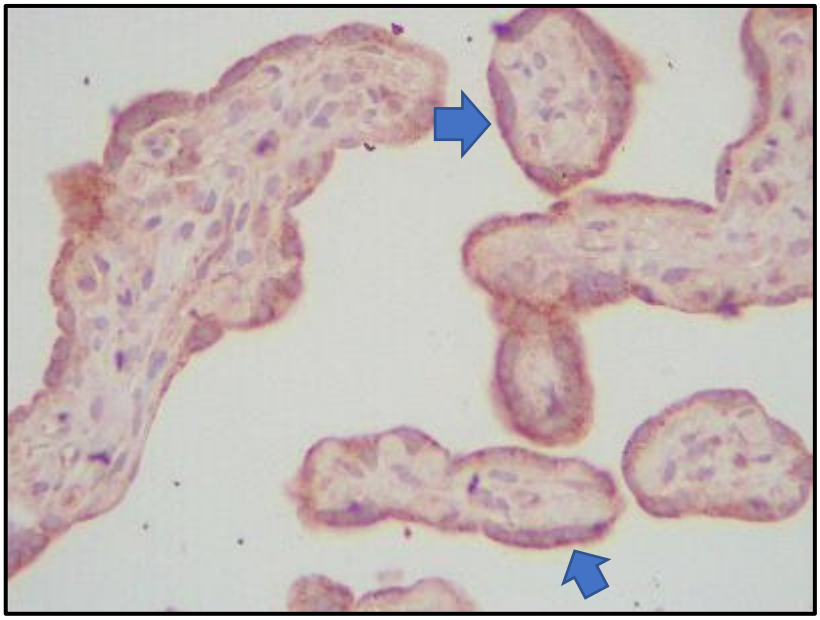


Figura 35: Vellosidades terminales del grupo control (N), con inmunomarcación del receptor GPR120 de color café rojizo, indicando su presencia en la zona apical del sincitiotrofoblasto en contacto con la sangre materna (flechas azules). IHQ 40x.

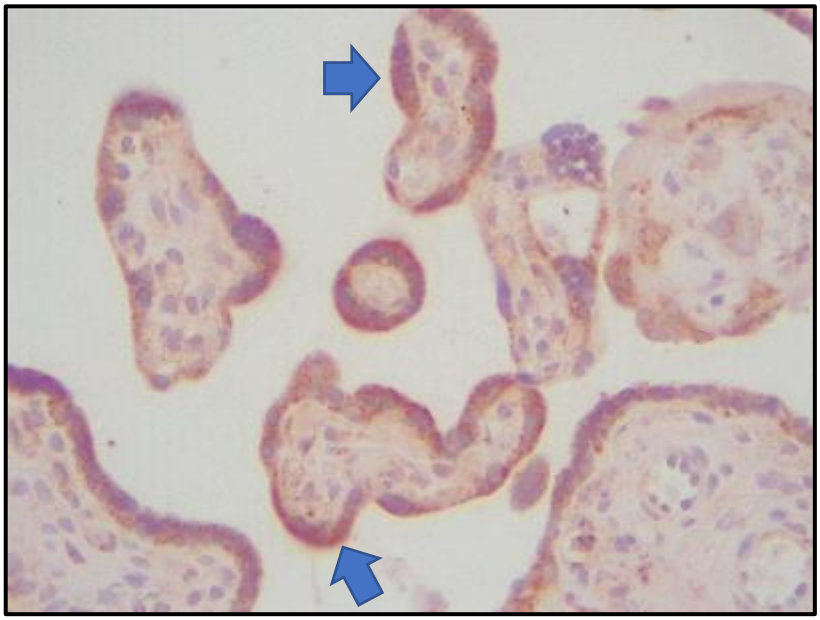


Figura 36: Vellosidades terminales del grupo suplementado con 200 mg de DHA, con inmunomarcación del receptor GPR120 de color café rojizo, indicando su presencia en la zona apical del sincitiotrofoblasto en contacto con la sangre materna (flechas azules). IHQ 40x.

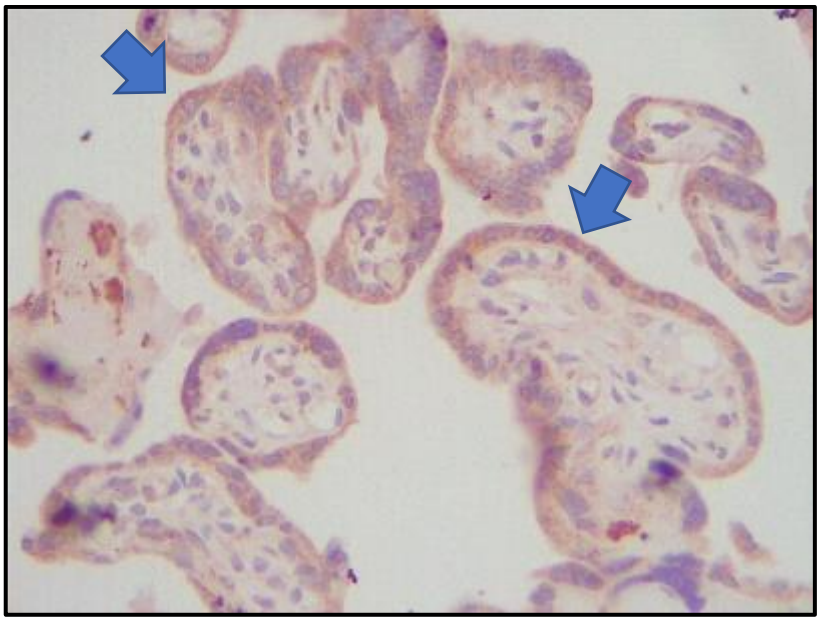


Figura 37: Vellosidades terminales del grupo suplementado con 800 mg de DHA, con inmunomarcación del receptor GPR120 de color café rojizo, indicando su presencia en la zona apical del sincitiotrofoblasto en contacto con la sangre materna (flechas azules). IHQ 40x.

Tabla 16: Descripción estadística de los datos obtenidos de la inmunomarcación del receptor de ácidos grasos GPR120, de los grupos experimentales.

	CTRL	**200 mg**	**800 mg**
Mediana	61,5	58	55
CI Mediana (5%-95%)	48 - 72	41 - 76	45 – 66
Media	59,7	58,4	56,3
CI Media (5%-95%)	49 – 70,3	45,9 – 70,8	49,3 – 63,2
Desviación estándar	14,9	17,4	9,6
Error medio estándar	4,7	5,5	3,0
N	10	10	10

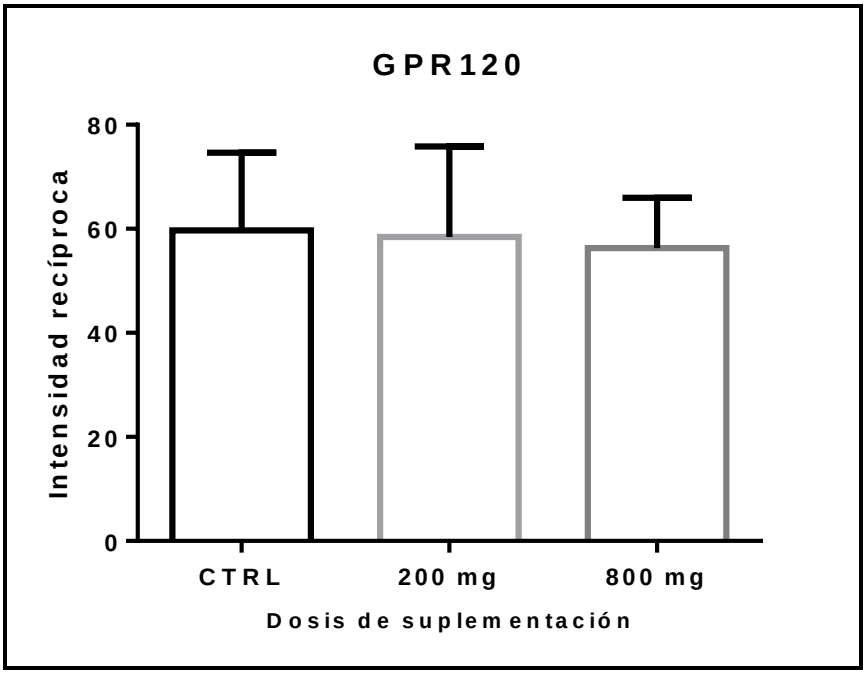


Figura 38: Intensidad recíproca del receptor de ácidos GPR120 en los grupos experimentales. Prueba de Anova de una vía y Test de comparación múltiple de Tukey.

.

CAPÍTULO 7: DISCUSIÓN

Según lo indicado en la introducción, la suplementación nutricional con DHA mejora aspectos metabólicos tanto en las madres con obesidad como en el recién nacido, según lo observado en reportes anteriores. Es así que esta tesis planteó evaluar si dichas mejoras ocurren en asociación con una regulación de modificaciones histológicas asociadas a daño en las vellosidades terminales de placentas de madres con obesidad, tales como edema, hipercapilaridad e inmadurez vellositaria, en concomitancia a cambios en la expresión del transportador de ácidos grasos FAT/CD36 y el receptor de ácidos grasos GPR120. Adicionalmente, se quiso evaluar si estas posibles regulaciones mejoran con una suplementación mayor de DHA.

En base a lo anterior, se propuso como objetivo comparar la morfología de vellosidades coriónicas, y la expresión Inmunohistoquímica de FAT/CD36 y GPR120 entre placentas de mujeres normopeso sin suplementación de DHA y placentas de mujeres con obesidad pregestacional suplementadas con 200 o 800 mg/DHA al día, que participaron como voluntarias de la cohorte MIGHT entre los años 2018 y 2019.

Nuestros resultados indican que existe una mayor frecuencia de los cambios morfológicos asociados a daño, como edema, hipercapilaridad e inmadurez vellositaria en las placentas provenientes de mujeres con obesidad, y que la suplementación con DHA no logró disminuir estos cambios Además, se observó que no existen diferencias, en la expresión del transportador de ácidos grasos FAT/CD36 ni el receptor de ácidos grasos GPR120 entre los grupos estudiados.

En las siguientes secciones se discutirán las variables histológicas y de expresión proteica que se evaluaron en esta tesis, en relación a las posibles causas de las modificaciones encontradas en obesidad y los efectos que su presencia inducirían en las vellosidades terminales de la placenta.

Edema

El edema se describe como acumulación de fluido en el intersticio de la vellosidad, con disrupción y reemplazo celular de la arquitectura intravellosa (61). Histológicamente se observa como espacios en blanco dentro del estroma de la vellosidad (99).

Existen principalmente tres tipos de edema: 1) edema hidrostático, que es la acumulación excesiva de fluido intersticial, 2) edema por permeabilidad capilar, causado por la disrupción de la estructura de los poros en la membrana microvascular, y 3) linfedema, que puede resultar de una disfunción de las bombas linfáticas (100).

Las vellosidades terminales al ser irrigadas por la sangre materna (en el espacio intervelloso) y por la sangre fetal (en los capilares vellositarios fetales), se piensa que la causa de edema en las vellosidades debería estar asociada a los sistemas cardiovasculares de la madre y/o del feto. Uno de los mecanismos podría ser un aumento exacerbado de la filtración transcapilar en respuesta a un incremento de la presión arterial y venosa (100) ya que, ambas presiones aumentan considerablemente en mujeres que comienzan el embarazo con obesidad (101-102). La presión sanguínea en la placenta está gobernada por el flujo sanguíneo de las arterias umbilicales, lo que se torna importante al considerar que el IMC materno posee una correlación positiva con el índice de pulsatilidad de la arteria uterina (103), que es reflejo de la resistencia vascular al paso de la sangre. De lo anterior se puede deducir que la obesidad pregestacional de la madre incide en las presiones de ambos componentes sanguíneos de la placenta que finalmente terminaría en la generación de edema hidrostático intersticial en las vellosidades coriónicas.

Fisiológicamente el edema es observable en un bajo porcentaje de placentas. Así lo describen Shen-Schwarz *et al*. quienes analizaron 1925 placentas colectadas desde las 19 semanas de gestación en adelante, y evidenciaron que sólo un 13% de ellas (259 placentas) presentaban edema en sus vellosidades. Los autores adicionalmente determinaron que de la totalidad de placentas con edema, un 25% de ellas provenían de embarazos de pretérmino (menor a 37 semanas de gestación), siendo más frecuente y marcado antes de las 32 semanas (104). Nuestros resultados van de la mano con lo reportado anteriormente, ya que de un total

de 10 placentas control analizadas, en 5 de ellas se observó al menos 1 vellosidad terminal con edema. Así, en este grupo hubo una frecuencia de edema de un 2%.

El edema se considera de carácter fisiopatológico ya que se encuentra frecuentemente asociado a inmadurez vellositaria, hemorragia y fibrosis (104). Es posible encontrarlo habitualmente en patologías del embarazo como la diabetes gestacional (62). En embarazos con obesidad, Roberts *et al.* analizaron 80 placentas, de las cuales 33 pertenecían a mujeres obesas. En su estudio no encontraron diferencias en la prevalencia de edema en placentas de mujeres con obesidad comparadas con las placentas de mujeres normopeso (105). En contraste a esto, Treesh *et al.* notaron este tipo de cambios con distribución focal en las vellosidades distales en la mayoría de los casos estudiados con diabetes (61). Nuestros resultados muestran que la frecuencia del hallazgo está significativamente elevada en las vellosidades terminales de las placentas de mujeres con obesidad. Interesantemente, a diferencia del grupo control, el edema se encontró en todas las placentas de madres con obesidad. La inexistencia de diferencia estadística en la frecuencia de edema en las vellosidades terminales entre ambos subgrupos de madres con obesidad (200 y 800 mg/día de DHA), pensamos que se basa en la dispersión de los datos de las frecuencias observadas en el grupo de madres que consumió 800 mg/día. Aun así, las medianas de ambos grupos sugieren un incremento de la frecuencia de edema en el grupo de madres que consumió la dosis mayor de DHA: 18,75 (I.C. 95% 15 a 26) y 28 (I.C. 95% 14 a 40) en 200 mg/día y 800 m/día, respectivamente. Junto a esto, la falta de diferencias estadísticas se podría correlacionar con la adherencia al tratamiento (suplementación con DHA), ya que ésta fue de un 50%, por lo que las voluntarias realmente no consumieron las cantidades de DHA sugeridas para este proyecto.

El efecto del edema en el funcionamiento de la placenta no está claro en absoluto. Naeye *et al.* sugieren que un edema excesivo puede repercutir en el flujo de oxígeno y nutrientes a través de la barrera sincitio-endotelial, generando, en los casos más extremos, un estado de isquemia placentaria, ya que frecuentemente la vellosidad se encontraría sin riego sanguíneo, existiendo la posibilidad de que el edema bloqueara los capilares por compresión (106).

Hipercapilaridad

La hipercapilaridad, también llamada corangiosis, es una vascularización intensa y difusa de las vellosidades terminales de la placenta (107). Una vellosidad coriónica normal presenta no más de 5 canales vasculares (108), de esta manera, considerando el número de vasos en la vellosidad, 10 capilares por vellosidad es definido como corangiosis (63).

El término corangiosis fue introducido por Altshuler (109) quien lo define técnicamente como 10 o más vellosidades terminales que tienen 10 o más capilares, observadas en un microscopio a un aumento de 10x en al menos 10 áreas observadas aleatoriamente en zonas no infartadas de la placenta (109).

Algunos autores expresan que aunque la presencia de corangiosis debe tenerse en cuenta en los informes de patología, tanto su patogenia como su importancia clínica siguen siendo inciertas (110), pues es un cambio en la placenta que no ha sido estudiado extensamente. Su etiología aún no es clara (108), sin embargo, este hallazgo se ha asociado con embarazos riesgosos, alteraciones fetales, maternas y placentarias que incluyen preeclampsia, diabetes, hipertensión, anomalías congénitas y tabaquismo (111); así como en situaciones en las que existe un cierto estado de hipoperfusión placentaria mantenida, y en las que la transferencia de oxígeno al feto está disminuida (112). Un ejemplo de aquello ocurriría en preeclampsia, en donde la hipoxia del tejido placentario causa una proliferación de las células endoteliales (108), y la expresión de determinados factores vasculares, tales como el factor de crecimiento endotelial vascular y el factor de crecimiento placentario (113), que modulaban la función y estructura placentaria induciendo la proliferación del tejido conjuntivo y la hipervascularización placentaria. Es decir, el patrón de crecimiento mostrado por los capilares de las vellosidades coriónicas típico de la corangiosis sería una adaptación placentaria en un intento de maximizar el acceso fetal al oxígeno materno (112). Sin embargo, la relación histogénica entre el incrementado número de capilares y la hipoxia crónica no ha sido clarificada (114).

El hallazgo de corangiosis en la placenta tiene una importante significación clínica, ya que revela la existencia de un ambiente intrauterino muy desfavorable para el feto. De hecho, su presencia se ha asociado con la aparición de graves alteraciones neurológicas, con

malformaciones fetales y con un aumento de la mortalidad perinatal en un 28, 39 y 42% de los casos respectivamente (112).

En embarazos riesgosos existe la presencia de este hallazgo. Cortes *et al*. lo demuestran al estudiar 41 placentas provenientes de mujeres con patologías como síndrome hipertensivo asociado al embarazo, restricción del crecimiento intrauterino, infección materna por virus VIH y diabetes. Del total, en 8 placentas se encontró este cambio morfológico (107). Castejón & Pérez en casos de embarazos que cursaron hipertensión crónica, también observaron la presencia de corangiosis (99). Así mismo, en placentas de mujeres diabéticas también existe la presencia de este hallazgo (62). Junto a esto, *Berceanu et al.* encontraron que la presencia de corangiosis fue mayor en aquellas placentas de mujeres con diabetes tipo 1 (diabetes pregestacional) que aquellas que tuvieron diabetes gestacional (115).

En casos de embarazos cursados con obesidad Roberts *et al*. no encontraron diferencias en hipercapilaridad comparados con mujeres normopeso (105), al igual que en el estudio de Brouwers *et al*. en el que no hubo diferencias significativas de corangiosis entre mujeres con obesidad y normopeso (116). Sin embargo, los resultados obtenidos en este proyecto de tesis evidenciaron una mayor frecuencia de corangiosis en ambos grupos de embarazos de mujeres con obesidad al compararlos con el grupo de mujeres normopeso. Nuestros resultados concuerdan con los hallazgos de Loardi *et al.*, y Castejón & López quienes hallaron un aumento en el número de capilares en mujeres con obesidad (63, 117). Además, la suplementación con DHA no generarían cambios en la frecuencia de este hallazgo histológico.

Inmadurez vellositaria

La máxima maduración vellositaria se alcanza al tercer trimestre, con abundantes vellosidades terminales de pequeño calibre (40-100 μm), con poco estroma, y abundante formación de membrana vasculo-sincitial (118). El proceso de maduración vellositaria puede definirse en 4 etapas: (a) muy inmaduro (<25 semanas), (b) inmaduro (25-33 semanas), (c) ligeramente inmaduro (34-38 semanas), y (d) maduro (39 semanas o más) (119)

El retraso de la maduración es una entidad donde la maduración de las vellosidades placentarias terminales no ocurre o toma lugar en menor grado que en una gestación normal (120). Es un fenotipo placentario caracterizado por vellosidades terminales agrandadas, con excesivo estroma hipercelular (121), capilares alejados de la periferia, y escasez de membranas vasculo-sincitiales (119). En bajo aumento (10x) las vellosidades se ven alargadas con una celularidad estromal y matriz extracelular aumentada (120). A mayores aumentos la mayoría de los capilares no son periféricos resultando en una disminución de la membrana vasculo-sincitial. Además, el sincitiotrofoblasto que la rodea se ve más grueso e hipercelular (120).

La inmadurez se observa con mayor frecuencia en mujeres con intolerancia a la glucosa, pero también se encuentra en asociación con la obesidad materna, el aumento excesivo de peso durante el embarazo, la obstrucción parcial e intermitente del cordón umbilical, y algunos casos de restricción del crecimiento fetal (119). El crecimiento normal de la placenta se detiene después de las 37 semanas pasando a una transición de crecimiento nuevo a una diferenciación. En casos de diabetes y obesidad materna, elevados niveles de factores de crecimiento podrían inhibir la diferenciación a vellosidades terminales, promoviendo un crecimiento continuo (119).

Berceanu *et al*. estudiaron 53 casos de mujeres con diabetes mellitus o diabetes gestacional. En su estudio encontraron que la inmadurez vellositaria se ha observado desde el segundo trimestre, predominantemente en casos de diabetes gestacional con un 37,5%, por lo que durante el tercer trimestre este hallazgo aumentó progresivamente, superando el 40% hacia el final del último trimestre, tanto para las pacientes con diabetes gestacional como para aquellas con diabetes mellitus 1 (115). Esto concuerda con los hallazgos obtenidos por Gheorman *et al.* quienes estudiaron 19 placentas de mujeres con diabetes, y este fenómeno de inmadurez vellositaria fue observado en todos los casos estudiados (62).

En casos estudiados de mujeres con obesidad, Huang *et al.*, Dubova *et al. y* Loardi *et al*, compararon en reportes independientes, placentas de mujeres con obesidad versus placentas de mujeres normopeso, encontrando que las vellosidades de placentas de mujeres con obesidad eran menos maduras que aquellas de mujeres normopeso (54, 63, 122). Todos

estos hallazgos concuerdan con los obtenidos en este proyecto en el que ambos grupos con obesidad pregestacional presentaron mayor frecuencia de inmadurez vellositaria comparado con el grupo control normopeso. Además, se observó que la suplementación con DHA no genera cambios en la frecuencia de este hallazgo histológico. No se ha reportado evidencia de los efectos de la suplementación con este tipo de omega-3 en la morfología placentaria.

La importancia clínica de la inmadurez vellositaria no está delineada completamente. Se propone que las vellosidades son ineficientes con respecto al intercambio de nutrientes y gases debido al aumento de la distancia de difusión, y a la falta de membranas vasculo-sincitiales especializadas. Una segunda consideración relevante es la frecuente asociación de inmadurez con placentas anormalmente grandes, lo que lleva a un aumento en la proporción de sustrato utilizado por la placenta a expensas del feto (120). Además, presenta un riesgo de hipoxia fetal prenatal como consecuencia de la reducida capacidad de difusión de la placenta (123).

FAT/CD36

FAT/CD36 es una proteína integral de membrana de 80 kD con dos dominios transmembrana, y un gran bucle extracelular glicosilado (46). Posee una alta afinidad por ácidos grasos de cadena larga, especialmente ácido araquidónico (AA) y DHA (47). En una dieta excesiva de alimentos ricos en grasa, este transportador contribuye a la acumulación de lípidos y la disfunción metabólica (48). En placenta se localiza tanto en la zona apical, en contacto con la sangre materna, como en la membrana basal del sincitiotrofoblasto, en contacto con los capilares fetales (93). Se ha demostrado que CD36 está involucrado en la absorción de ácidos grasos en el corazón y músculo esquelético, sin embargo, en placenta no está bien dilucidado aún su rol (93). Esta tesis evidenció una clara inmunomarcación de FAT/CD36 en vasos fetales dentro de las vellosidades coriónicas. Para entender cuál es la función del transportador en dicha localización serán necesarios otros tipos de experimentos que se diseñen para responder dicha pregunta.

Segura *et al*. estudiaron 151 placentas de mujeres con sobrepeso, obesidad y diabetes gestacional, y a través de qPCR encontraron que en los tres casos los niveles de expresión de ARNm de CD36, en placenta total, estaban aumentados (94). Resultados similares

obtuvieron Dubé *et al*. quienes al comparar 6 placentas de mujeres normopeso y 6 placentas de mujeres con obesidad, hallaron que los niveles de ARNm y de proteína de CD36 estaban significativamente incrementados en placentas de mujeres con obesidad comparados con embarazos normopeso (93).

Si es que la elevada expresión génica de CD36 finalizase con un aumento de los niveles de proteínas, se podría sugerir que dicho efecto podría deberse a los altos niveles de triglicéridos en mujeres con obesidad, aumentando así la captación y el metabolismo de ácidos grasos, incluyendo LDL oxidada en mujeres con obesidad, en comparación con mujeres de peso normal (93).

Interesantemente, se ha reportado que el sexo del feto influye en la expresión de CD36. Brass *et al.,* al estudiar placentas humanas, encontraron que en mujeres con obesidad, el nivel de expresión de CD36 era menor en fetos masculinos, sin presentar cambios en fetos femeninos, al compararlos con mujeres normopeso (124). Así lo demuestra el estudio de Reynolds *et al*. Sin embargo ellos no hallaron diferencias en la expresión de ARNm de CD36 en placentas de fetos masculinos, pero si un aumento de este transportador en las placentas de fetos femeninos proveniente de mujeres con una dieta alta en grasas (125). Estos efectos específicos del sexo pueden, al menos en parte, aludir a los mecanismos diferenciales de restricción del crecimiento fetal en la descendencia (125). Sin embargo, las placentas utilizadas en esta tesis no se categorizaron según sexo, ya que se propuso observar la globalidad del fenómeno.

Este es el primer trabajo en reportar los efectos de la suplementación con DHA sobre la expresión y/o localización de FAT/CD36 en placentas provenientes de mujeres con obesidad pregestacional, sin embargo no encontramos diferencias entre los grupos. Si se pudo observar una leve tendencia a una mayor expresión de CD36 en placenta de mujeres con obesidad pregestacional, que concordaría con los estudios de Dubé *et al.* (93) y Segura *et al.* (94), sin embargo, es necesario aumentar el número de muestras analizadas para confirmar estos hallazgos. Sin embargo, no se realizaron análisis en pos de evidenciar un cambio de su distribución en la cara materna o fetal de la placenta, según la condición fisiológica de la

madre, ya que, los análisis se centraron en las vellosidades coriónicas. Nuevas tecnologías de análisis de placas histológicas permitirían dilucidar dicha pregunta.

La suplementación con Omega-3 ciertamente posee un efecto a nivel metabólico en la placenta. Así lo indica el estudio de Calabuig-Navarro *et al*., quienes encontraron que la inflamación placentaria asociada a obesidad materna se redujo significativamente después de una suplementación diaria de 800 mg de DHA + 1.200 mg de EPA (71). En paralelo, la suplementación con Omega-3 demostró ser capaz de reducir los lípidos (expresados en mg por gramo de tejido) en un 28% en placentas de mujeres con obesidad y sobrepeso que fueron suplementadas (71).

GPR120

Los ácidos grasos pueden funcionar como moléculas de señalización, actuando a través de receptores en el citosol y la membrana celular. GPR120 es un receptor de membrana acoplado a proteína G, mediador de los efectos antiinflamatorios y sensibilidad de la insulina del ácido graso omega-3, ácido docosahexaenoico (DHA) (50).

La disfunción de GPR120 se ha encontrado asociada a la obesidad en humanos (50), ya que en individuos con esta condición los niveles de expresión de GPR120 se encuentran aumentados, por lo que se propone estaría implicado en la fisiopatología de la obesidad (50). Lo anterior también lo indican Ichimura *et al.*, quienes encontraron que los niveles de ARNm de GPR120 se incrementan en el tejido adiposo de individuos obesos comparado con el grupo control normopeso (55).

Westhoff *et al*. evidenciaron que el receptor GPR120 está presente en la placenta humana, y que su expresión de ARNm está disminuida en placentas de recién nacidos (RN) masculinos por agentes proinflamatorios como la obesidad materna e IL-6 placentario (97). En placentas de RN femeninos, GPR120 está disminuido como consecuencia de alteraciones del perfil lipídico de la madre como el colesterol y LDL (97). El estudio realizado por Lager *et al*. demostró que GPR120 se localiza predominantemente en la membrana microvellositaria del sincitiotrofoblasto de la placenta humana, y que su nivel de expresión de proteínas no se encuentra alterado por el IMC materno (50).

Otro estudio observó que el nivel proteico de GPR120 en el hígado, aumenta en ratones con una dieta alta en ácidos grasos. Específicamente, cuando los animales fueron suplementados con aceite de lino, rico en ácidos grasos omega-3 (98). En humanos aún no existe evidencia respecto a los efectos de la suplementación con DHA sobre el receptor GPR120 en tejidos placentarios provenientes de mujeres con obesidad.

Nuestros datos indican que la suplementación con DHA no induce cambios en la expresión de GPR120 incluso a dosis diferentes.

Efectos del DHA observados en el estudio

Para finalizar, las razones por las cuales en este estudio, no se obtuvieron los resultados esperados en las placentas de los grupos con obesidad pregestacional, podrían estar relacionadas a la cantidad de muestras por grupo experimental, ya que sólo se consiguió estudiar 10 placentas por grupo; por lo tanto, el aumento del n muestral podría evidenciar las diferencias entre las dosis de DHA.

Por otro lado, resulta importante resaltar las distintas dosis, la adherencia a la suplementación, y el tipo de Omega-3, ya sea solo DHA o mezclado con EPA, utilizado en los diversos ensayos clínicos, lo que se traduce en una difícil comparación de los resultados. En relación a esto, en el estudio de Calabuig-Navarro *et al.* (71), donde usaron una dosis de 800 mg de DHA, se logró reducir la inflamación provocada por la obesidad. En otro estudio, Szajewska *et al.* (86) usaron dosis más altas de DHA (920 y 1183 mg) mezclados con EPA y esta suplementación logró aumentar la duración del embarazo, reduciendo el riesgo de un embarazo prematuro. Larqué *et al.* (87) emplearon dosis de 500 mg de DHA + 150 mg de EPA y no encontraron diferencias en los niveles de expresión de CD36. Esto sugeriría que 500 mg de DHA no serían suficientes para generar cambios significativos a nivel de este transportador de ácidos grasos. Sumado a lo expuesto, se encuentra la adherencia materna a la suplementación. En este estudio se evidenció que en ambos grupos la adherencia fue cercana a un 50%. En base a lo anterior se calcula que las voluntarias del grupo experimental suplementado con 200 mg de DHA, realmente habrían consumido 100 mg de DHA, este

valor está por debajo de lo recomendado para mujeres en periodo de gestación y podría no hacer efecto. En el caso de las pacientes suplementadas con 800 mg de DHA su consumo efectivo pudo ser de 400 mg, y esta dosis tampoco logró reducir la frecuencia de estos hallazgos histológicos. Esto indica que una suplementación con dosis cercanas a los 400 mg de DHA, el consumo real máximo de este estudio, no parecen ser suficientes para lograr reducir los efectos provocados por la obesidad.

Directamente relacionado a lo planteado anteriormente, se encuentra la dieta materna. Actualmente la dieta occidental presenta una relación omega-6/omega-3 de 10-20:1, muy distante del 1-2:1 que según estudios mantenían nuestros antepasados cazadores recolectores y que sería la óptima. Esto se traduce en una alimentación sobrecargada a las grasas saturadas, cereales, ácidos grasos omega-6 y ácidos grasos trans, y una disminución en la ingesta de fibra y ácidos grasos omega-3 (126). Esto conlleva a un estado proinflamatorio propio de la obesidad, y a otras importantes alteraciones metabólicas (127). Si analizamos la situación, es probable que estas mujeres hayan mantenido su nociva alimentación, lo que sumado a la baja adherencia a la suplementación, es poco el efecto que podría ocasionar el DHA, lo que se reflejaría en la ausencia de cambios en los resultados. Lamentablemente en este estudio no se realizó una encuesta de alimentación que nos pudiera ayudar a dilucidar este tema.

En el caso del receptor GPR120 la ausencia de cambios podría deberse, además de lo comentado anteriormente, a la afinidad del receptor por este ácido graso omega-3, sin embargo, son conjeturas que deben ser investigadas para su corroboración ya que no existen reportes relacionados a este tema.

Finalmente, debemos mencionar la implicancia del sexo del feto en la función placentaria. Evans *et al.* mencionan que la placenta humana presenta dimorfismo sexual en respuesta a entornos adversos, han reportado que los fetos masculinos se caracterizan por presentar mayores desenlaces adversos al compararlos con fetos femeninos, potencialmente debido a la disminución de defensas antioxidantes en situaciones como la obesidad (128). Otros autores como O'Tierney *et al.* han mencionado que los fetos femeninos son menos influenciables que los fetos masculinos por variaciones en la dieta materna, ganancia de peso y composición corporal (129). Junto a esto, observaron que en fetos masculinos hay menores

niveles de ácidos grasos omega-3 (129). Los resultados del estudio podrían tener relación con lo mencionado anteriormente, ya que en el grupo de madres suplementadas con 200 mg de DHA, 8 de las placentas corresponden a fetos femeninos, por lo que la ausencia de efecto por parte del DHA podría guardar relación con que la mayoría de las placentas corresponden a fetos femeninos, y éstos podrían reaccionar en menor medida a las variaciones en la dieta de la madre. En el caso de las placentas correspondientes al grupo de madres suplementadas con 800 mg de DHA, sólo 4 placentas corresponden a fetos femeninos; por lo que futuras investigaciones deben diseñarse con un número suficiente de muestras que permitan la evaluación de la posible diferencia entre sexos de los efectos inducibles por la suplementación con DHA.

CAPÍTULO 8: CONCLUSIÓN

Este estudio quiso evaluar si existía algún cambio dosis dependiente de DHA sobre los hallazgos encontrados en la placenta por efecto de la obesidad. Nuestros resultados dieron a conocer que a nivel histológico, efectivamente las placentas de mujeres con obesidad pregestacional presentaron una mayor frecuencia de los cambios morfológicos mencionados anteriormente. Sin embargo no se observaron los cambios esperados en los niveles de expresión de FAT/CD36 y del receptor GPR120.

Concluimos, también, que dentro del marco estudiado en este proyecto, aparentemente el DHA no conlleva ningún beneficio a nivel placentario, ya que los resultados demuestran que se mantienen las alteraciones provocadas por la obesidad materna. Sin embargo, puede ser que su efecto no sea evidente por fallas en el diseño del estudio, que se detallan a continuación.

8.1 Limitaciones

Una de las limitaciones de este proyecto de investigación se relaciona con los grupos experimentales, ya que se contó con un grupo control sin suplementación con DHA, sin embargo, no se pudo tener un segundo grupo control que sí tuviera una suplementación con DHA para establecer una comparación entre mujeres normopeso que ayudara a esclarecer los posibles efectos de este ácido graso omega-3, independientemente del estado nutricional materno. Además, dentro del diseño del estudio no se consideró un grupo de madres con obesidad sin suplementación con DHA, debido a estimaciones de que el nivel de DHA de 200 mg/día es fácil de alcanzar con una dieta adecuada. Sin embargo, su inclusión podría haber contribuido a establecer una mejor comparación con los grupos que sí tuvieron suplementación, para profundizar y aclarar si los cambios son realmente significativos en los casos de obesidad.

Una segunda limitación, se relaciona con la cantidad de muestras por grupo experimental, ya que se consiguió estudiar 10 placentas por grupo. Sin embargo, se hace necesario tener en cuenta el estudio de un mayor número de muestras de manera tal que

futuras investigaciones aporten a los resultados de esta tesis y se logre que sean más representativos.

Por último, como otra limitación se tiene en conocimiento que la adherencia al tratamiento (suplementación con 200 y 800 mg de DHA) fue del 50%, por lo tanto, las mujeres con obesidad pregestacional realmente consumieron la mitad de la suplementación necesaria para esta investigación. Respecto a lo anterior, se podría sugerir que la dosis de suplementación no fue suficiente para generar cambios significativos, y para posibles futuras investigaciones se debe tener en consideración este factor.

8.2 Proyecciones

Finalmente, cabe mencionar que Seidman *et al.* estudiaron placentas y demostraron la importante asociación diagnóstica del fenotipo endotelial CD15 con la inmadurez vellositaria, ya que reportaron que la maduración fetoplacentaria al final del embarazo se correlaciona con la desaparición de la inmunomarcación de CD15 en los vasos placentarios (123). Estos hallazgos podrían suponer un diagnóstico más preciso y acertado de la inmadurez vellositaria en placentas de mujeres con embarazos riesgosos o complicados con alguna patología.

Dentro de las proyecciones se hace necesario realizar un análisis y estudio más profundo de las alteraciones en la placenta provocadas por la obesidad materna, ya que es el órgano fundamental para el desarrollo del feto y todo lo ocurrido en la madre se ve reflejado en este órgano por lo que es fundamental su estudio a cabalidad. Esto debido a que existe poca información sobre los cambios morfológicos estudiados en este proyecto y sobre posibles otras modificaciones que generen riesgos para la salud de la madre y el recién nacido. Junto a esto, se podría realizar el estudio de otros transportadores de ácidos grasos involucrados en el metabolismo de la placenta y también, la utilización de otras técnicas complementarias.

Además, este estudio muestra por primera vez los efectos del DHA en distintas dosis sobre las vellosidades coriónicas de placentas provenientes de madres con obesidad, tanto en

su morfología como en el nivel de expresión de FAT/CD36 y GPR120. A pesar de que los resultados no fueron los esperados, este proyecto abre una línea de investigación en la que se pueda abarcar el estudio y análisis de otros tipos de terapias e intervenciones enfocadas en la dieta y ejercicio, que puedan ayudar al entendimiento y mejoramiento de la calidad de vida de mujeres que cursan un embarazo con obesidad, además de estudios enfocados en otros mecanismos y factores metabólicos que pudieran verse influenciados con esta patología.

CAPÍTULO 9: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moreno M. Definición y clasificación de la obesidad. Rev Médica Clínica Las Condes. Elsevier; 2012;23(2):124–8. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0716864012702882.
2. Atalah E. Epidemiología de la obesidad en chile. Rev Med Clin Condes. 2012;23(2):117–23. Available from: http://www.clc.cl/Dev_CLC/media/Imagenes/PDF revista m?dica/2012/2 marzo/Dr_Atala-3.pdf
3. Malo-serrano M, Castillo N, Pajita D. La obesidad en el mundo Obesity in the world. An Fac Med. 2017;78(2):173–8.
4. Petermann F, Duran E, Labraña A, Martínez M, Leiva A, Garrido-Méndez A, et al. Factores asociados al desarrollo de obesidad en Chile: resultados de la Encuesta Nacional de Salud 2009-2010. Red Med Chile. 2017;145:716–22.
5. López JC, González-García L. Enfermedades asociadas a la obesidad. Rev Endocrinol y Nutr. 2001;9(2):77–85. Available from: http://www.medigraphic.com/pdfs/endoc/er-2001/er012g.pdf
6. Labatut, B. FAO/OPS: sobrepeso afecta a casi la mitad de la población de todos los países de América Latina y el Caribe salvo por Haití. Chile: Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe; 2017. Disponible en: http://www.fao.org/americas/noticias/ver/es/c/463396/.
7. Departamento de Epidemiología. ENCUESTA NACIONAL DE SALUD 2016-2017. Chile: 2017.
8. Ministerio de Salud de Chile, Encuesta Nacional de Salud 2009-2010, 2010.
9. Ministerio de Salud de Chile, estado nutricional 2009-2010, 2010. Disponible en: http://deis.minsal.cl/ev/en
10. Garmendia M, Alonso F, Kain J, Uauy R, Corvalan C. Alarming weight gain in women of a post-transitional country. Public Health Nutr. 2013;17(3):667–73.
11. Raimann X. Obesidad y sus complicaciones. Rev Médica Clínica Las Condes. 2011;22(1):20–6.

12. Soca PE, Peña AN. Consecuencias de la Obesidad. Acimed. 2009;20(4):84–92. Available from: http://scielo.sld.cu/pdf/aci/v20n4/aci061009.pdf
13. Cabrerizo L, Rubio MA, Ballesteros MD, Moreno C. Revisión Complicaciones asociadas a la obesidad. Rev Esp Nutr Comunitaria. 2008;14(3):156–62. Available from: http://www.fesnad.org/resources/files/Publicaciones/RevNutCom/4.pdf
14. Pizzi R, Fung L. Obesidad y mujer. Rev Obstet Ginecol Venez. 2015;75(4):221–4.
15. Riobó P, Fernández B, Kozarcewski M, Fernández J. Obesidad En La Mujer. Nutr Hosp. 2003;18(5):233–7.
16. Espich MM. Consecuencias de la obesidad en la reproducción y en el embarazo. Rev Esp Méd Quir. 2010;27(4):302–9.
17. Pacheco-Romero J. Gestación en la mujer obesa: consideraciones especiales. An la Fac Med. 2017;78(2):103. Available from: http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/anales/article/view/13219
18. Lozano A, Betancourth W, Turcios L, Cueva J, Ocampo D, Portillo C, et al. Sobrepeso y Obesidad en el Embarazo: Complicaciones y Manejo. iMedPub. 2016;12(3):1–7.
19. González-Moreno J, Juárez-López J, Rodríguez-Sánchez J. Obesidad y embarazo. Rev Med (Puebla). 2013;4(4):269–75. Available from: www.revistamedicamd.com
20. De la Calle M, Armijo O, Martín E, Sancha M, Magdaleno F, Omeñaca F, et al. Sobrepeso Y Obesidad Pregestacional Como Factor De Riesgo De Cesárea Y Complicaciones Perinatales. Rev Chil Obstet Ginecol. 2009;74(4):233–8.
21. Barrera C, Germain A. Obesidad y Embarazo Obesity and Pregnancy. Rev Med Clin Condes. 2012;23(2):154–8.
22. Farías M. Obesidad materna: severo problema de salud pública. Rev Chilena Obstet y Ginecol. 2013;78(6):409–12.
23. Araya Bannout MA, Padilla O, Garmendia ML, Atalah E, Uauy R. Obesidad en mujeres chilenas en edad fértil. Rev Med Chil. 2014;142(11):1440–8.
24. Mockus I. Obesidad y peso al nacer. Rev Fac Med Univ Nac Colomb. 2007;55(1):1–3.
25. Aguilar-Cordero M, Baena L, Sánchez-López A. Nutrición Hospitalaria. Nutr Hosp. 2016;33(5):18–23.

26. Lepe M, Bacardí Gascón M, Castañeda-González LM, Pérez Morales ME, Jiménez Cruz A. Efecto de la obesidad materna sobre la lactancia: Revisión sistemática. Nutr Hosp. 2011;26(6):1266–9.

27. Barrera R, Fernández LA. Programación metabólica fetal. Perinatol y Reprod Humana. 2015;29(3):99–105. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.rprh.2015.12.003

28. Rodriguez-Cortés Y, Mendieta-Zerón H. La placenta como órgano endocrino compartido y su acción en el embarazo normoevolutivo. Rev Med e Investig. 2014;2(1):28–34. Available from: http://www.uaemex.mx/RevMedInvUAEMex/docs/Vol2Num1/LA_PLACENTA_COMO_ORGANO.PDF

29. Avagliano L, Massa V, Bulfamante G. Histology of Human Placenta. En: Histopathology. 2016. p. 1–15.

30. Huppertz B. The anatomy of the normal placenta. J Clin Pathol. 2008;61(12):1296–302

31. Cunningham, F., Leveno, K., Bloom, S., Hauth, J., Rouse, D., Spong, C. Williams Obstetricia. 23ª edición. México: McGraw-Hill; 2011

32. Rampersad R, Cervar-zivkovic M, Nelson DM. Development and Anatomy of the Human Placenta. En: The Placenta: From Development to Disease. 2011. p. 18–26.

33. Gartner L, Hiatt J. Atlas Color de Histología. 4ª edición. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana; 2006.

34. Kierszenbaum, A. Histología y Biología Celular: Introducción a la anatomía patológica. 2ª edición. Nueva York: Elsevier; 2008.

35. Young B, O'Dowd G, Woodford P. Wheater Histología Funcional: Texto y atlas en color. 6ª edición. España: Elsevier; 2014.

36. Gartner L, Hiatt J. Texto Atlas de Histología. 2ª edición. México: McGraw-Hill; 2002.

37. Sadler, T. Langman: Embriología Médica. 13ª edición. Barcelona: Wolters Kluwer; 2016.

38. Purizaca-Benites M. La placenta y la barrera placentaria. Rev Per Ginecol Obs. 2008;54:270–278.
39. Maltepe E, Penn A. Development, Function, and Pathology of the Placenta. 10ª edición. Fetal Growth and Development. Elsevier Inc; 2017. 40-60 p.
40. Zakowski MI, Herman NL. The Placenta: Anatomy, Physiology, and Transfer of Drugs. En: Chestnut's Obstetric Anesthesia: Principles and Practice. 2012. p. 55–72.
41. Acevedo S, Espino y Sosa S, Gallardo J, Velásquez B, Camargo L, Guzmán M. La placenta humana: Revisión. Perinatol Reprod Hum. 2008;22:230–45.
42. Gude N, Roberts C, Kalionis B, King R. Growth and function of the normal human placenta. Thromb Res. 2004;114:397–407.
43. Johns E, Denison F, Reynolds R. The impact of maternal obesity in pregnancy on placental glucocorticoid and macronutrient transport and metabolism. Mol Basis Dis. 2018;1–10. Available from: https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.12.025
44. Knipp GT, Audus KL, Soares MJ. Nutrient transport across the placenta. Elsevier. 1999;38:41–58.
45. Lewis R, Desoye G. Placental Lipid and Fatty Acid Transfer in Maternal Overnutrition. Ann Nutr Metab. 2017;70:228–31.
46. Duttaroy AK. Transport of fatty acids across the human placenta: A review. Prog Lipid Res. 2009;48(1):52–61. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2008.11.001
47. Haggarty P. Placental Regulation of Fatty Acid Delivery and its Effect on Fetal Growth A Review. Placenta. 2002;23(16):28–38.
48. Pepino M, Kuda O, Samovski D, Abumrad N. Structure-Function of CD36 and Importance of Fatty Acid Signal Transduction in Fat Metabolism. Annu Rev Nutr. 2014;34:281–303.
49. Brett KE, Ferraro ZM, Yockell-lelievre J, Gruslin A, Adamo KB. Maternal-Fetal Nutrient Transport in Pregnancy Pathologies: The Role of the Placenta. Int J Mol Sci. 2014;15:16153–85.
50. Lager S, Ramirez V, Gaccioli F, Jansson T, Powell T. Expression and localization of the omega-3 fatty acid receptor GPR120 in human term placenta. Placenta. 2014;35(7):523–5.

51. Oh DY, Walenta E. Omega-3 fatty acids and FFAR4. Front Endocrinol. 2014;5:1–7
52. Zhang D, Sing Leung P. Potential roles of GPR120 and its agonists in the management of diabetes. Drug Des Devel Ther. 2014;8:1013–27
53. Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H. GPR120 is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-Inflammatory and Insulin Sensitizing Effects. 2011;142(5):687–98.
54. Huang J, Xue M, Zhang J, Yu H, Gu Y, Du M, et al. Protective role of GPR120 in the maintenance of pregnancy by promoting decidualization via regulation of glucose metabolism. EBioMedicine. 2019;39:540–51. Available from: https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.12.019
55. Ichimura A, Hirasawa A, Poulain O, Bonnefond A, Hara T, Yengo L, et al. Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. Nature. 2012;483:1–8.
56. Liu H, Wang W, Xu Z, Liu C, He D. FFA4 receptor (GPR120): A hot target for the development of anti-diabetic therapies. Eur J Pharmacol. 2015;763:160–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.06.028
57. Castellanos L, Rodríguez M. El efecto de omega 3 en la salud humana y consideraciones en la ingesta. Rev Chil Nutr. 2015;42(1):90–5.
58. Hudson B, Shimpukade B, Milligan G, Ulven T. The molecular basis of ligand interaction at free fatty acid receptor 4 (FFA4/GPR120). J Biol Chem. 2014;289(29):20345–58.
59. Ovalle A, Barriga T, Kakarieka E. ¿Se relaciona la obesidad en el embarazo con muerte fetal por insuficiencia placentaria? Rev Chil Obs Ginecol. 2017;82(6):614–20.
60. Wallace JM, Horgan GW, Bhattacharya S. Placental weight and efficiency in relation to maternal body mass index and the risk of pregnancy complications in women delivering singleton babies. Placenta. 2012;33(8):611–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2012.05.006.
61. Treesh S, Khair N. Histological Changes of the Human Placenta in Pregnancies Complicated with Diabetes. J Cytol Histol. 2015;6(2):1–7.

62. Gheorman L, Pleşea IE, Gheorman V. Histopathological considerations of placenta in pregnancy with diabetes. Rom J Morphol Embryol. 2012;53(2):329–36.
63. Loardi C, Falchetti M, Prefumo F, Facchetti F, Frusca T. Placental morphology in pregnancies associated with pregravid obesity. J Matern Neonatal Med. 2016;29(16):2611–6.
64. Swanson D, Block R, Mousa SA. Omega-3 Fatty Acids EPA and DHA: Health Benefits Throughout Life. Adv Nutr. 2012;3:1–7.
65. Garmendia M, Corvalán C, Casanello P, Araya M, Flores M, Bravo A, et al. Effectiveness on maternal and offspring metabolic control of a home-based dietary counseling intervention and DHA supplementation in obese/ overweight pregnant women (MIGHT study): A randomized controlled trial—Study protocol María. Contemp Clin Trials. 2018;70:35–40. Available from: https://doi.org/10.1016/j.cct.2018.05.007
66. Leyva-Rendón A. DHA y funcionamiento cerebral: ¿Cuáles son los beneficios? Rev Mex Neuroci. 2011;12(6):365–72.
67. Valenzuela R, Tapia G, González M, Valenzuela A. Omega-3 fatty acids (EPA and DHA) and its application in diverse clinical situations. Rev Chil Nutr. 2011;38:1–12.
68. Farías M, Poblete J, Carvajal J. La suplementación materna con ácido docosahexaenoico (DHA) carece de beneficio clínicamente significativo. Rev Chil Obs Ginecol. 2012;77(5):355–66.
69. Valenzuela A, Nieto MS. Docosahexaenoic acid (DHA) in fetal development and in infant nutrition. RevMedChil. 2001;129(0034-9887):1203–11.
70. Koletzko B, Cetin I, Brenna J. Dietary fat intakes for pregnant and lactating women. Br J Nutr. 2007;98:873–7.
71. Calabuig-Navarro V, Puchowicz M, Glazebrook P, Haghiac M, Minium J, Catalano P, et al. Effect of n-3 supplementation on placental lipid metabolism in overweight and obese women. Am J Clin Nutr. 2016;103(4):1–9.
72. Leghi G, Muhlhausler B. The effect of n-3 LCPUFA supplementation on oxidative stress and inflammation in the placenta and maternal plasma during pregnancy. Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids. 2016;113:33–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.plefa.2016.08.010

73. Katan MB, De JP, Birgelen APJM Van, Penders M, Zegwaard M. Kinetics of the incorporation of dietary fatty acids into serum cholesteryl esters, erythrocyte membranes, and adipose tissue: an 18-month controlled study. J Lipid Res. 1997;38:2012–22.
74. Lewis RM, Childs CE, Calder PC. New perspectives on placental fatty acid transfer. Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids. 2018;138:24–9. Available from: https://doi.org/10.1016/j.plefa.2018.10.001
75. Gil-Campos M, Dalmau J. Importancia del Ácido docosahexaenoico (DHA): funciones y recomendaciones para su ingesta en la infancia. An Pedriatr. 2010;73(3):1–8.
76. Risco E. Importancia del DHA en el embarazo y la lactancia. España: Barcelona IVF; 2016. Disponible en: https://barcelonaivf.com/dha-en-el-embarazo-y-la-lactancia/
77. Makrides M, Ra G, Aj M, Yelland L, Quinlivan J, Ryan P. Efecto de la suplementación con DHA durante el embarazo en depresión materna y neurodesarrollo de niños jóvenes: un estudio randomizado controlado. REV CHIL Obs GINECOL. 2010;75(6):422–4.
78. Kris-etherton PM, Grieger JA, Etherton TD. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids Dietary reference intakes for DHA and EPA. Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids. 2009;81:99–104. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.plefa.2009.05.011
79. Haghiac M, Yang X, Presley L, Smith S, Dettelback S. Dietary Omega-3 Fatty Acid Supplementation Reduces Inflammation in Obese Pregnant Women: A Randomized Double-Blind Controlled Clinical Trial. PLoS One. 2015;10(9):1–14.
80. White PJ, Marette A. Is omega-3 key to unlocking inflammation in obesity? Diabetologia. 2006;49:1999–2001.
81. Lombardo YB, Chicco AG. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review. J Nutr Biochem. 2006;17(1):1–13.
82. Hendrich S. (n-3) Fatty Acids: Clinical Trials in People with Type 2 Diabetes. Adv Nutr. 2010;1:3–7.

83. Basu S, Haghiac M, Surace P, Challier J, Guerre-millo M, Singh K, et al. Pregravid Obesity Associates With Increased Maternal Endotoxemia and Metabolic Inflammation. Obesity. 2011;19(3):476–82. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/oby.2010.215/nature06264
84. Challier JC, Basu S, Bintein T, Minium J, Hotmire K, Catalano PM, et al. Obesity in Pregnancy Stimulates Macrophage Accumulation and Inflammation in the Placenta. Placenta. 2008;29(3):274–81.
85. Delhaes F, Giza SA, Koreman T, Eastabrook G, Mckenzie CA, Bedell S, et al. Altered maternal and placental lipid metabolism and fetal fat development in obesity: Current knowledge and advances in non-invasive assessment. Placenta [Internet]. 2018;69:118–24. Available from: https://doi.org/10.1016/j.placenta.2018.05.011.
86. Szajewska H, Horvath A, Koletzko B. Effect of n – 3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation of women with low-risk pregnancies on pregnancy outcomes and growth measures at birth: a meta-analysis of randomized controlled. Am J Clin Nutr. 2006;83:1337–44.
87. Larqué E, Krauss-etschmann S, Campoy C, Hartl D, Linde J, Klingler M. Docosahexaenoic acid supply in pregnancy affects placental expression of fatty acid transport proteins. Am J Clin Nutr. 2006;84(1):853–61.
88. Helman T, Sinclair A, Simmer K, Koletzko B, Gibson R, D'Vaz N, et al. Omega-3 Fatty Acids for Maternal and Infant Health and Development. Sci Consens Work. 2009.
89. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and A (NDA). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. EFSA J. 2010;8(3):1–107.
90. Valenzuela A, Sanhueza C. Aceites de origen marino; su importancia en la nutrición y en la ciencia de alimentos. Rev Chil Nutr. 2009;36(3):246–57.
91. Koletzko B, Lien E, Agostoni C, Böhles H, Campony C, Cetin I, et al. The roles of long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy: review of current knowledge and consensus. J Perinat Med. 2008;36(1):5–14.

92. Lewis RM, Wadsack C, Desoye G. Placental fatty acid transfer. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2018;21(2):78–82.
93. Dubé E, Gravel A, Martin C, Desparois G, Moussa I, Ethier-Chiasson M, et al. Modulation of Fatty Acid Transport and Metabolism by Maternal Obesity in the Human Full-Term Placenta. Biol Reprod. 2012;87(1):1–11.
94. Segura M, Demmelmair H, Krauss-etschmann S, Nathan P, Dehmel S, Padilla M, et al. Maternal BMI and gestational diabetes alter placental lipid transporters and fatty acid composition. Placenta. 2017;57:144–51. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2017.07.001
95. Larque E, Ruiz-Palacios M, Koletzko B. Placental regulation of fetal nutrient supply. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2013;16(3):292–7.
96. Zhu M, Ma Y, Long N, Du M, Ford S. Maternal obesity markedly increases placental fatty acid transporter expression and fetal blood triglycerides at midgestation in the ewe. AJP Regul Integr Comp Physiol. 2010;299(5):1224–31. Available from: http://ajpregu.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpregu.00309.2010
97. Westhoff G, Grayson B, Barker D, Morris C, Thornburg K, O'Tierney P. The expression of the omega-3 fatty acid receptor, GPR120, is more sensitive to inflammatory cytokines and maternal obesity in male infants than in females. Am J Obstet Gynecol Suppl. 2012;1. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2011.10.840
98. Gaspar RC, Veiga CB, Pereira M, Dátilo MN, Ramos M, Ana S, et al. Unsaturated Fatty Acids from Flaxseed oil and exercise modulate GPR120 but not GPR40 in the liver of Obese Mice: A new anti- inflammatory approach. J Nutr Biochem. 2018;66:52–62. Available from: https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.12.003.
99. Castejón O, Pérez M. The Placental Villi During Chronic Hypertension. J Emerg Rare Dis. 2018;1(2):1–5.
100. Scallan J, Huxley V, Korthuis R. Capillary Fluid Exchange: Regulation, Functions, and Pathology. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010.
101. Amoakoh-coleman M, Ogum-alangea D, Modey-amoah E. Blood pressure patterns and body mass index status in pregnancy : An assessment among women

reporting for antenatal care at the Korle-Bu Teaching hospital , Ghana. PLoS ONE 12. 2017;9(12):1–13.

102. Savitri AI, Zuithoff P, Browne JL, Amelia D, Baharuddin M, Grobbee DE, et al. Does pre-pregnancy BMI determine blood pressure during pregnancy ? A prospective cohort study. BMJ Open. 2016;6:1–8.

103. Sarno L, Maruotti GM, Saccone G, Morlando M, Sirico A, Martinelli P. Maternal body mass index influences umbilical artery Doppler velocimetry in physiologic pregnancies. Prenat Diagn. 2014;35:125–8.

104. Shen-schwarz S, Brownb D. Villous Oedema of the Placenta: A Clinicopathological Study. Placenta. 1989;10:297–307.

105. Roberts KA, Riley SC, Reynolds RM, Barr S, Evans M, Statham A, et al. Placental structure and inflammation in pregnancies associated with obesity. Placenta. 2011;32(3):247–54. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2010.12.023

106. Naeye R, Maisels J, Lorenz R, Botti J. The Clinical Significance of Placental Villous Edema. Pediatrics. 1983;71(4):588–96.

107. Cortés H, Muñoz H. Utilidad clínica del estudio anatomo- patológico de la placenta en el hospital universitario san vicente de paúl. Rev Colomb Obstet Ginecol. 2007;58(1):60–4.

108. De la Ossa M, Cabello-Inchausti B, Robinson M. Placental Chorangiosis. Arch Pathol Lab Med. 2001;125:1258.

109. Altshuler G. Chorangiosis. An important placental sign of neonatal morbidity and mortality. Arch Pathol Lab Med. 1984; 108(1):71-74.

110. Stanek J. Chorangiosis of Chorionic Villi. Arch Pathol Lab Med. 2016;140:588–93.

111. Petersen SS, Khangura R, Davydov D, Zhang Z, Sangha R. Placental Chorangiosis: Increased Risk for Cesarean Section. Case Rep Obstet Gynecol. 2017;2017:1–5.

112. González M, Fargueta J, González C, Jiménez B. Muerte perinatal en una gestación múltiple asociada a corangiosis placentaria. An Pediatr. 2006;65(6):632–3.

113. Helske S, Vuorela P, Carpén O, Hornig C, Weich H, Halmesmäki E. Expression of vascular endothelial growth factor receptors 1 , 2 and 3 in placentas from normal and complicated pregnancies. Mol Hum Reprod. 2001;7(2):205–10.

114. Soma H, Murai N, Tanaka K, Oguro T, Kokuba H, Fujita K, et al. Angiogenesis in villous chorangiosis observed by ultrastructural studies. Med Mol Morphol. 2013;46:77–85.

115. Berceanu C, Tetileanu A, Ofiteru A, Bratila E, Mehedintu C, Voicu N, et al. Morphological and ultrasound findings in the placenta of diabetic pregnancy. Rom J Morphol Embryol. 2018;59(1):175–86.

116. Brouwers L, Franx A, Vogelvang TE, Houben ML, Rijn BB Van, Nikkels PGJ. Association of Maternal Prepregnancy Body Mass Index With Placental Histopathological Characteristics in Uncomplicated Term Pregnancies. Pediatr Dev Pathol. 2019;22(1):45–52.

117. Castejon O, Lopez A. Syncytial Cell Surface of Placental Villi Associate with Obesity. Cell Cell Life Sci J. 2018;3(2):1–6.

118. Baergen RN. Manual of Pathology of the Human Placenta, 2ª ed. New York: Springer, 2011.

119. Redline RW. Distal villous immaturity. Diagnostic Histopathol. 2012;18(5):189–94. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.mpdhp.2012.02.002

120. Treacy A, Higgins M, Kearney J, McAuliffe F, Mooney E. Delayed Villous Maturation of the Placenta: Quantitative Assessment in Different Cohorts. Pediatr Dev Pathol. 2013;16:63–6.

121. Bukowski R, Hansen NI, Pinar H, Willinger M, Reddy UM, Parker CB, et al. Altered fetal growth, placental abnormalities, and stillbirth. PLoS ONE 12. 2017;8:1–27.

122. Dubova EA, Pavlov KA, Borovkova EI, Bayramova MA, Makarov IO, Shchegolev AI. Vascular Endothelial Growth Factor and its Receptors in the Placenta of Pregnant Women with Obesity. Morphol Pathomorphology. 2011;151(2):253–8.

123. Seidmann L, Suhan T, Kamyshanskiy Y, Nevmerzhitskaya A, Gerein V, Kirkpatrick CJ. CD15 A new marker of pathological villous immaturity of the term

placenta. Placenta. 2014;35(11):925–31. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2014.07.018

124. Brass E, Hanson E, O'Tierney P. Placental oleic acid uptake is lower in male offspring of obese women. Placenta. 2013;34(6):1–15.

125. Reynolds CM, Vickers MH, Harrison CJ, Segovia SA, Gray C. Maternal high fat and/or salt consumption induces sex- specific inflammatory and nutrient transport in the rat placenta. Physiol Rep. 2015;3(5):1–10.

126. Simopoulos AP. Evolutionary Aspects of Diet: The Omega-6 / Omega-3 Ratio and the Brain. Mol Neurobiol. 2011;44(2):203–15.

127. Simopoulos AP. Importance of the Omega- 6/Omega- 3 Balance in Health and Disease: Evolutionary Aspects of Diet. World Rev Nutr Diet. 2011;102:10–21.

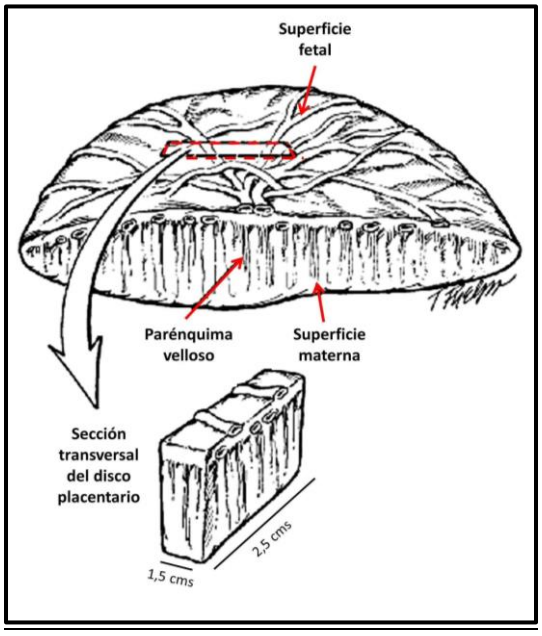
128. Evans L, Myatt L. Sexual dimorphism in the effect of maternal obesity on antioxidant defense mechanisms in the human placenta. Placenta. 2017;51:64–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2017.02.004

129. O'Tierney-ginn P, Gillingham M, Fowler J, Brass E, Marshall NE, Thornburg KL. Maternal Weight Gain Regulates Omega-3 Fatty Acids in Male, Not Female, Neonates: A Cross-Sectional Study. Reprod Sci. 2017;24(4):560–7. Available from: https://doi.org/10.1177/1933719116660843

CAPÍTULO 10: APÉNDICE

Anexo 1: Toma de muestras

1. Colocar la placenta con el lado fetal hacia arriba sobre una bandeja de disección pre enfriada.
2. Cortar el cordón umbilical a 1 cm de la base, medir y guardar a 4ºC si es necesario.
3. Cortar el amnios y descartar.
4. Pesar y fotografiar la placenta por ambas caras.
5. Medir la placenta en 3 dimensiones (largo x ancho x alto).
6. Colocar la placenta con el lado fetal hacia arriba y ubicar 3 sitios representativos.
7. De estos, tomar un trozo transversal de 1.5 x 2.5 cm que abarque todas las capas de la placenta (placa coriónica, trofoblasto y decidua)
8. Depositar los 3 trozos en un vaso precipitado con 100 ml de PBS 1x frío y lavar.
9. Repetir el paso anterior 2 veces más o hasta que se haya eliminado la sangre por completo.
10. Colocar los trozos en un frasco de polipropileno tapa rosca con 250 ml de Formalina 10% tamponada.
11. Mantener las muestras en formalina hasta su inclusión (máximo 72 hrs).



Identificación y etiquetado de las muestras

Para trabajar con las muestras de placenta, éstas fueron clasificadas de la siguiente manera:

- Grupo Normal: **N**
- Grupo Obesa 12: **O12**
- Grupo Obesa 13: **O13**

Cada placenta se enumeró del -1 al -10, y cada muestra del .1 al .3.

Ejemplo: O12-4.1, O12-4.2, O12-4.3. Grupo Obesa 12 - Placenta número 4 con tres muestras.

Los frascos con muestras en formalina serán recepcionados en el laboratorio. Estos llegarán identificados con el nombre del grupo de estudio y el número de placenta.

Los cassette deben identificarse con el nombre del grupo de estudio, el número de la placenta y el número de muestra. Este último fue designado de manera aleatoria.

Anexo 2: Deshidratación, aclaramiento e impregnación

Deshidratación

Etanol 70º	30 minutos
Etanol 80º	30 minutos
Etanol 95º I	30 minutos
Etanol 95º II	30 minutos
Etanol 100º I	30 minutos
Etanol 100º II	30 minutos
Etanol 100º III	30 minutos

Aclaramiento

Xilol I	15 minutos
Xilol II	15 minutos
Xilol III	15 minutos

Impregnación

Parafina I	30 minutos
Parafina II	30 minutos
Parafina III	30 minutos

Anexo 3: Corte

1. Realizar cortes de 4 μm de espesor en micrótomo (Leitz, Wetzlar).
2. Colocar los cortes en el baño estirado a 40ºC
3. Tomar un corte y adherirlo a un portaobjeto tratado con polilisina, para la tinción de Hematoxilina-Eosina
4. Tomar dos cortes y adherirlos a un portaobjetos con carga para la técnica de Inmunohistoquímica. Un corte se utiliza para la técnica y el segundo corte como control negativo.
5. Secar en estufa a 60ºC durante 1 hora.

Anexo 4: Tinción de rutina Hematoxilina-Eosina

1. Desparafinación
    a- Xilol I (10 min)
    b- Xilol II (10 min)
    c- Xilol III (10 min)
2. Rehidratación:
    a- Alcohol 100º (10 min)
    b- Alcohol 100º (10 min)
    c- Alcohol 95º (10 min)
    d- Alcohol 70º (10 min)
3. Lavado en agua destilada (10 min)
4. Tinción nuclear con Hematoxilina de Harris durante 30 segundos.
5. Viraje en agua corriente (10 min)
6. Alcohol 95º (5 min)
7. Eosina alcohólica, durante 4 segundos.
8. Deshidratación:
    a- Alcohol 95º (5 min)
    b- Alcohol 100º (5 min)
    c- Alcohol 100º (5 min)
    d- Alcohol/Xilol (5 min)
9. Aclaramiento:
    a- Xilol (5 min)
    b- Xilol (5 min)
10. Cubrir con medio de montaje hidrófobo.

Anexo 5: Protocolo inmunohistoquímica anti-CD36

1. Desparafinación:
   a- Xilol I (10 min)
   b- Xilol II (10 min)
   c- Xilol III (10 min)
2. Rehidratación:
   a- Alcohol 100º (10 min)
   b- Alcohol 100º (10 min)
   c- Alcohol 95º (10 min)
   d- Alcohol 70º (10 min)
3. Lavado en agua destilada (10 min)
4. Recuperación antigénica en buffer citrato durante 15 minutos en vaporera (Oster) (calentar buffer previamente durante 20 minutos). Luego enfriar a temperatura ambiente con las placas en el buffer durante 15 minutos.
5. Lavado en agua destilada (10 min)
6. 3 cambios en PBS 1X, 5 min cada uno.
7. Bloqueo de peroxidasa endógena con H2O2 (30%) al 3% en PBS 1X durante 30 minutos.
8. 3 cambios en PBS 1X, 5 min cada uno.
9. Bloqueo de sitios inespecíficos:
   a- Aplicar Cas-Block (Invitrogen, 008120) durante 30 minutos a temperatura ambiente.
   b- Aplicar suero de cabra durante 30 minutos a temperatura ambiente.
10. Incubación del anticuerpo primario anti-CD36 (Policlonal, PA1-16813, Thermo Fisher) en PBS/Tween20 en dilución 1:100, durante la noche a 4ºC.
11. 3 cambios en PBS 1X, 5 min cada uno.
12. Incubación con anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (Jackson Inmunoresearch, 111-035-003), hecho en cabra en dilución 1:500 en PBS 1X pH 7.2 durante 1 hora.
13. 3 cambios en PBS 1X, 5 min cada uno.
14. Revelado cromogénico con NovaRed kit (Vector, SK-4800) durante 2’ y 30” de acuerdo con la siguiente proporción:

Agua destilada	1	2	3	H2O2
2,5 ml	75 µl	50 µl	50 µl	50 µl
1,25 ml	38 µl	25 µl	25 µl	25 µl
625 µl	19 µl	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl
313 µl	9,5 µl	6,25 µl	6,25 µl	6,25 µl

15. Lavado en agua destilada (5 min)
16. Contraste con Hematoxilina de Harris (10-15 segundos)
17. Viraje en agua corriente (10 min)
18. Deshidratación:
    a- Alcohol 95º (dipping)
    b- Alcohol 100º (dipping)
    c- Alcohol 100º (dipping)
    d- Alcohol/Xilol (dipping)
19. Aclaramiento:
    a- Xilol (5 min)
    b- Xilol (5 min)
20. Cubrir con medio de montaje hidrófobo.

Preparación PBS 1X: 100 ml de solución madre PBS 10X + 900 ml de agua destilada.

Preparación buffer citrato: 50 ml buffer citrato + 450 ml de agua destilada.

Anexo 6: Protocolo inmunohistoquímica anti-GPR120

1. Desparafinación:
   a- Xilol I (10 min)
   b- Xilol II (10 min)
   c- Xilol III (10 min)
2. Rehidratación:
   a- Alcohol 100º (10 min)
   b- Alcohol 100º (10 min)
   c- Alcohol 95º (10 min)
   d- Alcohol 70º (10 min)
3. Lavado en agua destilada (10 min)
4. Recuperación antigénica en buffer citrato durante 15 minutos en vaporera (Oster) (calentar previamente durante 20 min) Luego enfriar a temperatura ambiente con las placas en buffer durante 15 min.
5. Lavado en agua destilada (10 min)
6. 3 cambios en PBS 1X, de 5 min cada uno.
7. Bloqueo de peroxidasa endógena con H2O2 (30%) al 3% en PBS 1X durante 30 minutos.
8. 3 cambios en PBS 1X, de 5 min cada uno.
9. Bloqueo de sitios inespecíficos:
   a- Aplicar Cas-Block (Invitrogen, 008120) durante 30 minutos a temperatura ambiente.
   b- Aplicar suero de cabra durante 30 minutos a temperatura ambiente.
10. Incubación del anticuerpo primario anti-GPR120 (Policlonal, HPA042563, Sigma-Aldrich) en PBS/Tween20 en dilución 1:50, durante la noche a 4ºC.
11. 3 cambios en PBS 1X, de 5 min cada uno.
12. Incubación con anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (Jackson Inmunoresearch, 111-035-003), hecho en cabra. Diluido 1:500 en PBS 1X pH 7.2 durante 1 hora.
13. 3 cambios en PBS, de 5 min cada uno.
14. Revelado cromogénico con NovaRed kit (Vector, SK-4800) durante 3’ y 30” de acuerdo con la siguiente proporción:

Agua destilada	1	2	3	H2O2
2,5 ml	75 µl	50 µl	50 µl	50 µl
1,25 ml	38 µl	25 µl	25 µl	25 µl
625 µl	19 µl	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl
313 µl	9,5 µl	6,25 µl	6,25 µl	6,25 µl

15. Lavado en agua destilada (5 min)
16. Contraste con Hematoxilina (25 segundos)
17. Viraje en agua corriente (10 min)
18. Deshidratación:
    a- Alcohol 95º (dipping)
    b- Alcohol 100º (dipping)
    c- Alcohol 100º (dipping)
    d- Alcohol/Xilol (dipping)
19. Aclaramiento:
    a- Xilol (5 min)
    b- Xilol (5 min)
20. Cubrir con medio de montaje hidrófobo.

Preparación PBS 1X: 100 ml de solución madre PBS 10X + 900 ml de agua destilada.

Preparación buffer citrato: 50 ml buffer citrato + 450 ml de agua destilada.

Anexo 7: Acta de aprobación comité de ética.

SERVICIO DE SALUD METROPOLITANO SUR ORIENTE
COMITE ETICO-CIENTIFICO

ACTA DE APROBACION EXPEDITA
Santiago, Chile 05 de octubre del 2017

La, Dra. Paola Casanello, Investigador para el Centro Hospital Dr. Sotero del Río, Estudio ref.: Programación fetal de la respuesta inflamatoria y la grasa corporal por la obesidad materna: papel del DHA en la modulación de las marcas epigenéticas de obesidad y enfermedad metabólica.

Ha hecho llegar a este Comité los siguientes documentos:

- Enmienda.
- Consentimiento Informado, Grupo Control, V.3 del 10.05.2017.
- Consentimiento Informado, versión 4 del 26.9.2017.

Revisada la documentación enviada y teniendo en consideración que los cambios no alteran la validez del estudio, ni implican riesgos a los pacientes, se le otorga **APROBACIÓN EXPEDITA.**

SERVICIO DE SALUD METROPOLITANO SUR ORIENTE
COMITE DE EVALUACION ETICO-CIENTIFICO

Dr. Patricio Michaud Ch.
Presidente
Comité Ético Científico
Servicio de Salud Metropolitano Sur Oriente

Cc Archivo

Av. Concha y Toro 3459 - Paradero 30, Vic. Mackenna - Teléfonos: 225762401 - 225765163 - Puente Alto

SERVICIO DE SALUD METROPOLITANO SUR ORIENTE
COMITE ETICO-CIENTIFICO

ACTA DE APROBACIÓN

Miembros del Comité de Evaluación Ético Científico que participaron en la sesión del 08 de Junio del 2017

Comité constituido en conformidad a la resolución exenta N°2886 del Servicio de Salud Metropolitano Sur Oriente de fecha de fecha 06 de julio 2009.
Acreditado por SEREMI de Salud 019892 de fecha 14 Abril 2014.

Dr. Patricio Michaud Ch, S.S.M.S.O. Presidente del Comité
Sra. Verónica Cantuarias B. Enfermera matrona. Hospital Padre Hurtado
Dr. Robert Davis C. Hospital Sótero del Río
Dr. Gonzalo Menchaca O. Hospital Sótero del Río
Sra. Edith Mora San M. Asistente Social, Hospital Sótero del Río.
Sr. Jose Luis Rivadeneira Domínguez. Abogado S.S.M.S.O.

Estudio: Programación fetal de la respuesta inflamatoria y la grasa corporal por la obesidad materna: papel del DHA en la modulación de las marcas epigenéticas de obesidad y enfermedad metabólica.
Investigador Responsable: Dra. Paola Casanello
Co Investigador Local: Dr. Juan Pedro Kusanovic
Patrocinio: FONDECYT
Centros: Hospital Dr. Sotero del Rio
Fecha Aprobación: 08 de junio del 2017.

Este informe se refiere a la revisión que el Comité hizo de los siguientes documentos:

- El proyecto en la versión original aprobada por Fondecyt
- El resumen de la propuesta de investigación traducida al español
- El protocolo abreviado traducido al español
- El CV del Investigador Responsable
- El Consentimiento informado ya aprobado y timbrado por el Comité de Ética del INTA
- La carta de aceptación y opinión fundada del Jefe del Servicio de Obstetricia y Ginecología

Evaluación Ética.

Se trata de la continuación de una línea de investigación en obesidad y marcador de inflamación.
Se hará en madres obesas que recibieron DHA en 2 dosis diferentes y madres de peso normal.

Av. Concha y Toro 3459 - Paradero 30, Vic. Mackenna - Teléfonos: 2288 09 55 - 225785383 - Puente Alto