

“Evaluación del efecto de anticuerpos antifosfolípidos sobre la presencia y activación de STAT-3 en células trofoblásticas en un modelo in vitro”

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: Macarena Aguilera Olguín

Profesor Guía: Sebastián San Martín H; PhD

Profesor Co-guía: Ángela Cadavid J; MD. PhD

Año: 2017

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar este trabajo deseo expresar agradecimientos a mi madre, ya que ha sido un ejemplo en perseverancia y esfuerzo en la vida. Un pilar fundamental durante todos los procesos de mi desarrollo. También quiero agradecer a mi hermana por apoyarme y acompañarme, especialmente durante mi formación como profesional y difícil periodo universitario. Y a toda mi familia.

A mis amigas y amigos por su apoyo y amistad incondicional, que de alguna u otra manera aportaron con el desarrollo de esta tesis.

A mi profesor guía y co-guía; por recibirme en este proyecto, por el tiempo dedicado al desarrollo de este trabajo, por orientarme, enseñarme y aumentar mis conocimientos. Así como también al Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Valparaíso y al Grupo de Reproducción de la Universidad de Antioquia, Medellín por toda la ayuda brindada.

Finalmente a cada uno que me entregó su apoyo de alguna u otra forma, como cuando preguntaban; “¿y, cómo va la tesis?”.

RESUMEN

Patologías durante el embarazo pueden alterar el desarrollo embrionario y fetal promoviendo un aumento de la morbimortalidad durante etapas tempranas de la vida intrauterina. Una de ellas es el SAF, enfermedad autoinmune que se caracteriza por la producción de una familia heterogénea de anticuerpos que inducen complicaciones tromboembólicas y morbilidad gestacional, como por ejemplo, abortos a repetición, muerte fetal, entre otros. Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo de acción de los aAFL que promueven estas condiciones.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de los aAFL en la actividad y presencia de la proteína STAT-3, la cual forma parte de la vía de señalización que está activa durante el primer trimestre del embarazo y se relaciona con la actividad de las células trofoblásticas. Alteraciones en ésta vía pueden estar relacionadas con la morbilidad gestacional observada en las madres con SAF. El estudio se realizó en modelos in vitro utilizando la línea celular HTR8/SVneo, cultivadas con IgG de sueros de pacientes con manifestaciones del SAF (PM y PM/VT) y los controles negativos (NHS, Pneg y RPMI). Posteriormente los cultivos fueron fijados y se procesaron para realizar técnica inmunocitoquímica, utilizando los anticuerpos anti-STAT-3, anti-STAT-3p y anti-SOCS-3. Se tomaron microfotografías de cada ensayo con cada anticuerpo y se analizaron a través del programa ImagePro Plus. Se obtuvieron resultados estadísticamente significativos para SOCS-3 en el caso PM, donde se obtuvo una diferencia ($P < 0.05$) en la intensidad de la marcación en comparación con el control NHS, no así en el caso PM/VT.

Los aAFL tienen un efecto en la disminución de la actividad y presencia de la proteína STAT-3 en el caso PM, que en este estudio se puede identificar por la disminución en la presencia de la proteína SOCS-3, aunque no se puede decir lo mismo de PM/VT. Estos hallazgos permiten aportar una de las causas a nivel celular y molecular de las pacientes con manifestaciones del SAF y morbilidad gestacional.

PALABRAS CLAVES: Síndrome antifosfolípido; invasión; trofoblasto; STAT-3.

ABSTRACT

Pathologies throughout the pregnancy can alter the development of the embryo and foetus, resulting in an increased morbidity and mortality rate during the early stages of intrauterine life. One of them is APS an autoimmune disease that is characterised by the production of a heterogeneous family of antibodies that induce thromboembolic complications and gestational morbidity. For example, recurrent miscarriages, stillbirth, among others. However, the mechanism used by the antiphospholipid antibodies that promote these conditions is unknown.

The aim of this research was to evaluate the effect the antibodies have on the activity and presence of the STAT-3 protein, which is part of the signalling pathway that is active during the first trimester of a pregnancy and it is related to trophoblast cell activity. Alterations in this pathway can be related to gestational morbidity observed in mothers with APS. The study was carried out on in vitro models using the HTR8/SVneo cell line, cultured with IgG and extracted from the serum of patients with displays of APS (PM and PM/VT) and the respective negative control (NHS, Pneg and RPMI). Subsequently, samples of culture were set and processed to carry out immunocitochemical techniques using anti-STAT-3, anti-STAT-3p and anti-SOCS-3 antibodies. Microphotographs were taken of each test with each antibody, and they were analysed using the ImagePro Plus programme. Statistically significant results were obtained for SOCS-3 in the PM case, where a difference ($P < 0.05$) was obtained in the marking intensity, compared to NHS control, which was not the case in PM/VT.

The aPL have an effect in the decrease of activity and presence of the STAT-3 protein in the PM case, which in this study can be identified by the decrease in the presence of the SOCS-3 protein, although the same cannot be said about PM/VT, these findings allow the contribution of one of the causes at cell and molecular level in patients with displays of APS and gestational morbidity.

KEYWORDS: antiphospholipid syndrome; invasion; trophoblast; STAT-3.

LISTA DE ACRÓNIMOS

- aAFL: anticuerpos antifosfolípidos.
- STAT-3: transductor de señal y activador de la transcripción (signal transducer and activator of transcription).
- STAT-3p: transductor de señal y activador de la transcripción fosforilada (signal transducer and activator of transcription phosphorylated).
- SOCS: supresor de señalización por citoquinas (suppressors of cytokine signalling).
- JAK: janus quinasa (janus kinases).
- IgG: inmunoglobulina G.
- SAF: síndrome antifosfolípido.
- DOI: densidad óptica integrada.
- aAL: anticuerpo anticoagulante lúpico.
- aCL: anticuerpos anti-cardiolipina.
- anticuerpos anti- β_2 glicoproteína I: anti- β_2 GPI.
- EPF: factor de embarazo inicial (early pregnancy factor).
- hCG: gonadotropina coriónica humana (human chorionic gonadotropin).
- MUC-1: mucina asociada a membrana.
- LIF: factor inhibidor de leucemia (leukemia inhibitory factor).
- IL-1: interleucina 1.
- CSF-1: factor estimulante de colonias 1 (colony stimulating factor 1).
- CO₂: dióxido de carbono.
- TIMP: inhibidores tisulares de la metaloproteinasas (tissue inhibitors of metalloproteinases).
- u-PA: activador de plasminógeno-urocinasa (urokinase plasminogen activator).
- PAI: inhibidor del activador del plasminógeno 1 (plasminogen activator inhibitor).
- TGF- β : factor de crecimiento transformante beta (transforming growth factor beta).
- HGF: factor de crecimiento del hepatocito (hepatocyte growth factor).
- HLA: antígeno leucocitario humano (human leukocyte antigen).

- Células NK: células asesinas naturales (natural killer cells).
- LES: lupus eritematoso sistémico.
- ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (enzyme-linked immunosorbent assay).
- ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario.
- SBF: suero bovino fetal.
- PBS: buffer fosfato salino (phosphate-buffered saline).

ÍNDICE

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 FECUNDACIÓN Y DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO	3
1.2 IMPLANTACIÓN Y DECIDUALIZACIÓN.....	4
1.3 PLACENTACIÓN	10
1.4 CIRCULACIÓN PLACENTARIA	14
1.5 PATOLOGÍAS DEL EMBARAZO ASOCIADAS AL SISTEMA INMUNOLÓGICO	15
1.5.1 <i>Síndrome antifosfolípido</i>	16
1.5.1.1 Anticuerpos antifosfolípidos	17
1.5.1.2 Diagnóstico	19
1.5.1.3 Tratamiento	21
1.5.1.4 Pronóstico.....	22
1.6 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN JAK/STAT Y TROFOBLASTO	23
CAPÍTULO 2. PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA.....	27
2.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	27
2.2 HIPÓTESIS.....	27
2.3 RELEVANCIA	27
CAPÍTULO 3. OBJETIVOS.....	28
3.1 OBJETIVO GENERAL	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
CAPÍTULO 4. METODOLOGÍA	29
4.1 TIPO DE ESTUDIO	29
4.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	29
4.3 TAMAÑO DE LA MUESTRA.....	30
4.4 VARIABLES DE ESTUDIO	31
CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS	32

5.1 CULTIVOS CELULARES OBTENIDOS DESDE EL GRUPO DE REPRODUCCIÓN DE LA SEDE DE INVESTIGACIÓN UNIVERSITARIA DE LA UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA, MEDELLÍN.	32
5.1.1 Cultivo de células trofoblásticas HTR8/SVneo	32
5.2 SUERO DE LAS PACIENTES.....	32
5.2.1 Procedimiento de recolección y seguimiento de las pacientes	33
5.2.2 Pruebas de laboratorio para el diagnóstico del SAF	34
5.3 INCUBACIÓN DE LAS CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS CON LAS IGG DE LAS PACIENTES CON SAF	34
5.3.1 Preparación de cultivos realizados en Colombia	35
5.3.2 Fijación e inclusión en parafina de los cultivos	36
5.4 PROCESAMIENTO DE CULTIVOS EN TACO DE PARAFINA EN CHILE	37
5.5 HEMATOXILINA – EOSINA	38
5.6 INMUNOCITOQUÍMICA	39
5.7 ANÁLISIS INMUNOCITOQUÍMICO DE LOS ENSAYOS.....	42
5.8 MANEJO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS OBTENIDOS	42
5.9 CONSIDERACIONES ÉTICAS	43
CAPÍTULO 6. RESULTADOS.....	44
6.1 PLANO DE CORTE Y HEMATOXILINA-EOSINA	44
6.2 PRESENCIA DE STAT-3 CON LA TÉCNICA DE INMUNOCITOQUÍMICA	46
6.2.1 Ensayos de invasión en cultivo RPMI.....	46
6.2.2 Ensayos de invasión en cultivos NHS	48
6.2.3 Ensayos de invasión en cultivo Pneg	49
6.2.4 Ensayos de invasión en cultivo PM.....	50
6.2.5 Ensayos de invasión en cultivo PM/VT.....	51
6.3 PRESENCIA DE STAT-3 FOSFORILADA CON LA TÉCNICA DE INMUNOCITOQUÍMICA	53
6.3.1 Ensayos de invasión en cultivos RPMI	53
6.3.2 Ensayos de invasión en cultivos NHS	55
6.3.3 Ensayos de invasión en cultivo Pneg	56
6.3.4 Ensayos de invasión en cultivo PM.....	57
6.3.5 Ensayos de invasión en cultivo PM/VT.....	58
6.4 PRESENCIA DE SOCS-3 CON LA TÉCNICA DE INMUNOCITOQUÍMICA	60
6.4.1 Ensayos de invasión en cultivos RPMI	60

6.4.2 Ensayos de invasión en cultivos NHS	62
6.4.3 Ensayos de invasión en cultivo Pneg	63
6.4.4 Ensayos de invasión en cultivo PM.....	64
6.4.5 Ensayos de invasión en cultivo PM/VT.....	65
CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN	67
CAPÍTULO 8. CONCLUSIÓN.....	71
CAPÍTULO 9: BIBLIOGRAFÍA	72
CAPÍTULO 10: APÉNDICE	80
ANEXO 1: PROTOCOLO DE FIJACIÓN E INCLUSIÓN EN PARAFINA DE LOS CULTIVOS	80
ANEXO 2: TINCIÓN DE HEMATOXILINA – EOSINA	81
ANEXO 3: PROTOCOLO INMUNOHISTOQUÍMICA ANTI- STAT-3	82
ANEXO 4: PROTOCOLO INMUNOHISTOQUÍMICA ANTI- STAT-3 FOSFORILADA	84
ANEXO 5: PROTOCOLO INMUNOHISTOQUÍMICA ANTI-SOCS-3.....	86
ANEXO 6: CONTROLES INMUNOHISTOQUÍMICA	88

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1.1. Desarrollo folicular en ovario, ovulación, fecundación y transporte del embrión en sus primeras etapas del desarrollo desde la trompa de Falopio al útero.....	4
Figura 1.2. Diagrama del estado preimplantatorio, procesos para receptividad uterina, aposición y adhesión del blastocisto.....	8
Figura 1.3. Diagrama de implantación, y procesos necesarios para la invasión trofoblástica.....	9
Figura 1.4. Implantación del blastocisto.....	12
Figura 1.5. Formación de una vellosidad coriónica.....	13
Figura 1.6. Mecanismos patógenos de coagulación mediados por aAFL.....	18
Figura 1.7. Efectos de aAFL sobre la placenta.....	19
Figura 1.8. Vía de señal de transducción JAK-STAT.....	25
Figura 5.1. Tacos de parafina obtenidos de los ensayos de invasión 1, 2 y 3.....	37
Figura 5.2. Esquema de la disposición de control externo positivo y negativo.....	40

Figura 6.1. Resultados de Hematoxilina Eosina: Ensayos de invasión 1, 2 y 3 de los cultivos RPMI y NHS.....	44
Figura 6.2. Resultados de Hematoxilina Eosina: Ensayos de invasión 1, 2 y 3 de los cultivos Pneg, PM y PM/VT.....	45
Figura 6.3. Resultados de anti-STAT-3: Corte número 1 de los ensayos de invasión 1, 2 y 3 del cultivo RPMI.....	46
Figura 6.4. Resultados de anti-STAT-3: Corte número 2 y 3 de los ensayos de invasión 1, 2 y 3 del cultivo RPMI.....	47
Figura 6.5. Resultados de anti-STAT-3: Corte número 1, 2 y 3 de los ensayos de invasión 1, 2 y 3 del cultivo NHS.....	48
Figura 6.6. Resultados de anti-STAT-3: Corte número 1, 2 y 3 de los ensayos de invasión 1, 2 y 3 del cultivo Pneg.....	49
Figura 6.7. Resultados de anti-STAT-3: Corte número 1, 2 y 3 de los ensayos de invasión 1, 2 y 3 del cultivo.....	50
Figura 6.8. Resultados de anti-STAT-3: Corte número 1, 2 y 3 de los ensayos de invasión 1, 2 y 3 del cultivo PM/VT.....	51
Figura 6.9. Gráfico de barras que muestra la media más la desviación estándar del DOI obtenido de las microfotografías de los distintos ensayos para verificar la presencia de STAT-3.....	52
Figura 6.10. Resultados de anti-STAT-3p: Corte número 1 de los ensayos de invasión 1, 2 y 3 del cultivo RPMI.....	53
Figura 6.11. Resultados de anti-STAT-3p: Corte número 2 y 3 de los ensayos de invasión 1, 2 y 3 del cultivo RPMI.....	54
Figura 6.12. Resultados de anti-STAT-3p: Corte número 1, 2 y 3 de los ensayos de invasión 1 y 2 del cultivo NHS.....	55
Figura 6.13. Resultados de anti-STAT-3p: Corte número 1, 2 y 3 de los ensayos de invasión 1, 2 y 3 del cultivo Pneg.....	56
Figura 6.14. Resultados de anti-STAT-3p: Corte número 1, 2 y 3 de los ensayos de invasión 1, 2 y 3 del cultivo PM.....	57
Figura 6.15. Resultados de anti-STAT-3p: Corte número 1, 2 y 3 de los ensayos de invasión 1, 2 y 3 del cultivo PM/VT.....	58

Figura 6.16. Gráfico de barras que muestra la media más la desviación estándar del DOI obtenido de las microfotografías de los distintos ensayos para verificar la presencia de STAT-3 fosforilada.....	59
Figura 6.17. Resultados de anti-SOCS-3: Corte número 1 de los ensayos de invasión 1, 2 y 3 del cultivo RPMI.....	60
Figura 6.18. Resultados de anti-SOCS-3: Corte número 2 y 3 de los ensayos de invasión 1, 2 y 3 del cultivo RPMI.....	61
Figura 6.19. Resultados de anti-SOCS-3: Corte número 1, 2 y 3 de los ensayos de invasión 1 y 2 del cultivo NHS.....	62
Figura 6.20. Resultados de anti-SOCS-3: Corte número 1, 2 y 3 de los ensayos de invasión 1, 2 y 3 del cultivo Pneg.....	63
Figura 6.21. Resultados de anti-SOCS-3: Corte número 1, 2 y 3 de los ensayos de invasión 1, 2 y 3 del cultivo PM.....	64
Figura 6.22. Resultados de anti-SOCS-3: Corte número 1, 2 y 3 de los ensayos de invasión 1, 2 y 3 del cultivo PM/VT.....	65
Figura 6.23. Gráfico de barras que muestra la media más la desviación estándar del DOI obtenido de las microfotografías de los distintos ensayos para verificar la presencia de SOCS-3.....	66
Figura 7.1. Activación de la Vía JAK/STAT por receptor de citoquina y regulación por SOCS.....	69
Figura 10.1 Anti-STAT3: Microfotografías de control externo positivo (lado izquierdo) y negativo (lado derecho) de corte histológico de placenta de término.....	88
Figura 10.2 Anti-STAT3 fosforilada: Microfotografías de control externo positivo (lado izquierdo) y negativo (lado derecho) de corte histológico de carcinoma de próstata.....	88
Figura 10.3 Anti-SOCS3: Microfotografías de control externo positivo (lado izquierdo) y negativo (lado derecho) de corte histológico de placenta de término humana.....	89
Figura 10.4 Resultados de Control negativo externo: Ensayo de cultivo RPMI (medio solo) lado izquierdo y NHS (mujeres sanas) en lado derecho.....	89
Figura 10.5 Resultados de Control negativo externo: Ensayo de cultivos Pneg (negativas para aAFL) lado izquierdo y PM (Morbilidad gestacional) en lado derecho.....	90

Figura 10.6 Resultados de Control negativo externo: Ensayo de cultivos PM (Morbilidad gestacional).....	90
---	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 5.1. Listado de cultivos celulares con los respectivos estímulos aplicados.....	35
Tabla 5.2. Listado de ensayos.....	35
Tabla 5.3. Listado y detalle de anticuerpos.....	41

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

El síndrome antifosfolípido (SAF), es un trastorno multisistémico definido por presentar complicaciones tromboembólicas (asociado a trombosis arterial y venosa siendo la última más frecuente) y morbilidad gestacional (abortos espontáneos a repetición en el primer trimestre, muerte fetal tras la décima semana de gestación y nacimientos prematuros por preeclampsia o insuficiencia placentaria) con títulos elevados de anticuerpo antifosfolípido persistente en el plasma de las pacientes, por lo que representa una agrupación de hallazgos clínicos y de laboratorio (1,2). Los anticuerpos antifosfolípidos (aAFL) son una familia heterogénea de autoanticuerpos asociados a fosfolípidos, o proteínas asociadas a los fosfolípidos de membrana (1,3). Entre los criterios para determinar el SAF se consideran el anticuerpo anticoagulante lúpico (aAL), los anticuerpos anti-cardiolipina (aCL) y los anticuerpos anti- β_2 glicoproteína I (anti- β_2 GPI) (4).

La prevalencia real de la patología es desconocida, pero se calcula que afecta aproximadamente al 0,5% de la población, principalmente al sexo femenino (5). Una de las causas de este desconocimiento es que el diagnóstico del síndrome y de los aAFL es complejo (6). Cabe destacar que no todos los pacientes con dichos anticuerpos circulantes desarrollan el síndrome, el 5% son asintomáticos (1).

La pérdida de embarazo durante el primer trimestre es la complicación más frecuente durante la gestación, estimado en un 15% de los casos reconocidos. La incidencia de abortos a repetición (definido como 3 o más abortos espontáneos consecutivos antes de las 20 semanas de gestación) está entre el 1-5% de la población (7,8). Entre el 10 al 25% de los abortos involuntarios recurrentes se deben a la presencia de los aAFL (9), junto con el 3,8% de los nacidos muertos y el 13,7% con restricción del crecimiento intrauterino debido a estos anticuerpos (10). En mujeres con pérdida gestacional recurrente, la presencia de aAFL se asocia a una mayor tasa de pérdida en edades gestacionales superior a 10 semanas. Esto fue corroborado

en un estudio multicéntrico de casos y controles, que estima un aumento de tres veces en la probabilidad de IgG aCL y/o anti- β_2 GPI en el suero de las madres con muerte fetal, en comparación con los controles de nacidos vivos (11).

En el embarazo parece ser que los aAFL, son la causa directa de la disfunción del trofoblasto, también de la activación del complemento en la interfase materno-fetal que provoca un intercambio ineficiente entre ambos culminando en aborto, preeclampsia, restricción del crecimiento intrauterino o muerte fetal (1). Estudios experimentales in vitro han demostrado que los aAFL han aumentado la tasa de apoptosis, disminuido la velocidad y extensión de la proliferación, migración e invasión de células trofoblásticas (12). La vía de JAK-STAT es uno de los principales mecanismos de señalización, mediante el cual las citoquinas y los factores de crecimiento modulan la proliferación celular, diferenciación, migración, invasión y apoptosis (13). STAT-3 está involucrada en el proceso de invasión trofoblástica, ya sea en su adhesión al endometrio, angiogénesis y regulación de la invasión (14); además juega un papel importante en la embriogénesis temprana mediante el intercambio metabólico entre el embrión y la placenta (13). Los niveles de STAT-3 en su forma normal y fosforilada han sido objeto de estudio y vinculados al comportamiento invasivo del trofoblasto (15). Se ha demostrado que la disminución de la expresión de STAT-3 puede contribuir en la función anormal del trofoblasto en embarazos afectados por la restricción del crecimiento fetal idiopático. En estudios funcionales sugieren que STAT-3 puede ser potencialmente importante en el desarrollo normal y patológico de la placenta humana. Se encontraron consecuencias perjudiciales de la reducción de STAT-3 que conducen a la diferenciación y la apoptosis prematura (13).

La fisiopatología del SAF es compleja y el mecanismo de acción de los aAFL aún no se ha dilucidado completamente (5). En base a la información mencionada previamente, los aAFL circulantes en el plasma de las pacientes podrían tener relación con la vía de señalización JAK/STAT de las células trofoblásticas que podrían inducir la morbilidad gestacional. El propósito de este estudio es aportar en el esclarecimiento de los mecanismos fisiopatológicos del síndrome antifosfolípido específicamente asociado al embarazo.

1.1 Fecundación y desarrollo embrionario temprano

La fecundación se define como la penetración de un espermatozoide en un ovocito II comúnmente en la región ampular de las trompas de Falopio. Este proceso se inicia en el momento en que el espermatozoide entra en contacto con la zona pelúcida (16), la cual está compuesta por glicoproteínas (ZP1, ZP2 y ZP3) que permiten la fijación del espermatozoide a través de receptores. Posteriormente el núcleo del espermatozoide ingresa al ovoplasma; aquí el ovocito secundario completa la segunda división meiótica formando el ovocito maduro y el segundo corpúsculo polar. Los 23 cromosomas de cada progenitor se fusionan y luego se dividen dando a lugar dos núcleos con número diploide de cromosomas (17). Entre los días 1 al 7 ocurre la segmentación del cigoto, cuyas sucesivas divisiones mitóticas originan las blastómeras; durante el segundo día de desarrollo ya se han formado 4 blastómeras que se dirigen hacia el útero. En los siguientes días éstas continúan segmentándose formando una masa celular denominada mórula, alcanzando 16 células (18,19).

Ya en la quinta división celular se generan 2 grupos de células; las que formarán al embrión (macizo celular interno) cuya división es más lenta, se caracterizan por ser células grandes, en poca cantidad y pluripotenciales; y las segundas que formarán membranas nutritivas y protectoras que corresponden a células pequeñas, en gran cantidad, que se dividen de manera rápida y son totipotenciales; éstas últimas posteriormente se diferenciarán en células trofoblásticas (19). Véase Figura 1.1.

Al salir de la trompa de Falopio y llegar al útero la mórula mantiene su multiplicación, pero las células del interior no logran nutrirse correctamente, es por esto que se acumula líquido secretado por células trofoblásticas que amplían los espacios intercelulares y reorganizan las células, creando en el interior una cavidad denominada cavidad blastocística o blastocele. En este periodo preimplantatorio el blastocisto consta de aproximadamente 107 células (20). A medida que aumenta el líquido en el blastocele, se van separando las blastómeras en 2 zonas; una capa celular externa delgada denominada trofoblasto y un grupo de blastómeras

en el centro denominado embrioblasto (masa celular interna) que dará origen al embrión (ver figura 1.1) (21).

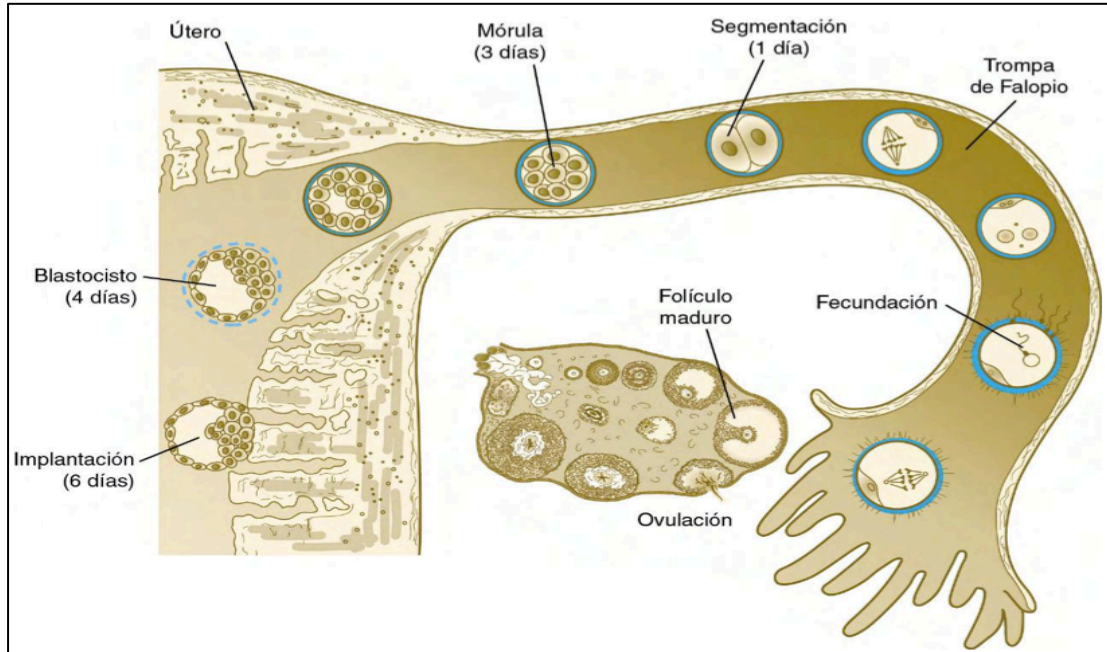


Figura 1.1. Desarrollo folicular en ovario, ovulación, fecundación y transporte del embrión en sus primeras etapas del desarrollo desde la trompa de Falopio al útero (18).

1.2 Implantación y decidualización

Posterior al desarrollo del blastocisto y la llegada a la cavidad uterina se inicia el fenómeno de implantación del embrión, alrededor de seis días después de la fecundación. Este proceso refiere al fenómeno en el cual el blastocisto se adhiere, desintegra el epitelio del útero, lo penetra, invade el estroma y toma contacto con el sistema circulatorio de la madre formando la placenta (22). En el momento de su integración con el endometrio, el blastocisto está constituido por 100 a 250 células en su totalidad (23); este proceso sucede habitualmente en el tercio superior de la pared dorsal del útero (24). Para que suceda lo anterior mencionado, el blastocisto debe

estar en la etapa de desarrollo apropiado y en circunstancias hormonales específicas denominado ventana de implantación (25).

El endometrio debe estar preparado para la implantación, lo que requiere de una capacidad de atraer y mantener al blastocisto (periodo de máxima receptividad uterina); para aquello necesita transformarse en un órgano nutritivo, como es la decidua, que actúa de base placentaria durante toda la gestación (25,26). En los días previos a este proceso el endometrio llega a su punto máximo en la actividad secretora y se observan cambios de sus componentes denominado reacción decidual, que a su vez le otorga el nombre de decidua, tales cambios son; engrosamiento del endometrio, las glándulas se tornan más tortuosas y dilatadas y las células epiteliales que las recubren acumulan glucógeno y lípidos. Además de la mucosa las células del estroma también participan en la reacción, ya que luego de la implantación se transforman en células deciduales poligonales de aspecto epiteloides que aumentan de tamaño presentando mayor edema e inflamación. También son ricas en glucógeno y actúan como una barrera a la penetración trofoblástica (17,27).

En el epitelio del endometrio se han descrito la existencia de pinópodos, los cuales son especializaciones de la membrana plasmática que corresponden a microvellosidades quísticas y que participan en la fijación del blastocisto. Además se ha propuesto que las integrinas endometriales contribuyen a la fijación del mismo (17,27). También se sugiere que las moléculas de adhesión requeridas para la unión del blastocisto estarían sobre los pinópodos (28) (ver figura 1.2).

Durante la ventana de implantación, hay un aumento específico de la expresión de citoquinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión y receptores que serán los que tendrán contacto con los componentes extracelulares del blastocisto. Estos cambios proporcionan un ambiente idóneo para la implantación y desarrollo del embrión y están regulados por el ovario a través de la síntesis de estradiol y progesterona (25,27) .

De otro lado, antes de la implantación se produce la rotura y desaparición de la zona pelúcida del blastocisto (29), que le permite enviar señales a la madre y así establecer una

relación paracrina con el endometrio, donde las citoquinas embrionarias modulan las citoquinas endometriales, integrinas y otros factores que a su vez modulan la implantación (27).

A su vez el ovario produce factor de embarazo inicial (early pregnancy factor o EPF) antes de la implantación, ya que luego de la implantación el EPF que está asociado a crecimiento, proliferación e inmunosupresión, lo produce el blastocisto. Otra hormona que tiene un papel importante es la relaxina proveniente en su mayoría del cuerpo lúteo, la cual favorece la implantación promoviendo la angiogénesis, maduración y acortamiento del cuello uterino. El trofoblasto se encuentra muy activo, produce señales que estimulan al endometrio haciéndolo más receptivo, y mediante la hCG (gonadotrofina coriónica humana), mantiene al cuerpo lúteo que tiene como función seguir secretando estrógeno y progesterona (17,27).

El proceso de implantación se divide en 4 fases:

- Aposición
- Adhesión
- Rotura de la barrera epitelial
- Invasión o migración

En la primera fase denominada aposición, el blastocisto busca el lugar de implantación y las células del trofoblasto polar situadas bajo el embrioblasto se ponen en contacto con la decidua para iniciar el proceso de adhesión (ver figura 1.2). Luego en la adhesión al útero, el blastocisto debe perder la zona pelúcida; para esto se han descrito 2 mecanismos no excluyentes: uno mecánico donde el blastocisto ejerce presión debido a la expansión sobre la zona pelúcida debilitándola y el segundo bioquímico mediado por las proteasas como tripsina para degradarla (24). Cuando el endometrio y el blastocisto están en contacto llega un punto en que las membranas celulares se aproximan tanto que forman complejos de unión o gap junctions, por medio de las moléculas de adhesión (17). Por otra parte, las células epiteliales del endometrio sintetizan MUC-1 (mucina asociada a membrana) la cual actúa como molécula anti-adhesión, para regular este proceso (27).

Las citoquinas y los factores de crecimiento especialmente LIF (factor inhibidor de leucemia), IL-1 (interleucina 1), CSF-1 (factor estimulante de colonias 1) y CD-98 cumplen un papel importante en el proceso de adhesión e invasión del blastocisto, ya que se ha demostrado que su ausencia altera dichos procesos (ver figura 1.2). También se ha observado que las cargas electroestáticas de las estructuras implicadas, participan en este mecanismo de adhesión, donde el endometrio por su concentración de CO₂ adquiere carga negativa y el blastocisto rico en bicarbonato, tiene una carga positiva (27).

Subsiguiente a la adhesión, el epitelio endometrial constituye una barrera que debe ser invadida por el embrión para proceder a la implantación, por lo que debe inducir apoptosis de las células endometriales y digerir su matriz intercelular. Las proteinasas, como serinproteasas y metaloproteinasas son las que intervienen en la invasión del estroma endometrial, la rotura de la membrana basal y la penetración de los vasos sanguíneos maternos. Además la presencia de leucocitos, macrófagos y linfocitos T ayudan a degradarla (17).

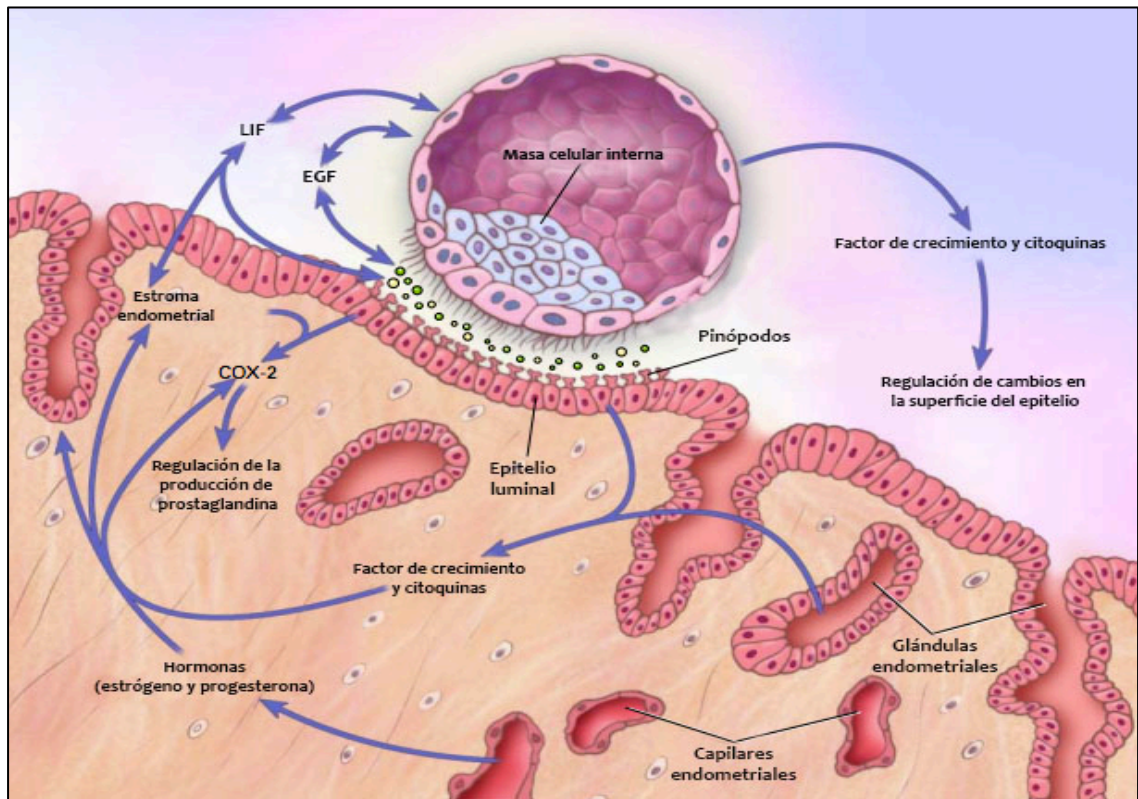


Figura 1.2. Diagrama del estado preimplantatorio, procesos para receptividad uterina, aposición y adhesión del blastocisto (Modificado de Norwitz, E; et al 2001)(32).

Finalmente en la invasión mientras el blastocisto penetra la decidua, las células más externas del trofoblasto se dividen rápidamente, tanto así que se pierden los límites celulares y forman el sincitiotrofoblasto (30) capaz de producir enzimas que degradan la matriz extracelular y secretan factores que desencadenan la apoptosis de las células endometriales (31), a su vez recubre al citotrofoblasto (células que aún mantienen los límites celulares)(ver figura 1.3). En el sincitiotrofoblasto se forman lagunas y el citotrofoblasto reemplaza el endotelio de las arteriolas uterinas hasta llegar al primer tercio miometrial (30). Al comienzo solo hay una pequeña zona de sincitiotrofoblasto que pronto se expande para rodear todo el embrión. Pequeñas prolongaciones de estas células se introducen entre las células epiteliales uterinas, ya que tienen propiedades muy invasivas por lo que se abren con rapidez y erosionan el estroma endometrial. A medida que progresa, las prolongaciones del sincitiotrofoblasto cubren tramos de los vasos sanguíneos endometriales maternos, erosionan las paredes vasculares y la sangre materna ingresa en las lagunas aisladas que se han formado en el trofoblasto. Luego de que las lagunas se han llenado de

sangre, el trofoblasto se vuelve menos invasivo (18). Cuando las células trofoblásticas erosionan las paredes de las arteriolas, dejando que la sangre alcance las lagunas trofoblásticas da comienzo a la placentación hemocorial (17).

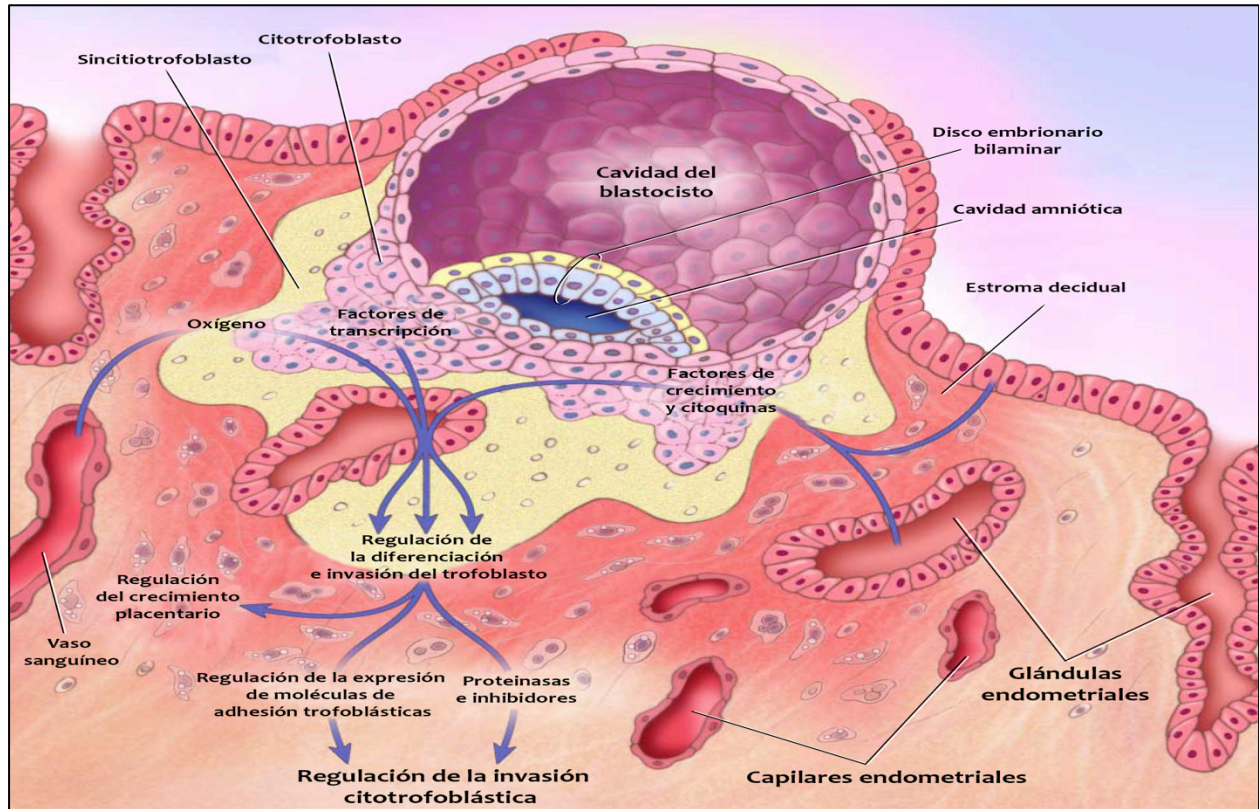


Figura 1.3 Diagrama de implantación, y procesos necesarios para la invasión trofoblástica (Modificado de Norwitz, E; et al 2001)(32).

En el proceso de invasión, uno de los factores fundamentales son las proteasas que conforman sistemas proteolíticos, ubicadas en el espacio extracelular y en la membrana de las células del trofoblasto (33).

Los más importantes son:

- Activador de plasminógeno-urocinasa (u-PA) \leftrightarrow Inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI -1). Ambos de origen trofoblástico
- Metaloproteinasas (estromalisina y colagenosa tipo IV) \leftrightarrow inhibidores tisulares de la metaloproteinasas (TIMP). De origen trofoblástico, degradan matriz extracelular de la decidua.

- Proteínas relacionadas con el receptor LDL (LRP), cuya función fundamental es degradar el primer complejo mencionado (u-PA/PAI-1).
- Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). De origen decidual.

Los sistemas mencionados son regulados por hormonas ováricas, citoquinas, moléculas de adhesión y TGF- β . U-PA es producida por el trofoblasto, la cual da origen a plasmina que a su vez activa el TGF- β , por lo que se concluye que el trofoblasto también regula su propia invasión (27).

1.3 Placentación

Posterior a la implantación se produce la placentación, donde se establecen relaciones definitivas para la nutrición del feto (26). En esta etapa las células trofoblásticas darán origen a la placenta de tipo hemocorial denominada así, puesto que el intercambio de sustancias es a través de las vellosidades placentarias conformadas por tejido fetal que flota en la sangre materna (34); ésta forma parte importante de la circulación materno-fetal donde el flujo óptimo de sangre materna es parcialmente afectado por la actividad invasora de las células trofoblástica (35). La placenta se representa comúnmente como una estructura simple, que comunica el embrión al útero. Dentro de ésta se desarrolla una cavidad denominada espacio intravelloso con una red de vellosidades coriónicas que están en contacto con la circulación de la sangre materna, lo que permite el intercambio de nutrientes, gases y desechos (36).

Cuando ha ocurrido la implantación, el trofoblasto se diferencia en veloso que origina las vellosidades coriónicas y extravelloso que migra e invade a la decidua, miometrio y arterias espirales de la madre (28).

La propiedad de invasión del trofoblasto extraveloso se debe a la secreción de enzimas proteolíticas que degeneran la matriz extracelular. Uno de los productos sintetizados es el activador de plasminógeno cuya función es convertir el plasminógeno en plasmina (proteasa de serina de amplia acción); estas proteasas fragmentan proteínas y activan metaloproteinasas secretadas como proenzimas inactivas (37). El citotrofoblasto extraveloso no expresa moléculas HLA I y HLA II clásicas, exceptuando niveles bajos y transitorios de HLA-C (38), sin embargo, expresa moléculas HLA I no clásicas que la hace resistente a la lisis de linfocitos citotóxicos (28,39), también HLA-G cuyo polimorfismo limitado permite la tolerancia al aloinjerto fetal (40), HLA-E que se caracterizan por prevenir la citotoxicidad inducida por las células NK (28,39). De esta forma el tejido fetal evita ser reconocido como extraño y de ser rechazado por las células del sistema inmune materno donde la placenta actúa como barrera inmunológica activa, ya que permite la tolerancia de los dos organismos antigénicamente diferentes (39).

A medida que el trofoblasto va invadiendo, cercano al día 13 post-fecundación la capa de sincitiotrofoblasto es atravesada por conductos de lagunas trofoblásticas que son pequeñas cavidades. El sincitiotrofoblasto sigue invadiendo más tejido materno, como son decidua basal y capilares deciduales superficiales, las lagunas formadas se llenan de sangre formándose así el espacio intervelloso (28).

Las vellosidades coriónicas que surgen a partir del trofoblasto son parte fundamental de la placenta, las células del citotrofoblasto se introducen en el sincitiotrofoblasto formando las vellosidades primarias (ver figura 1.4A)(ver figura 1.5), las lagunas se unen y forman un laberinto dividido por columnas de citotrofoblasto que comienzan a hacer protrusión hacia el sincitiotrofoblasto. Es así como los conductos de los laberintos forman parte del espacio intervelloso y las vellosidades primarias. Luego las células mesodérmicas penetran estas vellosidades y crecen hacia la decidua formando las vellosidades secundarias (ver figura 1.4B)(ver figura 1.5). A continuación las células mesodérmicas de la parte central se diferencian en células sanguíneas y vasos sanguíneos (angiogénesis) formando las vellosidades placentarias definitivas o vellosidades terciarias (ver figura 1.5). Los capilares formados se comunican con los capilares de la placa coriónica y pedículo de fijación; además tienen contacto con el sistema circulatorio intraembrionario generando la conexión entre la placenta y el embrión. Hay

vellosidades que van desde la placa coriónica a la decidua basal denominadas vellosidades de anclaje y las que se ramifican en los costados de los troncos vellosos se denominan vellosidades terminales que conforman la barrera placentaria (ver figura 1.5); además la unión de varias vellosidades constituyen un cotiledón que a su vez se dividen por tabiques intercotiledones (37,41).

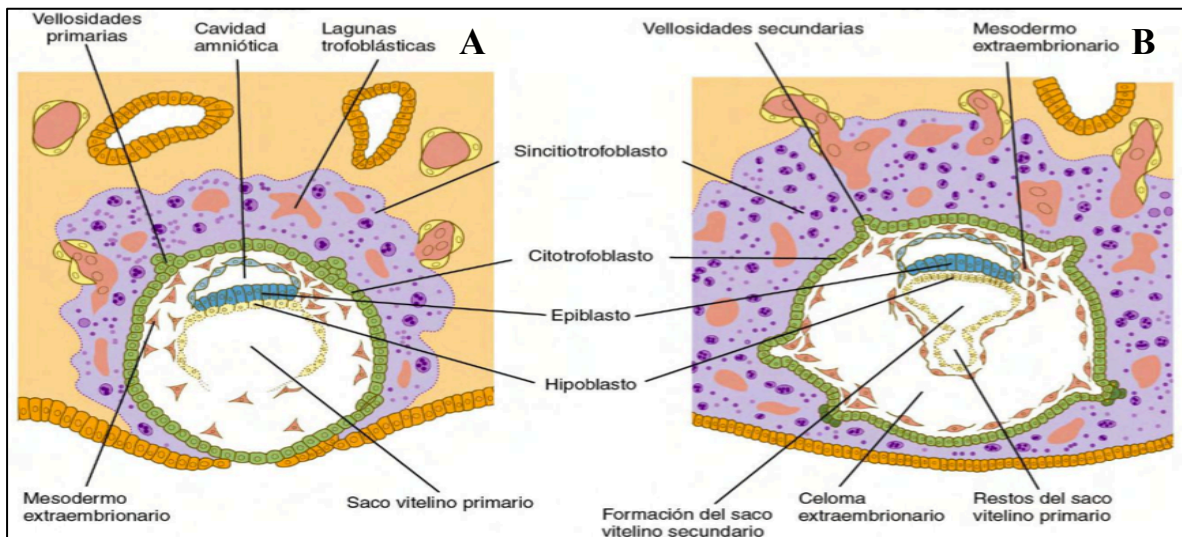


Figura 1.4. Implantación del blastocisto. A: el blastocisto casi completa la implantación, se están formando las vellosidades primarias y está apareciendo el mesoderma extraembrionario. B: se están formando las vellosidades secundarias (Carlson, B. 2014)(18).

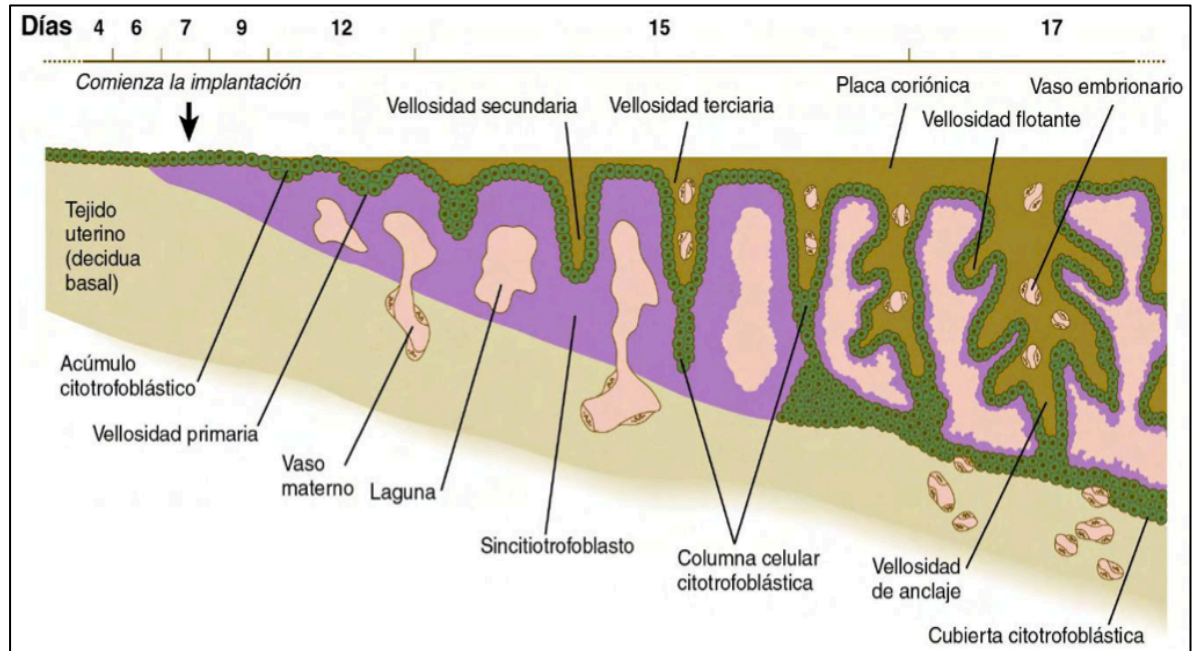


Figura 1.5. Formación de una vellosidad coriónica: comienza con acúmulo de citotrofoblasto (parte izquierda de la figura) y se desarrolla hasta formar una vellosidad de anclaje (parte derecha de la figura) (Carlson, B. 2014)(18).

La barrera placentaria está conformada por: sincitiotrofoblasto, citotrofoblasto, mesoderma extraembrionario y capilares fetales (23). Tiene como función impedir la mezcla entre la sangre materna y fetal, puesto que el intercambio entre ambos se realiza a través de ella con un comportamiento dinámico influido por el movimiento de la sangre que ingresa de forma pulsátil al espacio intervelloso. Además se ha demostrado que el grosor de ésta varía en base a la evolución del embarazo, ya que se observa un adelgazamiento generado por la desaparición progresiva del citotrofoblasto que comienza desde la semana 16, quedando solo sincitiotrofoblasto y escaso tejido conectivo en la vellosidad desde el tercer trimestre (28,42). Asimismo se observan cambios en el tejido conectivo que pasa de una matriz extracelular laxa a una densa con células fusiformes. También ocurre una modificación con infiltración de las células de Hofbauer, que son macrófagos fetales con fenotipo inmunosupresor, producen diversas citoquinas que actúan de manera paracrina sobre el trofoblasto y parecen ser importantes mediadores de la defensa de la interfase materno fetal (37).

La modificación de la vasculatura materna se lleva a cabo por las células del trofoblasto extravascular endovascular que penetran las arterias espirales e intersticiales, las cuales circundan las arterias espirales maternas lo que les permite prepararlas para la acción del trofoblasto endovascular (37). La circulación uteroplacentaria ocurre por la erosión de las paredes de las arterias espirales del útero y su modificación, que mientras crece el embrión proporcionan un flujo sanguíneo de presión baja cada vez mayor. Las células citotrofoblásticas infiltrantes que migran de las vellosidades de anclaje, infiltran las arterias espirales y por secreción de una matriz extracelular especializada y desplazamiento de elementos celulares producen modificaciones en éstas. El primer líquido materno que baña el trofoblasto no es muy celular y su tensión de oxígeno es baja; en este periodo los hematíes fetales contienen hemoglobina embrionaria que se adapta a una baja tensión de O₂. La hipoxia estimula la mitosis en las células citotrofoblásticas, lo que facilita el rápido crecimiento (18).

El crecimiento continuo del embrión exige un sistema eficaz de intercambio, que queda cubierta por la circulación útero-placentaria, cuyo sistema permite que la sangre materna y fetal logren un intercambio de gases y metabolitos por medio de difusión (29).

1.4 Circulación placentaria

En condiciones normales la sangre de la madre y el feto no se mezcla, puesto que los cotiledones reciben la sangre por medio de 80 a 100 arterias uterinas espirales que atraviesan la placa decidual y desembocan en los espacios intervillosos (42).

Se pueden distinguir dos tipos de circulación en la interfase materno-fetal:

- Circulación fetal: es de tipo venoso y desoxigenada, fluye a la placenta por dos arterias umbilicales. Por otro lado, la sangre de concentración significativamente mayor de oxígeno, retorna de la placenta a través de una vena umbilical hacia el feto (21).
- Circulación materna o uteroplacentaria: la sangre que está en el espacio intervelloso está temporalmente fuera del sistema circulatorio materno. Ésta ingresa al espacio intervelloso a través de las arterias endometriales de la decidua basal cuyo flujo es pulsátil y se impulsa por la presión sanguínea materna (17). Es rica en oxígeno y nutrientes, llega al útero por medio de las arterias uterinas, viaja por las arterias uteroplacentarias e ingresan a las lagunas placentarias con un impulso que genera un choque contra la placa coriónica, permitiendo deslizarse sobre las vellosidades coriónicas favoreciendo el intercambio a través de la membrana placentaria (19).

1.5 Patologías del embarazo asociadas al sistema inmunológico

El sistema inmune cumple el rol de proteger al organismo por medio del reconocimiento de antígenos potencialmente patógenos, eliminándolos a través de la inmunidad humoral o celular. No obstante, en ocasiones esta respuesta puede fallar; ya sea por inmunodeficiencia, autoinmunidad o hipersensibilidad (27).

En el caso de las enfermedades autoinmunes, se caracterizan por perder la tolerancia a los antígenos propios generando autoanticuerpos que reaccionan con diversas proteínas propias. Son enfermedades poco frecuentes, sin embargo, más común en mujeres, lo que conlleva a que en embarazadas se presente mayor riesgo de complicaciones como por ejemplo, aborto, muerte

fetal, parto pretérmino y crecimiento intrauterino restringido (27,43). Dentro de las enfermedades autoinmune que afectan a las embarazadas se encuentra el síndrome antifosfolípido, determinado como un estado de hipercoagulabilidad mediado por anticuerpos (2).

1.5.1 Síndrome antifosfolípido

Es un trastorno autoinmune que se puede clasificar en: primario cuando se presenta como entidad única y no está asociado a otra patología autoinmune y, secundario cuando está asociado a una enfermedad autoinmune, como por ejemplo, a lupus eritematoso sistémico (LES)(44). El cuadro clínico del SAF primario y secundario pueden ser idénticos, sin embargo, las manifestaciones clínicas en el SAF secundario podrían complicarse debido a la enfermedad subyacente (45). También está la forma catastrófica asociada a una tasa de mortalidad más alta que la forma clásica, con un índice de mortalidad de 50%, puede presentar insuficiencia multiorgánica de manera acelerada y está presente en 1% del total de los pacientes con SAF (1,46). El origen de la autoinmunidad aún no es claro, no obstante, hay un consenso generalizado en que este tipo de enfermedades tienen una etiología multifactorial, donde participan factores ambientales y genéticos (2).

Con respecto a la frecuencia del SAF primario, es desconocida, sin embargo la incidencia del secundario es de 30%. Este síndrome podría ser el estado más común de hipercoagulabilidad adquirida que ocurre en más del 2% de la población (1). Principalmente afecta a jóvenes y adultos de mediana edad con el 85% de los pacientes entre 15 – 50 años y es más común en mujeres que en hombres cuya relación puede variar según la forma en como se presente el síndrome (1:3 en SAF primario y 1:7 en SAF secundario) (45).

La principal causa de muerte es cerebral, estando presente en un 27,2% de pacientes con SAF, seguido por complicaciones cardíacas 19,8% e infecciones 19,8% (46).

1.5.1.1 Anticuerpos antifosfolípidos

Los aAFL son autoanticuerpos de tipo IgG o IgM, que se fijan a los fosfolípidos con carga negativa ubicados en la membrana celular (17,37). Comprenden un grupo heterogéneo de anticuerpos cuya única característica en común es su reactividad frente a los fosfolípidos de membrana, pero con diferente especificidad (47). En general, el aAL es más específico para determinar el SAF, mientras que los aCL son más sensibles. La especificidad de los aCL para el SAF aumenta con el título y es mayor con los isotipos IgG que con los isotipos IgM (43).

Otro anticuerpo considerado fundamental en el SAF es el anti- β_2 GPI, que reconocen a la β_2 GPI unida a la superficie de las células endoteliales, monocitos y plaquetas, por lo que se asocia principalmente a mayor riesgo de trombosis. La unión de este anticuerpo a la β_2 GPI expresada por las células trofoblásticas, resulta en la inhibición del crecimiento y diferenciación (3).

Además de las manifestaciones clínicas ya mencionadas, también se encuentran las no trombóticas o también denominadas como no clásicas, tales como trombocitopenia, anemia hemolítica, epilepsia, entre otras. Muchas de las manifestaciones clínicas no clásicas mencionadas, están asociadas a persistencia de los aAFL pero no son específicas del SAF por lo que no están incluidas como criterios clínicos (43).

La mayoría de las evidencias sobre los mecanismos potencialmente responsables de la formación de trombos en el SAF han sido en modelos in vitro que muestran que se produce a

través de distintas rutas. Entre ellas se podría mencionar: la interacción con células endoteliales a través de la unión a β_2 GPI, la promoción de la adhesión endotelial de leucocitos a través del aumento de la expresión del factor tisular en células endoteliales y monocitos, la promoción de la agregación plaquetaria y la interferencia en la cascada de la coagulación inhibiendo la actividad anticoagulante (ver figura 1.6 y 1.7) (48).

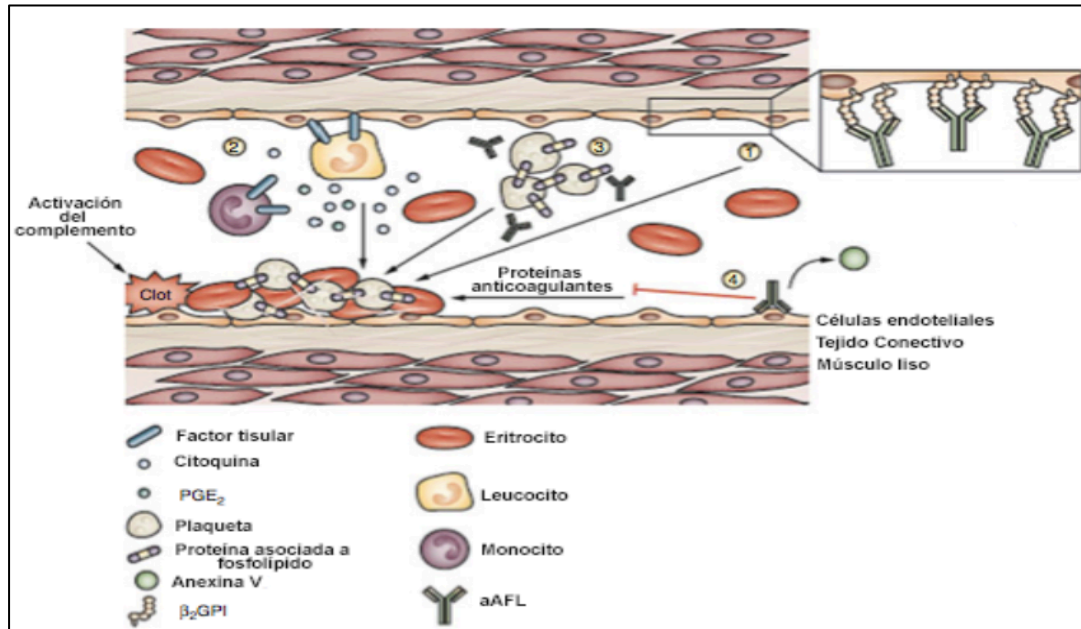


Figura 1.6. Mecanismos patógenos de coagulación mediados por anticuerpos antifosfolípidos. 1: aAFL interactúan con células endoteliales principalmente por la unión a β_2 GPI . 2: aAFL aumentan la expresión del factor tisular en células endoteliales y monocitos, promueven la adhesión endotelial de leucocitos, secreción de citoquinas y síntesis de PGE₂ (prostaglandina E₂). 3: aAFL reconocen proteínas asociadas a fosfolípidos de las plaquetas promoviendo su agregación. 4: aAFL interfieren con los componentes plasmáticos de la cascada de la coagulación, inhibiendo la actividad anticoagulante (Modificado de Luigi, P. 2015)(48).

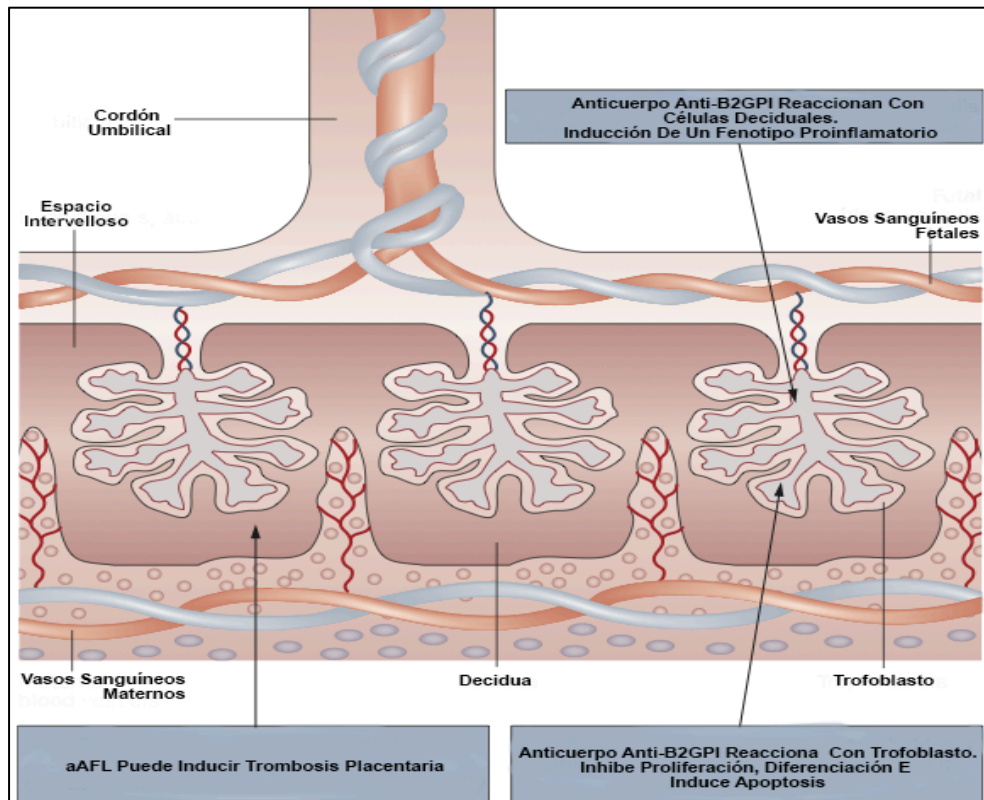


Figura 1.7. Efectos de aAFL sobre la placenta: la trombosis placentaria podría ser inducida debido a la unión de aAFL a monocitos, células endoteliales y plaquetas. Unión de aAFL a membrana del trofoblasto resulta en la modulación de funciones biológicas celulares. Abreviaturas: aAFL: anticuerpos anti-fosfolípidos; anti- β 2GPI : anticuerpo β 2 glicoproteína I (Modificado de Luigi, P; et al 2011)(48).

1.5.1.2 Diagnóstico

Los criterios para incluir a un paciente dentro de este síndrome han variado a lo largo del tiempo y se han ido agregando nuevas categorías para definirlo; tales como “probable” cuando los pacientes son anticuerpos antifosfolípidos positivo, pero carecen de los criterios clínicos necesarios para ser definitivo y “seronegativo” cuando presenta manifestaciones clínicas,

pero es negativo para los anticuerpos; estas variaciones han ocurrido debido a que en ciertas características clínicas y de laboratorio que antes no se contemplaban en los criterios (trombocitopenia o livedo reticularis), se ha demostrado que se presentan con alta frecuencia. Por otro lado se encuentran los pacientes con manifestaciones atípicas que no cumplen completamente con los criterios (2,43).

Dentro de los criterios clasificatorios para el SAF, están:

- Criterio clínicos: uno o más fenómenos tromboticos venoso, arterial o de pequeños vasos en cualquier órgano o tejido. Se debe confirmar a través de estudios de imagen, doppler o histológico (2,49).

Manifestaciones obstétricas: uno o más muertes de un feto morfológicamente normal a partir de la décima semana de gestación. Uno o más nacimientos prematuros de un neonato morfológicamente normal a partir de la semana 34 de gestación por preeclampsia o eclampsia grave o insuficiencia placentaria grave. Tres o más abortos consecutivos antes de la décima semana de gestación, descartando previamente anomalías en la anatomía materna, alteraciones hormonales o cromosómicas (2,49).

- Criterios de laboratorio: aCL isotipo IgG y/o IgM en sangre de título moderado o alto en 2 o más ocasiones separadas por 12 semanas y determinadas por ELISA. AAL presente en plasma en 2 o más ocasiones separadas por 12 semanas, determinado según la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (prolongación de la coagulación dependientes de fosfolípidos, la no corrección de prolongación de coagulación al añadir plasma pobre en plaquetas, acortamiento o corrección de la prolongación de la coagulación al añadir fosfolípidos o exclusión de otras coagulopatías) (2,49).
- Anticuerpos anti- β_2 GPI isotipo IgG y/o IgM en sangre, presentes a título moderado o alto en 2 o más ocasiones separadas por 12 semanas y determinado mediante la técnica ELISA (2,49).

Para determinar a un paciente con SAF, debe presentar al menos un criterio clínico y uno analítico. Sin embargo, no se puede diagnosticar en los casos en que la presencia del criterio analítico y clínico estén separadas por menos de 12 semanas o más de 5 años (43).

1.5.1.3 Tratamiento

En el caso de los eventos trombóticos como manifestación primaria, se busca evitar cualquier factor de riesgo vascular adicional, tales como, fumar, control del peso corporal, de la presión arterial, lípidos, etc. (45,50). Además el uso de anticonceptivos orales que contienen estrógenos o la terapia de reemplazo de estrógenos también debe evitarse, debido a su actividad protrombótica (50). En el SAF primario una dosis baja de aspirina (75-100mg/día) es recomendable para evitar la agregación plaquetaria; la heparina de bajo peso molecular se utiliza como terapia de primera línea después de la trombosis, luego se cambia a warfarina por sus efectos anticoagulantes (51,52). En el SAF secundario se recomienda hidroxiclороquina y baja dosis de aspirina (50). En algunos casos también se recomiendan esteroides (51). Para situaciones refractarias y difíciles de SAF primario, el tratamiento consiste en heparina o estatina y fármacos inmunosupresores selectivos (agentes anti-B, rituximab y belimumab) (50,51).

Por otro lado, el tratamiento para las manifestaciones obstétricas se divide en:

- Pacientes con SAF basado en historial solo con morbilidad gestacional: dosis bajas de aspirina combinado con dosis profilácticas de heparina de bajo peso molecular (50).
- Pacientes con SAF basado en historial trombótico sin embarazos previos: dosis baja de aspirina combinado con warfarina, siendo esta última reemplazada por heparina al confirmar el embarazo (50).

Para los casos refractarios donde la combinación de aspirina y heparina no cumplen el objetivo, se recomienda aumentar la dosis de heparina de bajo peso molecular pasando de una dosis profiláctica a una dosis terapéutica, uso de hidroxiclороquina, dosis baja de corticosteroides y aféresis (intercambio plasmático o inmunoadsorción) (50).

1.5.1.4 Pronóstico

La tasa de embarazos exitosos en pacientes con SAF sin tratamiento es baja, siendo un 20-30% de los casos. Mientras que pacientes con el tratamiento mencionado alcanzan una tasa de 70% de tener un parto vivo (50).

En un estudio de 10 años aproximadamente el 50% de los pacientes que son positivos para aAFL pueden desarrollar el síndrome; el 59% de estos casos experimenta recurrentes eventos trombóticos con una mortalidad del 10%. Además hay evidencia de que estos eventos trombóticos contribuyen a su vez a daños irreversibles de los órganos (53).

Uno de los mecanismos patogénicos propuestos en el SAF es la interacción de los aAFL y otras moléculas con propiedades anticoagulantes como la anexina V que tiene un rol trombomodulador, ya que cubre las membranas fosfolípídicas de las células placentarias y del endotelio vascular evitando que los fosfolípidos participen en los procesos de coagulación. Respecto a lo mencionado se ha demostrado in vitro que los aAFL desplazan esta molécula de la bicapa fosfolípídica (2). Otro ejemplo, es la β_2 GPI, cofactor de los fosfolípidos con propiedades anticoagulantes; tiene un rol importante en la preservación de la superficie vascular formando un complejo con los fosfolípidos y la protrombina que inhibe la activación del factor de coagulación XII (54). La expresión de la β_2 GPI en la superficie de la placenta durante el embarazo en condiciones normales, se debe a que el nivel de remodelación del tejido durante la placentación

es alto; a su vez el trofoblasto expresa fosfolípidos aniónicos en la membrana por lo que la placenta queda como un blanco importante para los aAFL (55).

A pesar de que se pensaba que los abortos espontáneos recurrentes resultaban de la insuficiencia placentaria y la trombosis, culminando en un infarto placentario, no todas las mujeres con pérdida de embarazo asociado a los aAFL tienen signos de infarto o vasculopatía placentaria (56). Respecto a la pérdida del embarazo en mujeres con este síndrome, se ha propuesto que podría ser por la interacción del aAFL circulante materno al endotelio de los vasos deciduales, que inhibirían la invasión del trofoblasto endovascular (57). Una de las vías de señalización que le confiere la capacidad de invadir al trofoblasto es el transductor de señal de Janus quinasa y activador de la transcripción (JAK-STAT), de la cual diversos estudios sugieren que juega un rol principal en las vías que modulan la placentación (58,59). Una de las citoquinas que tiene la capacidad, a través de su receptor, de activar la vía STAT-3 es IL-6 (interleucina 6). Estudios han establecido que las células trofoblásticas expresan esta citoquina que actúa de manera autocrina y/o paracrina con las células del trofoblasto para promover la actividad de STAT-3 (55).

1.6 Vías de señalización JAK/STAT y trofoblasto

La capacidad de migración e invasión de las células trofoblásticas iniciada inmediatamente después de la implantación en el endometrio es regulada por numerosas citoquinas, como por ejemplo, factor inhibidor de leucemia (LIF), interleucina-6, factor de crecimiento de hepatocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos, entre otros. Estos interactúan con receptores específicos de las células trofoblásticas activando cascadas de señalización intracelular que inducen la expresión de genes importantes para la invasión. Una de estas vías de señalización, como se mencionó anteriormente es JAK/STAT (58).

Las proteínas STAT son factores de transcripción ubicadas en el citoplasma que se activan por fosforilación a causa de una tirosina en respuesta a la estimulación del receptor de citoquinas. La fosforilación de Janus quinasa (JAK) conduce a la dimerización de STAT y su translocación al núcleo, continuado por la activación de la transcripción (60).

La unión de las citoquinas a su receptor, induce a la yuxtaposición de tirosina quinasa asociadas al receptor Janus quinasa o JAKs, permitiéndoles fosforilar. La activación de este receptor faculta a que las proteínas STATs intracelulares sean capaces de unirse a las JAKs, siendo así fosforiladas y activadas, luego se disocian del receptor y forman homo u heterodímeros que se trasladan al núcleo de la célula. En el núcleo, las STATs regulan o aceleran la transcripción de proteínas uniéndose a las regiones promotoras de éstas, como por ejemplo, la transcripción de la proteína SOCS, un regulador específico que genera una retroalimentación negativa en STAT-3 uniéndose a las JAKs (58,61) (ver figura 1.8).

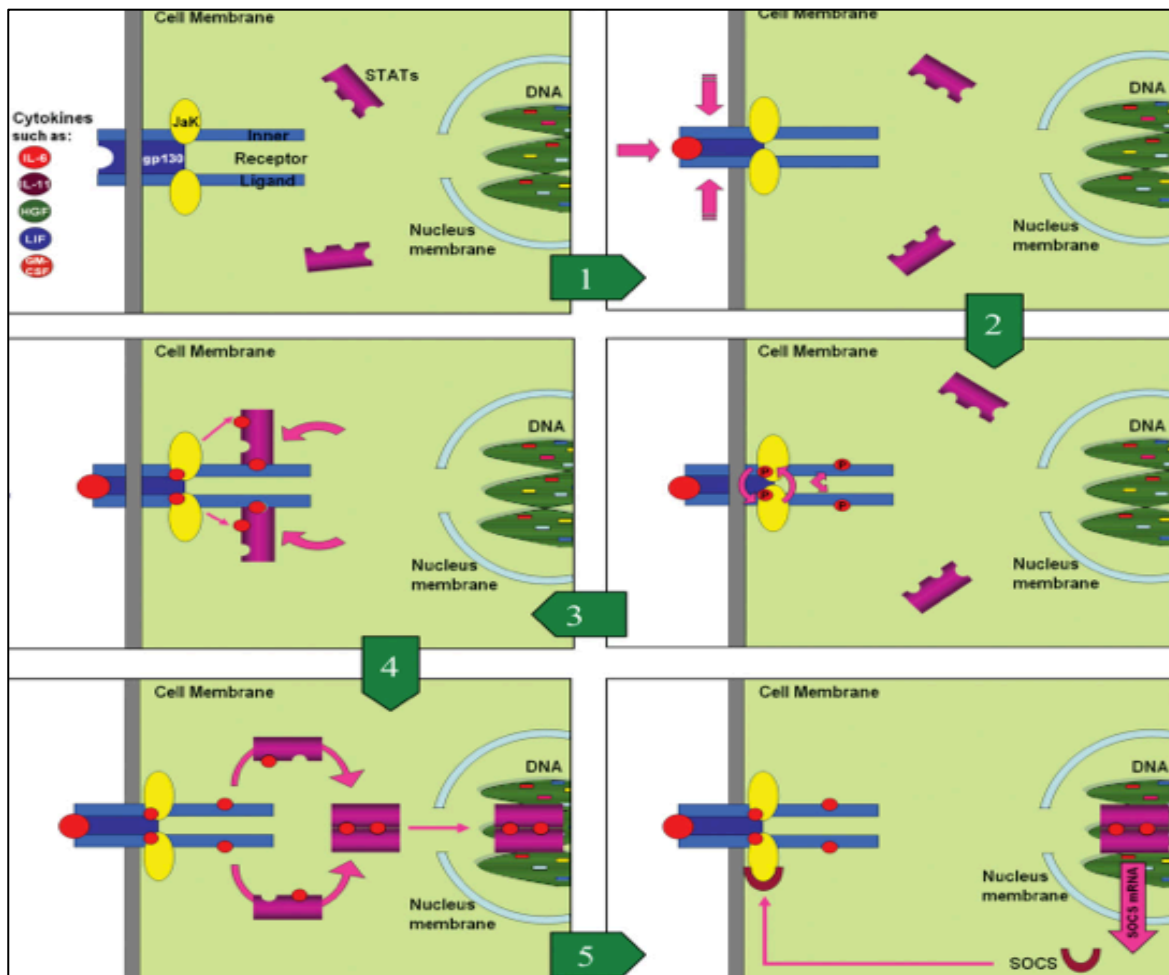


Figura 1.8. Vía de señal de transducción JAK-STAT: (1) Citoquinas se unen al receptor específico; (2) Luego de unirse las citoquinas al receptor JAKs se fosforilan y se activan; (3) STATs se unen a su propio receptor ligando, se fosforilan y se activan; (4) STATs se separan del receptor, formando dímeros (homo y heterodímeros) y se trasladan al núcleo para regular la transcripción de proteínas; (5) un grupo de las proteínas producidas es la familia de las SOCs, las cuales limitan la promoción de la activación de STAT por la unión de los JAKs (Fitzgerald, J; et al 2008)(58).

La alteración de la señalización del receptor de citoquina asociada a la vía de señalización JAK, tiene importantes consecuencias patológicas, observadas en trastornos inmunes y hematopoyéticos. Como por ejemplo, inmunodeficiencias, enfermedades inflamatorias, desórdenes mieloproliferativos, leucemias, trastornos autoinmunes, entre otros (62,63).

En el caso del trofoblasto, STAT-3 fosforilada, está fuertemente asociada a la capacidad invasora. En estudios se ha sugerido que la desregulación de la actividad de STAT-3 en el desarrollo de la placenta está involucrada en los mecanismos de procesos patológicos, como es la placentación defectuosa, disminución de la invasión y preeclampsia (64). Se ha demostrado que es parte fundamental en el desarrollo embrionario; estudios con embriones deficientes de STAT-3 mueren en el útero dentro de 6 a 7 días posteriores al coito. Además la supresión local de la actividad de STAT-3 ha dado como resultado una disminución de la implantación y supresión de la decidualización (65).

En un estudio de revisión sistemática relacionado a los aAFL y la placenta, se menciona que hay evidencia que sugiere que el SAF afecta a la coagulación y activación del complemento en trofoblasto in vitro, sin embargo, en consenso de estudios in vivo refieren que no sería el principal mecanismo por el cual los anticuerpos podrían causar complicaciones obstétricas. Además indican que la mayor parte de las investigaciones se han enfocado en los cambios del trofoblasto en función de la presencia de los aAFL y pocos han dirigido sus estudios a las posibles vías intracelulares que podrían estar afectada (66).

En base a lo referido anteriormente, donde se establece que la vía JAK/STAT está relacionado principalmente en la invasión trofoblástica y que alteraciones podrían causar diversas patologías obstétricas; además de que aún no se ha dilucidado cuáles serían las vías intracelulares afectadas en relación al SAF, se propone evaluar con la presencia de aAFL, alteraciones en la presencia y activación de la proteína STAT 3 en las células de trofoblasto en un modelo in vitro; de esta manera aportar con la patogenia del SAF.

CAPÍTULO 2. PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA

2.1 Pregunta de investigación

¿Existe alteración en la presencia y activación de la proteína STAT-3 en células trofoblásticas HTR-8/SVneo estimuladas con anticuerpos antifosfolípidos en un modelo in vitro?

2.2 Hipótesis

En presencia de los anticuerpos antifosfolípidos, disminuye la presencia y activación de la proteína STAT-3 en células de trofoblasto HTR-8/SVneo en un modelo in vitro.

2.3 Relevancia

En este proyecto de investigación se pretende estudiar el efecto de los aAFL relacionado a la presencia y activación de la proteína STAT3 en células de trofoblasto HTR-8/SVneo, utilizando modelos in vitro; de esta manera contribuir en esclarecer los mecanismos fisiopatológicos del SAF que pueden llevar a morbilidad gestacional.

CAPÍTULO 3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Determinar la presencia y activación de la proteína STAT-3 en la línea celular de trofoblasto HTR-8/SVneo, estimulada con aAFL provenientes de pacientes con diferentes manifestaciones clínicas del SAF, en un modelo in vitro.

3.2 Objetivos Específicos

➤ Evaluar en presencia de IgG extraídas de sueros de pacientes con SAF, la presencia de la proteína STAT-3 en células trofoblásticas HTR-8/SVneo en un modelo in vitro mediante la técnica de inmunohistoquímica.

➤ Evaluar en presencia de IgG extraídas de sueros de pacientes con SAF, la activación de la proteína STAT-3 mediante la detección de STAT-3 fosforilada en células trofoblásticas HTR-8/SVneo en un modelo in vitro mediante la técnica de inmunohistoquímica.

➤ Evaluar en presencia de IgG extraídas de sueros de pacientes con SAF, la presencia de SOCS-3 en células trofoblásticas HTR-8/SVneo en un modelo in vitro mediante la técnica de inmunohistoquímica.

CAPÍTULO 4. METODOLOGÍA

4.1 Tipo de estudio

El siguiente estudio según la intervención del investigador se caracteriza por ser de tipo experimental, donde se evaluará el efecto de IgG extraídas de sueros de pacientes con SAF en relación a la presencia y activación de la proteína STAT-3 en células trofoblásticas HTR-8/SVneo en modelos in vitro. Es un estudio de corte transversal, ya que los datos se recolectaron en momento y tiempo único.

La investigación debido al número de variables de interés es de tipo analítico, en el cual se consideraron como variable independiente la presencia/ausencia de los aAFL y como variable dependiente la presencia y activación de la proteína STAT-3 en las células trofoblásticas HTR-8/SVneo .

4.2 Población de Estudio

La población de estudio corresponde a líneas celulares de citotrofoblasto extraveloso HTR8/SVneo, que fue desarrollada en un cultivo de explante de placenta humana en el primer trimestre e inmortalizada por transfección con un ADNc que codifica el antígeno T40 grande del virus de simio (67).

Criterios de inclusión: esta población se seleccionó con el argumento de que exhiben un alto índice de proliferación y comparten varias similitudes fenotípicas con las células trofoblásticas del primer trimestre, incluyendo fenotipo invasivo in vitro.

Criterios de exclusión: se excluirán del estudio todo cultivo con células HTR-8/SVneo que no alcance los parámetros esperados de viabilidad y proliferación celular.

4.3 Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra se escogió por conveniencia, estableciendo 5 casos nombrados a continuación:

- RPMI: células HTR8/SVneo en matrigel en medio solo (RPMI).
- NHS: células HTR8/SVneo en matrigel con IgG de suero de mujeres sanas.
- Pneg: células HTR8/SVneo en matrigel con IgG de suero de mujeres con morbilidad gestacional y negativas para aAFL.
- PM: células HTR8/SVneo en matrigel con IgG de suero de mujeres con morbilidad gestacional y presencia de aAFL
- PM/VT: células HTR8/SVneo en matrigel con IgG de suero de mujeres con morbilidad gestacional, trombosis vascular y positivas para aAFL

Cada caso o ensayo de invasión se hizo por triplicado, para evitar el error interensayo

4.4 Variables de estudio

Independiente: presencia/ausencia de aAFL.

Dependientes: presencia y activación (STAT-3p) de la proteína STAT-3 y presencia de SOCS-3.

CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cultivos celulares obtenidos desde el Grupo de Reproducción de la Sede de Investigación Universitaria de la Universidad de Antioquia, Medellín.

5.1.1 Cultivo de células trofoblásticas HTR8/SVneo

La línea celular HTR-8/SVneo (trofoblasto extravelloso de primer trimestre inmortalizado con un virus simiano) se mantuvo en medio RPMI1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) y 1% de antibióticos. El medio se cambió cada 48 horas.

5.2 Suero de las pacientes

La selección de sueros de las pacientes obtenidas del Grupo de Reproducción correspondieron a 4 grupos de mujeres con los criterios de inclusión mencionados:

- Suero de mujeres con morbilidad gestacional, trombosis vascular y positivas para aAFL (PM/VT) =7.
- Suero de mujeres con morbilidad gestacional y presencia de aAFL (PM) = 8.

- Suero de mujeres con morbilidad gestacional y negativas para aAFL (Pneg) = 10.
- Suero de mujeres sanas (NHS) = 7.

Los grupos de pacientes con trombosis y con morbilidad gestacional asociada al SAF fueron definidos utilizando los criterios de Sapporo revisados y mencionados anteriormente (2,49).

Para todos los grupos se tuvo en cuenta los siguientes criterios de exclusión:

- Negativa del paciente, familiares o del médico tratante para ingresar al estudio.
- Pacientes con otras enfermedades asociadas, tales como, infecciones, diabetes, cáncer o cualquier otra enfermedad crónica.

5.2.1 Procedimiento de recolección y seguimiento de las pacientes

La investigadora principal (médica inmunóloga) directora del proyecto en el cual se enmarca la presente tesis, a través de la base de datos del Grupo de Reproducción de la Universidad de Antioquia, identificó a las pacientes que cumplían con los criterios de inclusión para luego contactarse con ellas y solicitarles la colaboración en el estudio, donando la muestra de sangre con una previa firma del consentimiento informado. Luego de obtener la muestra, se verificó la presencia de los aAFL y se entregaron estos resultados a las pacientes para su historia clínica.

Para el caso de los individuos sanos, fueron captados entre personas pertenecientes a la Sede de Investigación Universitaria, de la Universidad de Antioquia en Medellín, Colombia con previa firma del consentimiento informado.

5.2.2 Pruebas de laboratorio para el diagnóstico del SAF

- Determinación de los anticuerpos anti- β_2 GPI por medio de la técnica ELISA: se empleó el kit comercial Quanta Lite de Inova Diagnostics para semicuantificar los niveles de IgG anti- β_2 GPI.
- Determinación de los anticuerpos aCL por medio de la técnica ELISA: se utilizó el kit comercial para cuantificar los niveles de IgG aCL de Biosystems, según indicaban las instrucciones del fabricante.
- Determinación del aAL: se evaluó por tiempo parcial de tromboplastina activado usando el kit comercial PTTA de Organon Técnica y la determinación del tiempo de víbora de Russel con el kit comercial y tamizaje LAC SCREEN y LAC CONFIRM (Instrumentation laboratories) para confirmarlo.

A partir de estas técnicas se verificó que las pacientes tuvieran alguna de las pruebas positivas en al menos 2 ocasiones y con un intervalo de 12 semanas.

5.3 Incubación de las células trofoblásticas con las IgG de las pacientes con SAF

Posterior a la obtención de los sueros tanto de donantes como de pacientes se procedió aplicar a los distintos ensayos de invasión, los cuales refieren a RPMI, Pneg, NHS, PM y PM/VT. Ver Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Listado de cultivos celulares con los respectivos estímulos aplicados.

Estímulo	Muestras	Detalle
OPTIMEM o RPMI	OPTIMEM O RPMI	En medio solo
Anticuerpos tipo IgG (50ug/mL):	NHS	Mujeres sanas
	Pneg	Morbilidad gestacional, negativas para aAFL
	PM	Morbilidad gestacional
	PM/VT	Morbilidad gestacional y trombosis vascular

Cada ensayo de invasión con su respectivo estímulo se realizó por triplicado. Ver Tabla 5.2.

Tabla 5.2. Listado de ensayos

ENSAYO	DETALLE
INVASIÓN 1	Células HTR-8/SVneo en matrigel con los estímulos por 48hrs. (RPMI, NHS, Pneg, PM y PM/VT)
INVASIÓN 2	Células HTR-8/SVneo en matrigel con los estímulos por 48hrs. (RPMI, NHS, Pneg, PM y PM/VT)
INVASIÓN 3	Células HTR-8/SVneo en matrigel con los estímulos por 48hrs. (RPMI, NHS, Pneg, PM y PM/VT)

5.3.1 Preparación de cultivos realizados en Colombia

En una placa de cultivo de 24 pozos se agregaron 800 ml de RPMI-SBF al 10%. Las células HTR-8/SVneo (1×10^5 células en 200 ml) se cultivaron con RPMI1640 sin IgG (control sin tratamiento) o con IgG policlonal (50 mg / ml) según fue el caso.

Se sembraron en una membrana con poros de $8 \mu\text{m}$ de tamaño (Millipore, Billerica, EE.UU.) recubierto con factor de crecimiento reducido de la matriz extracelular ECM Gel (Sigma) con dilución 1:3 en medio DMEM libre de suero (Gibco®). Después de 24 horas, los

insertos se recuperaron y las células trofoblásticas situadas en el lado superior que no invadieron la membrana se retiraron usando hisopos de algodón.

5.3.2 Fijación e inclusión en parafina de los cultivos

El medio de cultivo se retiró y se fijaron las muestras en formaldehído al 4% en PBS dejando a 4°C por una hora, posteriormente se lavaron 2 veces en PBS por 10 minutos cada uno. Las muestras fueron deshidratadas en una serie de alcoholes de grados ascendentes (10 minutos cada uno) y luego se pasaron por propanol I, II y II (10 min cada uno). Posteriormente se impregnaron en parafina líquida 3 veces (20 minutos cada una).

La inclusión se realizó en moldes metálicos con parafina líquida (60°C) y cassetes de plásticos, refrigerados hasta que se retiraron del molde metálico, obteniendo finalmente 15 tacos (ver figura 5.1)(Ver Anexo 1 para mayor detalle del protocolo).

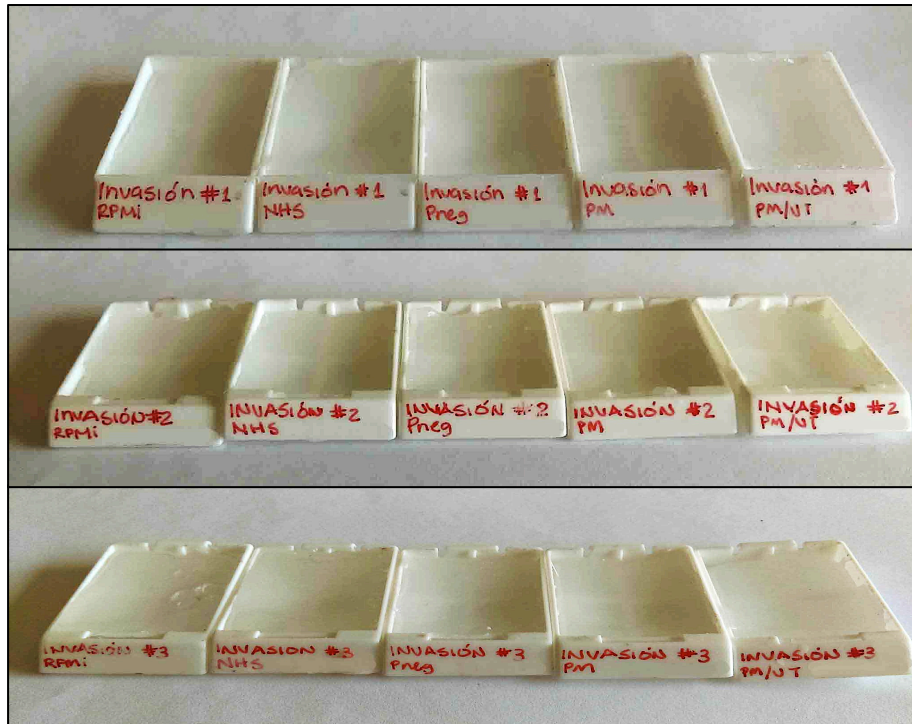


Figura 5.1. Tacos de parafina obtenidos de los ensayos de invasión 1, 2 y 3: 15 tacos de parafina en total.

5.4 Procesamiento de cultivos en taco de parafina en Chile

Los tacos de parafina fueron cortados en serie a 5 μ m de grosor en un micrótomo marca Leitz Wetzlar; los cortes se depositaron en un recipiente con agua destilada fría mezclada con 10 ml de alcohol 95° (referencia de una tapa) y luego se dejaron en un baño de estirado a 40°C. Al ser muestras pequeñas y poco visibles en los tacos de parafina y en los cortes de 5 μ m, los primeros fueron procesados con la técnica Hematoxilina-Eosina hasta llegar al plano de corte.

Para la técnica de Hematoxilina-Eosina los cortes fueron adheridos a portaobjetos tratados previamente con polilisina (Santa Cruz Biotechnology) y secados en estufa (Merck) a 60°C por 1 hora. En cambio para las técnicas de inmunohistoquímica, los cortes fueron adheridos a portaobjetos previamente tratados con silane (Sigma- Aldrich) o en portaobjetos cargados (Citoglas) y secados en estufa (Merck) a 60°C por 1 hora.

5.5 Hematoxilina – eosina

Los primeros cortes realizados en los tacos de parafina de los distintos ensayos (RPMI, NHS, Pneg, PM y PM/VT) fueron teñidos con tinción de rutina Hematoxilina-Eosina, con el fin de llegar al plano de corte con células HTR-8/SVneo .

Para realizar la técnica de rutina, los cortes fueron desparafinados y rehidratados en una serie de xilol (10 minutos cada uno) y alcoholes de grados descendente y posteriormente lavados en agua destilada (5 minutos cada uno). Se realizó tinción nuclear con hematoxilina de Harris por 30 segundos y su viraje en agua corriente por 10 minutos. Se dejó en alcohol de 95% (5 min.) para teñir con eosina alcohólica durante 4 segundos. Finalmente se deshidrataron los cortes en alcoholes de grados ascendentes, se aclararon en xilol (5 minutos cada uno) y se cubrieron con medio de montaje hidrófobo (Entellan, Merck). Para mayor detalle del protocolo, ver Anexo 2.

5.6 Inmunocitoquímica

Al llegar al plano de corte de cada muestra (RPMI, NHS, Pneg, PM y PM/VT) por cada uno de los tacos (15 tacos en total) se realizaron 4 cortes (3 cortes positivos y 1 negativo) para cada uno de los anticuerpos. Los cortes fueron desparafinados y rehidratados en una serie de xilol y alcoholes de grados descendente y lavados en agua destilada respectivamente (10 minutos cada uno).

Para los anticuerpos y procedimientos que lo requirieron, se realizó recuperación antigénica sumergiendo los cortes de las muestras en solución buffer citrato a pH 6 (que fue previamente calentado por 20 minutos) durante 15 minutos a 95°C en una vaporera (Oster). Posteriormente se dejaron enfriar a temperatura ambiente manteniendo las placas en buffer durante 15 minutos para luego lavar en agua destilada por 10 minutos. Se efectuaron 3 lavados en PBS 0,1M a pH 7,2 por 5 minutos cada uno.

A continuación se realizó el bloqueo de peroxidasa endógena sumergiendo las placas en una solución de peróxido de hidrógeno (30% marca Merck) diluido al 3% en PBS a temperatura ambiente durante 30 min utilizando el agitador orbital (Labnet). Se procedió a lavar 3 veces en PBS 0,1M a pH 7,2 por 5 minutos cada uno. Para evitar marcación de sitios inespecíficos en una cámara húmeda, los cortes son marcados con un lápiz hidrófobo y se les aplicó una solución de Cas-Block (Invitrogen) durante 30 min a temperatura ambiente, luego se incubaron en suero normal de cabra (Gibco®) al 5% diluido en PBS/Tween 20 durante 30 minutos a temperatura ambiente.

La incubación del anticuerpo primario (ver tabla 5.3) fue aplicado en una dilución en PBS/Tween 20 estandarizada previamente y se dejaron actuar durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente las placas fueron lavadas con 3 cambios en PBS 0,1M a pH 7,2 por 5 minutos cada uno e incubados con el anticuerpo secundario respectivo conjugado con HRP en una dilución en PBS 0,1M a pH 7,2 estandarizada previamente, durante una hora a temperatura ambiente.

Se continuó con 3 cambios en PBS 0,1M a pH 7,2 por 5 minutos cada uno. Seguidamente se realizó el revelado cromogénico con NovaRed – Kit (Vector® Prolab LTDA.) en un tiempo estandarizado y determinado previamente a cada anticuerpo y se realizó un lavado con agua destilada durante 5 min para impedir que la solución reveladora continúe reaccionando. Se realizó contraste nuclear con Hematoxilina de Harris por 15 segundos aproximadamente, se lavó en agua corriente por 8 minutos para el viraje. Finalmente se deshidrataron los cortes en alcoholes de grados ascendentes (1 dipping rápido por cada uno), se aclaró en xiloles (5 minutos) y se cubrieron con medio de montaje hidrófobo (Entellan, Merck). Para mayor detalle de cada protocolo, ver Anexo 3, 4 y 5.

- Controles: en el mismo portaobjetos con controles externos de tejidos humanos, el primer corte como control positivo se incubó con anticuerpo primario correspondiente y al segundo corte como control negativo se le aplicó solución de PBS 0,1 M en vez de anticuerpo primario. Además en el mismo portaobjetos de los cortes con los distintos ensayos (RPMI, NHS, Pneg, PM y PM/VT) al último corte se le aplicó una solución de PBS 0,1M en vez de anticuerpo primario como control negativo (Ver Figura 5.2).

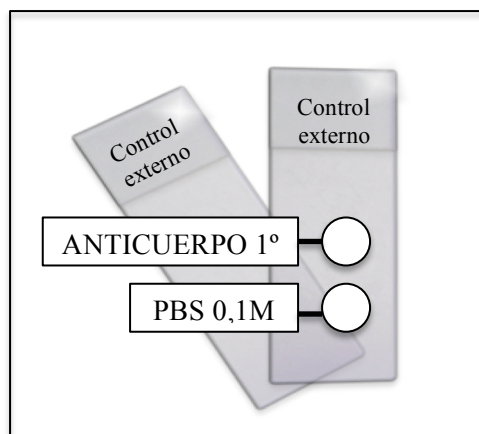


Figura 5.2. Esquema de la disposición de control externo positivo y negativo (Modificado de <https://multimed.com.mx/consumibles/229-portaobjetos-.html>)(90).

Tabla 5.3. Listado y detalle de anticuerpos.

Anticuerpo Primario	Código y empresa	Isotipo y Origen	Especificidad	Recuperación Antigénica	Dilución	Anticuerpo Secundario
STAT 3	Santa Cruz Biotechnology, H-190: sc-7179	IgG Anticuerpo policlonal de conejo	Stat3 P92 en ratón, rata, humano, pez cebra	No	1:100 en PBS/Tween 20	IgG de cabra, anti-conejo. Conjugado en HRP (1:1000 en PBS)
STAT 3 fosforilada	Cell Signaling technology, Phospho-STAT3 (TYR705) #9131	IgG Anticuerpo policlonal de conejo	Stat3 fosforilada en Tyr705 Ratón, rata, humano, mono	Sí	1:100 en PBS/Tween 20	IgG de cabra, anti-conejo. Conjugado en HRP (1:1000 en PBS)
SOCS 3	Santa Cruz Biotechnology, H-130: sc-9023	IgG Anticuerpo policlonal de conejo	SOCS 3 en ratón, rata y humano	Sí	1:500 en PBS/Tween 20	IgG de cabra, anti-conejo. Conjugado en HRP (1:1000 en PBS)

5.7 Análisis inmunocitoquímico de los ensayos

El análisis inmunocitoquímico de cada placa fue examinado en un microscopio Olympus CX21 con cámara integrada (Olympus DP71) y conectado a un computador. Todas las microfotografías fueron tomadas en las mismas condiciones, en aumento final de 1000x y obtenidas por el software DPController y DPManager. Se utilizó la técnica de iluminación Köhler (68) que permite iluminar de manera uniforme las muestras.

De todas las microfotografías obtenidas se escogió 1 por cada corte (cada placa contenía 3 cortes) de todos los ensayos, con un total de 45 fotos. Para el análisis densitométrico (densidad óptica integrada o DOI) de cada microfotografía, se utilizó como software Image Pro Plus. Los valores obtenidos por el software fueron ordenados en Excel para su posterior análisis GraphPad Prism©.6.0.

5.8 Manejo y análisis estadístico de los datos obtenidos

El procesamiento y el análisis de los datos se realizó con el software GraphPad Prism©.6.0 donde los datos fueron expresados como la media más la desviación estándar de los experimentos por triplicado de cada uno de los estímulos con los sueros individuales, previa evaluación de la distribución normal.

En el caso del ensayo de invasión 3 NHS, si bien se logró llegar al plano de corte verificando la presencia de las células, los cortes posteriores al de Hematoxilina-Eosina no presentaron células a pesar de haber cortado el taco en su totalidad. Es por esto que para el caso mencionado solo se consideraron los ensayos de invasión de NHS 1 y 2 para inmunocitoquímica, por lo que los datos se resumieron en medianas y rangos aplicando la prueba estadística no-paramétrica de Kruskal-Wallis con un post-test de Dunn, donde se compararon todas las muestras con el control NHS. La confiabilidad de los resultados se estableció con un intervalo de confianza del 95% y una estimación de error alfa del 5%. Cada estudio comparativo se realizó bajo las mismas condiciones para reducir la variabilidad.

5.9 Consideraciones éticas

Este proyecto se considera de riesgo mínimo. Se sigue las normas establecidas de la Declaración de Helsinki, octubre 3 de 2000 y bajo las normas del Ministerio de Protección Social de Colombia, resolución N° 00084730 de 1993 en el artículo 11 de la misma y en la Ley 84 de 1989, donde se exige el respeto de los derechos y la dignidad de los pacientes, sin manipulación o alteración de la información de las historias clínicas.

Cada individuo que participó en la investigación, firma un consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética de la Sede de Investigación Universitaria (SIU) de la Universidad de Antioquia en Medellín, Colombia. Este consentimiento fue conocido por cada paciente y firmado por ella o un representante, previo a la obtención de la muestra de sangre. Todos aquellos que aceptaron y firmaron el consentimiento, se les entregó una copia del mismo.

CAPÍTULO 6. RESULTADOS

6.1 Plano de corte y Hematoxilina-Eosina

Posterior a varios cortes de 5 μm de los tacos de parafina, se logró llegar al plano de corte y confirmar la presencia de células trofoblásticas HTR-8/SVneo a través de la técnica Hematoxilina-Eosina (Ver Figura 6.1 y 6.2).

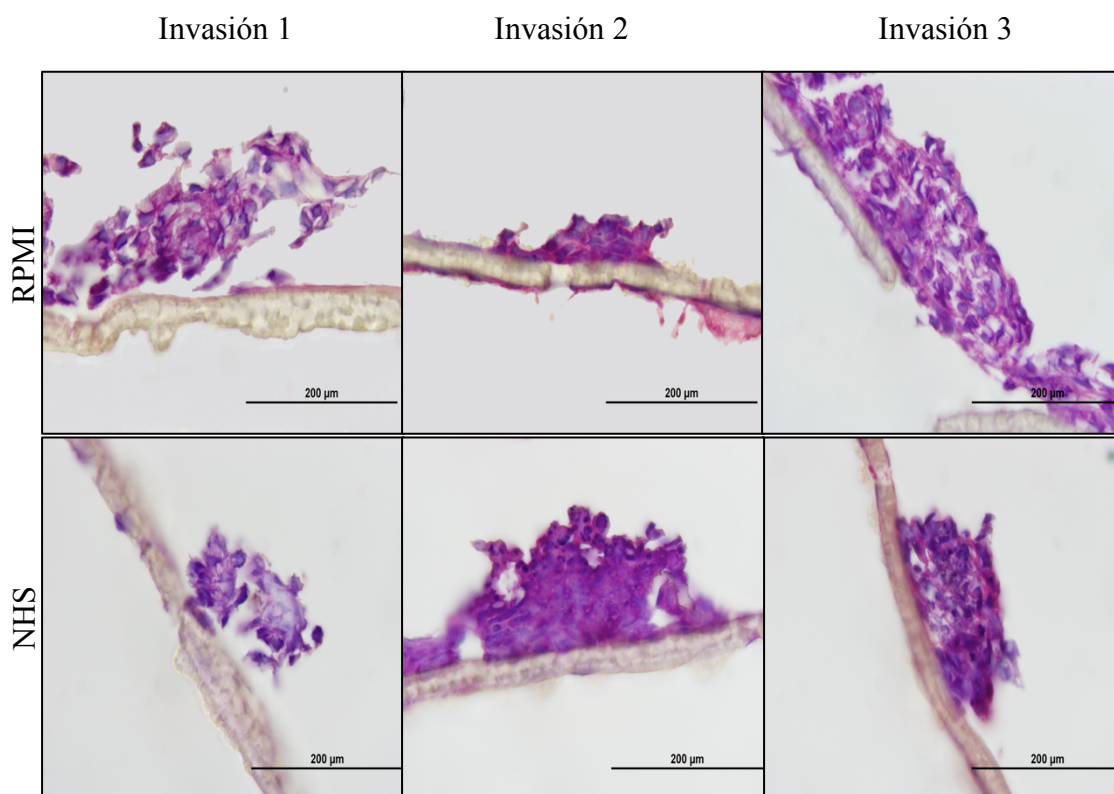


Figura 6.1. Resultados de Hematoxilina Eosina: Ensayos de invasión 1, 2 y 3 de los cultivos RPMI y NHS (Microfotografías H&E aumento 1000X).

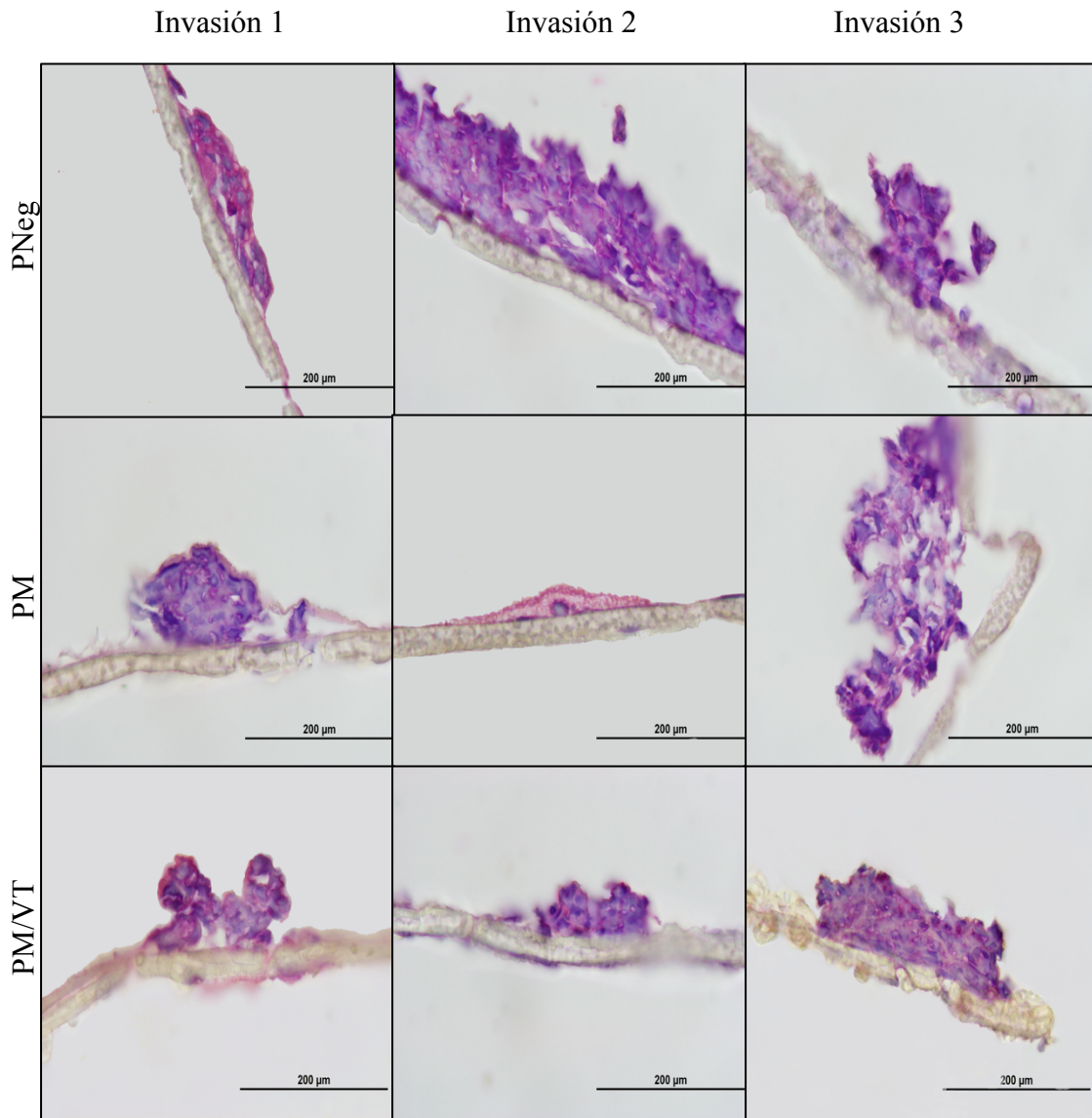


Figura 6.2. Resultados de Hematoxilina Eosina: Ensayos de invasión 1, 2 y 3 de los cultivos Pneg, PM y PM/VT (Microfotografías H&E aumento 1000X).

A continuación se presentan los resultados obtenidos de la técnica de inmunocitoquímica con los anticuerpos mencionados en la tabla 5.3 de cada uno de los ensayos en relación a los objetivos específicos establecidos.

Como referencia de los controles negativos, ver microfotografías en Anexo 6.

6.2 Presencia de STAT-3 con la técnica de inmunocitoquímica

La presencia de STAT-3 en los distintos ensayos, se observó en la marcación de las células HTR-8/SVneo con un patrón citoplasmático de color rojizo.

6.2.1 Ensayos de invasión en cultivo RPMI: Ver figura 6.3 y 6.4

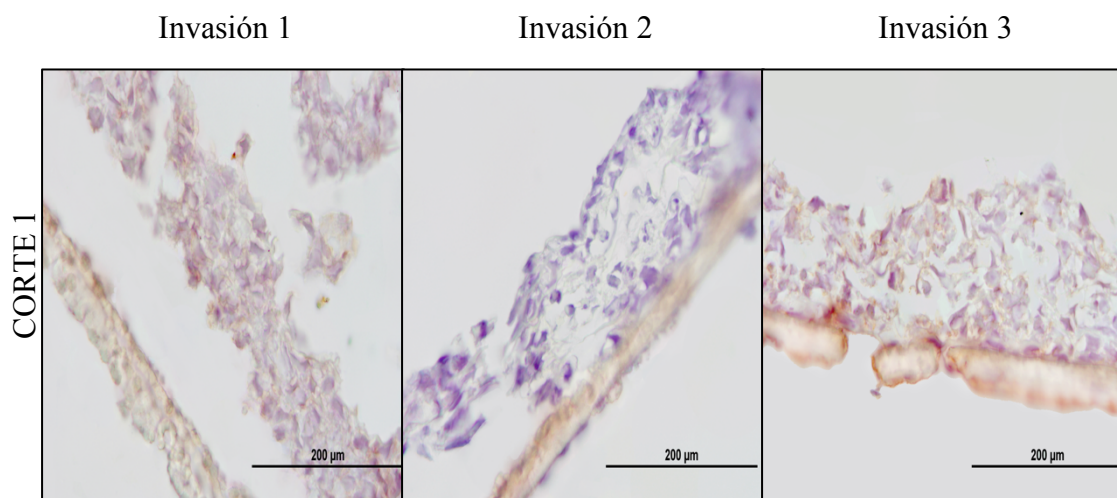


Figura 6.3. Resultados de anti-STAT-3: Corte número 1 de los ensayos de invasión 1, 2 y 3 del cultivo RPMI (Microfotografías STAT-3 aumento 1000X).

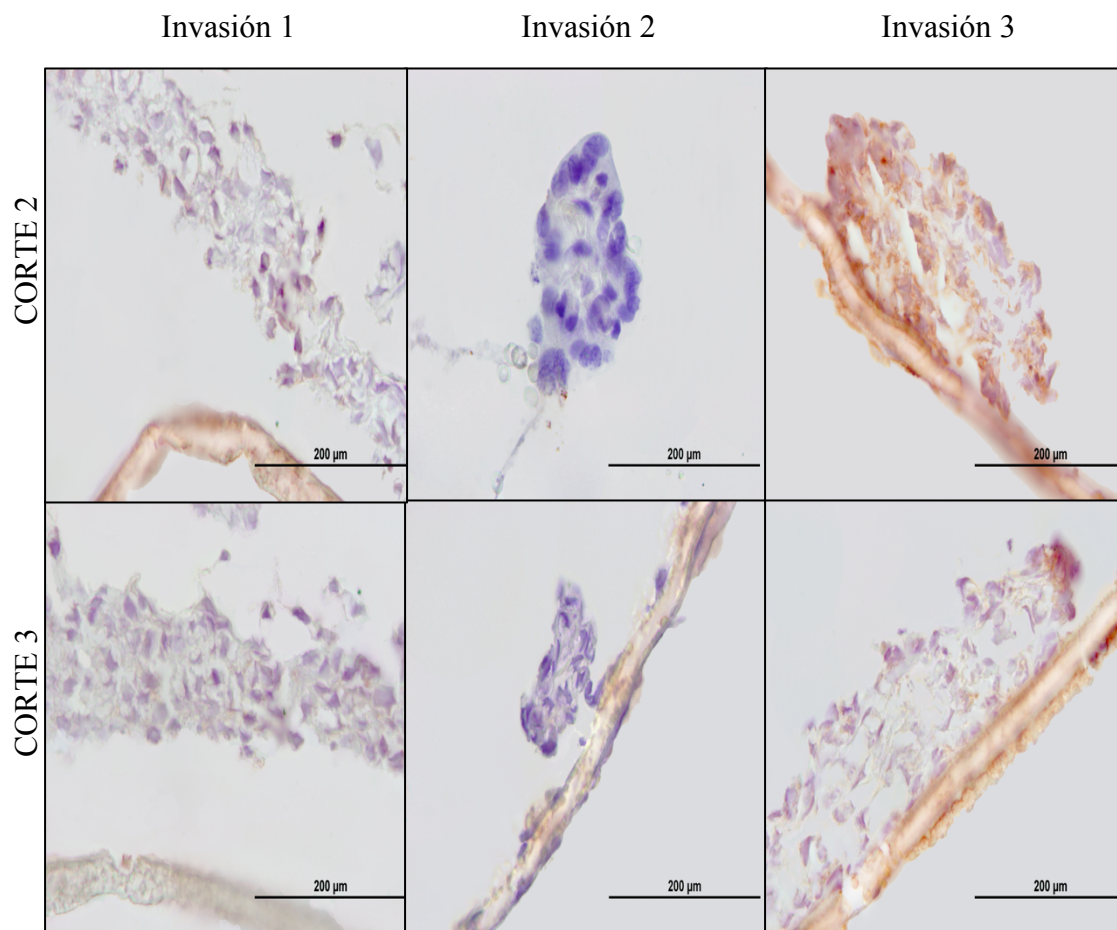


Figura 6.4. Resultados de anti-STAT-3: Corte número 2 y 3 de los ensayos de invasión 1, 2 y 3 del cultivo RPMI (Microfotografías STAT-3 aumento 1000X).

6.2.2 Ensayos de invasión en cultivos NHS: Ver Figura 6.5

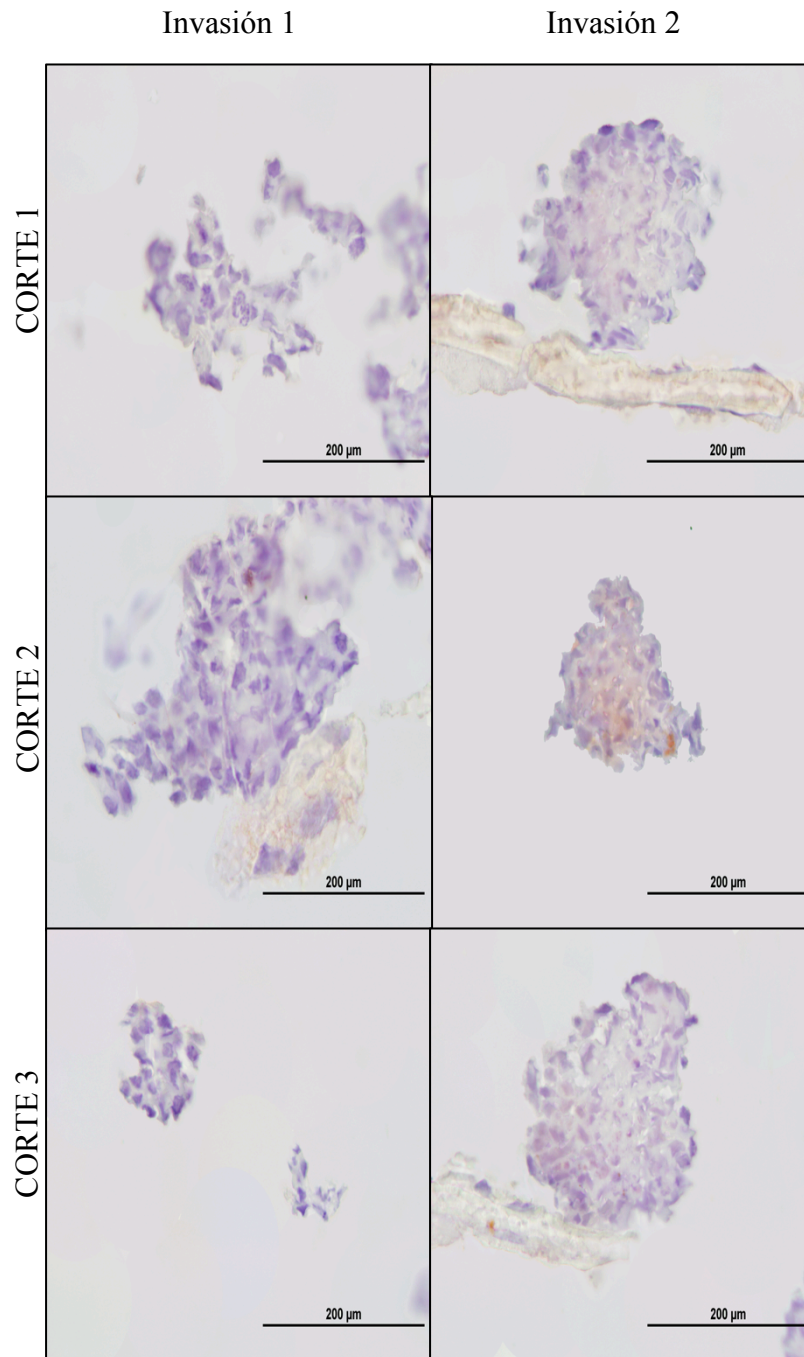


Figura 6.5. Resultados de anti-STAT-3: Corte número 1, 2 y 3 de los ensayos de invasión 1, 2 y 3 del cultivo NHS (Microfotografías STAT-3 aumento 1000X).

6.2.3 Ensayos de invasión en cultivo Pneg: Ver Figura 6.6

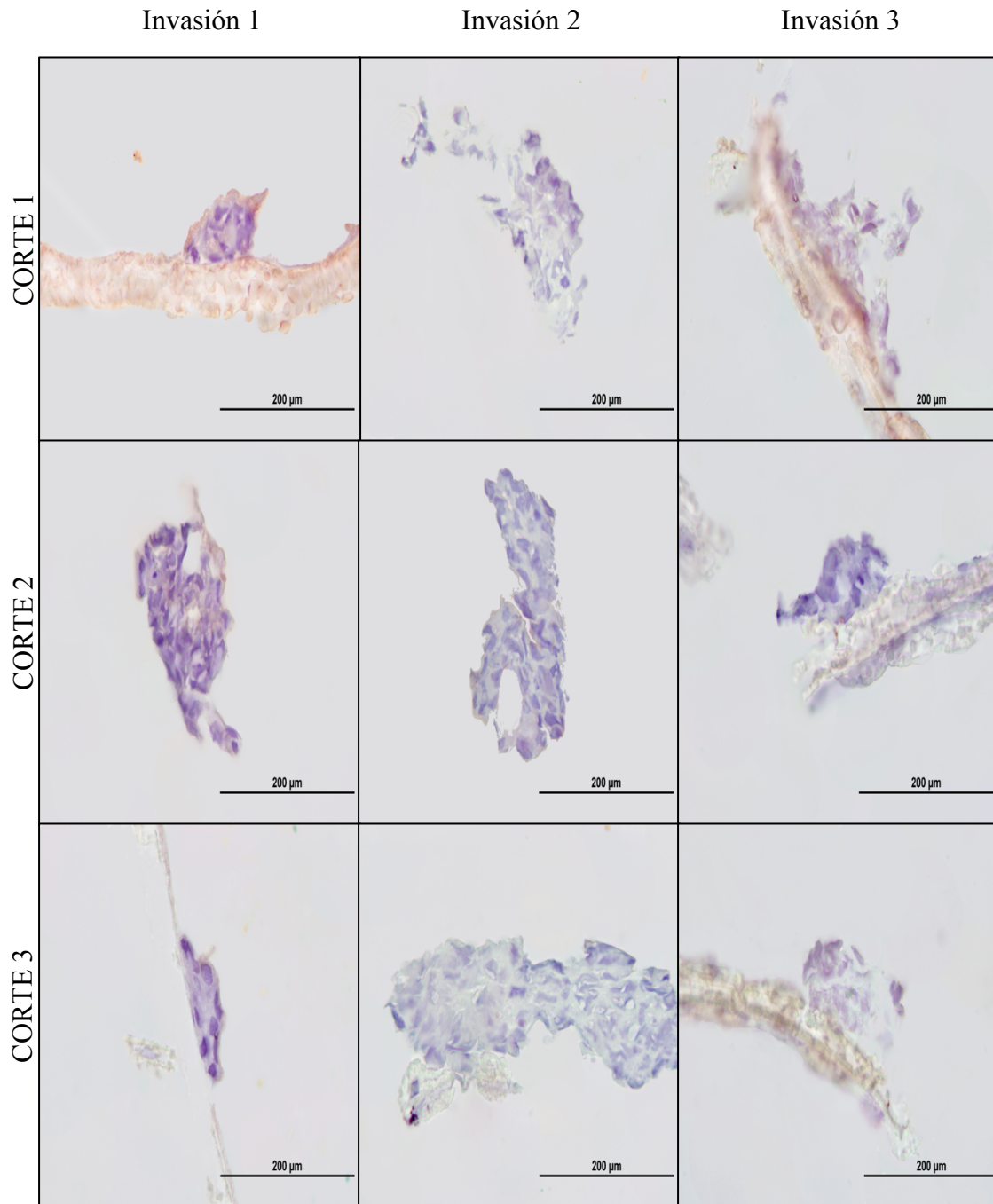


Figura 6.6. Resultados de anti-STAT-3: Corte número 1, 2 y 3 de los ensayos de invasión 1, 2 y 3 del cultivo Pneg (Microfotografías STAT-3 aumento 1000X).

6.2.4 Ensayos de invasión en cultivo PM: Ver Figura 6.7

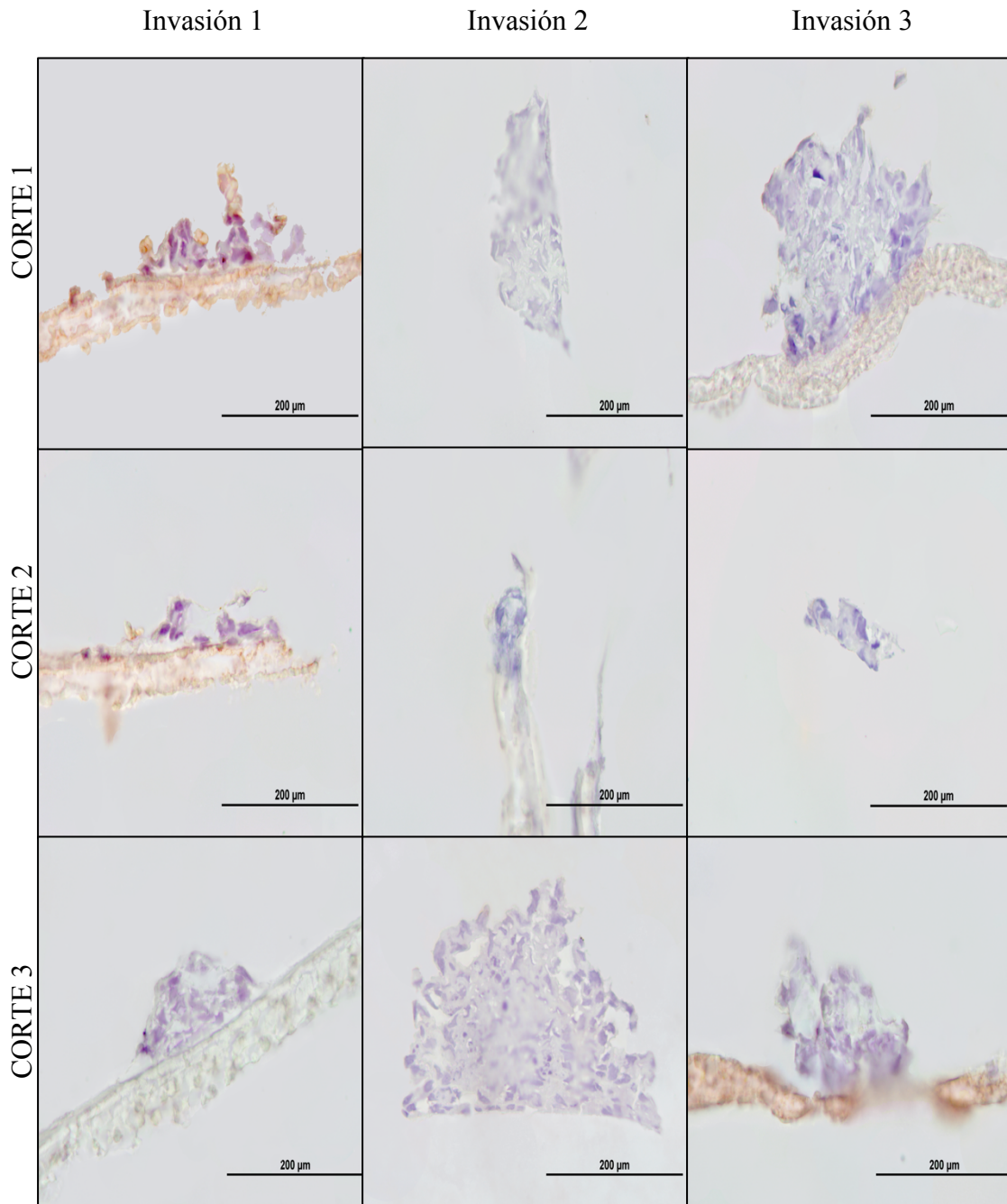


Figura 6.7. Resultados de anti-STAT-3: Corte número 1, 2 y 3 de los ensayos de invasión 1, 2 y 3 del cultivo PM (Microfotografías STAT-3 aumento 1000X).

6.2.5 Ensayos de invasión en cultivo PM/VT: Ver Figura 6.8

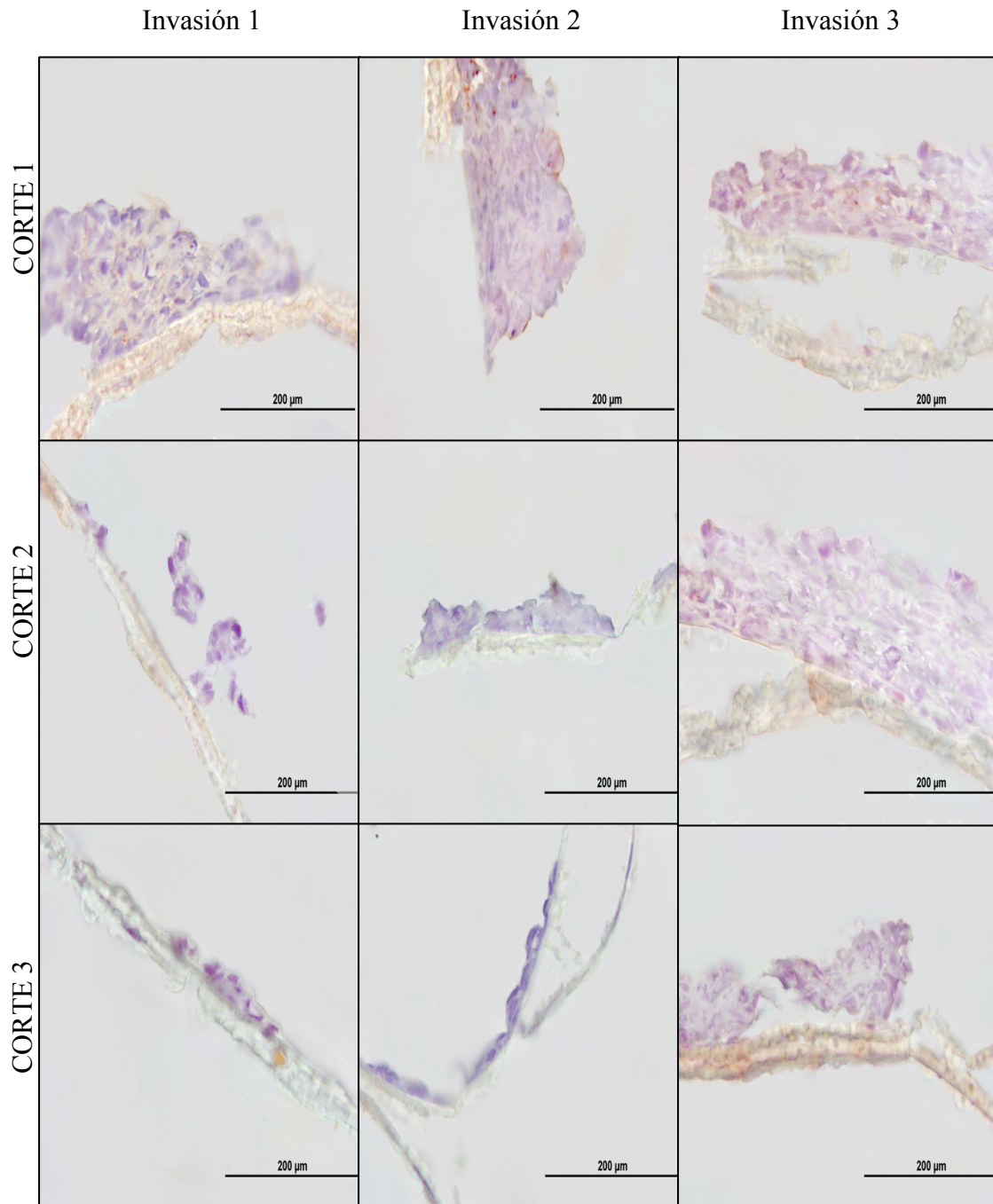


Figura 6.8. Resultados de anti-STAT-3: Corte número 1, 2 y 3 de los ensayos de invasión 1, 2 y 3 del cultivo PM/VT (Microfotografías STAT-3 aumento 1000X).

En todos los ensayos se observó marcación positiva de la presencia STAT-3, sin embargo, con diferencias en la intensidad. El DOI obtenido de cada microfotografía expresados como la media más la desviación estándar se representan en el siguiente gráfico (ver Figura 6.9). En el análisis estadístico el valor promedio del DOI más bajo se encontró en el ensayo PM, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los ensayos con el control NHS.

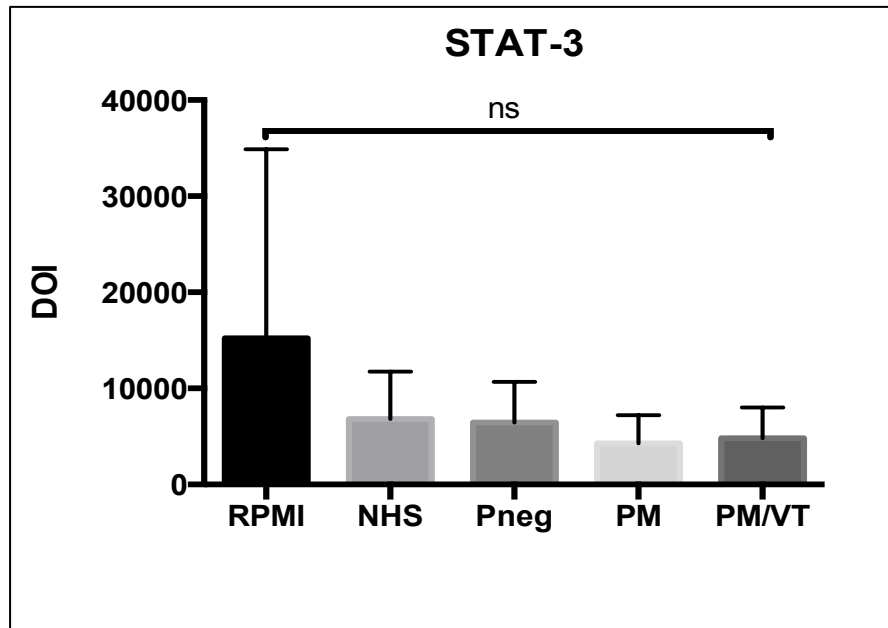


Figura 6.9. Gráfico de barras que muestra la media más la desviación estándar del DOI obtenido de las microfotografías de los distintos ensayos (RPMI, NHS, Pneg, PM y PM/VT) para verificar la presencia de STAT-3. Sin diferencias estadísticamente significativas en la marcación. Ns: no significativo.

6.3 Presencia de STAT-3 fosforilada con la técnica de inmunocitoquímica

La presencia de STAT-3 fosforilada en las células HTR-8/SVneo, tiene un patrón de marcación nuclear de color rojizo, cuya marca en estos ensayos fue casi imperceptible.

6.3.1 Ensayos de invasión en cultivos RPMI: Ver Figura 6.10 y 6.11

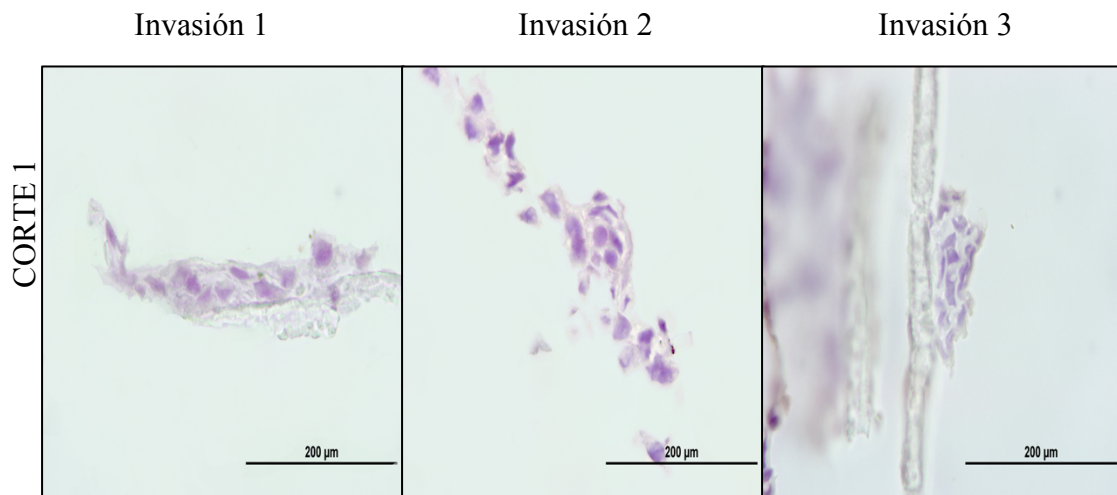


Figura 6.10. Resultados de anti-STAT-3p: Corte número 1 de los ensayos de invasión 1, 2 y 3 del cultivo RPMI (Microfotografías STAT-3p aumento 1000X).

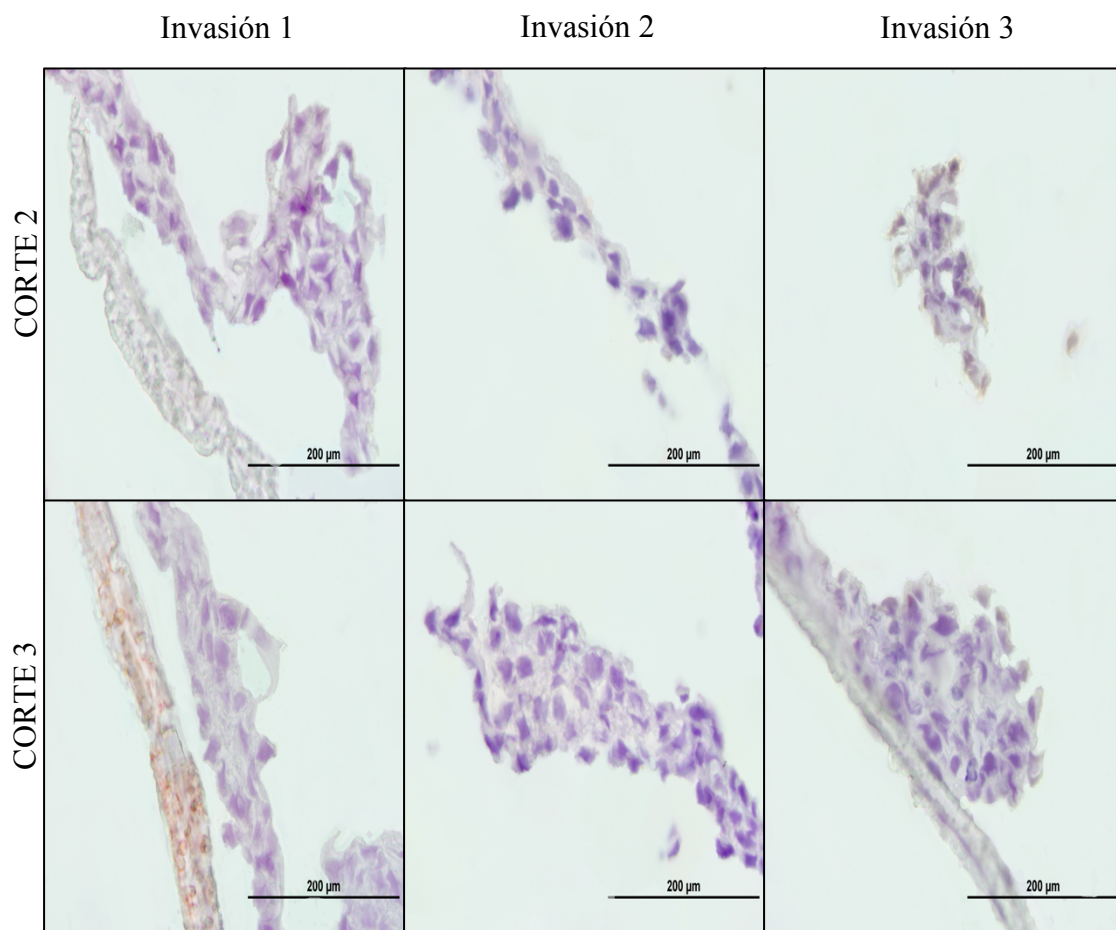


Figura 6.11. Resultados de anti-STAT-3p: Corte número 2 y 3 de los ensayos de invasión 1, 2 y 3 del cultivo RPMI (Microfotografías STAT-3p aumento 1000X).

6.3.2 Ensayos de invasión en cultivos NHS: Ver Figura 6.12

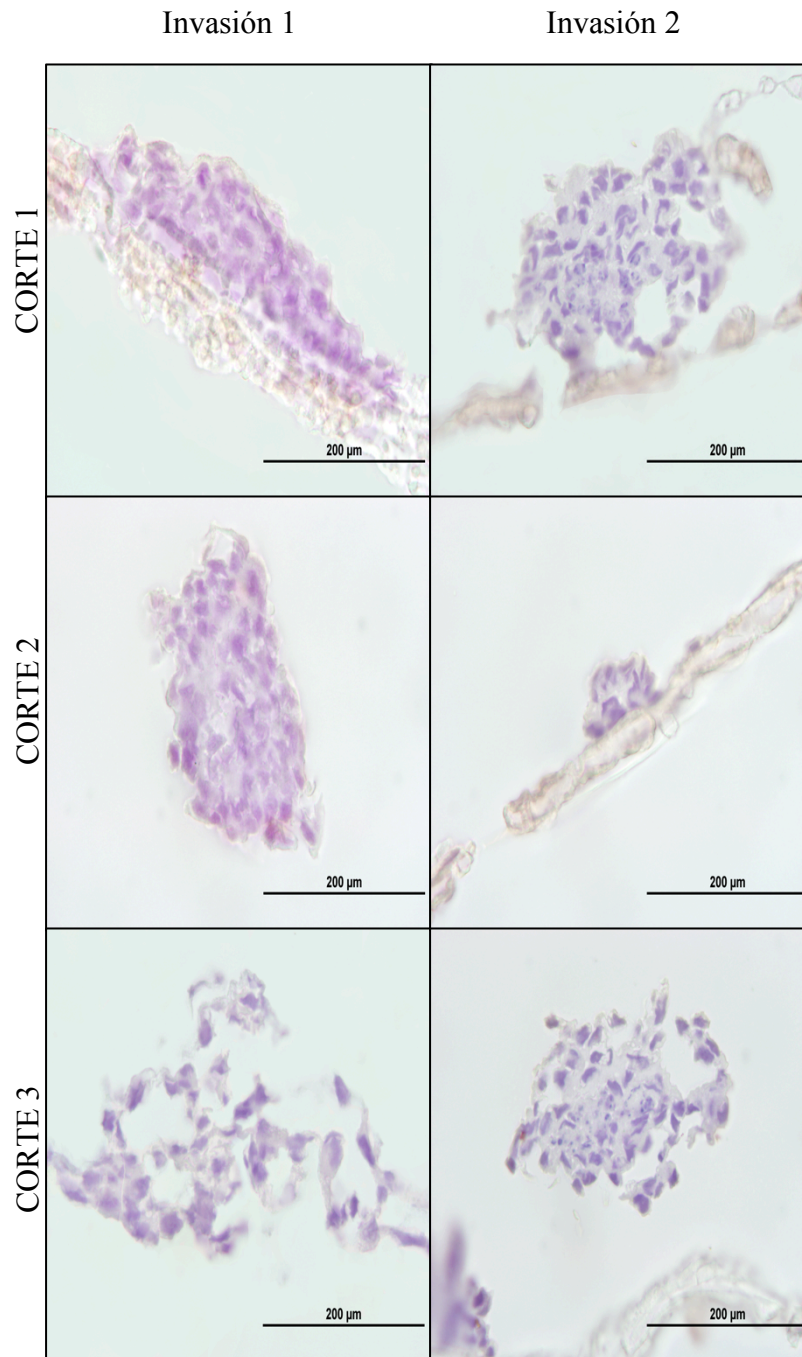


Figura 6.12. Resultados de anti-STAT-3p: Corte número 1, 2 y 3 de los ensayos de invasión 1 y 2 del cultivo NHS (Microfotografías STAT-3p aumento 1000X).

6.3.3 Ensayos de invasión en cultivo Pneg: Ver Figura 6.13

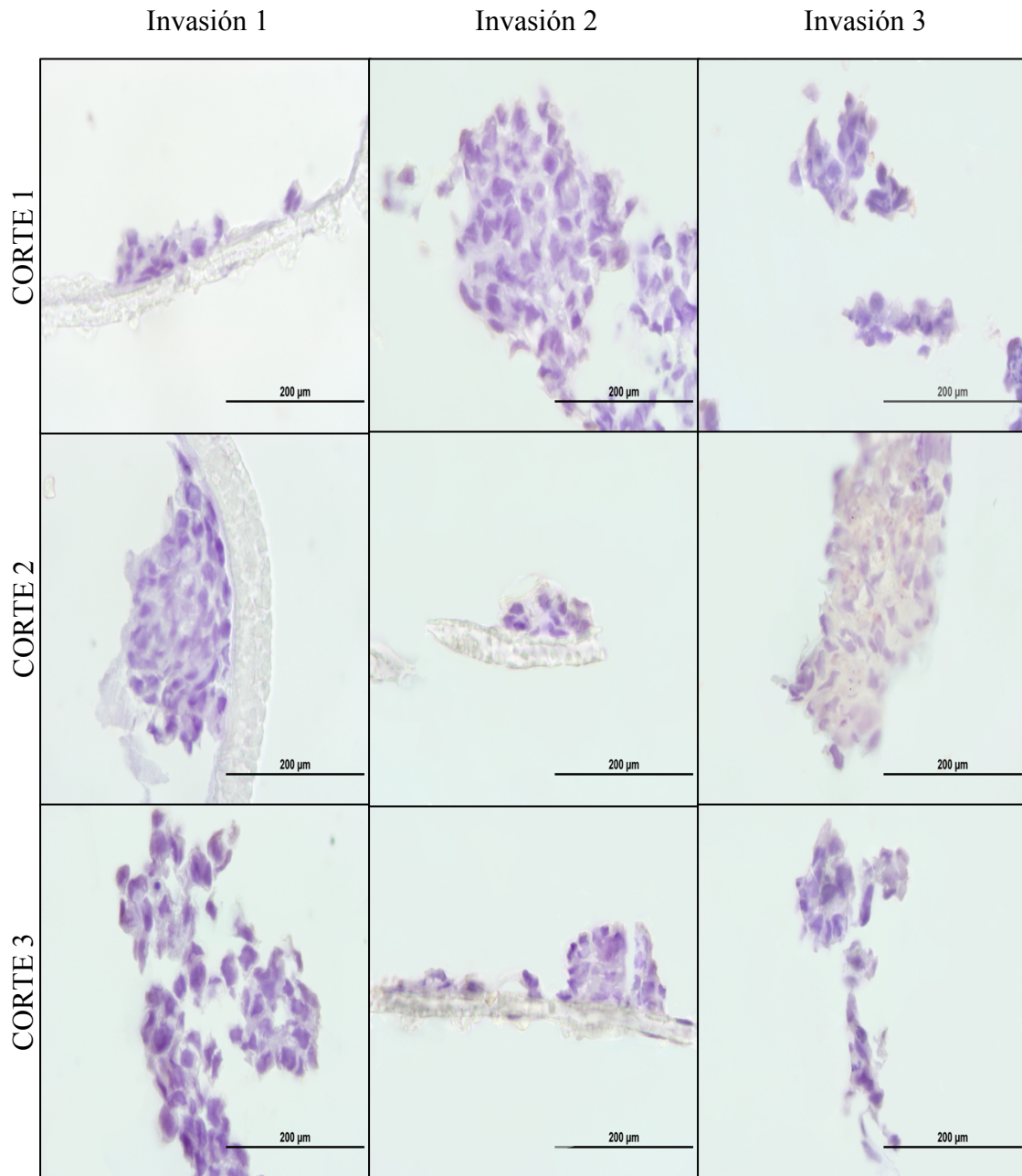


Figura 6.13. Resultados de anti-STAT-3p: Corte número 1, 2 y 3 de los ensayos de invasión 1, 2 y 3 del cultivo Pneg (Microfotografías STAT-3p aumento 1000X).

6.3.4 Ensayos de invasión en cultivo PM: Ver Figura 6.14

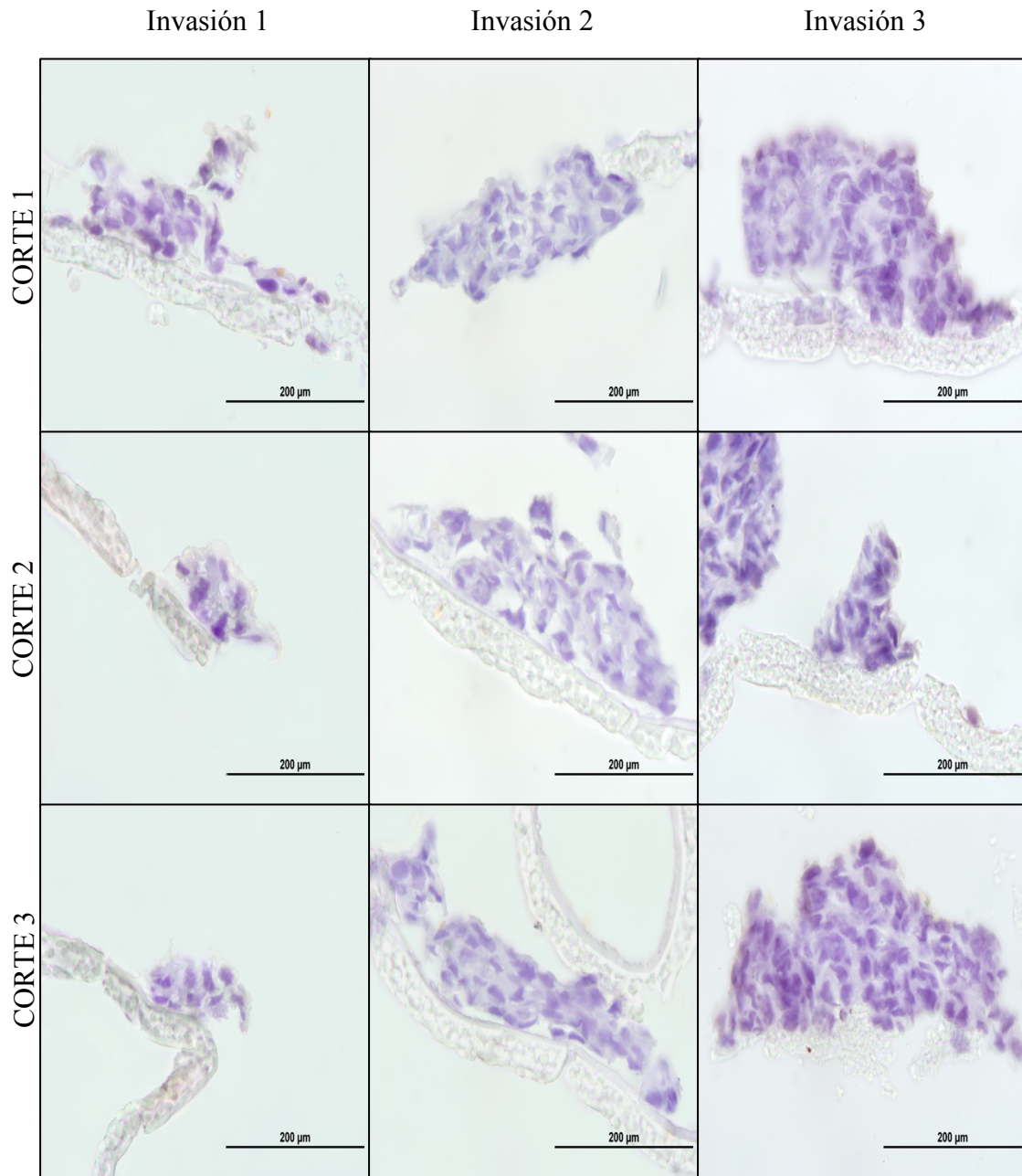


Figura 6.14. Resultados de anti-STAT-3p: Corte número 1, 2 y 3 de los ensayos de invasión 1, 2 y 3 del cultivo PM (Microfotografías STAT-3p aumento 1000X).

6.3.5 Ensayos de invasión en cultivo PM/VT: Ver Figura 6.15

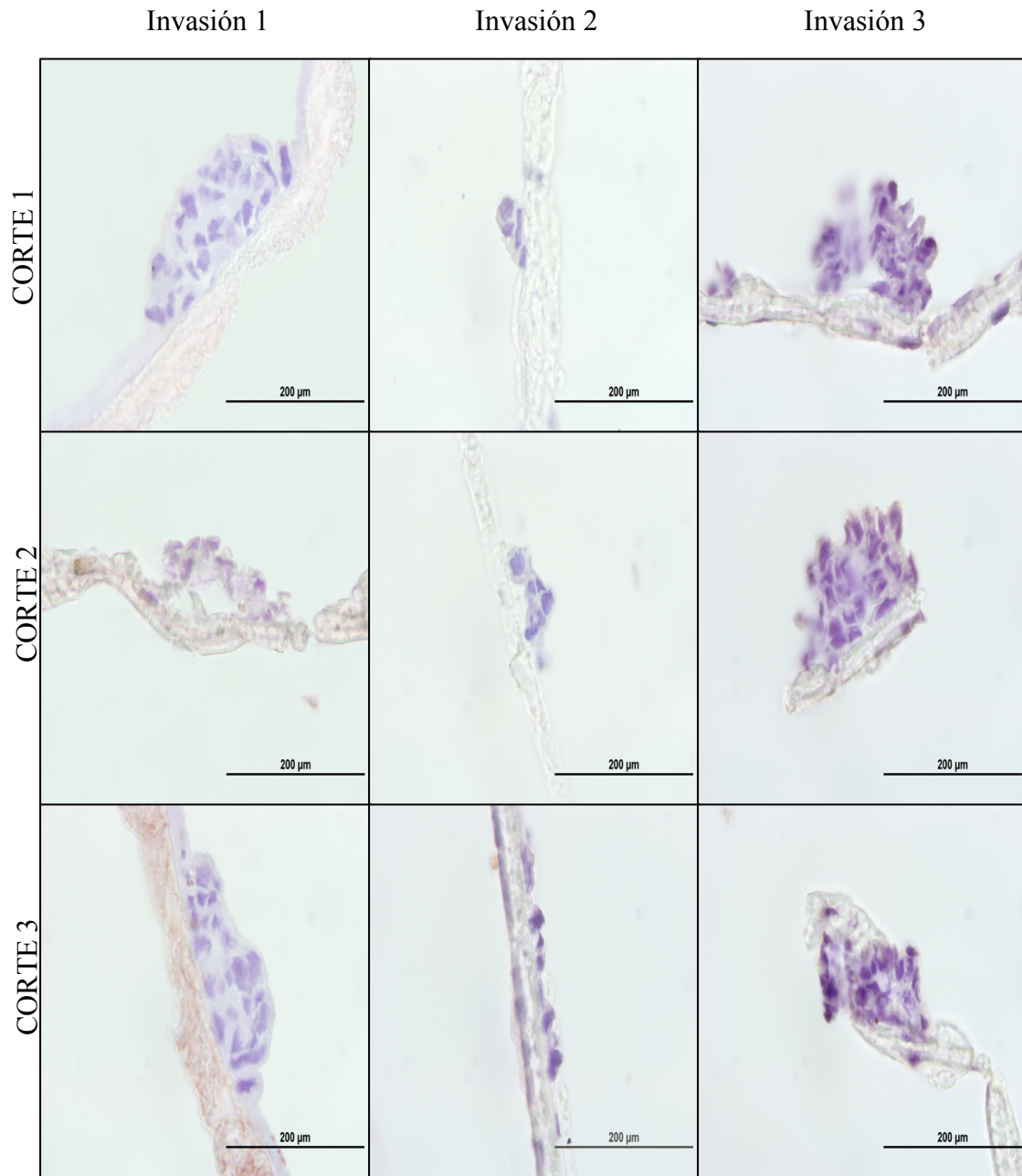


Figura 6.15. Resultados de anti-STAT-3p: Corte número 1, 2 y 3 de los ensayos de invasión 1, 2 y 3 del cultivo PM/VT (Microfotografías STAT-3p aumento 1000X).

No se observó una marcación nuclear positiva en ninguno de los ensayos de forma evidente, tanto así que los valores promedios obtenidos del DOI en el análisis de la expresión de STAT-3 fosforilada fueron muy bajos (ver figura 6.16) en comparación con los valores promedios obtenidos del DOI en STAT-3 y SOCS-3. Además en el análisis comparativo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación con el control NHS.

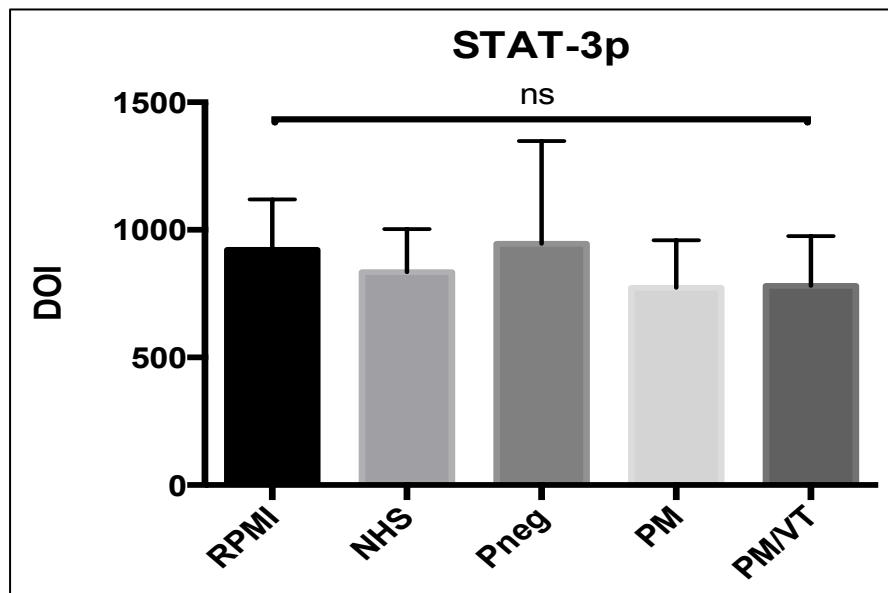


Figura 6.16. Gráfico de barras que muestra la media más la desviación estándar del DOI obtenido de las microfotografías de los distintos ensayos (RPMI, NHS, Pneg, PM y PM/VT) para verificar la presencia de STAT-3 fosforilada. Sin diferencias estadísticamente significativas en la marcación Ns: no significativo.

6.4 Presencia de SOCS-3 con la técnica de inmunocitoquímica

La presencia de SOCS-3, se observó en la marcación de las células HTR-8/SVneo con un patrón de membrana y citoplasmático de color rojizo.

6.4.1 Ensayos de invasión en cultivos RPMI: Ver Figura 6.17 y 6.18

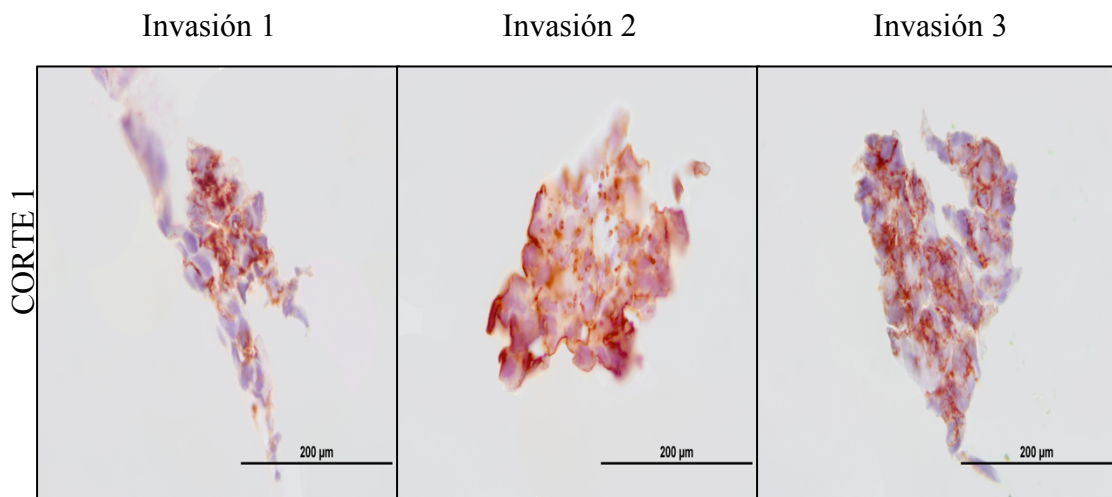


Figura 6.17. Resultados de anti-SOCS-3: Corte número 1 de los ensayos de invasión 1, 2 y 3 del cultivo RPMI (Microfotografías SOCS-3 aumento 1000X).

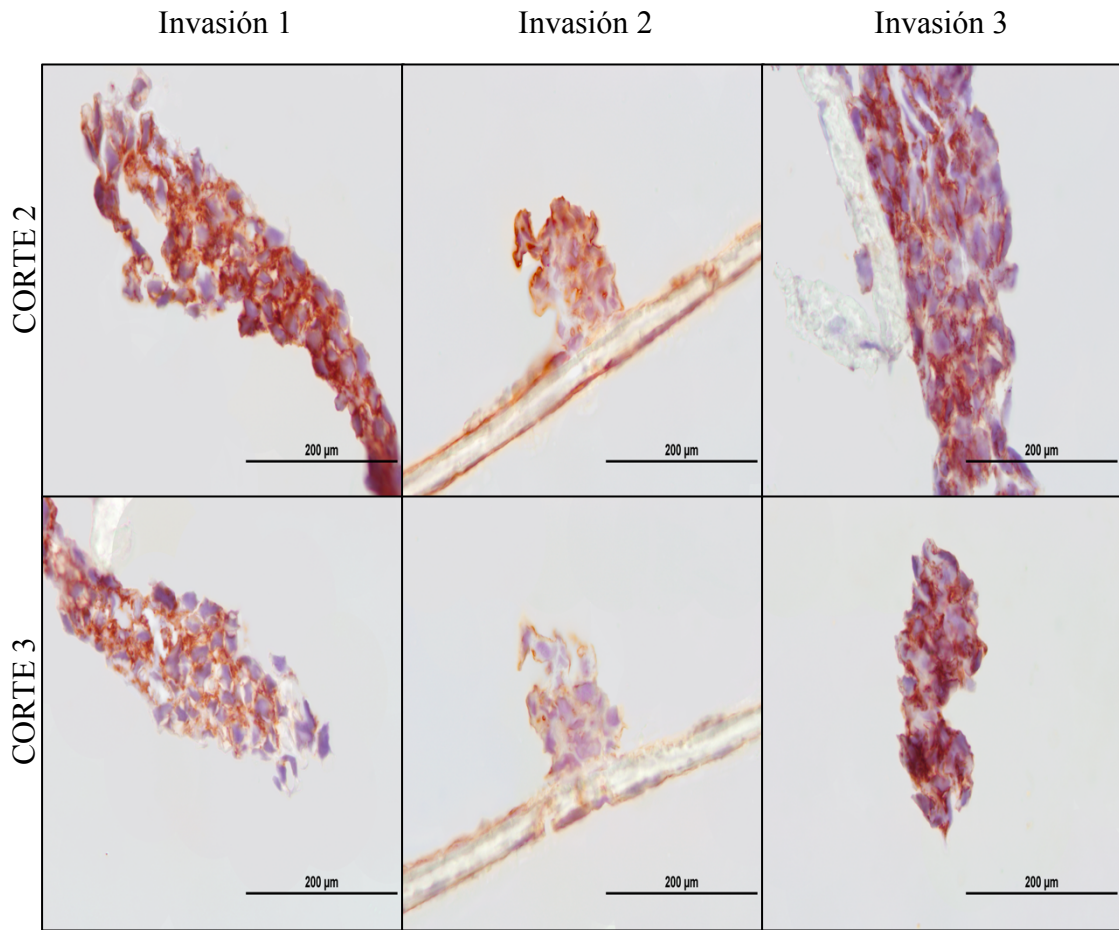


Figura 6.18. Resultados de anti-SOCS-3: Corte número 2 y 3 de los ensayos de invasión 1, 2 y 3 del cultivo RPMI (Microfotografías SOCS-3 aumento 1000X).

6.4.2 Ensayos de invasión en cultivos NHS: Ver Figura 6.19

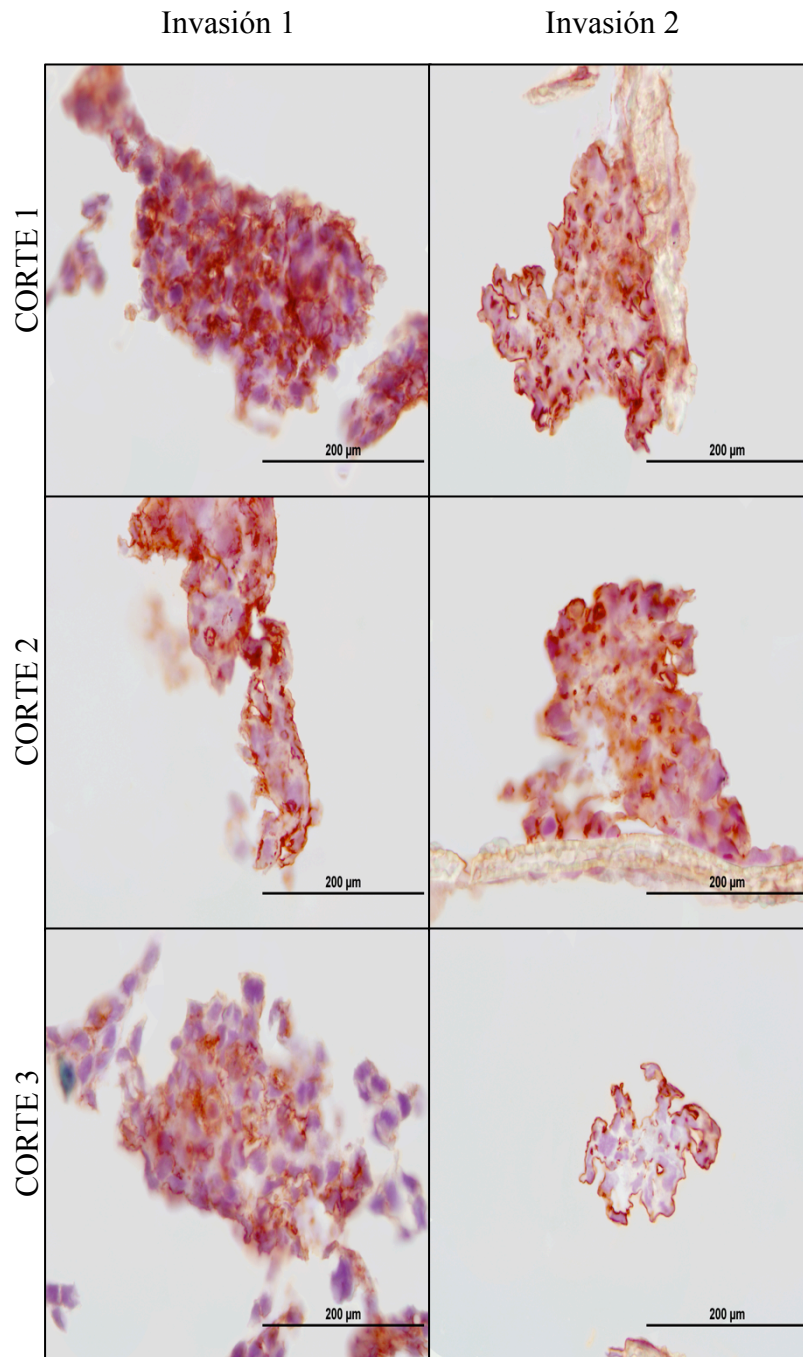


Figura 6.19. Resultados de anti-SOCS-3: Corte número 1, 2 y 3 de los ensayos de invasión 1 y 2 del cultivo NHS (Microfotografías SOCS-3 aumento 1000X).

6.4.3 Ensayos de invasión en cultivo Pneg: Ver Figura 6.20

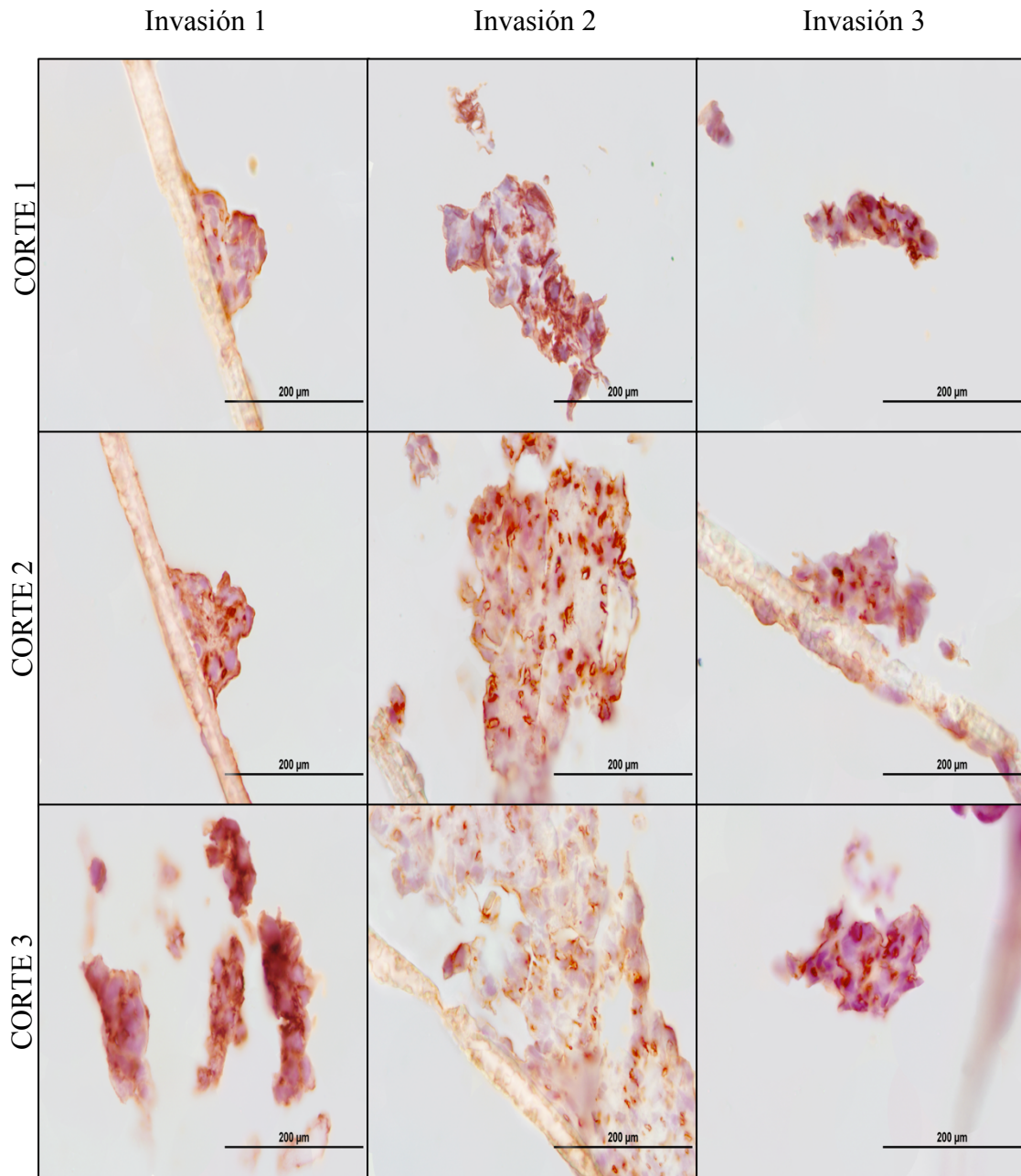


Figura 6.20. Resultados de anti-SOCS-3: Corte número 1, 2 y 3 de los ensayos de invasión 1, 2 y 3 del cultivo Pneg (Microfotografías SOCS-3 aumento 1000X).

6.4.4 Ensayos de invasión en cultivo PM: Ver Figura 6.21

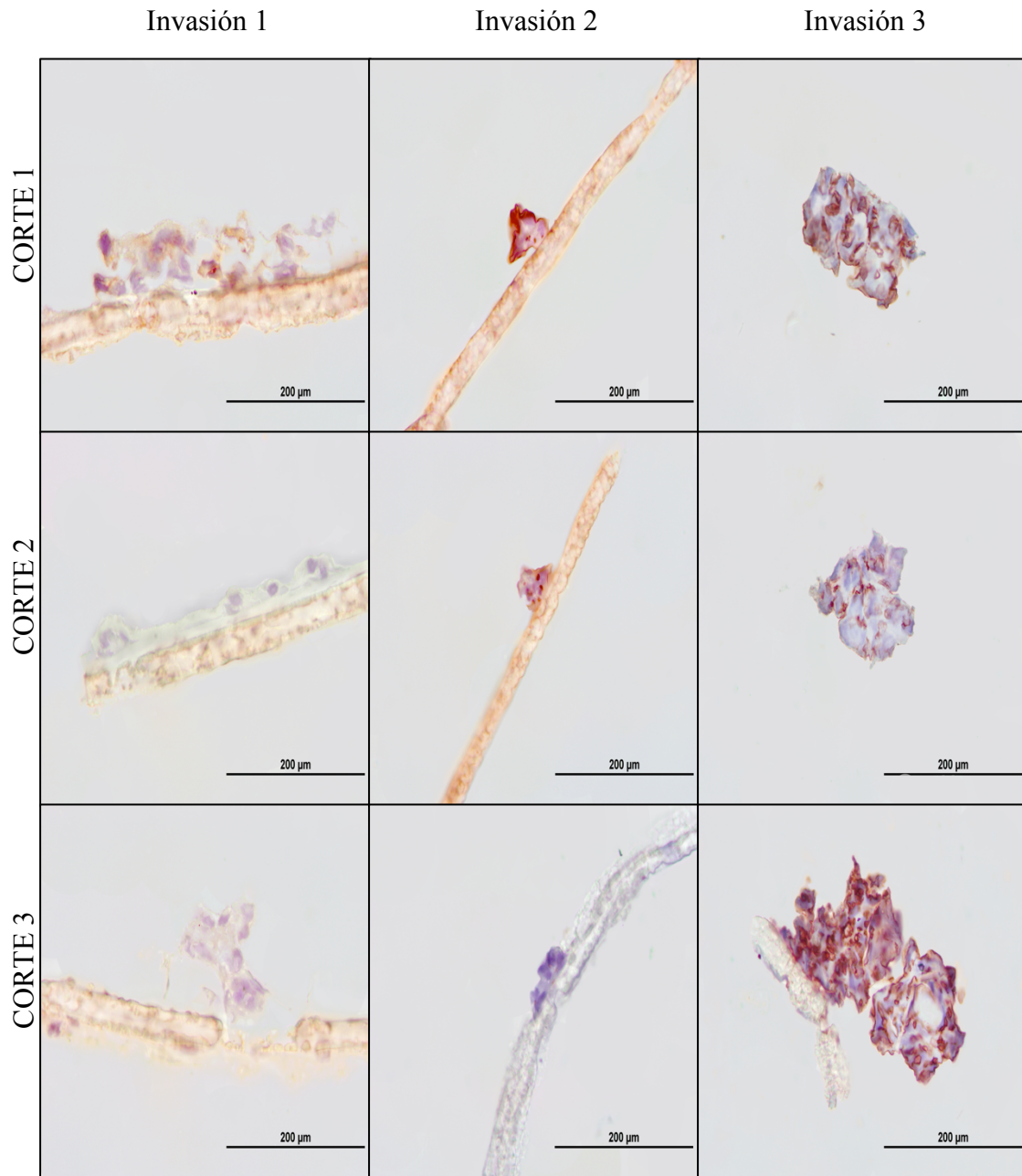


Figura 6.21. Resultados de anti-SOCS-3: Corte número 1, 2 y 3 de los ensayos de invasión 1, 2 y 3 del cultivo PM (Microfotografías SOCS-3 aumento 1000X).

6.4.5 Ensayos de invasión en cultivo PM/VT: Ver Figura 6.22

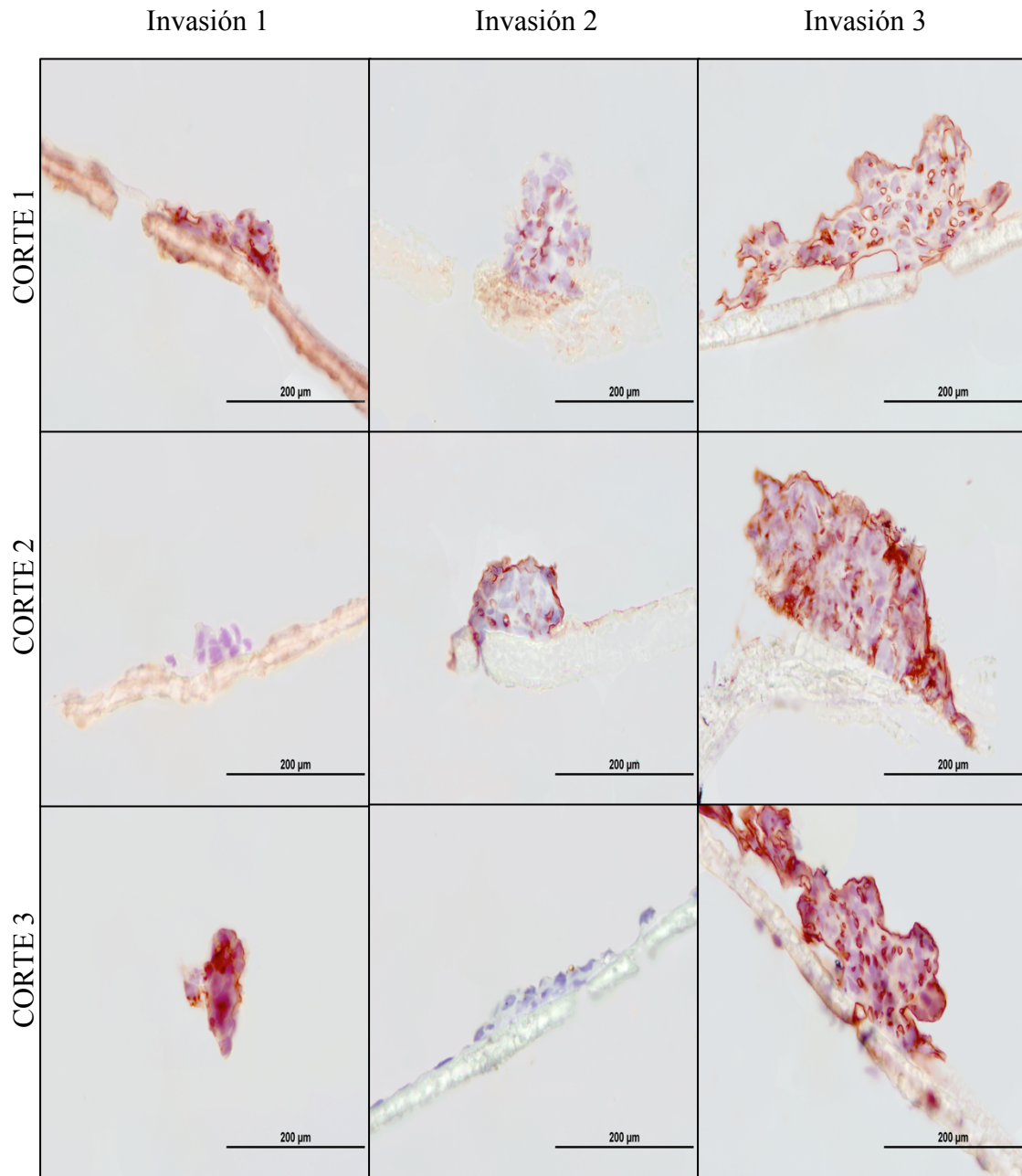


Figura 6.22. Resultados de anti-SOCS-3: Corte número 1, 2 y 3 de los ensayos de invasión 1, 2 y 3 del cultivo PM/VT (Microfotografías SOCS-3 aumento 1000X).

Se observó una marca positiva de la presencia de SOCS-3 en todos los ensayos, con intensidades variables según el caso. Los datos obtenidos en el análisis del DOI en el caso de SOCS-3 se observan en el siguiente gráfico (ver figura 6.23). En el análisis estadístico de los datos, en el ensayo PM se obtuvieron resultados y diferencias estadísticamente significativas del DOI ($P < 0.05$) en comparación con el control NHS.

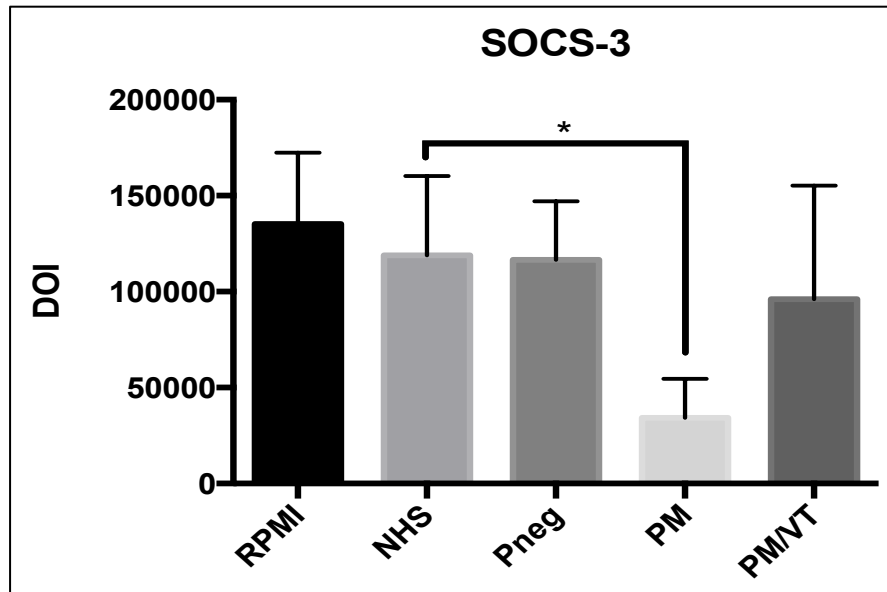


Figura 6.23. Gráfico de barras que muestra la media más la desviación estándar del DOI obtenido de las microfotografías de los distintos ensayos (RPMI, NHS, Pneg, PM y PM/VT) para verificar la presencia de SOCS-3. PM tiene una diferencia estadísticamente significativa de la marcación de SOCS-3 en comparación con el control NHS ($*P < 0,05$).

CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN

La presencia de aAFL está asociada a resultados desfavorables en el embarazo con historias clínicas de aborto espontáneo recurrente, preeclampsia, y restricción del crecimiento uterino (69). Aunque existe tratamiento al inicio del embarazo lo que aumenta la tasa de nacidos vivos en pacientes con SAF, las complicaciones siguen siendo altas por lo que es necesario una terapia más específica (70), para esto se requiere conocer los efectos que inducen los aAFL a nivel celular y molecular.

Diversos estudios han revelado que los aAFL tienen efectos directos tanto in vitro como in vivo en células trofoblásticas, lo que resulta en alteraciones en la implantación y desarrollo placentario (70), sin embargo, aún no se ha aclarado completamente el efecto de los aAFL en dichas células (66), por lo que el desarrollo y resultados analizados en la presente tesis se enfocaron en una de las proteínas STAT-3 la cual forma parte de la vía de señalización JAK/STAT que podría verse afectada.

La alteración de JAK/STAT podría ser una de las causas de la morbilidad gestacional en el SAF, ya que se ha evidenciado que alteraciones en la actividad de STAT-3 se relacionan a complicaciones en el embarazo, como por ejemplo, abortos espontáneos recurrentes. Investigaciones en ratones han observado que la proteína STAT-3 juega un rol importante en la implantación, donde el bloqueo de STAT-3p (STAT-3 activada) atenúa este proceso (71), asimismo embriones de ratón homocigoto sin STAT-3 degeneran rápidamente justo después de la implantación (72). Experimentos in vivo con ARN de interferencia han confirmado que la regulación del fenotipo invasivo de las células trofoblásticas es debido a esta proteína (73).

En comparación con las otras proteínas STATs conocidas, la inactivación de STAT-3 en la línea germinal de ratones no es compatible con el desarrollo normal, como así también la inactivación dirigida de factores o componentes de señalización implicados en la activación de STAT-3, puesto que culmina en la muerte embrionaria temprana (74).

En este estudio se analizó la presencia de la proteína STAT-3 y su activación como STAT-3p, obteniendo una leve disminución en la marca con inmunocitoquímica en los casos PM y PM/VT, no obstante, no se obtuvo diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control NHS, esto se explica debido a que la técnica utilizada tiene ciertas limitaciones, debido a que se evaluaron las proteínas en un momento específico. La fijación de las células HTR8/SVneo se realizó posterior a la invasión, momento en que la mayoría de las células estaría en proceso de inhibir la vía de señalización JAK/STAT por acción de SOCS-3. Es por esto que se analizó también la presencia de SOCS-3 en los ensayos.

La proteína SOCS-3 (supresor de la señalización de citoquinas) se caracteriza por ser un regulador negativo del transductor de señal Janus quinasa mediada por citoquinas (75,76); inhibe la transducción de señales mediante la unión a los receptores de citoquinas (JAKs), bloqueo de la activación de JAKs y bloqueo de la fosforilación de STATs (77,78) (ver Figura 7.1). Investigaciones en ratones modificados genéticamente han demostrado que cambios en SOCS-3 tiene un rol importante en las fisiopatologías relacionadas al desarrollo de la placenta pretérmino y término, un ejemplo, es en ratones que carecen de SOCS-3 mueren durante el periodo perinatal por la formación de una placenta defectuosa (79,80). Además es considerado importante en la regulación de la respuesta inmune innata y adaptativa (81).

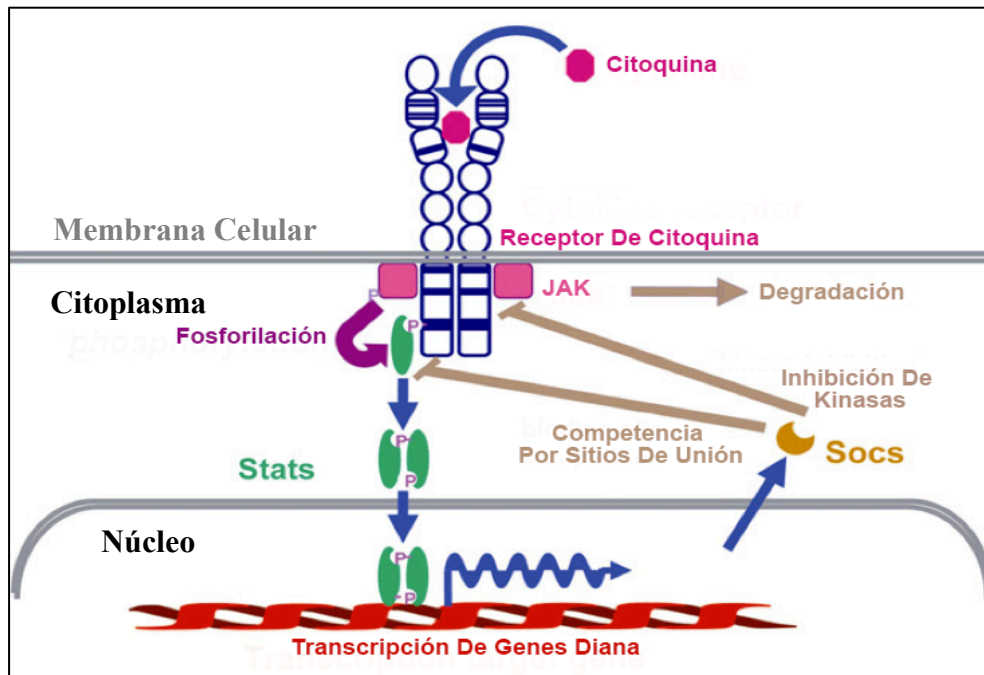


Figura 7.1. Activación de la Vía JAK/STAT por receptor de citoquina y regulación por SOCS: las citoquinas se unen a su receptor específico ubicado en la membrana celular, inducen la activación de Jak que fosforilan las tirosinas (STAT) intracelulares del complejo receptor formando complejos homo/heterodiméricos de tirosinas fosforiladas que ingresan al núcleo uniéndose a promotores de genes específicos para activar la transcripción de genes diana, como por ejemplo, los genes de SOCS que codifican la proteína que actúa en un circuito de retroalimentación negativa por 3 mecanismos: inhibición de Jaks, competencia de los sitios de unión y degradación de los complejos receptores. (Modificado de O'Sullivan LA, et al; 2007).

Las proteínas STATs están presentes de forma latente en el citoplasma (31) y son reclutadas debido a receptores activados durante la señalización de citoquinas y las proteínas SOCS son sintetizadas en respuesta a la activación de STAT (82). La actividad de la proteína SOCS-3 es regulada principalmente a nivel transcripcional e inducida por la vía JAK/STAT activada (83), esto se ha evidenciado en distintos estudios como por ejemplo, células corticotróficas (AtT-20), células de leucemia mieloide aguda y en células Rcho-1 (células trofoblásticas obtenidas a partir de coriocarcinoma de rata), se encontró que JAK quinasa/STAT-3 regula la expresión de SOCS-3, donde sugieren que el mecanismo molecular de la expresión de SOCS-3 implica la activación de STAT-3 (84–86).

La información y estudios mencionados, apoyan que la presencia de la proteína SOCS-3 actúa como un indicador de la activación de la vía JAK/STAT y la proteína STAT-3. En nuestros resultados en relación a la presencia de SOCS-3 en las células trofoblásticas HTR8/SVneo, se encontró una diferencia en la marcación con inmunocitoquímica de la proteína en PM y PM/VT, sin embargo, sólo hubo una diferencia estadísticamente significativa en los ensayos PM donde la marca fue menor al comparar con el control NHS. En un estudio comparativo en monocitos sanos sobre los efectos de IgG de pacientes con distintos tipos clínicos del SAF; trombosis vascular (sin morbilidad gestacional), con morbilidad gestacional (sin trombosis) y por otro lado con morbilidad gestacional y trombosis, difieren en la activación y regulación de ciertas vías de señalización entre los grupos, encontrando que en un grupo se promovía la regulación de una vía y por el contrario en el otro no (87). Los resultados de esta investigación, a pesar de estar en un contexto distinto evaluado en monocitos sanos, obtuvo resultados similares encontrando diferencias en la activación de vías de señalización en los distintos grupos, proponiendo además que el grupo con morbilidad gestacional y trombosis tenía mayor similitud con el grupo de trombosis vascular.

Otro estudio similar consistente con nuestros resultados; en células HTR8/SVneo, también obtuvo resultados diferidos entre dos grupos analizados (PM-/VT+ y PM+/VT-) en relación a la proteína TLR4 (70). Por lo que podemos proponer que según las manifestaciones clínicas presentadas en el SAF se observarán a su vez efectos a nivel intracelulares distintos en modelos in vitro. Adicional a esto, se ha planteado que los eventos de señalización celular inducido por los aAFL son tan heterogéneos como los mismos anticuerpos (88), lo que también podría explicar la diferencia entre la marca positiva de SOCS-3 en ambos grupos.

CAPÍTULO 8. CONCLUSIÓN

Tanto la implantación exitosa como la invasión del trofoblasto dependen de múltiples acontecimientos a nivel celular y molecular. La vía JAK/STAT-3-SOCS-3 forma parte importante cumpliendo un rol fundamental en estos procesos (89).

Nuestros hallazgos sugieren que los aAFL tendrían relación con la disminución de la presencia de STAT-3 en las células trofoblásticas en mujeres con morbilidad gestacional, aún cuando no se descartan alteraciones de otras proteínas implicadas en el proceso de implantación. Sin embargo, no se puede decir lo mismo en relación al caso PM/VT.

Esto permite identificar otro factor de las causas de morbilidad gestacional en el SAF, pese que aún quedan interrogantes en relación a PM/VT. La heterogeneidad de los efectos en las células, se ha planteado que es debido a la heterogeneidad de los aAFL (88), lo que dificulta la unificación de las alteraciones celulares y moleculares que conllevan al síndrome.

Cabe mencionar que se logró cumplir con los objetivos establecidos, aún cuando el modelo utilizado tenía ciertas limitantes, ya que el análisis y resultados de la presencia de SOCS-3 permitieron establecer y responder si existía alteración en la presencia y activación de la proteína STAT-3 con la presencia de los aAFL.

Proponemos estudiar y evaluar los niveles de STAT3 en modelos in vivo, como así también evaluar si ocurren las mismas diferencias en PM y PM/VT en dichos modelos. Además de considerar la proteína SOCS-3 como un futuro y posible indicador de morbilidad gestacional.

CAPÍTULO 9: BIBLIOGRAFÍA

1. Pouymiró P, Pouymiró Y, Pouymiró I. Syndrome of antiphospholipid antibodies. *Medisan*. 2012;16(3):429–44.
2. Alonso J, Inglada L, Pérez G. Síndrome antifosfolípido, estado actual. *An Med Interna*. 2007;24(5):242–8.
3. Chaturvedi S, McCrae KR. The antiphospholipid syndrome: still an enigma. *ASH Educ Progr B*. 2015;53–60.
4. Pengo V, Bison E, Zoppellaro G, Padayattil Jose S, Denas G, Hoxha A, et al. APS - Diagnostics and challenges for the future. *Autoimmun Rev*. Elsevier B.V.; 2016;75–7.
5. Santamaría-alza Y. Mecanismos fisiopatológicos del síndrome antifosfolípido. *Med la Univ Santander*. 2014;27(1):43–50.
6. Empson M, Lassere M, Craig J, Scott J. Prevention of recurrent miscarriage for women with antiphospholipid antibody or lupus anticoagulant. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005;(2).
7. Romero Guadix B, Martínez Navarro L, González Paredes A, Fontes Jimenez J. Epidemiología del aborto de repetición. *Progresos Obstet y Ginecol*. 2012;55(7):312–20.
8. Manzur A. Aborto recurrente. *Rev Médica Clínica Las Condes*. Elsevier; 2010;21(3):416–23.
9. Esteve-Valverde E, Ferrer-Oliveras R, Alijotas-Reig J. Obstetric antiphospholipid syndrome. *Rev Clínica Española (English Ed. Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Medicina Interna (SEMI))*; 2015;216(3):135–45.
10. Pantham P, Abrahams VM, Chamley LW. The role of anti-phospholipid antibodies in autoimmune reproductive failure. *Reproduction*. 2016;151(5):R79–90.
11. Brock CO, Brohl AS, Običan SG. Incidence, pathophysiology, and clinical manifestations of antiphospholipid syndrome. *Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev*. 2015;105(3):201–8.
12. Viall CA, Chen Q, Stone PR, Chamley LW. Human extravillous trophoblasts bind but do not internalize antiphospholipid antibodies. *Placenta*. Elsevier Ltd; 2016;42:9–16.

13. Borg AJ, Yong HEJ, Lappas M, Degrelle SA, Keogh RJ, Da Silva-Costa F, et al. Decreased STAT3 in human idiopathic fetal growth restriction contributes to trophoblast dysfunction. *Reproduction*. 2015;149(5):523–32.
14. Marconato HMF, Panico VJA, Saragiotto L, Machado TL, Lotti IRC, Kabbach BM, et al. PP124. Trofoblastic invasion: The role of subunits STAT1 and STAT3. *Pregnancy Hypertens An Int J Women's Cardiovasc Heal*. Elsevier; 2012;2(3):306.
15. Chan HY, Siu MKY, Zhang HJ, Wong ESY, Ngan HYS, Chan KYK, et al. Activated Stat3 expression in gestational trophoblastic disease: Correlation with clinicopathological parameters and apoptotic indices. *Histopathology*. 2008;53(2):139–46.
16. Bajo Arenas J, Coroleu L. *Fundamentos de Reproducción*. Madrid: Sociedad Española de Gineco-Obstetricia; 2009.
17. Bajo Arenas J, Melchor J, Mercé L. *Fundamentos de Obstetricia*. Madrid: Sociedad Española de Gineco-Obstetricia; 2007.
18. Carlson B. *Embriología Humana Y Biología Del Desarrollo*. 5th ed. Barcelona: Elsevier S.; 2014.
19. Hib J. *Embriología médica*. 8th ed. Buenos Aires: Clareo; 2006.
20. Sadler TW. *Medical Embryology*. 13th ed. China: Wolters Kluwer Health; 2015.
21. Moore K, Persaud T, Torchia M. *Embriología Clínica*. 9th ed. Canadá: Elsevier, S.; 2013.
22. Rohen J, Lütjen-Drecoll E. *Embriología funcional: una perspectiva desde la biología del desarrollo*. 3rd ed. Madrid: Médica Panamericana, S.A.; 2008.
23. Cunningham G, Leveno K, Bloom S, Hauth J, Gilstrap L, Wenstrom K. *Obstetricia de Williams*. 22nd ed. México, D.F.: McGraw-Hill Interamericana; 2006.
24. Urbina M, Lerner J. *Fertilidad y Reproducción Asistida*. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2008.
25. Cabero L, Saldivar D, Cabrillo E. *Obstetricia y Medicina Materno-Fetal*. 1st ed. Madrid: Médica Panamericana, S.A.; 2007.
26. Botella J. *La Placenta Fisiología Y Patología*. Madrid: Diaz de Santos; 1992.
27. González J, Laílla J, Fabre E, González E. *Obstetricia*. 6th ed. Barcelona: Elsevier Masson; 2013.
28. Purizaca-Benites M. La placenta y la barrera placentaria. *Rev Per Ginecol Obs*. 2008;54:270–8.

29. William J. Embriología humana. 3rd ed. Madrid: Elsevier, S.A.; 2003.
30. Comino R, López G. Obstetricia y Ginecología. 1st ed. Barcelona: Ariel, S.A.; 2004.
31. Suman P, Malhotra SS, Gupta SK. LIF-STAT signaling and trophoblast biology. *Jak-Stat.* 2013;2(4):e25155.
32. Norwitz E, Schust D, Fisher S. Implantation and the Survival of Early Pregnancy. *N Engl J Med.* 2001;345(19):1400–8.
33. Simón C, Horcajadas J, García-Velasco J, Pellicer A. El Endometrio Humano: Desde la investigación a la clínica. Madrid: Médica Panamericana, S.A.; 2009.
34. Welsch U, Sobotta J. Histología. 2nd ed. Madrid: Médica Panamericana, S.A.; 2010.
35. Reyna-villasmil E, Pérez CB, Santos-bolívar J. Invasión trofoblástica en el embarazo normal (II): Placentación profunda (Trophoblastic invasion in normal pregnancy (II): Deep placentation). *Av en Biomed.* 2015;4(1):27–37.
36. Hunkapiller N, Fisher S. Placental remodeling of the uterine vasculature. *Natl Inst Heal.* 2008;445:281–302.
37. Cunningham G, Leveno K, Bloom S, Spong C, Dashe J, Hoffman B, et al. *Williams Obstetrics.* McGrawHill. New York; 2014.
38. Ober C. HLA and pregnancy: The paradox of the fetal allograft. *Am J Hum Genet* [Internet]. 1998;62(1):1–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1376816&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
39. Iglesias M, Guzmán R, Martínez O, Restrepo JF, Bogotá AI. Inmunología de la reproducción. *Acta Médica Colomb.* 2002;27(3):170–80.
40. Lindaman A, Dowden A, Zavazava N. Soluble HLA-G molecules induce apoptosis in natural killer cells. *Am J Reprod Immunol.* 2006;56(1):68–76.
41. Gratacós E, Gómez R, Nicolaidis K, Romero R, Cabero L. *Medicina Fetal.* 1st ed. Madrid: Médica Panamericana, S.A.; 2009.
42. Valdés A, Pérez H, García R, López A. *Embriología humana.* La Habana: Ciencias Médicas; 2010.
43. Lirola M, Camacho M. Síndrome antifosfolípido. *Protoc diagn ter pediatr.* 2014;1:79–89.
44. Núñez-Álvarez CA, Cabiedes J. Mecanismos patogénicos de los anticuerpos antifosfolípidos. *Reumatol Clin.* 2011;7(1):72–6.

45. Negrini S, Pappalardo F, Murdaca G, Indiveri F, Puppo F. The antiphospholipid syndrome: from pathophysiology to treatment. *Clin Exp Med*. Springer International Publishing; 2016;1–11.
46. Espinosa G, Cervera R. Antiphospholipid syndrome: frequency, main causes and risk factors of mortality. *Nat Rev Rheumatol*. Nature Publishing Group; 2010;6(5):296–300.
47. Domenico G, Minisola G, Galeazzi M. HLA class II alleles and genetic predisposition to the antiphospholipid syndrome. *Autoimmun Rev*. 2003;2(6):387–94.
48. Luigi P. *Antiphospholipid Antibody Syndrome*. Milán: Springer; 2015.
49. Pierangeli S, Pierangeli H. Síndrome antifosfolípido: mecanismos patogénicos, diagnóstico y tratamiento. *Med Lab*. 2008;14:111–24.
50. Khamashta M, Taraborelli M, Sciascia S, Tincani A. Antiphospholipid syndrome. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. Elsevier Ltd; 2016;30(1):133–48.
51. Hughes G, Sangle S. *Hughes Syndrome: The Antiphospholipid Syndrome*. 1st ed. London: Springer-Verlag Londres; 2012.
52. Nalli C, Iodice A, Andreoli L, Lojaco A, Motta M, Fazzi E, et al. The effects of lupus and antiphospholipid antibody syndrome on foetal outcomes. *Lupus* [Internet]. 2014;23(6):507–17. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0961203313501402>
53. Bertolaccini M, Ateka-Barrutia O, Khamashta M. *Antiphospholipid Syndrome Handbook*. 1^o ed. London: Springer-Verlag Londres; 2010.
54. Lopes H, Reder G, Monteiro F, Otávio do Amaral J, Andrade M. Evaluation of platelet aggregation in the presence of antiphospholipid antibodies: anti- β 2GP1 and anticardiolipin. *Rev Bras Reumatol (English Ed)*. Elsevier; 2013;53(5):400–4.
55. Mulla M, Myrtolli K, Brosens J, Chamley L, Kwak-Kim J, Paidas M, et al. Antiphospholipid antibodies limit trophoblast migration by reducing IL-6 production and STAT3 activity. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63(5):339–48.
56. Alijotas-Reig J, Vilardell-Tarres M. Is Obstetric Antiphospholipid Syndrome a Primary Nonthrombotic, Proinflammatory, Complement-Mediated Disorder Related to Antiphospholipid Antibodies? 2010;65(1):39–45.
57. Sebire NJ, Regan L, Rai R. Biology and pathology of the placenta in relation to antiphospholipid antibody-associated pregnancy failure. *Lupus*. 2002;11(10):641–3.

58. Fitzgerald JS, Poehlmann TG, Schleussner E, Markert UR. Trophoblast invasion: The role of intracellular cytokine signalling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). *Hum Reprod Update*. 2008;14(4):335–44.
59. Markert UR, Morales DM, Ospina S. JAK/STAT signalling in placental trophoblast differentiation. *J Reprod Immunol* [Internet]. 2010;86(1):17–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165037810001245>
60. Skinnider B, Elia A, Gascoyne R, Patterson B, Trumper L, Kapp U, et al. Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2002;99(2):618–26.
61. Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*. 2002;285(1–2):1–24.
62. O’Sullivan LA, Liongue C, Lewis RS, Stephenson SEM, Ward AC. Cytokine receptor signaling through the Jak-Stat-Socs pathway in disease. *Mol Immunol*. 2007;44(10):2497–506.
63. Xu D, Qu C-K. Protein tyrosine phosphatases in the JAK/STAT pathway. *Front Biosci* [Internet]. 2008;13(216):4925–32. Available from: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=18508557&retmode=ref&cmd=prlinks\papers2://publication/uuid/047B1938-8A10-4E20-BAB9-633A327CC618>
64. Ko HS, Park BJ, Choi SK, Kang HK, Kim A, Kim HS, et al. STAT3 and ERK Signaling Pathways Are Implicated in the Invasion Activity by Oncostatin M through Induction of Matrix Metalloproteinases 2 and 9. 2016;57(3):761–8.
65. Lee JH, Kim TH, Oh SJ, Yoo JY, Akira S, Ku BJ, et al. Signal transducer and activator of transcription-3 (Stat3) plays a critical role in implantation via progesterone receptor in uterus. *FASEB J*. 2013;27(7):2553–63.
66. Tong M, Viall CA, Chamley LW. Antiphospholipid antibodies and the placenta: A systematic review of their in vitro effects and modulation by treatment. *Hum Reprod Update*. 2015;21(1):97–118.
67. Novoa S, Sánchez M. Obtención De Un Sub-Proteoma De Citoplasma De Una Línea Celular De Trofoblasto Mediante Fraccionamiento Con Detergentes. *Rev Acad Colomb Cienc*. 2011;35(136):277–85.

68. Ross M, Pawlina W. *Histología, Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular*. 5th ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2008.
69. Quenby S, Mountfield S, Cartwright J, Whitley GS, Ph D, Chamley L, et al. Antiphospholipid antibodies prevent extravillous trophoblast differentiation. *2005;83(3):691–8*.
70. Poulton K, Ripoll VM, Pericleous C, Meroni PL, Gerosa M, Ioannou Y, et al. Purified IgG from patients with obstetric but not IgG from non-obstetric antiphospholipid syndrome inhibit trophoblast invasion. *Am J Reprod Immunol*. 2015;73(5):390–401.
71. Finan RR, Mustafa FE, Al-Zaman I, Madan S, Issa AA, Almawi WY. STAT3 Polymorphisms Linked with Idiopathic Recurrent Miscarriages. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63(1):22–7.
72. Levy DE, Lee CK. What does Stat3 do? *J Clin Invest*. 2002;109(9):1143–8.
73. San Martin S, Fitzgerald JS, Weber M, Párraga M, Sáez T, Zorn TM, et al. STAT3 and SOCS3 expression patterns during murine placenta development. *Eur J Histochem*. 2013;57(2):118–23.
74. Sehgal PB, Levy DE, Hirano T. *Signal Transducers and Activators of Transcription (STATs), Activation and Biology*. 1st ed. New York: Springer Science + Business Media, B.V.; 2003.
75. Matsumoto A, Seki Y, Watanabe R, Hayashi K, Johnston J a., Harada Y, et al. A Role of Suppressor of Cytokine Signaling 3 (SOCS3/CIS3/SSI3) in CD28-mediated Interleukin 2 Production. *J Exp Med* [Internet]. 2003;197(4):425–36. Available from: <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20020939> \n <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2193868&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
76. Shuai K, Liu B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(11):900–11.
77. Takahashi Y, Carpino N, Cross JC, Torres M, Parganas E, Ihle JN. SOCS3: An essential regulator of LIF receptor signaling in trophoblast giant cell differentiation. *EMBO J*. 2003;22(3):372–84.
78. Kiu H, Nicholson SE. Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways. *Growth Factors* [Internet]. 2012;30(2):88–106. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22339650> \n <http://www.pubmedcentral.nih.gov/artic>

lerender.fcgi?artid=PMC3762697

79. Carow B, Rottenberg ME. SOCS3, a major regulator of infection and inflammation. *Front Immunol.* 2014;5:1–14.
80. Zhou X, Jiang Z, Zou Y, Yin Y, Zuo Q, Sun L. Role of SOCS3 in the Jak/stat3 pathway in the human placenta: Different mechanisms for preterm and term labor. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2015;94(10):1112–7.
81. Baker BJ, Akhtar LN, Benveniste EN. SOCS1 and SOCS3 in the control of CNS immunity. 2010;30(8):392–400.
82. Murray PJ. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol.* 2007;178:2623–9.
83. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J.* 2003;374(Pt 1):1–20.
84. Auernhammer CJ, Bousquet C, Melmed S. Autoregulation of pituitary corticotroph SOCS-3 expression: characterization of the murine SOCS-3 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1999;96(12):6964–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=22025&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
85. Schuringa JJ, Wierenga a T, Kruijer W, Vellenga E. Constitutive Stat3, Tyr705, and Ser727 phosphorylation in acute myeloid leukemia cells caused by the autocrine secretion of interleukin-6. *Blood.* 2000;95(12):3765–70.
86. Isobe A, Takeda T, Sakata M, Yamamoto T, Minekawa R, Hayashi M, et al. STAT3-mediated Constitutive Expression of SOCS3 in an Undifferentiated Rat Trophoblast-like Cell Line. *Placenta.* 2006;27(8):912–8.
87. Lambrianides A, Carroll CJ, Pierangeli SS, Pericleous C, Branch W, Rice J, et al. Effects of polyclonal IgG derived from patients with different clinical types of the antiphospholipid syndrome on monocyte signalling pathways1. 2010;184(12):6622–8.
88. Muller-Calleja N, Lackner KJ. Mechanisms of Cellular Activation in the Antiphospholipid Syndrome. *Semin thrombois Hemost.* 2017;43(4).
89. Nakamura H, Kimura T, Koyama S, Ogita K, Tsutsui T, Shimoya K, et al. Mouse model of human infertility: Transient and local inhibition of endometrial STAT-3 activation

results in implantation failure. FEBS Lett. 2006;580(11):2717–22.

90. MultiMed. Porta objetos 25x75 c/50 080.729.0010 [Internet]. 2016 [cited 2017 Jan 19]. Available from: multimed.com.mx/consumibles/229-portaobjetos-.html

CAPÍTULO 10: APÉNDICE

ANEXO 1: Protocolo de fijación e inclusión en parafina de los cultivos

- 1) Retirar medio de cultivo
- 2) Adicionar formaldehído 4% en PBS: 30 μ l gotas o 200 μ l en insertos. Dejar a 4°C x 1h.
- 3) Lavar con PBS x 10min 2 veces.
- 4) Deshidratación: Etanol 50% x 10min.
Etanol 70% x 10 min.
Etanol 95% I y II x 10min.
Etanol 100% I y II x 10min.
Propanol I, II y III x 10min.
- 5) Inclusión en Parafina (previamente líquida a 60°C en baño seco) I, II y III por 20min cada una. Depositar la muestra en los moldes metálicos con parafina líquida. Cubrir con los moldes plásticos y cubrir con más parafina, dejar secar a T° ambiente. Refrigerar hasta que se requieran desmoldar.

ANEXO 2: Tinción de Hematoxilina – Eosina

- 1) Desparafinación:
 - Xilol I (10 min)
 - Xilol II (10 min)
 - Xilol III (10 min)
- 2) Rehidratación:
 - Alcohol 100% I (5 min)
 - Alcohol 100% II (5 min)
 - Alcohol 95% (5 min)
 - Alcohol 70% (5 min)
 - Agua destilada (5min)
- 3) Coloración Hematoxilina de Harris (30 segundos)
 - Viraje en agua corriente (10min)
- 4) Alcohol de 95° (5min)
- 5) Eosina alcohólica (4 segundos)
- 6) Deshidratación:
 - Alcohol 100% I (5min)
 - Alcohol 100% II (5min)
 - Alcohol/Xilol (5min)
- 7) Aclaramiento:
 - Xilol I (5 min)
 - Xilol II (5 min)
- 8) Cubrir con medio de montaje hidrófobo.

ANEXO 3: Protocolo inmunohistoquímica anti- STAT-3

- 1) Desparafinación:
 - Xilol I (10 min)
 - Xilol II (10 min)
 - Xilol III (10 min)
- 2) Rehidratación:
 - Alcohol 100% I (10 min)
 - Alcohol 100% II (10 min)
 - Alcohol 95% (10 min)
 - Alcohol 70% (10 min)
- 3) Lavado en agua destilada durante 10 min.
- 4) 3 cambios en PBS, 5 min cada uno.
- 5) Bloqueo de peroxidasa endógena con H₂O₂ (30%) al 3% en PBS. Utilizar agitador orbital a temperatura ambiente, durante 30 min.
- 6) 3 cambios en PBS, 5 min cada uno.
- 7) Bloqueo de sitios inespecíficos:
 - Aplicar Cas – block durante 30 min a temperatura ambiente.
 - Incubación con suero normal (cabra) durante 30 min a temperatura ambiente.
- 8) Incubación del anticuerpo primario:
 - Anti –STAT 3 diluido en 1:100 en PBS/Tween20 durante la noche a 4° C.
- 9) 3 cambios en PBS, 5 min cada uno.
- 10) Incubación del anticuerpo secundario:
 - Anti-IgG de conejo, hecho en cabra, conjugado con HRP, diluido 1:1000 en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente.
- 11) 3 cambios en PBS, 5 min cada uno.
- 12) Revelado cromogénico con NovaRed – Kit, durante 3:00 min, de acuerdo a la siguiente proporción de sus componentes:

Agua destilada	1	2	3	H ₂ O ₂
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

13) Lavar en agua destilada durante 5 min.

14) Contraste nuclear:

Teñir brevemente con hematoxilina.

Virar hematoxilina en agua corriente durante 8 min.

15) Deshidratación:

Alcohol 95% (dipping)

Alcohol 100% I (dipping)

Alcohol 100% II (dipping)

Alcohol/Xilol (dipping)

16) Aclaramiento:

Xilol I (5 min)

Xilol II (5 min)

17) Cubrir con medio de montaje hidrófobo.

ANEXO 4: Protocolo inmunohistoquímica anti- STAT-3 fosforilada

1) Desparafinación:

Xilol I (10 min)

Xilol II (10 min)

Xilol III (10 min)

2) Rehidratación:

Alcohol 100% I (10 min)

Alcohol 100% II (10 min)

Alcohol 95% (10 min)

Alcohol 70% (10 min)

3) Lavado en agua destilada durante 10 min.

4) Recuperación antigénica en buffer citrato a 95° C durante 15 min. (dejar calentando el buffer previamente por 20 minutos).

Dejar enfriar manteniendo las placas en el buffer, durante 15 min.

Lavado en agua destilada, 10 min.

5) 3 cambios en PBS, 5 min cada uno.

6) Bloqueo de peroxidasa endógena con H₂O₂ (30%) al 3% en PBS. Utilizar agitador orbital a temperatura ambiente, durante 30 min.

7) 3 cambios en PBS, 5 min cada uno.

8) Bloqueo de sitios inespecíficos:

Aplicar Cas – block durante 30 min a temperatura ambiente.

Incubación con suero normal (cabra) durante 30 min a temperatura ambiente.

9) Incubación del anticuerpo primario:

Anti –STAT 3 fosforilado diluido en 1:100 en PBS/Tween20 durante la noche a 4° C.

10) 3 cambios en PBS, 5 min cada uno.

11) Incubación del anticuerpo secundario:

Anti-IgG de conejo, hecho en cabra, conjugado con HRP, diluido 1:1000 en PBS,

durante 1 hora a temperatura ambiente.

12) 3 cambios en PBS, 5 min cada uno.

13) Revelado cromogénico con NovaRed – Kit, durante 4:00 min, de acuerdo a la siguiente proporción de sus componentes:

Agua destilada	1	2	3	H ₂ O ₂
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

14) Lavar en agua destilada durante 5 min.

15) Contraste nuclear:

Teñir brevemente con hematoxilina.

Virar hematoxilina en agua corriente durante 8 min.

16) Deshidratación:

Alcohol 95% (dipping)

Alcohol 100% I (dipping)

Alcohol 100% II (dipping)

Alcohol/Xilol (dipping)

17) Aclaramiento:

Xilol I (5 min)

Xilol II (5 min)

18) Cubrir con medio de montaje hidrófobo.

ANEXO 5: Protocolo inmunohistoquímica anti-SOCS-3

1) Desparafinación:

Xilol I (10 min)

Xilol II (10 min)

Xilol III (10 min)

2) Rehidratación:

Alcohol 100% I (10 min)

Alcohol 100% II (10 min)

Alcohol 95% (10 min)

Alcohol 70% (10 min)

3) Lavado en agua destilada durante 10 min.

4) Recuperación antigénica en buffer citrato a 95° C durante 15 min. (dejar calentando el buffer previamente por 20 minutos).

Dejar enfriar manteniendo las placas en el buffer, durante 15 min.

Lavado en agua destilada, 10 min.

5) 3 cambios en PBS, 5 min cada uno.

6) Bloqueo de peroxidasa endógena con H₂O₂ (30%) al 3% en PBS. Utilizar agitador orbital a temperatura ambiente, durante 30 min.

7) 3 cambios en PBS, 5 min cada uno.

8) Bloqueo de sitios inespecíficos:

Aplicar Cas – block durante 30 min a temperatura ambiente.

Incubación con suero normal (cabra) durante 30 min a temperatura ambiente.

9) Incubación del anticuerpo primario:

Anti –SOCS3 diluido en 1:500 en PBS/Tween20 durante la noche a 4° C.

10) 3 cambios en PBS, 5 min cada uno.

11) Incubación del anticuerpo secundario:

Anti-IgG de conejo, hecho en cabra, conjugado con HRP, diluido 1:1000 en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente.

12) 3 cambios en PBS, 5 min cada uno.

13) Revelado cromogénico con NovaRed – Kit, durante 2:30 min, de acuerdo a la siguiente proporción de sus componentes:

Agua destilada	1	2	3	H ₂ O ₂
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

14) Lavar en agua destilada durante 5 min.

15) Contraste nuclear:

Teñir brevemente con hematoxilina.

Virar hematoxilina en agua corriente durante 8 min.

16) Deshidratación:

Alcohol 95% (dipping)

Alcohol 100% I (dipping)

Alcohol 100% II (dipping)

Alcohol/Xilol (dipping)

17) Aclaramiento:

Xilol I (5 min)

Xilol II (5 min)

18) Cubrir con medio de montaje hidrófobo.

ANEXO 6: Controles inmunohistoquímica

A continuación se presentan microfotografías de controles positivo y negativo externo para la técnica de inmunohistoquímica, véase figuras 10.1 a 10.6.

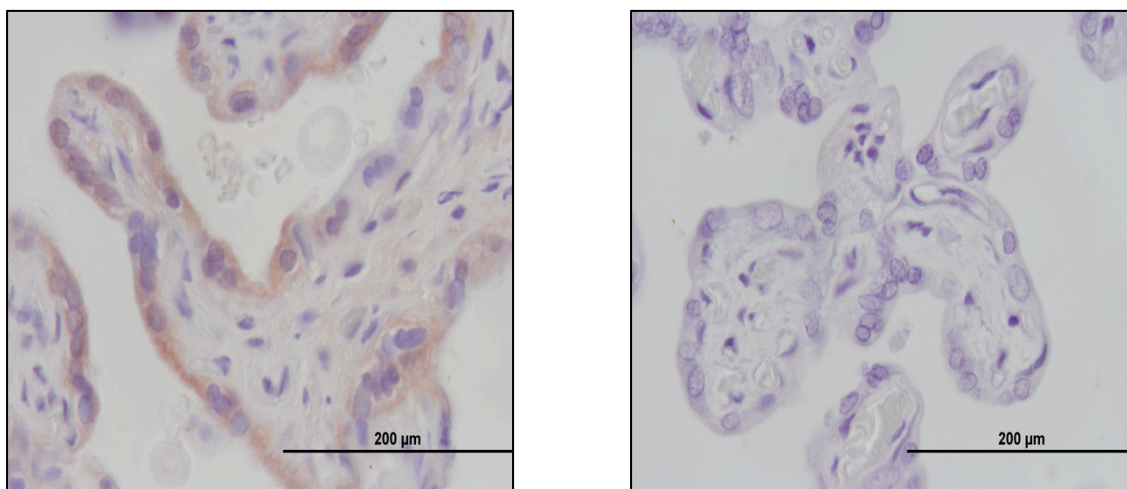


Figura 10.1 Anti-STAT3: Microfotografías de control externo positivo (lado izquierdo) y negativo (lado derecho) de corte histológico de placenta de término humana utilizado para marcar STAT3. Aumento 1000X.

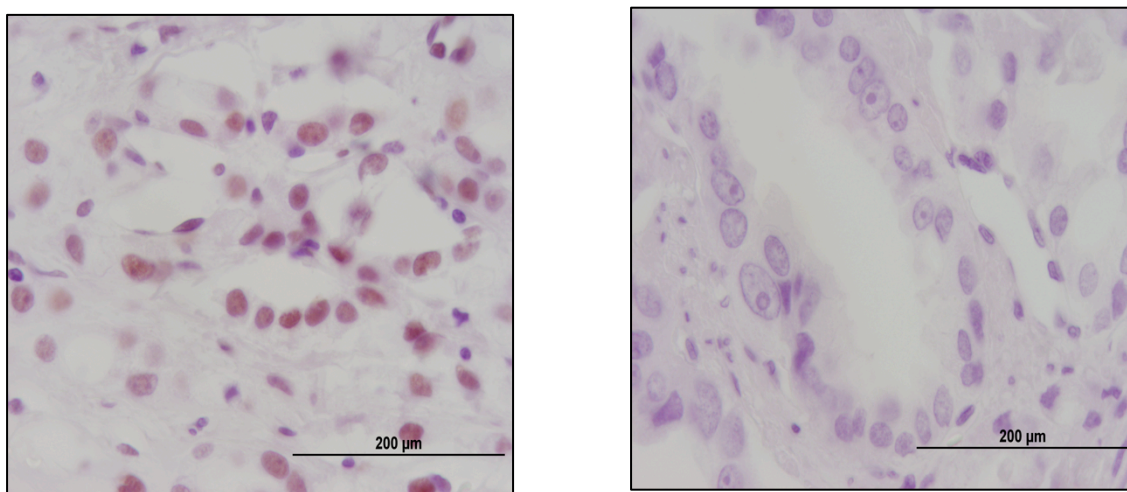


Figura 10.2 Anti-STAT3 fosforilada: Microfotografías de control externo positivo (lado izquierdo) y negativo (lado derecho) de corte histológico de carcinoma de próstata utilizado para marcar STAT3 fosforilada. Aumento 1000X.

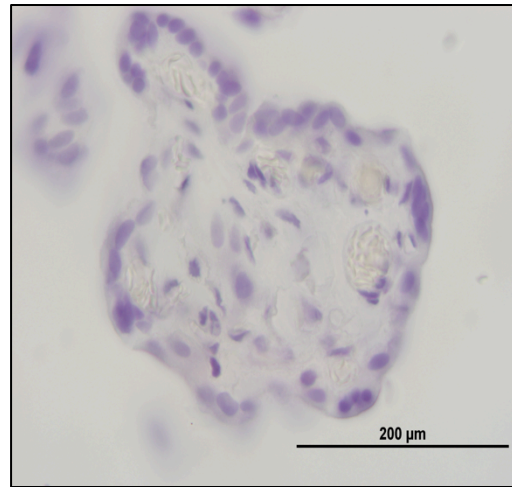
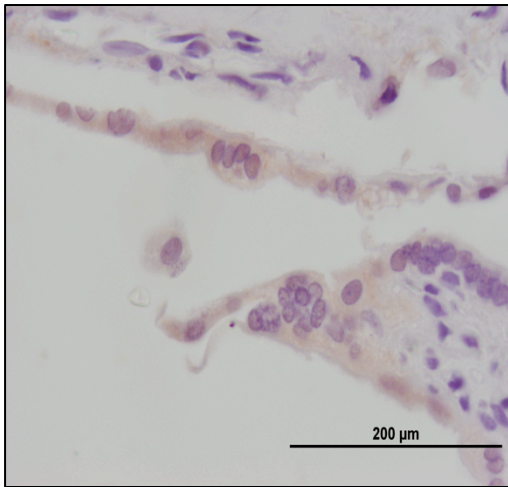


Figura 10.3 Anti-SOCS3: Microfotografías de control externo positivo (lado izquierdo) y negativo (lado derecho) de corte histológico de placenta de término humana utilizado para marcar SOCS3. Aumento 1000X.

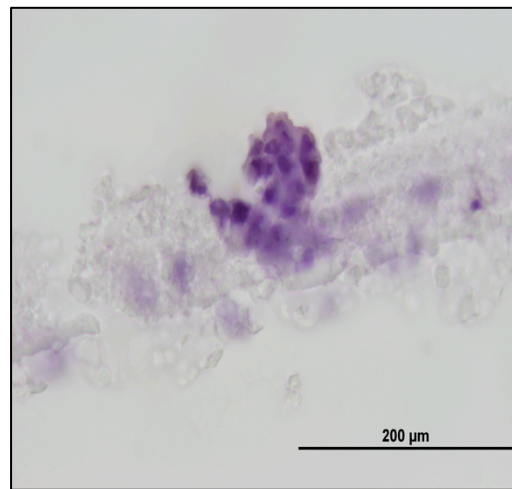
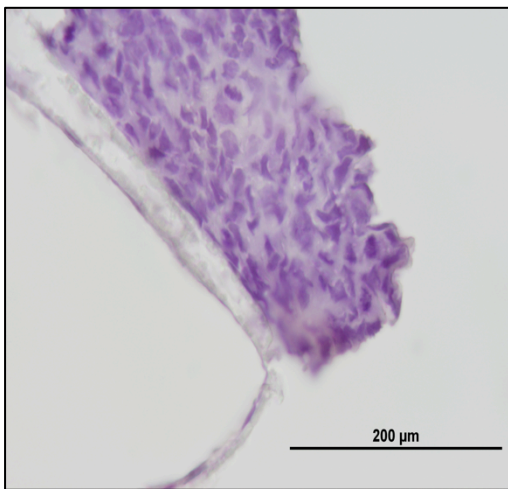


Figura 10.4 Resultados de Control negativo externo: Ensayo de cultivo RPMI (medio solo) lado izquierdo y NHS (mujeres sanas) en lado derecho. (Microfotografías Inmunohistoquímica control negativo aumento 1000X).

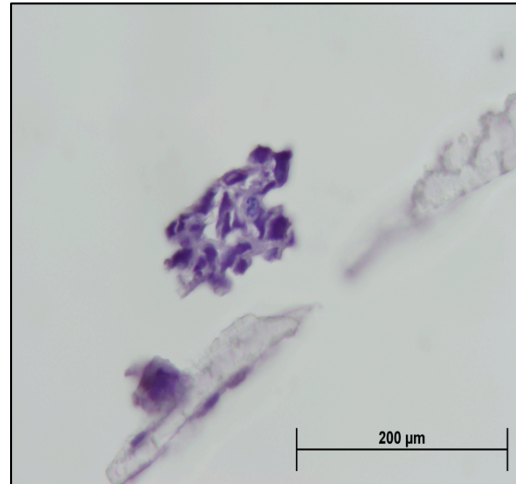
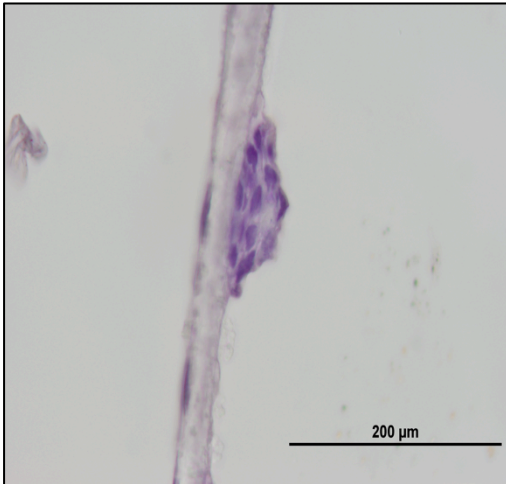


Figura 11.5 Resultados de Control negativo externo: Ensayo de cultivos Pneg (negativas para aAFL) lado izquierdo y PM (Morbilidad gestacional) en lado derecho. (Microfotografías Inmunohistoquímica control negativo aumento 1000X).

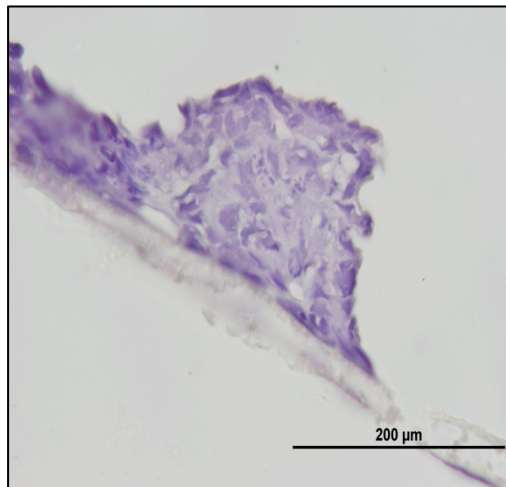


Figura 10.6 Resultados de Control negativo externo: Ensayo de cultivos PM (Morbilidad gestacional). (Microfotografías Inmunohistoquímica control negativo aumento 1000X).