



Universidad de Valparaíso  
Facultad de Medicina  
Escuela de Obstetricia y Puericultura  
Campus casa central

Relación entre el peso de nacimiento, nivel de apoptosis y proliferación de placentas de recién nacidos de pre-término pequeños para la edad gestacional (PT-PEG) y adecuados para la edad gestacional (PT-AEG), obtenidas de gestantes fisiológicas atendidas en el Hospital San Borja Arriarán

Tesis para optar al grado de Licenciado en Obstetricia y Puericultura

Profesor Guía: Sebastián San Martín H.  
Profesor Co - guía: Germán Iñiguez V.  
Asesor: René González V.

Nombre Estudiantes: Cinthya Cepeda Escobar  
Claudia Manzo Contreras  
Karla Messina Aguilera

Valparaíso, 2016

## Dedicatoria

Queremos dedicar este trabajo - que realizamos con mucho esfuerzo - a nuestras familias, que han sido un pilar fundamental a lo largo de nuestro camino académico, con su permanente apoyo y compañía en todo momento.

Y como uno de los sucesos culmines de nuestra carrera, dedicar el trabajo de esta investigación a todas aquellas usuarias, tutoras clínicas y personas que nos ayudaron en nuestra formación como profesionales en el área práctica, nos dieron la oportunidad de acompañarlas y nos enseñaron a ejercer la Obstetricia con pasión, en el área en que mejor nos desempeñamos.

*“Daría todo lo que sé, por la mitad de lo que ignoro” (René Descartes)*

## Índice

Resumen.....	6
Lista de abreviaturas .....	7
Introducción .....	9
Pregunta de investigación.....	11
Fundamentación: .....	11
Definición de términos.....	13
Marco teórico.....	15
Placenta.....	15
Etapas de placentación .....	15
Histología de la placenta .....	20
Apoptosis y proliferación celular.....	24
Proliferación celular .....	24
Apoptosis.....	26
Peso al nacer .....	32
Recién nacido prematuro.....	35
Diagnóstico precoz de la amenaza de parto prematuro.....	35
Inmunohistoquímica .....	38
Objetivos de investigación .....	42
Objetivo General .....	42
Objetivos Específicos.....	42
Hipótesis a desarrollar .....	43
Metodología.....	43
Mecanismos de determinación de universo y muestra.....	44
Criterios de inclusión y exclusión .....	44
Selección y recolección de muestras .....	45
Recolección de datos.....	46
Fijación y corte de muestra.....	46
Grupos de estudio.....	47

Estandarización de anticuerpos .....	48
Protocolo de inmunohistoquímica caspasa 3 activa.....	50
Protocolo de inmunohistoquímica KI 67 .....	53
Capturas fotográficas Caspasa 3 activa y KI 67 .....	56
Análisis morfológico de placentas.....	61
Caspasa 3 activa .....	61
KI – 67 en grupos de pretérmino .....	62
Discusión .....	64
Conclusión.....	70
Agradecimientos .....	71
Bibliografía .....	73
Anexos.....	77

**Relación existente entre el peso de nacimiento, nivel de apoptosis y proliferación de placentas de recién nacidos de pre-término pequeños para la edad gestacional y adecuados para la edad gestacional, obtenidas de gestantes fisiológicas atendidas en el Hospital San Borja Arriarán**

**Autores:**

**Profesor Guía:**

Dr. Sebastián San Martín Henríquez  
Centro de investigaciones biomédicas  
Profesor adjunto  
Facultad de Medicina  
Universidad de Valparaíso

**Profesor co – guía:**

MSc. Germán Iñiguez Vila  
Instituto de investigaciones Materno-infantil  
Profesor asociado  
Facultad de Medicina  
Universidad de Chile

**Asesor:**

MSc. René González Vargas  
Centro de Investigaciones biomédicas  
Facultad de Medicina  
Universidad de Valparaíso

**Estudiantes**

Cinthya Cepeda Escobar  
Claudia Manzo Contreras  
Karla Messina Aguilera

## Resumen

La placenta es un órgano primordial en el desarrollo del ser humano pues modula la comunicación y nutrición materno-fetal. Resulta indispensable el normal desarrollo para su óptimo funcionamiento. Dos de procesos que se encuentran en constante equilibrio son la proliferación y apoptosis celular, permitiendo una renovación de las células placentarias. Sin embargo, estos fenómenos deben auto limitarse y pueden estar alterados por condiciones patológicas, por ejemplo, en el síndrome hipertensivo del embarazo o la diabetes gestacional, donde el daño producido se refleja principalmente en el peso del recién nacido, el cual puede ser mayor o menor al esperado para su edad gestacional.

Este estudio se ha orientado a los recién nacidos desarrollados en ausencia de patologías maternas. Se analizaron los niveles de apoptosis/proliferación en base a sus placentas y según peso de nacimiento. Los grupos de estudio fueron recién nacidos de pre – término y que han sido clasificados como PT-PEG (pequeños para la edad gestacional) o PT-AEG (adecuados para la edad gestacional). Se analizaron fotografías de las placentas de los RNPT previamente sometidas a técnicas inmunohistoquímicas, observando el nivel de marcaje de las moléculas utilizadas: Caspasa 3 activa (para Apoptosis celular) y Ki – 67 (para proliferación celular).

Realizado el análisis morfológico, se concluye que la proliferación celular (medida en base al marcaje de KI – 67) esta disminuida en RNPT, con vaga marcación en AEG y nula en el grupo PEG. Caspasa en cambio presenta marcaje en ambos grupos de peso, sin embargo es bajo para ambos y no presenta diferencia significativa entre el grupo PT-PEG y PT-AEG.

Palabras clave: **placenta, proliferación, apoptosis, KI – 67, caspasa 3 activa, peso al nacer.**

## Lista de abreviaturas

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**AEG:** Adecuado para la edad gestacional.

**ATP:** Adenosin trifosfato.

**BCL-2:** Prototipo de proteína que controla la permeabilidad de membrana mitocondrial.

**BCL-X:** Similar a BCL-2, siendo X una proteína

**BID:** Miembro pro apoptótico de la familia BCL-2

**CTB:** Citotrofoblasto

**EBPN:** Extremo bajo peso al nacer

**EG:** Edad gestacional

**FAS L:** FAS ligando

**FLIP:** Proteína celular antagonista de caspasa

**G0:** Fase de inactividad referente a la proliferación celular

**G1:** Primer punto de control en proliferación celular

**G2:** Segundo punto de control en proliferación celular

**GEG:** Grande para la edad gestacional

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrogeno

**HgO:** Oxido de mercurio

**Ig:** Inmunoglobulina

**IgG:** Inmunoglobulina G

**IgM:** Inmunoglobulina M

**IHQ:** Inmunohistoquímica

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:** Fosfato de potasio monofásico

**M:** Mitosis

**MBPN:** Muy bajo peso al nacer

**MS:** Mesénquima

**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:** Bifosfato de sodio

**NaCl:** Cloruro de sodio

**OMS:** Organización mundial de la salud

**PEG:** Pequeño para la edad gestacional

**PBS:** Buffer fosfato salino

**pH:** Potencial de hidrógeno

**PN:** Peso al nacer

**PT:** Pretérmino

**RM:** Región Metropolitana

**RN:** Recién nacido

**S:** Etapa de replicación de ADN

**SOCHIPE:** Sociedad chilena de pediatría

**STB:** Sincitiotrofoblasto

**T- AEG:** Término adecuado para la edad gestacional

**TEV:** Trofoblasto extra embrionario

**T – GEG:** Término grande para la edad gestacional

**TGF – B: Factor** de crecimiento transformante B

**TNF: Factor** de necrosis tumoral

**T- PEG:** Término pequeño para la edad gestacional

**VS:** Vaso sanguíneo

## Introducción

El desarrollo de una nueva vida es un proceso delicado y complejo, que requiere un efectivo funcionamiento del cuerpo de la mujer, los órganos y moléculas bioquímicas encargadas del crecimiento del embrión

Una de las estructuras más importantes en la formación de este nuevo ser es la placenta. Este órgano formado por tejidos tanto maternos a nivel del endometrio uterino, como fetales, provenientes del corion, permite la comunicación de la circulación materno-fetal, facilitando procesos metabólicos y de intercambio gaseoso. También actúa secretando hormonas y produciendo una barrera entre ambos sistemas inmunológicos, facilitando así la supervivencia del feto en el vientre materno.(Roa, Smok S, & Prieto G, 2012)

Es bajo estas funciones entonces, que la placenta se encarga de manera general, de la nutrición del feto (Pérez Sanchez & Donoso Siña, 2012a), asegurando un crecimiento adecuado y armónico según la etapa de la gestación en la que se encuentre.

Durante el proceso de formación de la placenta o “Placentación”, existe una gran proliferación celular, sin embargo es necesaria la eliminación de los desechos generados, lo cual ocurre mediante el proceso de apoptosis(Rodríguez G, Couve P, Egaña U, & Chamy P, 2011). La apoptosis es un proceso de muerte celular silenciosa, que no involucra eventos inflamatorios, y donde los organelos se fragmentan, condensan y empaquetan sus membranas celulares. Así constituyen estructuras denominadas “Cuerpos apoptóticos”, los que luego serán fagocitados por células vecinas o macrófagos, asegurando que no permanezcan en el espacio extracelular y gatillen una respuesta inmune.(Rodríguez G et al., 2011)

Alteraciones en este proceso, pueden generar desarrollo de injurias a nivel placentario (Rodríguez G et al., 2011), lo cual afectará sin duda su funcionamiento, nutrición y el crecimiento adecuado del feto. Ello se verá reflejado en el examen físico realizado al recién nacido, cuyo peso será discordante con su edad gestacional, y lo cual puede generar ciertas consecuencias en la adaptación normal de este niño. Las dos variables más importante y que resultan

determinantes de la mortalidad y morbilidad de los recién nacidos son la prematuridad y el bajo peso al nacer.(Ventura-Juncá, 2012)

Como consecuencia de esto y con el objetivo de determinar la existencia de un proceso placentario que pudiese interferir con el crecimiento de los recién nacidos, es que a través de este estudio se pretende asociar los niveles proliferativos y apoptóticos con el peso del recién nacido, con el fin de relacionar estos parámetros con el desarrollo normal y anormal del feto y posterior recién nacido.

## **Pregunta de investigación:**

**¿Qué relación existe entre el peso al nacer y el la proliferación celular y nivel de apoptosis, en placentas de recién nacidos de pretérmino pequeños para la edad gestacional (PT-PEG) y pretérmino adecuados para la edad gestacional (PT-AEG), obtenidas de gestantes fisiológicas atendidas en el Hospital Clínico San Borja Arriarán de la Región Metropolitana, Santiago de Chile, desde el 2006 al 2014?**

## **Fundamentación:**

La importancia de esta investigación radica en estudiar los factores que pueden afectar el crecimiento normal de un feto, y cómo éstos inciden en el funcionamiento normal de la placenta, todo esto en el contexto de una gestación que finaliza debido al desencadenamiento de parto prematuro.

Como es sabido, la placenta es el órgano encargado de la nutrición del feto y en consecuencia, está fuertemente asociada al crecimiento de este.

En el proceso de formación de la placenta va a existir gran proliferación celular, ya que es un proceso necesario tanto para la creación y desarrollo del árbol vellositario, el cual es el encargado del intercambio materno-fetal, como para el desarrollo de territorios extravellositarios, que tienen gran importancia en el proceso de placentación. Esta proliferación va a generar elementos celulares que deberán ser eliminados a través del proceso de apoptosis.

La alteración de este equilibrio entre proliferación y apoptosis puede producir alteraciones a nivel de la placenta, que conllevaran al desarrollo de distintos problemas en la gestación.

Debido a lo anterior, en este estudio se pretende analizar el nivel de proliferación y apoptosis en células placentarias y relacionarlos con el peso de los recién nacidos de parto prematuro idiopático, con el fin de descubrir la relación que tienen estos procesos con el crecimiento tanto normal como anormal, teniendo también en consideración que al ser un parto prematuro (antes de las 37

semanas de gestación), la placenta debería estar aún en pleno funcionamiento y desarrollo en pro del crecimiento del feto.

## Definición de términos

1. **Apoptosis:** Del griego *apó*, separado de, y *ptôsis*, caída, corresponde a una muerte celular fisiológica o programada por el organismo. Es un término que se usa para diferenciarlo de otras muertes celulares accidentales (por traumatismos, sustancias tóxicas, etc.).(De Robertis & Hib, 2004)
2. **Caspasas:** Son proteasas citosólicas especiales, que se encargan de modificar la célula para llevarla a su apoptosis.(De Robertis & Hib, 2004)
3. **Proliferación:** Es un vía involucrada en procesos fisiológicos y patológicos, en la que a través del ciclo celular se duplican sus componentes de manera exacta y equitativa, donde el resultado final es la división en dos células hijas idénticas.
4. **Placenta:** Órgano extraembrionario que permite el desarrollo del embrión dentro del útero materno, gracias a la conexión que establece entre el riego sanguíneo materno-fetal, asegurando una adecuada nutrición del feto en desarrollo, y siendo esencial a su vez para la eliminación de desechos desde el embrión hacia la circulación materna.(Pérez Sanchez & Donoso Siña, 2012b)
5. **Recién nacido de término:** Todo recién nacido cuyo nacimiento ocurre después de las 37 semanas hasta antes de las 41 semanas completas.(Tapia L & Gonzalez M, 2008b)
6. **Recién nacido de pre-término:** Todo recién nacido cuyo nacimiento ocurre antes de las 37 semanas completas.(Tapia L & Gonzalez M, 2008b)

7. **Trofoblasto:** Masa externa del blastocisto constituida por células que se aplanan y conforman la pared. Son las encargadas de introducirse entre las células epiteliales de la mucosa uterina alrededor del sexto día de gestación.(Lagman& Sadler, 2007)
  
8. **Antígeno Fas:** Antígeno de superficie, receptor primario que forma parte de la vía extrínseca de la apoptosis.(Debesa Padilla, Alvarez Hidalgo, Puente Infante, Stewart Lemes, & Casas Morell, 2007)
  
9. **Bcl-2:** Familia de proteínas que forman parte de la regulación de la vía intrínseca de la apoptosis, actuando como anti-apoptótico.(Debesa Padilla et al., 2007)
  
10. **TUNEL:** Terminal deoxynucleotidyltransferasedeoxy-UTP-nickendlabeling → otro método útil para detectar la apoptosis celular que es selectivo para los núcleos celulares en apoptosis ya que mide la fragmentación del DNA celular aunque ésta fragmentación puede darse por otros fenómenos, pero incluso detecta células que morfológicamente no están en apoptosis pero ya comenzaron internamente el proceso de muerte celular.(Charriaut-Marlangue C & Ben-Ari Y, 1995)
  
11. **Kappa B:** Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas → es un complejo proteico que controla la transcripción del ADN y es utilizado por la célula para regular la proliferación y supervivencia celular.(Baeuerle& Baltimore, 1988)

## Marco teórico

### Placenta

La placenta es un órgano propio de los mamíferos, el cual tiene como función la comunicación materno fetal, promoviendo la transferencia de nutrientes y factores que regulan el crecimiento y desarrollo fetal a través de la circulación útero-placentaria(Pérez Sanchez & Donoso Siña, 2012c)

### Etapas de placentación

El proceso de placentación comienza con la implantación del blastocisto, iniciando en la madre una serie de cambios metabólicos y morfológicos en pro del desarrollo embrionario. Uno de ellos es la formación de la Placenta, órgano vital para el periodo de gestación.(Pérez Sanchez & Donoso Siña, 2012c) La placentación se divide en dos periodos, el pre vellositario, que comprende la etapa pre-lacunar y lacunar, y el período vellositario.(Schwarcz, Duverges, Díaz, & Fescina, 2003)

- ***Implantación***

A los 7 días post- fecundación el embrión se adherirá firmemente al epitelio endometrial, para luego sumergirse en el estroma endometrial.(Carlson, 2009)

Las células del blastocisto que están sometidas al proceso de implantación presentan un alto grado de proliferación, dando como resultado la formación del trofoblasto. Este trofoblasto está compuesto por dos tipos celulares. La capa más externa y que mantiene contacto con los tejidos maternos, se denomina Sinciciotrofoblasto (STB) y una capa celular interna que no ha tenido contacto con las células maternas y que por lo tanto no se han fusionado, reciben el nombre de

Citotrofoblasto (CTB). Con el pasar de los días se mantiene una invasión continua hacia el endometrio, produciéndose la erosión de los tejidos maternos, mediado por la acción de enzimas, principalmente metaloproteasas, derivadas del trofoblasto sincicial(Pérez Sanchez & Donoso Siña, 2012c)

Esta invasión se traduce en un *mayor contacto entre la superficie del blastocisto con los tejidos maternos, además de una mayor proliferación del trofoblasto con la consiguiente fusión celular*(Pérez Sanchez & Donoso Siña, 2012c)

La masa sinciciotrofoblástica irá aumentando su grosor en el punto de implantación con el paso de los días, *formando extensiones y digitaciones que invaden las capas más profundas del endometrio*(Pérez Sanchez & Donoso Siña, 2012c)

- ***Etapa Prelacunar***

Una vez implantado el blastocisto en la parte superior de la cara posterior de la pared uterina, los tejidos embrionarios mantienen contacto directo y estable con la mucosa uterina. Esto permite que inicie el desarrollo de la placenta.

La masa celular interna, se forma de un gran número celular y dan origen al Embrioblasto, *más cercano a la superficie interna de la vesícula trofoblástica*(Pérez Sanchez & Donoso Siña, 2012c). Estas células también darán origen a otras estructuras, como el embrión, cordón umbilical y el amnios. Tanto el mesénquima como los vasos sanguíneos derivados del embrioblasto contribuyen a la formación de la placenta.

- ***Etapa Lacunar***

Se desarrolla entre el 9no y 13vo día post coito. Su principal característica es que aparecen en el STB pequeñas vacuolas que al reunirse originan Lagunas(Schwarcz et al., 2003). La formación de las lagunas divide al trofoblasto en tres capas:1) Placa coriónica primaria, que mira hacia la cavidad del blastocisto; 2) Sistema lacunar separado por trabéculas; 3) Capa trofoblástica externa que mira hacia el endometrio(Pérez Sanchez & Donoso Siña, 2012c)

Tal como se mencionó, las lagunas se encuentran separadas por “Trabéculas”. Cuando el trofoblasto se desarrolla, y erosiona los vasos endometriales, la sangre ingresa a las lagunas, y permite la nutrición fetal(Schwarcz et al., 2003). En este periodo comienza la proliferación y migración del CTB, como también la **“Invasión trofoblástica”**: La decidua es capaz de sintetizar y secretar factores de diferenciación celular, junto con el factor de crecimiento transformante beta (TGF – B). Esto es posible debido a la capacidad proliferativa, histolítica y penetrante del trofoblasto, y se da ante la reacción de los tejidos maternos que mantienen contacto con él. Este mecanismo induce a que el trofoblasto se diferencie a Sincicio y pierda la capacidad de duplicarse a nivel celular. El STB cubrirá por completo la superficie del blastocisto, y el extremo del polo de implantación será el que se encargue de la formación de la Placenta, siendo mucho más grueso que el polo opuesto.(Pérez Sanchez & Donoso Siña, 2012c)

La invasión trofoblástica, originará cambios en el estroma endometrial. El estrés mecánico y hormonal al que se ve sometido, producirá una importante proliferación celular en este estroma, que originarán la decidua(Pérez Sanchez & Donoso Siña, 2012c)

- ***Periodo vellositario***

A medida que el desarrollo placentario avanza, las vellosidades coriónicas aumentan en tamaño y número, invadiendo constantemente el tejido materno, con el fin de establecer la circulación materno-fetal(Pérez Sanchez & Donoso Siña, 2012c)

Las trabéculas que separan las lagunas placentarias se dispondrán alrededor del corion de forma “Radiada”, y serán penetradas desde su base por el CTB que se encuentra en alta proliferación, así se originan las vellosidades primarias(Schwarcz et al., 2003). A su vez, esta proliferación y la ramificación de las vellosidades dan origen a los “Troncos vellositarios”, que provienen de las trabéculas(Pérez Sanchez & Donoso Siña, 2012c)Las vellosidades secundarias, se forman cuando las primarias son invadidas por el mesodermo extraembrionario(Schwarcz et al., 2003)

Las vellosidades coriónicas terciarias constituyen la unidad estructural y funcional de la placenta(Geneser, 2000). Se originan a partir de células troncales hematopoyéticas, contenidas dentro de capilares primitivos que se encuentran rodeados por endotelio(Pérez Sanchez & Donoso Siña, 2012c), además son las que predominan en la estructura placentaria al término de la gestación. La importancia de estas vellosidades es que a partir de ellas se establece la circulación materno-fetal(Schwarcz et al., 2003)(Carlson, 2009). (Ver figura 1)

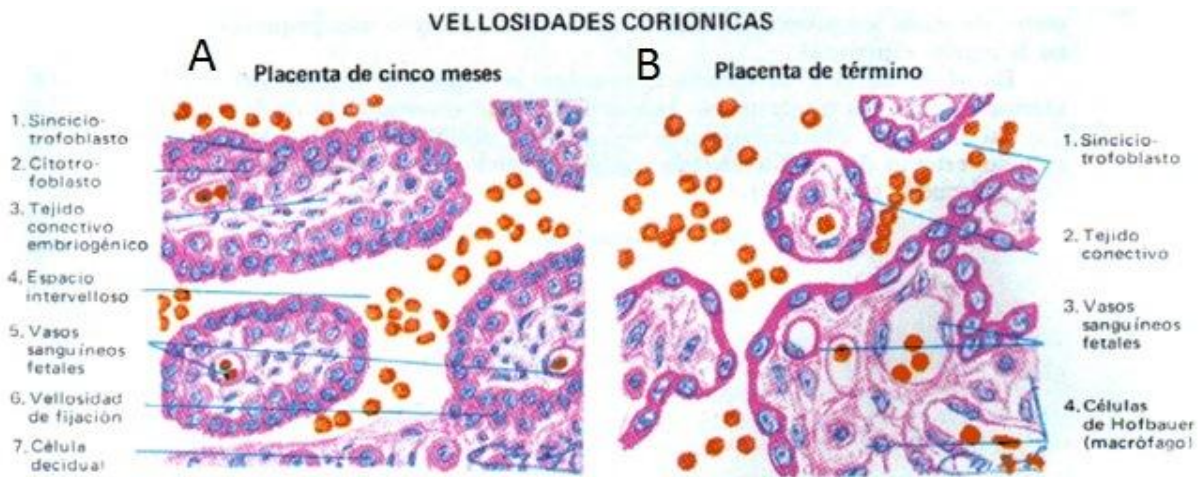
Producto del desarrollo del espacio lacunar, este se denominará “Espacio intervelloso”, que una vez ha crecido adquiere su configuración definitiva.(Schwarcz et al., 2003)

- ***Estructura placentaria de término***

La placenta madura posee forma redondeada. Su grosor bordea los 3 cm y el diámetro aproximadamente los 20 cm. Pesa alrededor de 500 gramos(Pérez Sanchez & Donoso Siña, 2012c). El cociente de peso placentario respecto al peso

fetal (índice placentario) es cercano a 0,15 en un embarazo de término normal(Schwarcz et al., 2003)

Describe dos caras; la fetal y la materna. La primera de ellas está completamente *cubierta por la placa coriónica*(Pérez Sanchez & Donoso Siña, 2012c) y *corresponde a la cavidad amniótica*(Schwarcz et al., 2003). Describe una textura brillante. Habitualmente el cordón umbilical se fija al centro de esta superficie fetal, y las ramificaciones de los vasos umbilicales o “vasos coriónicos”, rodean este sitio de inserción y se cubren de la capa del Amnios(Pérez Sanchez & Donoso Siña, 2012c). Los vasos al atravesar la placa coriónica forman los cotiledones placentarios fetales(Schwarcz et al., 2003).

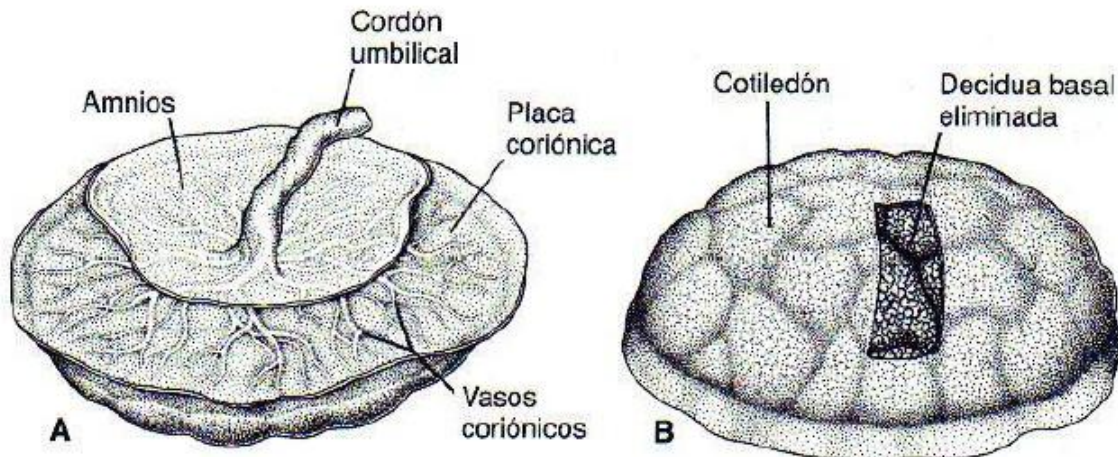


**Fig. 1A** Vellosidades coriónicas. Placenta de 5 meses. La lámina reproduce algunas vellosidades del preparado anterior observadas con mayor aumento. Se establece así que el epitelio trofoblástico está aquí constituido por una capa externa de células sinciciales (el sinciotrofoblasto, 1) y otra capa profunda de células bien delimitadas, el citotrofoblasto o capa de Langhans (2). En el corion de la vellosidad, constituido por tejido conectivo poco diferenciado (3) se hallan algunos pequeños vasos sanguíneos que contienen hematíes embrionarios, nucleados (5). Los hematíes que hay en los espacios intervellosos proceden de la sangre materna y son anucleados (4). Una de las vellosidades representadas es de fijación y se observa la zona de adherencia (6) y la existencia de células deciduales (7) en el endometrio subyacente. (M. Di Fiore, 2003)

**Fig. 1B** Vellosidades coriónicas. Placenta de término. A diferencia con las anteriores, el epitelio coriónico está representado únicamente por el sinciotrofoblasto (1) que forma un revestimiento fuertemente coloreado; el tejido conectivo está más diferenciado (2) y los vasos contienen hematíes embrionarios anucleados (3). Entre las células del tejido conectivo se diferencian algunas por su mayor volumen, su forma esferoide y el citoplasma muchas veces vacuolado; son las células de Hofbauer (4) consideradas por muchos como macrófagos. (M. Di Fiore, 2003)

En contraposición, el lado materno describe un aspecto mate, y se aprecian las subdivisiones en lóbulos (pueden ser hasta 35). Los surcos interlobulares son los ocupados por los tabiques placentarios. Cada lóbulo contiene en sí mismo una serie de cotiledones(Pérez Sanchez & Donoso Siña, 2012c). Los cotiledones constituyen la estructura básica circulatoria de la placenta(Schwarcz et al., 2003).

El espacio intervelloso, ubicado en cada lóbulo, corresponde a un compartimento prácticamente aislado de la circulación materna con respecto a la placenta(Pérez Sanchez & Donoso Siña, 2012c). Queda limitado por las placas basal y corial(Schwarcz et al., 2003). (Ver figura 2)



**Fig. 2 Placenta al término del embarazo. A. Cara fetal. La placa coriónica y el cordón umbilical están cubiertos por el amnios. B. Cara materna que muestra los cotiledones. Se ha eliminado la decidua de una determinada área.(Lagman & Sadler, 2007)**

## Histología de la placenta

### Tipos celulares involucrados

La placenta se compone de diferentes tipos celulares, uno de los principales es el Trofoblasto. Estas células trofoblásticas son las primeras que logran

diferenciarse del embrión, por lo que son sumamente importantes en el proceso de implantación en el endometrio y posterior proceso de placentación. Este órgano está compuesto por diferentes tipos celulares:

- **Citotrofoblasto (CTB):** Reciben la denominación de células de Langhans o gigante. Corresponde a la población de “Células madres”, de las que se diferencian los otros tipos de trofoblastos. Son mononucleadas y se ubican en las vellosidades coriónicas sobre la membrana basal del trofoblasto. Están recubiertas por el STB.
- **Sincitiotrofoblasto (STB):** Su función es intercambiar gases y nutrientes, además de secretar proteínas y hormonas que cooperan en la homeostasis del embarazo. Por lo tanto con este tipo celular se establece el primer intercambio de productos vía materno - fetal, y resultan indispensables para la nutrición y buen crecimiento del feto, además de un correcto funcionamiento de su metabolismo.
- **Citotrofoblasto (CTB):** Es una monocapa epitelial que reviste la superficie vellositaria coriónica. Estas células cubren toda la superficie del árbol vellositario, así como las superficies internas de la decidua basal y de la placa coriónica. Se genera por la fusión de las células de CTB y presenta un citoplasma con múltiples núcleos, sin que se observen membranas celulares que los separen.
- **Trofoblasto extravellositario (TEV):** Este grupo de células es el encargado de la invasión vascular del endometrio y miometrio. Se ubica fuera de las vellosidades coriónicas que realizan el intercambio. Se originan a partir de células del CTB de las vellosidades de anclaje. Luego de proliferar adquirirán características invasoras, por lo cual su principal función será invadir la superficie uterina y luego los vasos sanguíneos que

lo irrigan desde el miometrio, denominándose posteriormente como arterias espiraladas, las cuales tienen como función remodelar las paredes de los vasos vaso sanguíneos aumentando su lumen, para asegurar un buen riego sanguíneo desde la madre al feto. Se distinguen dos tipos de TEV; el TEV intersticial y TEV endometrial.

El trofoblasto se encuentra en permanente recambio, ya que de la proliferación continua del CTB depende el crecimiento y mantención de la superficie epitelial que cubre el árbol vellositario(G, P, U, & P, 2011)

### **Características histológicas de la placenta**

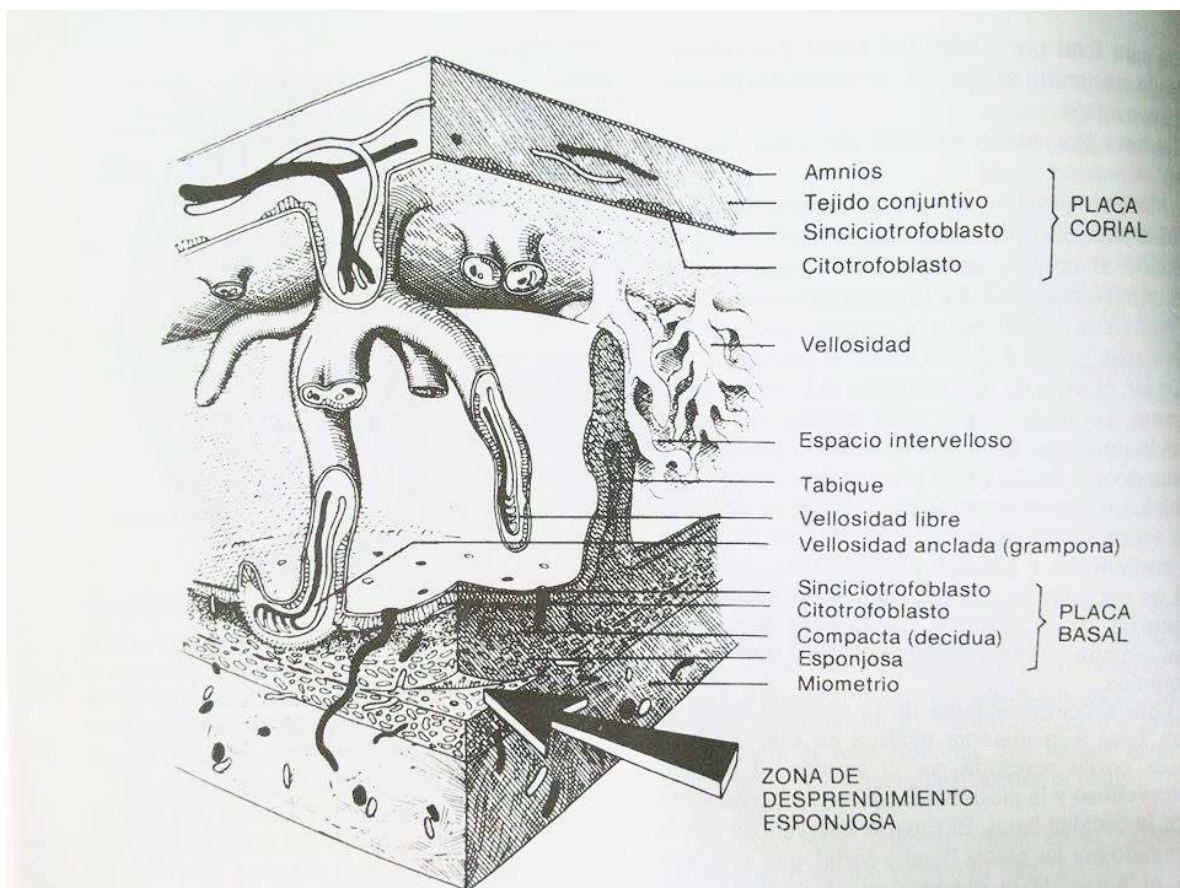
Aproximadamente a la 16<sup>o</sup> semana de gestación, la forma placentaria se ve determinada por el corion frondoso. Habitualmente es circular, asemejándose a un disco.

Un componente característico de la placenta son los “Cotiledones” o lobulillos. Se originan a partir de los Tabiques placentarios (los cuales se forman entre cuarto y quinto mes de gestación). Cada cotiledón contiene dentro de su estructura aproximadamente 2 – 4 *vellosidades con sus ramificaciones*(Geneser, 2000).

Formación tabiques placentarios: Se originan entre el cuarto a quinto mes de gestación, a partir de la decidua. Esta forma varios *tabiques cuneiformes*, los ***tabiques placentarios***, que se extienden desde la placa de la decidua hacia la *placa coriónica*, sin llegar hasta ella(Geneser, 2000). Los tabiques se encargan de dividir a la placenta en diferentes secciones denominadas “Cotiledones”, aproximadamente entre 15 a 20.

**Membrana placentaria:** La membrana placentaria es el tejido fetal que separa la sangre materna de la fetal(Geneser, 2000).

Hacia la semana veinte de desarrollo fetal, el trofoblasto se compone de Sincitiotrofoblasto y citotrofoblasto. A raíz de esto entonces, la membrana placentaria se compone de 6 capas en su totalidad: *sincitiotrofoblasto, citotrofoblasto y su membrana basal subyacente, el tejido conectivo del núcleo de la vellosidad, la membrana basal alrededor del capilar fetal y su endotelio*(Geneser, 2000).(Ver fig.3)



**Fig. 3** Esquema que muestra las relaciones de los diversos elementos de la placa corial y de la placa basal de la placenta. La flecha señala la zona de desprendimiento de la placenta desde la esponjosa del endometrio.(Schwarcz et al., 2003)

## Apoptosis y proliferación celular

El número de células existente en un tejido son controladas por dos procesos, uno es la multiplicación o proliferación celular y el segundo conocido como muerte celular fisiológica programada o apoptosis(Cambell, 2005)

### Proliferación celular

La proliferación celular es un vía involucrada en procesos fisiológicos y patológicos, en la que a través del ciclo celular se duplican sus componentes de manera exacta y equitativa, donde el resultado final es la división en dos células hijas idénticas(Alberts et al., 2011, Rang, H.P M.M Dale, J.M Ritter, 2008)

Dentro del dominio eucariota, específicamente en las células humanas es necesario que exista una célula preexistente para que pueda ocurrir el desarrollo o proliferación.(Alberts et al., 2011)

El ciclo celular es un proceso gradual y secuencial que consta de diferentes fases; M (mitosis), S (replicación DNA) y puntos de control (G1 y G2)(Cambell, 2005)Los tiempos de cada fase son variables y suelen distinguirse en el estudio de los diferentes tejidos, donde incluso podemos observar estructuras que carecen de actividad mitótica(Eynard, Valentich, & Rovasio, 2008).Este ciclo se activa mediante factores de crecimiento que a través de la síntesis de reguladores del ciclo (ciclinas y cdk), actúan sobre la célula inactiva e induce su división (Ver fig. 4)

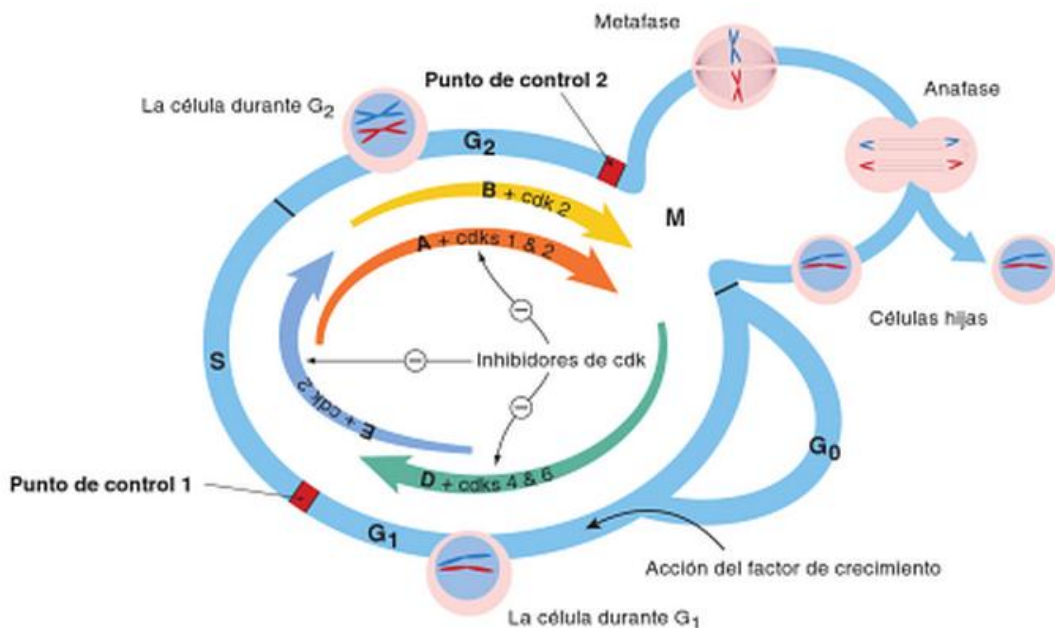


Fig. 4: Diagrama esquemático del ciclo celular en el que se han representado las funciones que desempeñan los complejos ciclinas/cdk (P. Rang, M. M. Dale, J. M. Ritter, R. J. Flower. Rang y Dale Farmacología, 2008)

### KI 67

Es una proteína nuclear no histona (Fernández & Nuñez, 2004) que está involucrada en la proliferación celular, la cual se puede detectar en el núcleo de la célula en la interfase del ciclo celular, en cambio en la fase de mitosis la mayoría de esta proteína se traslada a la superficie de la célula. Se encuentra presente en todas las fases activas del ciclo celular (G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> y mitosis), pero ausente en las células que se encuentran en reposo o fase inactiva (G<sub>0</sub>) (Scholzen & Gerdes, 2000). Al tener dicha característica, esta proteína es usada como técnica inmunohistoquímica para realizar estudios de proliferación celular presentes en la muestra. (Bolaños, Freyre, & Carlosama, 2007)

## Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso en el cual se autodestruyen células de forma ordenada ante la presencia de estímulos intra o extra celulares. Este proceso es fundamental para el desarrollo y mantenimiento de los tejidos desde la etapa embrionaria.

Esta vía es regulada de forma muy rigurosa, puesto que no debe haber un exceso o disminución de este proceso, ya que si lo hay podría llegar a generar diversas patologías.

Las células que son programadas a muerte en un principio aumentarán de volumen, luego se activan enzimas que degradan el ADN de la propia célula, sus proteínas nucleares y citoplasmáticas. La membrana plasmática de la célula apoptótica permanece intacta, pero el citoplasma, en cambio se modificará para que la célula y sus fragmentos (cariorexosis) sean dianas para que macrófagos los reconozcan y los fagociten. La célula muerta es eliminada inmediatamente antes de que sus componentes se hayan liberado, evitando la activación de reacciones inflamatorias en el huésped.

### **Vías de la apoptosis**

La apoptosis es un proceso enzimático y fisiológico secuencial, mediante el cual la célula degrada sus nucleoproteínas y luego se fragmenta, por medio de la activación de enzimas llamadas caspasas, cuya activación depende de un equilibrio ajustado entre las vías moleculares pro y antiapoptóticas.

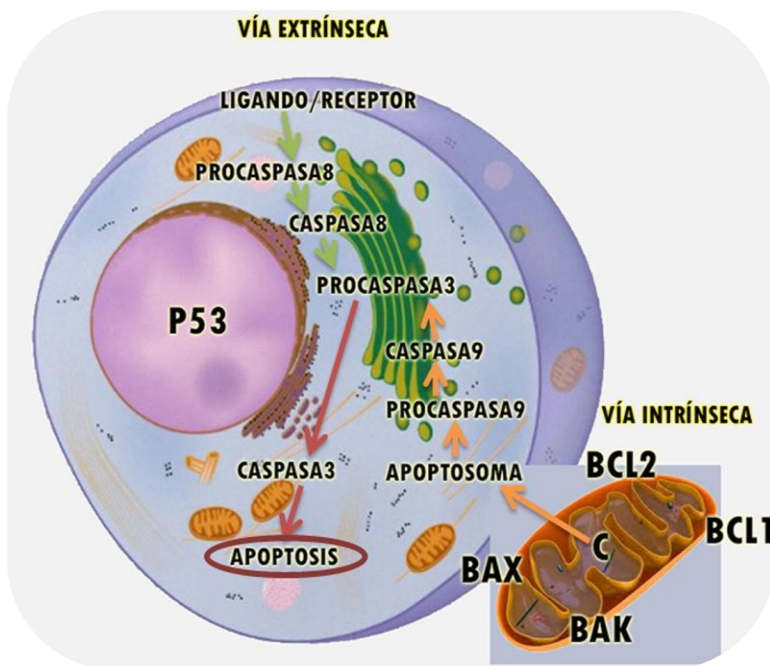
Las caspasas involucradas en la apoptosis (2, 3, 6, 7, 8, 9 y 10) actúan sobre numerosas dianas que participan de la transducción y ejecución de las señales apoptóticas, cuya finalidad es la activación de nucleasas que degradan el ADN, y el aumento de la cantidad de enzimas que destruyen nucleoproteínas y proteínas citoesqueléticas que dan estructura a la célula (Kumar, Abbas, Fausto,

&Mitchell, 2008). A su vez, se subdividen en caspasas iniciadoras del proceso de muerte celular (caspasas 2-8-9-10) y otras efectoras o ejecutoras (caspasas 3-6-7). Se sintetizan de forma inactiva (procaspasas) y al dividirse adquieren su forma funcional. Inicialmente son estimuladas las caspasas iniciadoras, las cuales luego activan las caspasas ejecutoras encargadas de la activación de enzimas relacionadas con la degradación del ADN y proteínas de estructura. (Kumar et al., 2008)(G et al., 2011)

Es así, que convergen dos vías distintas en la activación de las estas enzimas. Estas vías son conocidas como **vía mitocondrial y la vía de los receptores de muerte**. Aunque estas vías pueden interactuar, son inducidas, generalmente bajo diferentes condiciones, afectan a distintas moléculas y desempeñan diferentes funciones en la fisiología y en la fisiopatología del ser humano.(Karp, 2009)

- a) Vía mitocondrial (intrínseca):Se inicia por estrés celular (daño en DNA, falta de factores de crecimiento, entre otros)(Kumar et al., 2008). En la célula, las mitocondrias contienen proteínas capaces de inducir la apoptosis; dentro de ellas se encuentra el citocromo c y antagonistas de inhibidores citosólicos endógenos de la apoptosis. La elección entre la supervivencia y la muerte celular está determinada por la permeabilidad de la membrana mitocondrial, controlada por una familia de más de 20 proteínas, cuyo prototipo es Bcl-2(Kumar et al., 2008). Cuando las células están privadas de factores de crecimiento y de hormonas tróficas, se exponen a agentes que dañan el ADN, o se acumulan cantidades excesivas de proteínas mal plegadas. Se activa un grupo de sensores, de los cuales algunos son miembros de la familia Bcl-2, activan a su vez dos miembros proapoptóticos de la familia denominados Bax y Bak, que se dimerizan, se insertan en la membrana mitocondrial y forman poros en los que el citocromo c y otras proteínas mitocondriales se escapan hacia el citosol. Otros sensores relacionados

inhiben las moléculas pro apoptóticas Bcl-2 y Bcl-x, con el mismo resultado final, la pérdida de las proteínas mitocondriales (Kumar et al., 2008). El citocromo c, junto con algunos cofactores, activa la caspasa 9, mientras que otras proteínas bloquean los antagonistas de las caspasas que funcionan como inhibidores fisiológicos de la apoptosis. El resultado final es la activación de la cascada de caspasas que lleva la fragmentación nuclear. Si las células están expuestas a factores de crecimiento y otras señales de supervivencia, sintetizan miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2, cuyos dos miembros principales son la propia Bcl-2 y Bcl-x1. Estas proteínas antagonizan Bax y Bak y limitan de este modo el escape de las proteínas proapoptóticas mitocondriales. Las células privadas de factores de crecimiento no solo activan las proteínas proapoptóticas, sino que también muestran unas menores concentraciones de Bcl-2 y Bcl-x1, promoviendo la muerte. La vía mitocondrial parece ser la vía responsable de la mayoría de las situaciones de apoptosis (Huppertz & Herrler, 2005) (Ver figura 5).



**Fig.5** Vía intrínseca y extrínseca de la muerte celular programada

b) Vía de los receptores de la muerte (extrínseca): Muchas células expresan en su superficie moléculas denominadas receptores de muerte, las cuales desencadenan la apoptosis. La mayoría de estas son miembros de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF).

Los receptores de muerte proapoptóticos son el receptor tipo I para TNF y Fas (CD95)(Kumar et al., 2008). Fas-ligando (FasL) es una proteína de membrana expresada principalmente en los linfocitos T activados. Cuando estas células T reconocen dianas que expresan Fas, las moléculas Fas se unen con FasL, y luego se unen a proteínas adaptadoras, que a su vez se unen a la caspasa 8. El agrupamiento de muchas moléculas de caspasa lleva a su activación, comenzando de este modo la cascada de caspasas. En muchos tipos celulares la caspasa 8 puede cortar y activar un miembro proapoptótico de la familia Bcl-2 denominado Bid, el cual es parte de la vía mitocondrial. La activación combinada de ambas vías genera la apoptosis celular. FLIP es una proteína celular antagonista de caspasas, cuya función es bloquear la activación de éstas en fases posteriores de los receptores de muerte. (Ver figura 5)

### **Caspasa 3**

Existen dos grupos grandes de caspasas, las iniciadoras y las ejecutoras, dentro de este último grupo se encuentra la caspasa 3. Las caspasas iniciadoras median la activación de las caspasas ejecutoras o efectoras, estas proteasas son las encargadas de los cortes finales de sustratos que provocan la morfología típica de la apoptosis.

La caspasa 3 es uno de los mediadores cruciales dentro de la apoptosis, siendo esencial para ciertos procesos asociados con la fragmentación celular y en la formación de cuerpos apoptóticos, participando en la vía extrínseca e intrínseca.

La proteína CASP3 es parte de la familia de las proteasas cisteína-ácido aspártico. Estas caspasas están como proenzimas inactivas que se someten a procesamiento proteolítico en los residuos conservados aspártico para producir

dos subunidades, grandes y pequeñas, que dimerizan para formar la enzima activa (Polverino & Patterson, 1997).

La función de proenzima de la caspasa-3 es necesaria, ya que si no se regula la actividad de esta caspasa mataría las células indiscriminadamente. Esta proenzima 3 no tiene prácticamente ninguna actividad catalítica hasta que se activa después de la señalización de apoptosis a través de una caspasa iniciadora. Uno de los eventos de señalización es la introducción de la granzima B, que puede activar caspasas iniciadoras, en las células diana para la apoptosis por las células T asesinas. Esa activación de la vía extrínseca va a desencadenar la cascada de caspasas, en la que la caspasa-3 desempeña un papel dominante. En la activación intrínseca, el citocromo c de las mitocondrias junto con la caspasa-9, el factor de activación de la apoptosis-1, y ATP van a activar a la procaspasa-3. Estas moléculas son suficientes para activación de la caspasa-3.

### **Apoptosis placentaria**

Como se ha mencionado anteriormente, la apoptosis es un proceso esencial del desarrollo y morfogénesis embrionaria, en el cual se produce la muerte de células seleccionadas, previniendo la pérdida celular indiscriminada (Huppertz & Herrler, 2005). El nivel de apoptosis en la placenta durante la gestación fisiológica es menor durante el transcurso del primer trimestre, en comparación con el resto de la gestación y se encuentra marcadamente acelerado luego de las 40 semanas (Black et al., 2004). Las alteraciones patológicas durante la gestación están relacionados con un aumento en los niveles apoptóticos placentarios, como por ejemplo en enfermedades tales como el síndrome hipertensivo del embarazo, diabetes pre gestacional, síndrome antifosfolípido, etc. Estas complicaciones inciden sobre el desarrollo del feto, desde el punto de vista estructural y funcional.

Dentro de la vellosidad, la apoptosis se localiza predominantemente en el sincitiotrofoblasto en comparación al citotrofoblasto (Burton et al., 2003), puesto que las vías de la apoptosis pueden estar implicadas en el mantenimiento del sincitiotrofoblasto. Esto se concluye de dos observaciones, primero que la caspasa 8 está implicada en la fusión de citotrofoblasto con sincitiotrofoblasto, y segundo que algunos núcleos de sincitiotrofoblasto exhiben características morfológicas de la apoptosis con condensación de la cromatina periférica y picnosis gradual.

Como se ha mencionado anteriormente, la apoptosis es un proceso que se desencadena normalmente y que permite dar molde a las estructuras funcionales del organismo. No obstante, dependiendo del contexto biológico y de la etiología, los procesos apoptóticos pueden resultar perjudiciales para el desarrollo, es decir, la falta de regulación puede generar situaciones patológicas. Es por esto que en los últimos años se ha generado un creciente interés por investigar los procesos relacionados con la muerte celular en los distintos ámbitos de la vida humana, desde la embriogénesis hasta el envejecimiento fisiológico. Dentro de este contexto, la investigación centrada en los anexos embriológicos que permiten el desarrollo del nuevo ser va adquiriendo cada día más consistencia, puesto que, nos muestra problemáticas que inciden precozmente en el desarrollo del embrión, las cuales nos permiten tener un mapa bioquímico de relaciones a un nivel micro.

## Peso al nacer

El peso al nacer es un referente usado a nivel mundial para evaluar el estado nutricional intrauterino y el éxito de la atención prenatal. Es un indicador que permite vigilar el crecimiento y el desarrollo del recién nacido junto con ser un factor predictivo de su futura calidad de vida durante la niñez temprana.

El crecimiento fetal normal y la maduración de los sistemas son mediados por procesos hiperplásicos e hipertróficos que regulan la organización y diferenciación celular desde la fase embrional. (Leal, 2009) Este proceso depende de la carga genética del individuo, de la unidad feto-placentaria-materna y del adecuado aporte de oxígeno y nutrientes al feto.

El peso de nacimiento (PN) es importante para predecir la salud fetal y neonatal, por ser un buen predictor de riesgo de morbilidad y mortalidad. (Tapia L & Gonzalez M, 2008a)

De acuerdo al peso alcanzado por el recién nacido (RN), este se podrá clasificar de la siguiente forma:

La clasificación por peso ha establecido el grupo de extremo bajo peso al nacimiento (EBPN) para el menor de 1.000 grs y de muy bajo peso de nacimiento (MBPN) para el menor de 1.500 grs. El concepto de bajo peso de nacimiento (BPN), peso menor de 2.500 grs es un marcador de riesgo de población a nivel internacional. Por otro lado, se considera macrosómico al recién nacido con peso mayor o igual a 4.000 grs al nacer.

En general, las tasas de BPN y MBPN sobre el 15% y el 2% respectivamente, indican una población expuesta a un alto riesgo de morbilidad y mortalidad fetal y de lactante, y efectos a largo plazo en el crecimiento y rendimiento infantil. En Chile, alrededor del 6% de los niños al nacer son BPN, con el 1% de MBPN y el 0.4 % de EBPN. (2008)(Tapia L & Gonzalez M, 2008a)

La necesidad de asociar el peso a la edad gestacional (EG), dio origen a la realización de curvas de crecimiento intrauterino, las cuales son elaboradas según la edad de duración de la gestación, siendo confirmadas posteriormente con una ecografía precoz y la antropometría del RN. Los datos utilizados para la confección de las curvas corresponderán a pesos de niños nacidos de madres sin patología obstétrica o malformaciones. No todas las curvas fueron hechas de la misma forma, en la mayoría fue sin distinción de patologías maternas.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció los criterios para que una curva de crecimiento sea considerada como apropiada. Estos criterios son; que sean realizadas en base a grandes poblaciones, que tengan al menos 200 niños en cada tramo de edad gestacional, que incluyan más de una variable antropométrica y cuenten con procedimientos muestrales definidos y reales.

Estas curvas, si son tomadas de la población general, describen distribución poblacional, pero no necesariamente un patrón de normalidad. Esta situación se hace especialmente evidente en prematuros menores de 33 semanas, dado que estos nacimientos están fuertemente influenciados por patologías maternas y/o placentarias que determinan disminución del peso de nacimiento, y siendo también causa de parto

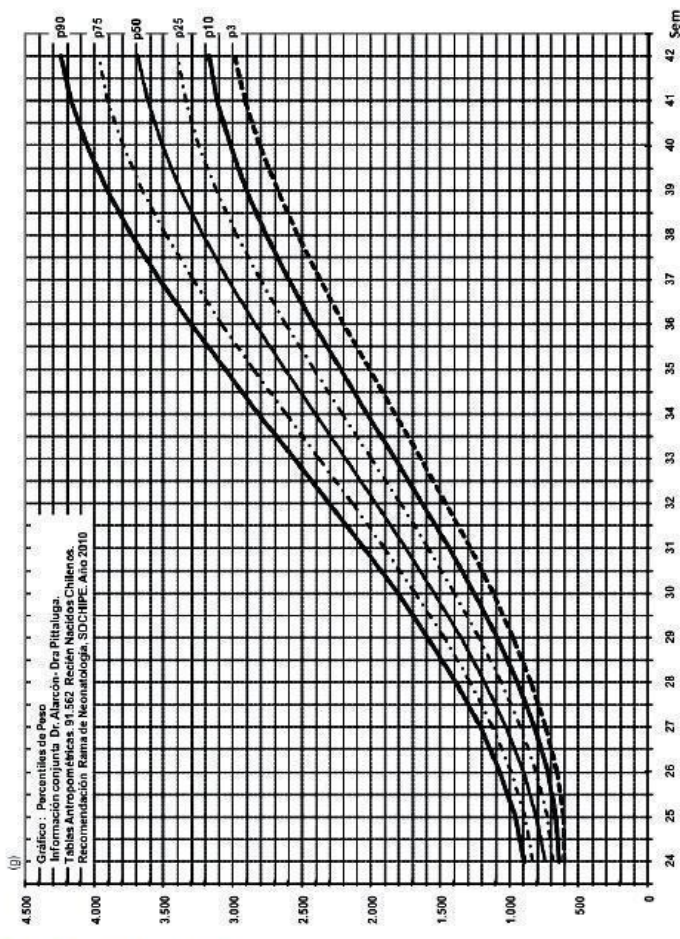


Fig. 6 Curva de percentiles de peso según EG Curva propuesta por Milad (2010)

prematureo en ocasiones.(Milad A. Marcela, Novoa P. José, Fabres B. Jorge, & Aspillaga M. Carlos, 2010)

Es importante utilizar curvas actualizadas, ya que los patrones tanto de cuidados de la madre como de alimentación se van modificando a través del tiempo, por lo que cambia también el potencial de crecimiento del niño. Actualmente, la recomendación de la rama de Neonatología de la Sociedad Chilena de Pediatría (SOCHIPE) es utilizar las curvas de crecimiento de población seleccionada que permitan pesquisar recién nacidos con crecimiento intrauterino insuficiente, ya que estos son los que presentan mayor riesgo en salud.

En nuestro país, las curvas de estimación de peso consideran las características tanto maternas (talla, paridad) como fetales (sexo fetal), ofreciendo una mejor detección de los fetos con restricción de crecimiento. Debido a que se asocia a curvas representativas de la población chilena, actualizadas y con una mejor sensibilidad y especificidad en la detección de la población de riesgo, se utilizará la curva propuesta por Milad, generada por los datos integrados de Alarcón y Pittaluga (2010) (Fig.6), que demuestra resultados superiores que la curva poblacional agregando, además, información perteneciente a la misma Dr. Milad, correspondiente a más recién nacidos entre 22 y 28 semanas.(Sepúlveda M & Valdés R, 2013)

La curva de crecimiento para EG define como RN de crecimiento adecuado para la EG (AEG) aquellos con peso entre el percentil 10 y 90, como pequeños para la EG (PEG) los con peso menor al percentil 10 y como grande para la EG (GEG) los con peso mayor al percentil 90.

La clasificación de PEG y GEG tiene repercusiones en el diagnóstico, pronóstico, vigilancia y tratamiento de los RN, ya que se caracteriza al recién nacido en una situación de riesgo.

## Recién nacido prematuro

Se define como prematuro a aquel recién nacido (RN) que nace antes de completar las 37 semanas de gestación. Cabe mencionar que un embarazo normalmente dura 40 semanas y que el límite entre parto prematuro y aborto es a las 22 semanas de gestación, 500 gramos de peso o 25 cm. de longitud céfalo-nalgas, todo esto según la OMS. (MINSAL, 2010).

El gran riesgo que trae consigo un recién nacido prematuro, radica en la dificultad que tiene para adaptarse a la vida extrauterina. El hecho de que nazcan antes de lo que corresponde, no permite su completo desarrollo intrauterino, por lo que suelen tener problemas asociados a la termorregulación, oxigenación, alimentación, infecciones, entre otros factores.(OMS, 2013)

La severidad de la morbilidad causada por la prematurez va a depender de diversos factores, tales como la EG al nacer, la etiología del parto prematuro, el peso al nacer y la presencia de malformaciones fetales, considerando también el factor externo atribuible a las características y estado de la unidad que atiende al RN, por lo que ésta morbilidad será distinta para cada prematuro, siendo aquellos que superen las 34 semanas (la gran mayoría) los que posean una morbilidad neonatal leve. La mayor morbimortalidad y tasa de secuelas se da en recién nacidos menores de 32 semanas de EG, considerados de alto riesgo, los cuales tienen posibilidad de manejo clínico desde las 23-24 semanas de gestación.(Pérez Sanchez & Donoso Siña, 2012d)

## Diagnóstico precoz de la amenaza de parto prematuro

Está basado en tres ejes principales: la edad gestacional, las características de las contracciones y las del cuello uterino. Si estos signos no resultan certeros, pueden complementarse con otros factores de riesgo mencionados más adelante.

En la actualidad, el parto prematuro es considerado como un síndrome, es decir, como un conjunto de signos y síntomas que desencadenan dilatación

cervical y contracciones uterinas antes de alcanzadas las 37 semanas de gestación. Se puede clasificar el parto prematuro en:

- Parto prematuro idiopático (presenta inicio espontáneo de contracciones uterinas con membranas íntegras).
- Parto prematuro asociado a rotura prematura de membranas ovulares (se inicia el trabajo de parto luego de la rotura de membranas antes de las 37 semanas de gestación).
- Parto iatrogénico (producto de la intervención médica prematura del embarazo por causa materna y/o fetal) (Goldenberg, Culhane, Iams, & Romero, 2009)(MINSAL, 2010)

Las muestras placentarias que se utilizarán para este estudio corresponden a las del primer grupo, pues se establece como criterio de exclusión cualquier patología tanto materna como fetal. (Sin considerar la condición patológica del parto prematuro en sí)

Existen diferentes causas posibles para la predisposición a parto prematuro idiopático, entre los que se encuentran factores de riesgo previos a la gestación o de la gestación actual.(Pérez Sanchez & Donoso Siña, 2012d)

Dentro de los diversos factores que se ha demostrado tienen asociación con la aparición de este síndrome los más destacados son:

- La infección intraamniótica: Responsable de 25 a 40% de los partos pretérminos a nivel global.(Petit & Abergel, 2012)
- Isquemia útero-placentaria: Hace referencia a la disminución del flujo sanguíneo del útero hacia la placenta.
- Disfunción cervical: Conocida también como incompetencia cervical, se relaciona con la incapacidad del cuello uterino para mantenerse rígido y cerrado.(Pérez Sanchez & Donoso Siña, 2012d)
- Acortamiento del período de quiescencia miometrial.(Pérez Sanchez & Donoso Siña, 2012d)

Otros factores de riesgo no menos importantes son: Partos pretérmino anteriores, tabaquismo materno, gestaciones múltiples, complicaciones maternas y fetales (mayoritariamente desnutrición intrauterina, sobre distensión uterina, entre otros), factores inmunológicos, hormonales y alergia.(Rellán Rodríguez. S, García de Rivera. C, & Aragón García. M. Paz, 2008)

## Inmunohistoquímica

Inmunohistoquímica es toda técnica que permite detectar in situ componentes celulares y extracelulares (antígenos) por medio de anticuerpos específicos (de ahí “inmuno”), empleando para ello sistemas de detección enzimáticos (histoquímica).(Martin & García, 2012)

En inmunohistoquímica se denomina antígeno a la sustancia que queremos detectar en una sección tisular o frotis celular. Se denomina antígeno porque actúa como sustancia extraña cuando es inyectado a un animal de experimentación, el cual desarrollará una reacción inmune, produciendo anticuerpos específicos.(Martin & García, 2012)

Un *epítopo o determinante antigénico* es la parte del antígeno que induce la respuesta inmune, y que es, por tanto reconocida por el anticuerpo.(Martin & García, 2012)

Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) son glicoproteínas en forma de “Y” sintetizadas por las células plasmáticas. Tras estimulación antigénica los linfocitos B se diferencian dando origen a células plasmáticas formadoras de anticuerpos.(Martin & García, 2012)

Los anticuerpos empleados en inmunohistoquímica son generalmente de la clase IgG y más raramente IgM. Las moléculas Ig pueden actuar por si mismas como antígenos mediante fragmento cristizable. Proporcionan de esta forma, determinantes antigénicos a los que pueden unirse anticuerpos secundarios, que permitirán la formación de cadenas de detección.(Martin & García, 2012)

La unión entre el parátopo de un anticuerpo y el epítopo de un antígeno se realiza por medio de enlaces covalentes, por lo que la unión es reversible, pudiendo disociarse durante los lavados.(Martin & García, 2012)

Mencionado esto, es importante describir los pasos mediante los cuales se lleva a cabo la técnica de inmunohistoquímica.

La técnica histológica comprende la preparación de los tejidos para su estudio microscópico, lo cual se logra sometiendo a la totalidad o una parte seleccionada del tejido por examinar, a una serie de procesos, los cuales serán descritos a continuación:

### **Muestras histológicas:**

Para la preparación de las muestras histológicas existen diversos tipos de estudios que se nombran a continuación:

- Congelación
- Corte mediante micrótomo
- Inclusión en parafina

De estos estudios el utilizado en este caso será la inclusión en parafina, la cual se describirá más adelante.

#### **1. Fijación**

Es el primer paso para tratar la muestra , es el proceso mediante el cual los elementos constitutivos de las células, y por tanto de los tejidos, son fijados en cuanto a su estado físico, y parcialmente también en su estado químico , de manera que puedan resistir el tratamiento sucesivo con varios reactivos sin pérdida, distorsión importante o descomposición (36).

La fijación realizada es para microscopía electrónica ya que posteriormente se deben analizar los resultados de la técnica inmunohistoquímica.

## **2. Deshidratación**

La deshidratación consiste en el reemplazo del agua tanto intra como extracelular, por parafina, llevándose a cabo con alcoholes en distinta concentración.

## **3. Aclaramiento**

Es el proceso que permite que el alcohol de los tejidos se reemplace por un líquido que disuelva la parafina, en este caso se utiliza Xilol, se llama aclarar ya que en muchos casos hace que el tejido se vuelva transparente.

## **4. Inclusión**

Consiste en la impregnación de tejidos con un medio que llene todas las cavidades naturales e intersticios tisulares, que en este caso será utilizada la inclusión en parafina la que tiene por objetivo transformar el material biológico semilíquido en otro sólido. Además la inclusión debe proporcionar una consistencia que brinde firmeza para que se realicen cortes del tejido, que siendo los suficientemente delgados no provoquen distorsión ni alteración de los elementos celulares o relaciones espaciales.

## **5. Sección**

Una vez obtenido los bloques de parafina, se cortan a 4 micras y las secciones en conjunto con el tejido se recogen en portaobjetos tratados. Las secciones

delgadas o “cortes” se obtienen utilizando instrumentos mecánicos diseñados para que en forma más o menos automática, seccionen el bloque de parafina en cortes delgados y de grosor uniforme. Los instrumentos de corte se denominan micrótomos. (34)

Una vez terminado los procesos para preparación de la muestra se da pie para el inicio de la técnica inmunohistoquímica.

Lo primero que se debe hacer es dejar las placas que contienen el tejido por una hora en una estufa, para que al momento de la desparafinación el tejido quede aferrado a la placa y no se desprenda. Una vez realizado esto, se comienza con la desparafinación en Xilol, la cual tiene por objetivo eliminar el medio de inclusión que en este caso es parafina.

Posteriormente se realiza una hidratación del tejido con etanol en concentraciones decrecientes desde alcohol al 100% hasta alcohol 70%.

Una vez terminado esto se dejan las muestras en agua destilada para luego someterlas a buffer citrato durante dentro de la vaporera y luego enfriando las muestras, todo esto para llegar a la incubación del anticuerpo primario y luego secundario para poder llevar a cabo la técnica inmunohistoquímica.

## Objetivos de investigación

### Objetivo General:

Determinar la relación existente entre el peso de nacimiento y el nivel de proliferación y apoptosis celular de placentas de recién nacidos de pretérmino PT-PEG y PT-AEG, que han sido obtenidas de gestantes fisiológicas atendidas en el Hospital Clínico San Borja Arriarán de la Región Metropolitana, Santiago de Chile, desde 2006 al 2014.

### Objetivos Específicos:

1. Determinar el nivel de proliferación celular de las placentas de recién nacidos de pre-término pequeños (RNPT PEG) y adecuados para la edad gestacional (RNPT AEG) mediante la observación de fotografías obtenidas a través de la técnica inmunohistoquímica.

2. Determinar el nivel de apoptosis de placentas de RN de pre-término pequeños (RNPT PEG) y adecuados para la edad gestacional (RNPT AEG) mediante la observación de fotografías obtenidas a través de la técnica inmunohistoquímica

3. Analizar morfológicamente el nivel de proliferación celular de recién nacidos pre-término pequeños (RNPT PEG) y adecuados para la edad gestacional (RNPT AEG) en placentas, obtenidas mediante técnica inmunohistoquímica

4. Analizar morfológicamente el nivel de apoptosis celular de recién nacidos pre-término pequeños (RNPT PEG) y adecuados para la edad gestacional (RNPT AEG) en placentas, obtenidas mediante técnica inmunohistoquímica.

### **Hipótesis a desarrollar**

Se propone que el peso al nacer es inversamente proporcional al nivel de apoptosis de la placenta, es decir, a mayor peso del recién nacido, hay menor apoptosis placentaria. Por otro lado, cuando se mantiene en equilibrio el proceso de apoptosis en la placenta, respondiendo a causas propias de su desarrollo, el peso de los recién nacidos debería ser adecuado para su edad gestacional.

Además se plantea, que al ser la isquemia placentaria una causa de parto pretérmino, esta influye directamente en el balance entre los niveles de apoptosis y de proliferación celular, viéndose éste último superado por la muerte celular placentaria.

### **Metodología:**

Se obtuvieron muestras de placentas de mujeres con gestaciones fisiológicas, del Hospital Clínico San Borja Arriarán en Santiago de Chile entre los años 2006 Y 2014. Se eligieron placentas de gestaciones de pre término con recién nacidos clasificados como RNPT - PEG y RNPT - AEG de acuerdo a tablas de crecimiento estandarizadas y utilizadas actualmente en la clínica. Las muestras de placenta serán sometidas a técnicas inmunohistoquímicas para de marcador de apoptosis (Caspasa 3 activa) así como marcador de proliferación celular (Ki67) con el fin de comparar el peso de los recién nacidos con los niveles de apoptosis y de proliferación celular de las muestras de placenta.

**Universo:** Placentas obtenidas de gestaciones cursadas por mujeres atendidas en el Hospital Clínico San Borja Arriarán, RM, Santiago de Chile, desde 2006 al 2014.(González Vargas, 2014)

**Muestra:** Placentas obtenidas de gestaciones fisiológicas cursadas por mujeres atendidas en el Hospital Clínico San Borja Arriarán, RM, Santiago de Chile, desde 2006 al 2014

## Mecanismos de determinación de universo y muestra

### **Criterios de inclusión y exclusión:**

- **Inclusión:** Los recién nacidos fueron evaluados por profesionales médicos al momento del parto, los cuales midieron sus parámetros antropométricos, categorizándolos de acuerdo a su peso y edad gestacional según las tablas de crecimiento de Milad y colaboradores. (Milad A. Marcela et al., 2010)

Para los recién nacidos de pre – término (PT), se incluyeron gestaciones entre las 32 y 36 semanas. Si el recién nacido se encontraba bajo el percentil 10 de peso para su edad gestacional(Milad A. Marcela et al., 2010)se le consideró PT – PEG y si se encontraba entre los percentiles 10 y 90 de peso se le consideró PT- AEG. En este estudio no se incorporaron recién nacidos de pre – término grandes para su edad gestacional (PT-GEG), debido a que el número de muestras obtenidas no fue necesario para la realización de una adecuada estadística

### **Exclusión:**

- Embarazos múltiples

- Consumo de drogas por parte de la madre (marihuana, cocaína, alcohol, etc.)
- Patologías de la madre (diabetes, hipertensión)
- Alteraciones genéticas evidentes o malformaciones en el recién nacido
- Presencia de meconio en la placenta (González Vargas, 2014)

Una vez obtenidas, las placentas fueron pesadas. Posteriormente se obtuvieron secciones de tejido cercanas al punto de inserción del cordón umbilical, de aproximadamente un centímetro cuadrado (1 cm<sup>2</sup>), lo que abarcó desde la placa coriónica hasta la placa basal de cada placenta.

#### Fuentes de información:

- Unidad de estudio o análisis: Cada placenta obtenida de gestaciones fisiológicas.
- Unidad referencial: Ficha perinatal de cada gestante.
- Unidad informante: Hospital Clínico San Borja Arriarán.

### Selección y recolección de muestras

Para la investigación se seleccionaron 156 placentas obtenidas del Servicio de Maternidad del Hospital Clínico San Borja Arriarán, las cuales fueron clasificadas en los distintos grupos de estudios según las curvas de crecimiento de la Doctora Marcela Milad. (Milad A. Marcela et al., 2010) **(Ver Tabla 1)** El número de placentas utilizadas por cada grupo de estudio se detalla a continuación.

Grupo de estudio	Cantidad de Placentas
Pre-término Pequeño para su edad gestacional (PT-PEG)	36
Pre-término Adecuado para su edad gestacional (PT-AEG)	34

Tabla 1 (González Vargas, 2014)

Las placentas fueron recolectadas entre los años 2006 – 2014. Cada madre firmó un consentimiento informado para participar en este estudio **(Ver Anexo 1)** El protocolo fue aprobado por los Comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y por el del Comité Ético-Científico del Servicio de Salud Metropolitano Central.

### **Recolección de datos**

La recolección de datos se hizo mediante el fotografiado de las muestras de placenta. Los cortes ubicados en un portaobjetos, son vistos al microscopio en un aumento de 100X y fotografiados en el computador mediante el programa “Dp Controller”. Las imágenes obtenidas son sometidas a análisis, donde tras ser observado el nivel de marcación de las células con caspasa 3 activa o Ki – 67 permite la caracterización morfológica de las mismas.

### **Fijación y corte de muestra.**

Las muestras de tejido fueron fijadas en formalina tamponada al 20% por un periodo de 48 a 72 horas. Posterior a ello, los tejidos fueron lavados con agua, siendo deshidratados en una batería de alcoholes ascendentes, aclarados en xilol e incluidos en parafina. **(Ver Anexo 2)**

Los bloques obtenidos a partir de estas muestras fueron analizados en el Laboratorio de ciencias Morfológicas del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso, en donde se realizaron cortes de 5 micras en un micrótopo (Leitz) tomando los planos transversales de las muestras. Los cortes fueron adheridos a portaobjetos pre-tratados con xilano al 3% (3-aminopropyltriethoxysilane) y secados en estufa a 60°C por una hora.

## Grupos de estudio

- Placentas de recién nacidos prematuros PEG (PT-PEG)
- Placentas de recién nacidos prematuros AEG (PT-AEG)

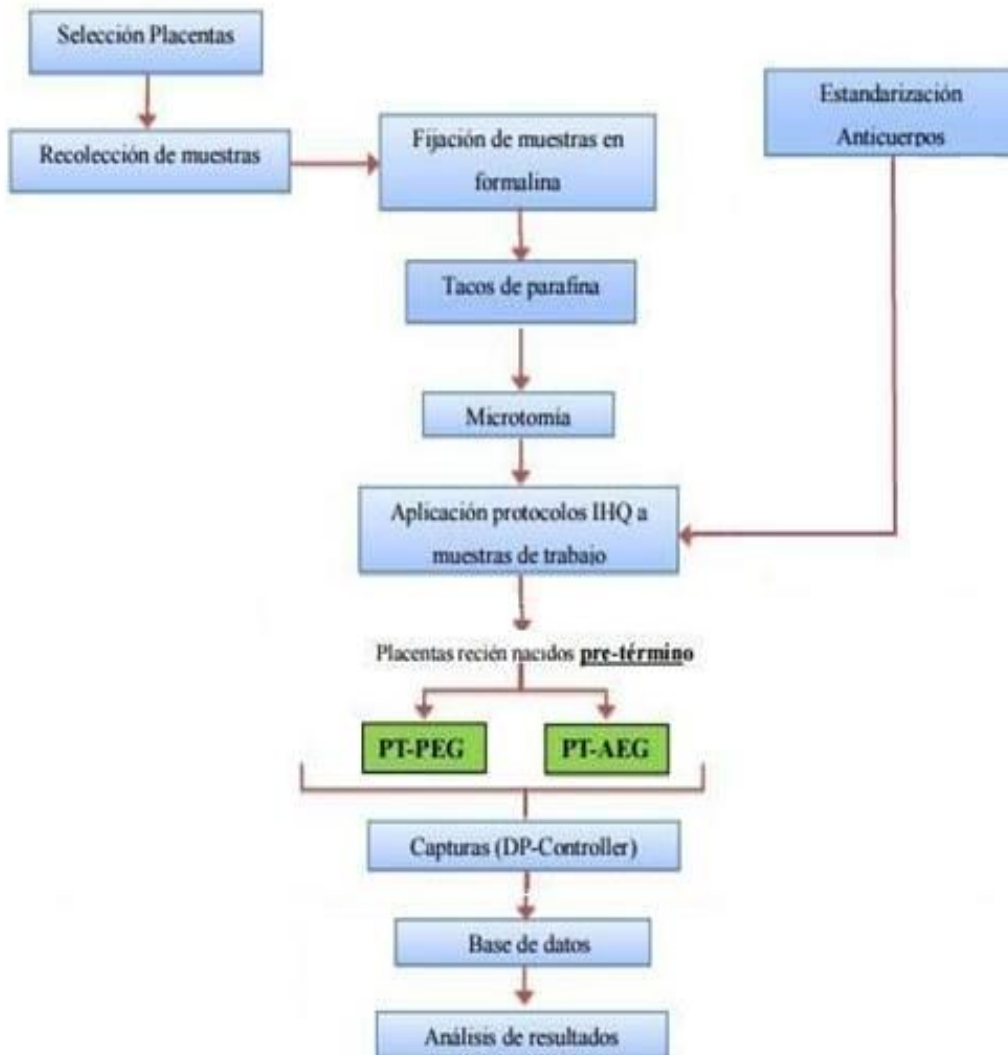


Fig. 7 (González Vargas, 2014)

## Estandarización de anticuerpos

Para efectos de este estudio, los procesos de estandarización de anticuerpos se realizaron mediante protocolos de Inmunohistoquímica (IHQ).

La Inmunohistoquímica es un inmunoensayo de tipo histológico basado en la detección de un antígeno de interés presente en algún tejido en particular, mediante una reacción antígeno anticuerpo.

El protocolo comenzó con la desparafinación de las muestras placentarias. Los portaobjetos con tejidos se sumergieron en Xilol I, II, III, de forma correlativa, 10 minutos en cada uno. Luego las muestras se rehidrataron con una batería de alcoholes en orden decreciente, comenzando con Alcohol 100% I hasta llegar a agua destilada, 10 minutos con cada agente (Ver Anexo 3).

Posteriormente, se evaluaron las muestras bajo recuperación antigénica. En este protocolo con recuperación, se precalentó una vaporera y un coplin con buffer citrato a pH 6.0 hasta los 95°C (Ver preparación Anexo 4). Alcanzada la temperatura, se dejaron las muestras por 15 minutos en coplin al interior de la vaporera.

Luego se realizaron 3 lavados con buffer fosfato salino (PBS) 0,1M pH 7.2-7.4 (Ver preparación Anexo 4). Luego se inhibió la peroxidasa endógena, con solución de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) al 3% v/v durante 30 minutos. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS para retirar el exceso de peróxido de hidrógeno.

Para bloquear los sitios inespecíficos existentes en la muestras se utilizó una solución CasBlock® durante 30 minutos (para bloquear sitios inespecíficos del anticuerpo primario) y luego suero normal de cabra por 30 minutos (para bloquear sitios inespecíficos del anticuerpo secundario), ambas incubaciones a temperatura ambiente en cámara húmeda.

Se agregó anticuerpo primario Anti –Active Caspase 3 antibody **1:500** en PBS. Se incubó toda la noche a 4° C.

Al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS para quitar el exceso de anticuerpo primario y se procedió a incubar con anticuerpo secundario Anti-IgG de conejo, hecho en cabra, conjugado con HRP, **diluido 1:500** en PBS, incubándose por 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente.

Para eliminar el exceso de anticuerpo secundario se realizaron 3 lavados con PBS por 5 minutos cada uno.

Para el revelado cromogénico se utilizó el Kit NovaRed Vector ®, durante 1 minuto 30 segundos (Tabla 2). El tiempo se estimó visualmente en donde las muestras se tornaron de un color rosado pálido, siendo éste el tiempo estándar para los siguientes procedimientos de revelado. La reacción de revelación cromogénica se detuvo depositando las muestras en agua destilada por 5 minutos

Agua destilada	1	2	3	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
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

Tabla 2(González Vargas, 2014)

Posterior al revelado, se realizó la tinción de contraste hematoxilina de Harris (tinción que permite diferenciar estructuras) durante 3 segundos aproximadamente (Ver preparación Anexo 5). Para eliminar el exceso de hematoxilina se dejaron las

muestras en agua corriente durante 10 minutos. Luego, se deshidrataron con una batería de etanoles y Xiloles, desde etanol 95% hasta Xilol II (sumergimiento rápido en los etanoles y 5 minutos en Xilol I y II). Finalmente se montaron las muestras con cubreobjetos y se visualizaron en microscopio óptico Olympus® modelo CX21.

### **Protocolo de inmunohistoquímica caspasa 3 activa:**

Los protocolos fueron aplicados en diferentes lotes, de acuerdo a las siguientes fechas:

- 16 de Diciembre de 2014
- 17 de Diciembre de 2014
- 22 de Diciembre de 2014
- 23 de Diciembre de 2014
- 06 de Enero de 2015
- 07 de Enero de 2015
- 12 de Enero de 2015
- 13 de Enero de 2015
- 14 de Enero de 2015
- 15 de Enero de 2015
- 09 de Abril de 2015
- 10 de Abril de 2015
- 13 de Abril de 2015
- 14 de Abril de 2015
- 04 de Junio de 2015
- 05 de Junio de 2015
- 09 de Junio de 2015
- 10 de Junio de 2015
- 11 de Junio de 2015
- 12 de Junio de 2015
- 14 de Junio de 2015
- 15 de Junio de 2015
- 13 de Julio de 2015
- 14 de Julio de 2015
- 20 de Julio de 2015
- 21 de Julio de 2015
- 03 de Agosto de 2015
- 04 de Agosto de 2015
- 24 de Agosto de 2015
- 25 de Agosto de 2015
- 31 de Agosto de 2015
- 01 de Septiembre de 2015
- 02 de Septiembre de 2015
- 07 de Septiembre de 2015
- 08 de Septiembre de 2015

En cada lote, se procesaron diferentes números de placentas debido a la disponibilidad de material de laboratorio.

Día 1:

Los tejidos fueron desparafinados, para eso debieron ser introducidos en un coplin y sumergidos en Xilol I, II, III, de forma correlativa, 10 minutos en cada uno. Luego las muestras se rehidrataron con una batería de alcoholes en orden decreciente, comenzando con Alcohol 100% I hasta llegar a agua destilada, 10 minutos con cada agente.

Posteriormente, se precalentó en vaporera un coplin con buffer citrato hasta los 95°C, en donde se evaluó para todas las muestras el protocolo con recuperación antigénica. Alcanzada la temperatura, se depositaron las muestras por 15 minutos. Luego se dejan enfriar durante 15 minutos, manteniéndolas en el buffer. Finalmente se lavan en agua destilada por 10 minutos.

Se realizaron 3 lavados con buffer fosfato salino (PBS) 0,1M pH 7.2-7.4, cada uno de 5 minutos. Luego se inhibió la peroxidasa endógena, para lo cual se usó una solución de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3% en PBS durante 30 minutos, utilizando el agitador orbital a temperatura ambiente.

Posterior a ello se realizaron nuevamente 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno, para retirar el exceso de peróxido de hidrógeno.

Se bloquearon los sitios inespecíficos existentes en la muestras, tanto para anticuerpo primario como secundario, utilizando Cas-Block® durante 30 minutos y suero normal de cabra también por 30 minutos, ambos a temperatura ambiente en cámara húmeda.

Posteriormente se procedió a agregar el anticuerpo primario, Anti –Active Caspase 3 antibody **1:500** en PBS/Tween 20. Se incubó toda la noche a 4° C.

Día 2:

Se realizaron 3 lavados con PBS, cada uno de 5 minutos, para quitar el exceso de anticuerpo primario.

Luego se incubó con el anticuerpo secundario Anti-IgG de conejo, hecho en cabra, conjugado con HRP, **diluido 1:500** en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras se lavaron con PBS (3 lavados de 5 minutos cada uno).

Se realizó el revelado cromogénico con el Kit NovaRed Vector ® de cada una de las muestras, durante 1 minuto 30 segundos. Luego las muestras se dejaron en agua destilada durante 5 minutos en un coplin.

Se llevó a cabo la tinción de contraste con hematoxilina de Harris durante 3 segundos, para luego ser dejadas en agua corriente durante 10 minutos.

Posteriormente las muestras fueron deshidratadas en una batería de etanoles y Xiloles, desde etanol 95% hasta Xilol II (sumergimiento rápido en los etanoles y 10 minutos en Xilol I y II).

Finalmente se montaron las muestras con cubre objeto y se visualizaron en microscopio óptico Olympus® modelo CX21.

## Protocolo de inmunohistoquímica KI 67

Los protocolos fueron aplicados en diferentes lotes, de acuerdo a las siguientes fechas:

- 06 de Octubre
- 07 de Octubre
- 08 de Octubre
- 09 de Octubre
- 05 de Noviembre
- 06 de Noviembre
- 17 de Noviembre
- 18 de Noviembre
- 19 de Noviembre
- 20 de Noviembre
- 24 de Noviembre
- 25 de Noviembre
- 26 de Noviembre
- 27 de Noviembre
- 30 de Noviembre
- 01 de Diciembre
- 02 de Diciembre

En cada lote, se procesaron diferentes números de placentas debido a la disponibilidad de material de laboratorio.

### Día 1

- 1 hora en estufa
- Desparafinación xilol I , II, III (10 MIN C /U )
- Rehidratación alcohol 100% I, II (10 min C/U) alcohol 95% (10 min c/u)  
alcohol al 70% (10 min c/u)
- Lavado en agua destilada (10 min)
- Recuperación antigénica en buffer citrato a 95° C durante 15 min ( dejar calentando el buffer previamente durante 20 min )
- Dejar enfriar manteniendo placas en buffer 15 min
- Lavado en agua destilada 10 min
- 3 Cambios en PBS 5 c/u

- Bloqueo en peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) al 3% en PBS , utilizar agitador orbital a T° ambiente durante 30 min
- 3 Cambios en PBS 5 min c/u
- Bloqueo de sitios inespecíficos: \*aplicar cas block durante 30 min a T° ambiente/ \* Incubación con suero normal de cabra durante 30 min a T° ambiente
- Incubación de anticuerpo primario anti- KI67 diluido 1:50 en PBS /TWEEN 20 durante la noche a 4° C

### Día 2

- 3 Lavados en PBS 5 min c/u
- Incubación del anticuerpo secundario anti- IgG de conejo hecho en cabra conjugado con HRP (Jackson code: 111-035003 lote 120745) diluido 1:500 en PBS durante 1 h a T° ambiente
- 3 lavados en PBS 5 min c/u
- Revelado cromogénico con nova red kit durante 5 min de acuerdo a la proporción de sus componentes detallados en tabla 2.

Agua destilada	1	2	3	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
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

Tabla 2(González Vargas, 2014)

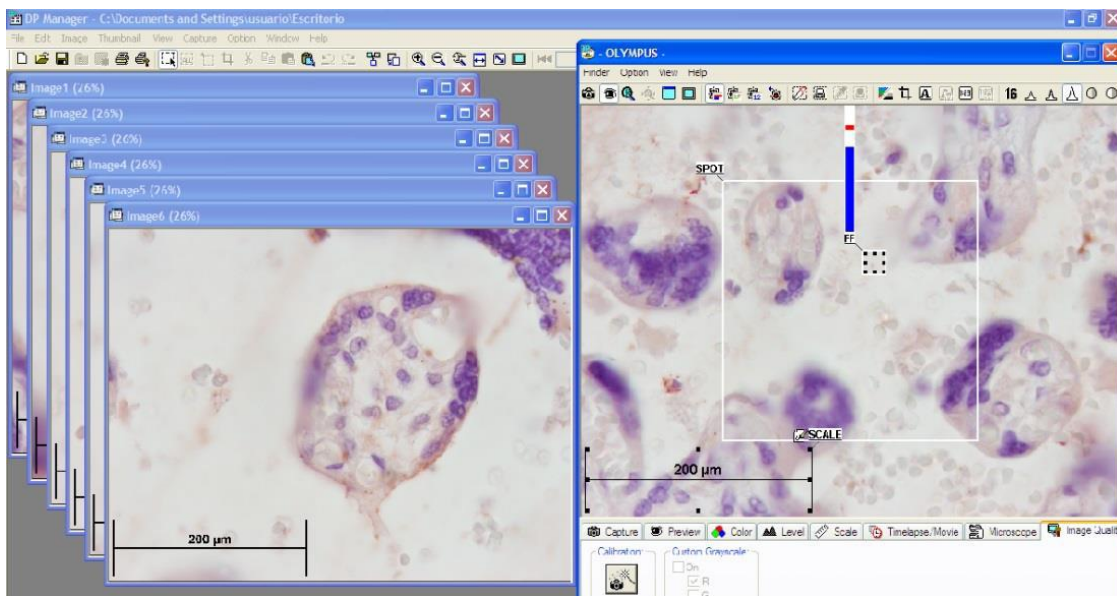
- Lavar en agua destilada 5 min

- Teñir brevemente con hematoxilina (tiempo depende de uso de hematoxilina)
- Virar hematoxilina en agua corriente durante 10 min
- Desparafinación: Alcohol al 95% Dipping/ Alcohol al 100% I – II Dipping/ Alcohol/xilol Dipping
- Aclaramiento: Xilol I (5 min)/ Xilol II (5 min)
- Cubrir con medio de montaje hidrófobo

## Capturas fotográficas Caspasa 3 activa y KI 67

Con los protocolos de inmunohistoquímica aplicados a todas las muestras, se procedió a realizar las capturas fotográficas con una cámara Olympus modelo DP71® (marca registrada) adosada a un microscopio óptico. El programa computacional DP Controller® (Figura 8), permitió realizar las capturas fotográficas de las placentas de cada grupo de estudio con aumento 100X, previo ajuste de objetivos, contraste, nitidez, designación de escala de medida y resolución de imágenes.

Se tomaron 10 capturas por cada placenta, en donde todas provenían de las vellosidades coriónicas de difusión.



**Figura 8: Interfaz programa computacional DP Controller.(González Vargas, 2014)**

## Variables:

### Objetivo específico 1:

Determinar el nivel de proliferación celular de las placentas de recién nacidos de pre-término pequeños y adecuados para la edad gestacional mediante la observación de fotografías obtenidas a través de la técnica inmunohistoquímica.

Variable	Definición	Dimensiones	Indicadores	Sub-indicadores
<b>Nivel de proliferación</b>	Nivel que indica la cantidad de aumento de células que ocurre en un órgano, en este caso, en la placenta.		Marcado con KI67  Sin Marcación para KI67	
<b>KI67</b>	KI67 es una proteína nuclear no histona que está involucrada en la proliferación celular, es usada como técnica inmunohistoquímica para realizar estudios de proliferación celular		Presencia de marca  Ausencia de marca	
<b>RN PT-PEG y PT-AEG</b>	Recién nacidos resultantes de partos de término con una gestación fisiológica. Un peso corporal igual o menor al peso considerado normal según la curva de crecimiento de la doctora Marcela Milad.	Gestación término  Peso al nacer          Curva de percentiles de crecimiento.	> 37 semanas de gestación.  BPN  Normal  Macrosómico   PEG  AEG	< 2.500 grs.          Percentil < 10  Percentil 90-10.

## Objetivo específico 2:

Determinar niveles apoptótico de las placentas de RN de pre-término, pequeños y adecuados para la edad gestacional mediante técnica inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo anti- caspasa 3 activa.

Variable	Definición	Dimensiones	Indicadores	Sub-indicadores
<b>Nivel de apoptosis</b>	Nivel relacionado con la cantidad de células muertas por mecanismos apoptóticos presentes en un organismo o tejido en este caso la placenta humana.		Marcado con caspasa 3 activa  Sin Marcación para caspasa 3 activa	
<b>Anticuerpo anti- caspasa 3 activa.</b>	Anticuerpo utilizado para identificar la presencia de caspasa 3, molécula que participa en el proceso de apoptosis.		Presencia de marca  Ausencia de marca	
<b>RN PT-PEG y T-GEG</b>	Recién nacidos resultantes de partos de término con una gestación fisiológica. Un peso corporal igual o menor al peso considerado normal según la curva de crecimiento de la doctora Marcela Milad.	Gestación término  Peso al nacer          Curva de percentiles de crecimiento.	> 37 semanas de gestación.  BPN  Normal  Macrosómico  PEG  AEG	< 2.500 grs.          Percentil < 10  Percentil 90-10.

### Objetivo específico 3:

Analizar morfológicamente el nivel de proliferación celular en placentas de RNPT, AEG y PEG, obtenidas mediante técnica IHQ

Variable	Definición	Dimensiones	Indicadores	Sub-indicadores
<b>Nivel de proliferación</b>	Nivel que indica la cantidad de aumento de células que ocurre en un órgano, en este caso, en la placenta.		Marcado con KI67  Sin Marcación para KI67	
<b>Análisis morfológico</b>	Descripción detallada y secuencial de una estructura		Vasos sanguíneos  Mesénquima  Citotrofoblasto  Sincitiotrofoblasto	
<b>RN PT-PEG y PT-AEG</b>	Recién nacidos resultantes de partos de término con una gestación fisiológica. Un peso corporal igual o menor al peso considerado normal según la curva de crecimiento de la doctora Marcela Milad.	Gestación término  Peso al nacer  Curva de percentiles de crecimiento.	> 37 semanas de gestación.  BPN  Normal  Macrosómico  PEG  AEG	< 2.500 grs.  >4.000 grs.  Percentil <10  Percentil 90-10.

### Objetivo específico 4:

Analizar morfológicamente el nivel de apoptosis celular de recién nacidos pre-término adecuados y pequeños para la edad gestacional en placentas, obtenidas mediante técnica inmunohistoquímica

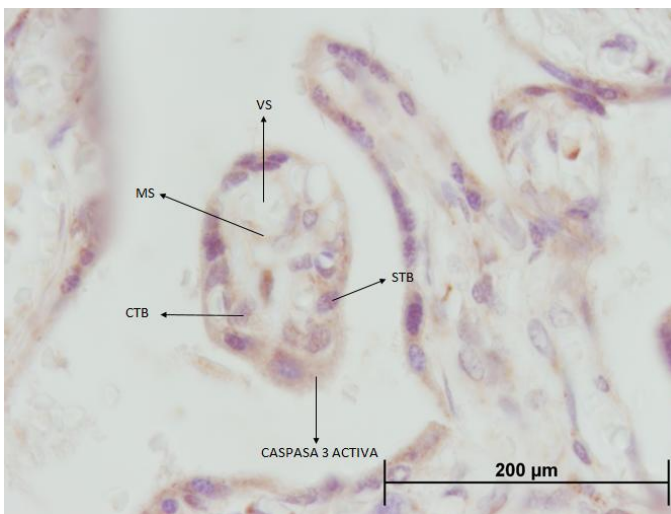
Variable	Definición	Dimensiones	Indicadores	Sub-indicadores
<b>Nivel de apoptosis</b>	Nivel relacionado con la cantidad de células muertas por mecanismos apoptóticos presentes en un organismo o tejido en este caso la placenta humana.		Marcado con caspasa 3 activa  Sin Marcación para caspasa 3 activa	
<b>Análisis morfológico</b>	Descripción detallada y secuencial de una estructura		Vasos sanguíneos  Mesénquima  Citotrofoblasto  Sincitiotrofoblasto	
<b>RN PT-PEG y PT-AEG</b>	Recién nacidos resultantes de partos de término con una gestación fisiológica. Un peso corporal igual o menor al peso considerado normal según la curva de crecimiento de la doctora Marcela Milad.	Gestación término  Peso al nacer        Curva de percentiles de crecimiento.	> 37 semanas de gestación.  BPN  Normal  Macrosómico  PEG  AEG	< 2.500 grs.      >4.000 grs.  Percentil < 10  Percentil 90-10.

## Análisis morfológico de placentas

### Caspasa 3 activa

En placentas de recién nacidos pretérmino, se pudo observar una menor cantidad de vasos sanguíneos (V.S), los cuales se ubican preferentemente en la zona central, por lo que el mesénquima (MS) ocupa mayor parte de la vellosidad. El citotrofoblasto (CTB) prácticamente no se observa.

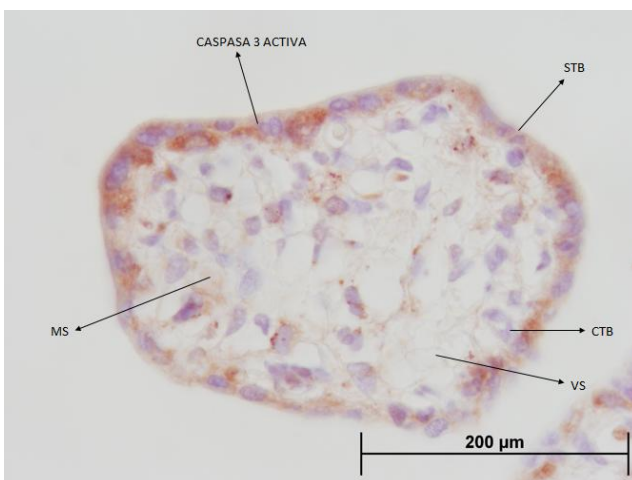
#### 1) Caspasa 3 activa en placentas de recién nacidos PT-PEG



Al analizar la presencia de caspasa 3 activa en placentas de recién nacidos de PT-PEG se encontraron escasas marcaciones de manera general, cuya concentración se observaba en algunas zonas de la periferia de las vellosidades. Se observa también menor cantidad de vasos sanguíneos, mayor cantidad de

sincitiotrofoblasto (STB) que de citotrofoblasto.

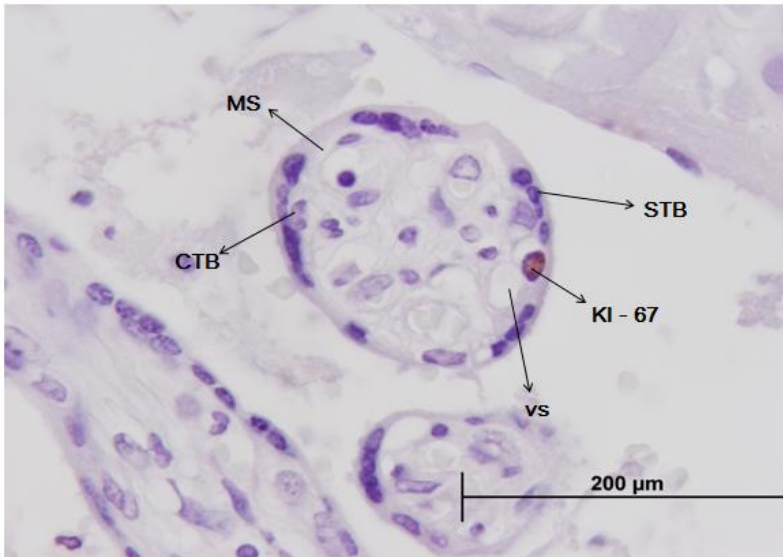
#### 2) Caspasa 3 activa en placentas de recién nacidos PT-AEG



El análisis de caspasa 3 muestra marcaje de manera general en las placas de pretérmino cuyo resultado neonatal se sitúa en el grupo de PT-AEG. De manera general y al igual que el grupo de PT-PEG, el marcaje es casi exclusivo de las vellosidades.

## KI - 67 en grupos de pretérmino

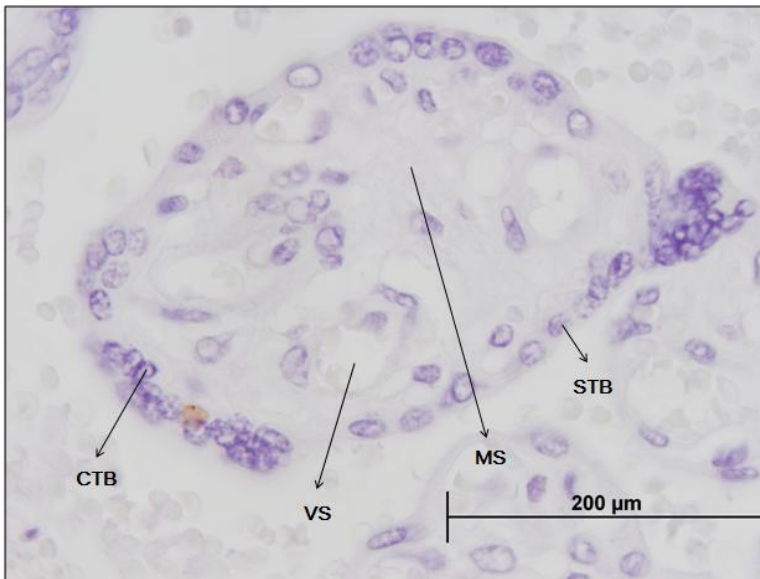
### 1. PT - AEG



En esta fotografía, se identifica STB, MS, VS y solo un par de células de CTB. Se observa una disposición homogénea de los vasos sanguíneos tanto en el centro como en la periferia de la vellosidad. Además de una distribución equitativa entre la cantidad de tejido mesenquimático con

respecto a la cantidad de los vasos sanguíneos. Cabe destacar que solo en algunas vellosidades del grupo de PT – AEG hubo tinción de los núcleos celulares con KI – 67. La mayoría de los núcleos teñidos se ubican en la periferia de la vellosidad, en el sincitiotrofoblasto.

### 2. RNPT – PEG



En esta imagen se identifica STB, VS, MS y algunas células de CTB. Esta fotografía representativa del grupo RNPT – PEG, pone de manifiesto la nula marcación de los núcleos celulares con KI – 67. En comparación con el grupo RNPT – AEG, la distribución de los vasos sanguíneos se encuentra

mayoritariamente en la periferia. Además la cantidad de tejido mesenquimático es mayor que la de vasos sanguíneos.

En el borde inferior de la vellosidad, se encuentra una zona teñida con hematoxilina, no corresponde a marcaje nuclear de KI – 67.

## Discusión

En gran medida todas las gestaciones dependen del buen funcionamiento de la unidad feto-placentaria para poder tener un desarrollo óptimo y normal. La placenta es el órgano encargado de nutrir al feto, por lo que toda patología o malformación que esta posea atentara en contra de la salud y bienestar de la gestación.

Siguiendo la línea de lo anterior y dada la función nutritiva de la placenta, el peso al nacer de los RN puede dar espacio a diversas dificultades a lo largo de su ciclo de vida, lo mismo que la EG que se tenga al momento del parto, siendo está clasificada como termino o pre termino. Si asociamos además, la EG con el peso al nacer, podemos saber si el RN es pequeño, adecuado o grande para esa edad gestacional.(Milad A. Marcela et al., 2010)

Tomando en cuenta que es la placenta la encargada de proveer al feto con lo necesario para desarrollarse de buena manera, se investigó si los procesos de proliferación y de apoptosis de este órgano influyen en las distintas categorías de peso al nacer de los RN, pensando en la posibilidad de una deficiente o sobre nutrición ejercida por la placenta.(Alberts et al., 2011)

Por consiguiente, fue necesario analizar los dos procesos asociados al crecimiento de la placenta: proliferación y apoptosis. La proliferación celular es una vía involucrada en procesos fisiológicos y patológicos, en la que a través del ciclo celular se duplican sus componentes de manera exacta y equitativa.(Scholzen & Gerdes, 2000) Una de las proteínas involucradas en este proceso es KI67, la cual está relacionada con procesos de proliferación (Bolaños et al., 2007)

La apoptosis por su parte es un proceso mediante el cual se autodestruyen células de forma ordenada ante la presencia de estímulos intra o extracelulares. De haber un exceso o disminución de este proceso, se podría llegar al desarrollo

de diversas patologías. En la apoptosis actúan diversas enzimas llamadas caspasas.(Huppertz & Herrler, 2005) En este estudio se utilizó caspasa 3, la cual es uno de los mediadores cruciales de la apoptosis, siendo esencial para ciertos procesos asociados con la fragmentación celular y en la formación de cuerpos apoptóticos, participando en la vía extrínseca e intrínseca(Polverino & Patterson, 1997).

Se trabajó con muestras de placentas sin patologías de pretérmino PT - PEG y PT - AEG.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, pueden ser analizados y comparados con otros documentos y publicaciones relacionadas con el tema.

De acuerdo al estudio realizado en el Departamento de Obstetricia y Ginecología de la Universidad Kobe de Medicina de Japón para determinar si ya sea la preeclampsia y el retardo del crecimiento están asociados con un aumento de la apoptosis placentaria (Ishihara et al., 2002)A diferencia del estudio presentado, el diseño de éste consistió en el análisis de 14 muestras placentarias de término (7 normales y 7 se encontraban complicadas con severos casos de preeclampsia o retardo del crecimiento durante la gestación) y la medición de la expresión del antígeno Fas y de la proteína Bcl-2 a través del método inmunoperoxidasaaavidina/biotina y en donde se determinó la presencia de apoptosis por el método TUNEL

El estudio tuvo como resultados generales la localización de antígeno Fas sin cambios en la intensidad en el sincitiotrofoblasto de todas las placentas analizadas. La proteína Bcl-2 fue abundantemente localizada en el sincitiotrofoblasto de las placentas de término normales, pero menos abundante en las placentas de madre con patología. La apoptosis aparentemente se encontró en los núcleos celulares del sincitiotrofoblasto y del citotrofoblasto. El índice apoptótico positivo de núcleos celulares del sincitiotrofoblasto en placentas afectadas por preeclampsia y RCIU fue significativamente más alto que en las placentas de término normales (preeclampsia severa,  $P < .001$ ; RCIU,  $P < .01$ ).

Microscopía electrónica de transmisión reveló la aparición de núcleos apoptóticos en trofoblastos en placentas de término con preeclampsia severa. Concluyendo el estudio que la expresión disminuida de la proteína Bcl-2 en el sincitiotrofoblasto en preeclampsia severa y RCIU puede resultar en el aumento de la apoptosis en el sincitiotrofoblasto en esas placentas.

Asociando estos resultados con el estudio presentado se puede inferir que la apoptosis celular se encuentra estrechamente relacionada con el retardo del crecimiento y que la expresión de la proteína Bcl-2 se ve disminuida al existir mayor apoptosis celular. Sin embargo, los resultados obtenidos demostraron que las placentas de pretérmino tanto PT-PEG y PT-AEG tenían escasa presencia de marcador de apoptosis celular de caspasa 3- activa, lo que puede llevar a inferir una inmadurez placentaria relacionada a la morfología que fue observada en la placenta que posee escasa cantidad de vasos sanguíneos y mayor presencia de mesénquima o también puede ser atribuido a que las placentas de este estudio no poseen patologías, por lo que no tendría que estar elevado el nivel apoptótico.

En el estudio realizado por el Departamento de Obstetricia y Ginecología de la Universidad de Mersin en Turquía, se analizó inmunohistoquímicamente la expresión del factor nuclear kappa-B y la apoptosis placentaria en gestaciones complicadas con RCIU y preeclampsia (Aban et al., 2004). En este trabajo se investigada la relación entre la expresión de NF-kappa B y la apoptosis de células trofoblásticas a través del análisis inmunohistoquímico de NF-Kappa B y de tres factores apoptóticos entre los cuáles se estudió la **caspasa-3** activa. El estudio se realizó en 34 muestras placentarias (19 preeclámpticas, 5 con RCIU y 10 normales) y dentro de los resultados se concluyó que existe un índice mayor de la expresión de caspasa 3 en RCIU y en placentas con preeclampsia ( $p= 0.003$ ) en comparación con las placentas de control.

Al asociarlo con el estudio presentado en esta investigación, podemos concluir que caspasa 3 tiene muy escasa marcación en las muestras de gestaciones de pretérmino. En conclusión, la marcación de caspasa 3 no se

encuentra elevada en las muestras del estudio, esto en comparación con las muestras analizadas en la investigación de la Universidad de Mersin, por lo que es en estas patologías donde la enzima estudiada se manifiesta de forma mayor debido a una anomalía en el proceso. En el caso del peso de los RN y la EG, no se encontró este mismo resultado en cuanto a la expresión de caspasa. Cabe mencionar, que el origen de las muestras analizadas en el estudio de la Universidad de Mersin es distinto a la procedencia de las muestras de esta investigación, por lo que los resultados pueden variar.

En un estudio realizado en el Departamento de Obstetricia y Ginecología de la Universidad Jikey por la escuela de medicina en Tokyo, Japón, se investigó sobre la apoptosis ocurrida en las vellosidades placentarias en embarazos complicados con restricción del crecimiento intrauterino sin ninguna patología.(Endo, Okamoto, Yamada, Nikaido, & Tanaka, 2005). Este estudio se centró en analizar casos de RCIU sin causa conocida y al igual que el presente estudio, sin complicaciones maternas. Además, la apoptosis en las placentas con RCIU fue correlacionada con la expresión de proteínas involucradas en la apoptosis y en la renovación celular. Las placentas de término fueron obtenidas de 16 gestaciones normales y 10 afectadas con RCIU sin síntomas maternos. La localización de la apoptosis fue analizada y contaron >2000 núcleos a través del método TUNEL y en microscopía electrónica de transmisión en ambos grupos. Como resultado se encontró que la incidencia de apoptosis es significativamente más alta en placentas con RCIU (2,98%) que en las placentas normales (1.46%) por el método TUNEL ( $p=0.03$ ). Además, el análisis inmunohistoquímico fue elaborado para examinar la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis y en general con la renovación celular, incluyendo la activación de **caspasa-3**, Bax, p53 y **Ki-67**. La expresión de la forma activa de caspasa-3 fue significativamente mayor en placentas con RCIU que en las gestaciones normales ( $p=0.03$ ) Estos resultados sugieren que la apoptosis a través de caspasa-3 podría jugar un rol en RCIU sin síntomas maternos.

Considerando la restricción de crecimiento en comparación con las placentas sin patologías es posible comparar los resultados con el análisis del presente estudio, de forma general, como consecuentes, ya que a pesar que los recién nacidos con RCIU pueden considerarse dentro del grupo de PEG se debe establecer la diferencia entre estos dos términos, siendo los recién nacidos con RCIU productos de una falla en el desarrollo durante la gestación mientras los recién nacidos PEG son considerados pequeños en relación al promedio, sin necesariamente tener una causa patológica.(Oyarzún Ebensperger, n.d.)En conclusión se puede explicar el aumento de caspasa-3 activa como consecuencia a un evento patológico o, como en el estudio realizado, como el resultado del desarrollo de la placenta y de su función principal de permitir el traspaso de nutrientes al recién nacido para su crecimiento, se sugiere por lo tanto que la apoptosis aumentada en las vellosidades placentarias permitiría generar espacio para un mayor flujo sanguíneo que podría ser la causa de recién nacidos con mayor peso al nacer.

Por otra parte, podríamos inferir que el escaso marcaje de Ki-67 en las muestras trabajadas podría deberse a que este marcador se ve expresado mayormente en placentas de primer trimestre (Bulmer, Morrison, & Johnson, 1988) que es la fase de mayor proliferación celular y no así en los períodos posteriores que podrían considerarse de reposo en primera instancia y deterioro celular posteriormente.(Scholzen & Gerdes, 2000)

Continuando con el análisis comparativo de KI67, en el estudio realizado por el Departamento de Histología y Embriología y por el Departamento de Obstetricia y Ginecología de la Universidad de Akdeniz, en Turquía, se investigó la expresión de proteínas relacionadas con el ciclo celular (PCNA, Ki67, p27 and p57) en placentas humanas normales y con preeclampsia, esto con el objetivo de comprender el rol que cumplen los reguladores del ciclo celular en las placentas preeclámpicas.(Unek, Ozmen, Mendilcioglu, Simsek, & Korgun, 2014) Se realizó a través de técnica inmunohistoquímica y sus resultados sugieren que en las placentas de gestaciones cursadas con la patología preeclampsia, KI67 se vio

significativamente aumentada, ya que la marcación resulto ser más intensa que en las placentas de gestaciones fisiológicas. Asociando los resultados anteriormente mencionados con los presentados en esta investigación, los cuales dejan en evidencia poco marcaje de KI67 en muestras de RN pre termino AEG Y PEG, se puede llegar a la conclusión de que al ser las muestras analizadas provenientes de placentas de embarazos fisiológicos, la escasa cantidad de KI67 visualizado a través de la técnica inmunohistoquímica es lo normal que se espera en una gestación que no está afectada por alguna patología.

## Conclusión

La placenta constituye un órgano fundamental y de vital importancia para el desarrollo no solo humano, si no que de la mayoría de los seres vivos. Cumple una función metabólica y secretora importante, permitiendo la comunicación materno-fetal, lo que ayuda al feto a desarrollarse tanto en la vida intrauterina como en la extrauterina.

Según investigadores y estudios analizados, se demuestra que, mayormente, la placenta ha sido evaluada en condiciones patológicas. Sin embargo, este es uno de los primeros estudios que evalúa marcadores placentarios en órganos sin patologías asociadas.

En esta investigación encontramos que en las placentas analizadas no está relacionado el peso a nacer de los recién nacidos pre-término, tanto PT - AEG, como PT - PEG, con la proliferación o muerte celular dada por los marcadores inmunohistoquímicos utilizados.

Finalmente, se necesitan otros trabajos e investigaciones para poder dilucidar como la placenta siendo un órgano capaz de adaptarse a la condiciones del feto, es capaz de regular este crecimiento fetal.

## Agradecimientos

En el desarrollo de este estudio contamos con el apoyo indispensable de muchas personas, por lo cual nos gustaría agradecer a cada una de ellas.

En primer lugar a nuestros padres, que sin duda han estado presentes desde el primer día de iniciada esta carrera, dándonos aliento y ánimo permanente para no decaer.

A nuestros tutores, que con su dedicación, tiempo y sobre todo paciencia, nos ayudaron en el progreso de esta tesis, enseñándonos nuevos y enriquecedores conocimientos e incorporándonos al área científica que involucra la Obstetricia. Queremos hacer una mención especial para nuestro asesor René González Vargas, quien desinteresadamente nos acompañó desde el primer día de este proyecto y que con mucha paciencia nos orientó en todo momento y siempre que lo requerimos. Al Tecnólogo médico Juan Varas Muñoz, quién nos acogió en su lugar de trabajo y estuvo siempre pendiente de nuestras dudas y falencias, para prestarnos apoyo y compartir sus conocimientos. A nuestro profesor guía Sebastián San Martín Henríquez- Matrón, quien durante estos dos años de trabajo nos animó a explorar otras aristas de la Obstetricia y nos permitió aportar nuestro granito de arena mediante este estudio, además de acompañarnos con esmerada paciencia durante el trayecto de este camino. Al profesor Germán Iñiguez Vila, por darnos la oportunidad de participar en este proyecto y confiar en nuestras capacidades aún sin conocernos. Además, manifestar nuestra gratitud al proyecto Fondecyt nº 1110240, a cargo del MSc Germán Iñiguez Vila, por cubrir los costos económicos asociados a esta investigación.

Y por último, pero no menos importante, agradecer a nuestros compañeros, amigos, parejas e hija, que vivieron con nosotros todo el estrés y frustraciones de este proceso, y también las muchas satisfacciones que conlleva llegar al resultado final. Agradecimientos especiales a Natalia Zamora, estudiante de Tecnología médica de la Universidad de Valparaíso, quien nos animó permanentemente en

nuestra estadía en el laboratorio y que en más de una ocasión nos salvó del desastre.

## Bibliografía

- Aban, M., Cinel, L., Arslan, M., Dilek, U., Kaplanoglu, M., Arpaci, R., & Dilek, S. (2004). Expression of Nuclear Factor-Kappa B and Placental Apoptosis in Pregnancies Complicated with Intrauterine Growth Restriction and Preeclampsia: An Immunohistochemical Study. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 204(3), 195–202. doi:10.1620/tjem.204.195
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Jhonson, A., Lewis, J., Raff, M., ... Walter, P. (2011). *Introducción a la biología celular*. (Editorial Panamericana, Ed.) (3ª Edición., p. Capítulo 7 y 18 Ciclo de división celular). México.
- Baeuerle, P., & Baltimore, D. (1988). I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science*, 242(4878), 540–546. doi:10.1126/science.3140380
- Black, S., Kadyrov, M., Kaufmann, P., Ugele, B., Emans, N., & Huppertz, B. (2004). Syncytial fusion of human trophoblast depends on caspase 8. *Cell Death and Differentiation*, 11, 90–98. doi:10.1038/sj.cdd.4401307
- Bolaños, H. J., Freyre, S. I., & Carlosama, J. H. (2007). *Determinación de la expresión de ki67 y de los reguladores del ciclo de división celular ciclina d1, p53 y bcl-2, en la mucosa gástrica de ratones de la cepa mus músculos sometidos al consumo crónico de habas y, habas y sal* (p. página 7). Colombia.
- Bulmer, J. N., Morrison, L., & Johnson, P. M. (1988). Expression of the proliferation markers Ki67 and transferrin receptor by human trophoblast populations. *Journal of Reproductive Immunology*, 14(3), 291–302. doi:10.1016/0165-0378(88)90028-9
- Burton, G. J., Skepper, J. N., Hempstock, J., Cindrova, T., Jones, C. J. P., & Jauniaux, E. (2003). A reappraisal of the contrasting morphological appearances of villous cytotrophoblast cells during early human pregnancy; evidence for both apoptosis and primary necrosis. *Placenta*, 24, 297–305. doi:10.1053/plac.2002.0882
- Cambell, R. (2005). *Biología*. (Editorial Panamericana, Ed.) (7ª edición., p. Capítulo 12 El ciclo celular 229). España.
- Carlson, B. (2009). Embriología humana y biología del desarrollo. In *Embriología humana y biología del desarrollo* (4º ed., p. 57). Barcelona: Elsevier.
- Charriaut-Marlangue C, & Ben-Ari Y. (1995). A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *NeuroReport*, 7, 61–64.
- De Robertis, E., & Hib, J. (2004). Fundamentos de Biología Celular y Molecular de De Robertis. In E. Ateneo (Ed.), *Fundamentos de Biología Celular y Molecular* (Cuarta edi., p. 393). Buenos aires.

- Debesa Padilla, A., Alvarez Hidalgo, R., Puente Infante, Y., Stewart Lemes, G., & Casas Morell, E. (2007). Relación de la apoptosis y autoinmunidad. In *Archivo médico de Camagüey*. Camagüey. Retrieved from <http://www.amc.sld.cu/Markup/alette/marcados/vol11/v.11/no.1/pdf/amc21107.pdf>
- Endo, H., Okamoto, A., Yamada, K., Nikaido, T., & Tanaka, T. (2005). Frequent apoptosis in placental villi from pregnancies complicated with intrauterine growth restriction and without maternal symptoms. *International Journal of Molecular Medicine*. doi:10.3892/ijmm.16.1.79
- Eynard, A. R., Valentich, M. A., & Rovasio, R. A. (2008). *Histología y embriología del ser humano: bases celulares y moleculares*. (Editorial Panamericana, Ed.) (4ª Edición., p. Capítulo 2 El núcleo como centro interactivo del c). Argentina.
- Fernández, M. E., & Nuñez, A. C. (2004). Cáncer de ovario: Factores, pronóstico y expectativas a futuro, discurso de doctor Manuel Escudero Fernández y contestación del académico doctor José Antonio Clavero Nuñez. *Académicos de Número*, Capítulo 6 página 42.
- G, M. R., P, C. C., U, G. E., & P, V. C. (2011). Documentos Apoptosis placentaria : mecanismos moleculares en la génesis de la preclampsia, 76(6), 431–438.
- Geneser, F. (2000). Histología sobre bases biomoleculares. In *Histología sobre bases biomoleculares* (3º ed., pp. 669 – 671). Buenos aires: Médica Panamericana.
- Goldenberg, R. L., Culhane, J. F., Iams, J. D., & Romero, R. (2009). Preterm Birth 1: Epidemiology and Causes of Preterm Birth. *Obstetric Anesthesia Digest*. doi:10.1097/01.aoa.0000344666.82463.8d
- González Vargas, R. (2014). *Evaluación de la presencia y distribución de klotho en placentas humanas provenientes de recién nacidos de pretérmino y término*. Universidad Andrés Bello.
- Huppertz, B., & Herrler, A. (2005). Regulation of proliferation and apoptosis during development of the preimplantation embryo and the placenta. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*. doi:10.1002/bdrc.20056
- Ishihara, N., Matsuo, H., Murakoshi, H., Laoag-Fernandez, J. B., Samoto, T., & Maruo, T. (2002). Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or intrauterine growth retardation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 186(1), 158–166. doi:10.1067/mob.2002.119176
- Karp, G. (2009). *Biología celular y molecular*. (Editorial Mc Graw Hill, Ed.) (5ª Edición., p. páginas 652–653). México.

- Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., & Mitchell, R. N. (2008). *Patología humana*. (Editorial Elsevier, Ed.) (8ª Edición., p. páginas 20–22). España.
- Lagman, J., & Sadler, T. . (2007). Langman embriología médica: con orientación clínica. In Edición Médica Panamericana (Ed.), *Langman embriología médica: con orientación clínica* (p. 42).
- Leal, M. del C. (2009). Low birth weight behavior and repercussion on infant mortality during 2001-2005. *Revista Cubana de Obstetricia Y Ginecología*, 35(4), páginas 99–107. Retrieved from [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0138-600X2009000400011&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-600X2009000400011&lng=es)
- Martin, I., & García, T. (2012). *Atlas de Inmunohistoquímica* (Díaz de Sa.). Madrid.
- Milad A. Marcela, Novoa P. José, Fabres B. Jorge, & Aspillaga M. Carlos. (2010). *Recomendación sobre Curvas de Crecimiento Intrauterino* (Vol. 81, pp. 264–274).
- MINSAL. (2010). *Guía Clínica Prevención Parto Prematuro*. Santiago de Chile.
- OMS. (2013). ¿Qué es un niño prematuro? Retrieved from [http://www.who.int/features/qa/preterm\\_babies/es/](http://www.who.int/features/qa/preterm_babies/es/)
- Oyarzún Ebensperger, E. (n.d.). Retardo de crecimiento intrauterino. Retrieved from <http://escuela.med.puc.cl/paginas/departamentos/obstetricia/altoriesgo/RCIU02.html>
- Pérez Sanchez, A., & Donoso Siña, E. (2012a). Obstetricia. In *Obstetricia* (4º ed., p. 316). Santiago de Chile: Mediterráneo.
- Pérez Sanchez, A., & Donoso Siña, E. (2012b). Obstetricia. In *Obstetricia* (4º Edición., p. página 136). Santiago de Chile: Mediterráneo.
- Pérez Sanchez, A., & Donoso Siña, E. (2012c). Obstetricia. In *Obstetricia* (4º ed., pp. 138 – 142). Santiago de Chile: Mediterráneo.
- Pérez Sanchez, A., & Donoso Siña, E. (2012d). Obstetricia. In *Obstetricia* (4ª Edición., p. páginas 717–719). Santiago de Chile: Mediterráneo.
- Petit, E., & Abergel, A. (2012). The role of infection in preterm birth. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*, 41(1), 14–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22192232>
- Polverino, A. J., & Patterson, S. D. (1997). Selective activation of caspases during apoptotic induction in HL-60 cells. Effects of a tetrapeptide inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 7013–7021. doi:10.1074/jbc.272.11.7013

- Rang, H.P M.M Dale, J.M Ritter, R. . F. (2008). *Rang y Dale Farmacología*. (Editorial Elsevier, Ed.) (6<sup>a</sup> edición., p. Capítulo 5 Proliferación celular y apoptosis 72–76). España.
- Rellán Rodríguez. S, García de Rivera. C, & Aragón García. M. Paz. (2008). El recién nacido prematuro. In *Protocolos Diagnósticos de la AEP: Neonatología* (p. páginas 68–70). España.
- Roa, I., Smok S, C., & Prieto G, R. (2012). Placenta: Anatomía e Histología Comparada. *International Journal of Morphology*, 30(4), 1490–1496. doi:10.4067/S0717-95022012000400036
- Rodríguez G, M., Couve P, C., Egaña U, G., & Chamy P, V. (2011). Apoptosis placentaria: mecanismos moleculares en la génesis de la preclampsia. *Revista Chilena de Obstetricia Y Ginecología*, 76(6), 431–438. doi:10.4067/S0717-75262011000600011
- Scholzen, T., & Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9
- Schwarcz, R., Duverges, C., Díaz, Á., & Fescina, R. (2003). Obstetricia. In *Obstetricia* (5<sup>o</sup> ed., pp. 11 – 17). Buenos aires: El Ateneo.
- Sepúlveda M, A., & Valdés R, E. (2013). Guía clínica FMIU. Retrieved October 15, 2014, from <http://medicinafetal.cl/guias.html>
- Tapia L, J. L., & Gonzalez M, A. (2008a). *Manual de Neonatología* (3rd ed., pp. 45–48). Mediterráneo.
- Tapia L, J. L., & Gonzalez M, A. (2008b). Neonatología. In *Manual de Neonatología* (3<sup>o</sup> Edición., p. 20). Santiago de Chile: Mediterráneo.
- Unek, G., Ozmen, A., Mendilcioglu, I., Simsek, M., & Korgun, E. T. (2014). The expression of cell cycle related proteins PCNA, Ki67, p27 and p57 in normal and preeclamptic human placentas. *Tissue & Cell*, 46(3), 198–205. doi:10.1016/j.tice.2014.04.003
- Ventura-Juncá, P. (2012). Manual de Pediatría. Retrieved July 26, 2015, from <http://escuela.med.puc.cl/paginas/publicaciones/manualped/RNPPremat.html>

# Anexos

## Anexo 1

### DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Queremos invitarla a participar en el estudio sobre la relación entre factores de crecimiento producidos en la placenta y el crecimiento pre y postnatal. Este estudio se realiza en el Instituto de Investigaciones Materno infantil (IDIMI), Hospital Clínico San Borja Arriarán y cuyo Investigador Responsable es el Dr. Germán Illigüez (Santa rosa 1234, 2º Piso, 9770852-09/3301622). Participan además los Co Investigadores Dra Cecilia Johnson, Dra Verónica Mericq; Dra Verónica Peña y Dr. Fernando Cassorla. Para ello le solicitamos leer con detalle este documento:

**Título del estudio: SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR INDUCIDA POR IGF-I EN PLACENTAS HUMANAS DE PRETÉRMINO Y TÉRMINO. REGULACIÓN POR EL SISTEMA KLOTHO/FGF**

**Propósito del estudio:** Con este estudio queremos conocer si hay diferencia en la producción de algunos factores placentarios (IGFs, IGFbPs, ALS, IGF-IR, FGFs, FGFRs, Klotho, IRS1, AKT, MAPKs, mTOR) entre **embarazos de término y pretérmino**. Las cuales se relacionarán con el peso y talla al nacimiento y su evolución durante el primer año de vida.

**Procedimiento:** Una vez producido el nacimiento de su hijo se obtendrá la placenta y una muestra de sangre de cordón umbilical (10 ml) en la cuales se estudiarán los factores de crecimiento. Esta muestra no significa ningún procedimiento invasivo para la madre o el recién nacido. Se le consultará telefónicamente la información de peso y talla de su hijo cada 6 meses, de no disponer usted de esta información se le solicitará controlarlo, sin costo para usted, en el IDIMI por un Pediatra y/o un Endocrinólogo Infantil para obtener estos datos.

**Confidencialidad:** La información de la ficha clínica (edad, peso y talla materna, características del parto y peso y talla del recién nacido) SOLO será conocida por los investigadores que participan en este estudio y no será difundida sin previo consentimiento. Los resultados de los exámenes y exploraciones clínicas de su hijo realizados durante este estudio solo serán usados en este proyecto y conocidos por sus investigadores. La identidad de su hijo no se hará pública, por lo tanto no aparecerá ni en presentaciones ni en posibles publicaciones.

El Investigador Responsable será el custodio de muestras y datos. Durante el desarrollo de este Proyecto, en las muestras de sangre y de placenta NO se realizarán estudios genéticos y no serán utilizadas en otros proyectos sin su autorización. Una vez finalizado el estudio las muestras se conservarán para un posible uso futuro de ellas, para lo cual se le solicitará su consentimiento.

**Beneficios:** No habrá beneficios por participar en este estudio. No existe ningún riesgo para usted y su hijo por participar en este proyecto. NO se le tomarán muestras de sangre a usted o a su hijo durante el desarrollo de este estudio. Se cubrirá el gasto de locomoción al final de cada visita. Además se le otorgará una colación al niño y a su acompañante cuando deba permanecer más de 3 horas en el Centro de Estudio (IDIMI).

**Participación en el estudio: Se garantiza que Ud. rehusar o retirarse en cualquier momento que lo desee, sin tener que dar explicaciones y sin afectar de ninguna manera la calidad de la atención para usted y su hijo.** En caso de retirarse del estudio se le consultará si es posible utilizar las muestras ya obtenidas. En caso de usted no autorizar el uso de ellas, las muestras serán eliminadas.

En caso de tener alguna duda o problema en relación a mi participación, éstas serán resueltas por los investigadores clínicos Dra. Verónica Peña y Fernando Cassorla (Fono: 9770850).

Declaro haber recibido una completa explicación respecto a mi participación en este proyecto de investigación por parte de los investigadores y una copia de este consentimiento.

Este estudio fue validado éticamente por el Comité Ético Científico del Servicio de Salud Metropolitano Central (SSMC) (Santa Rosa 1234) y por el Comité de Ética en Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Independencia 1027)

Si tiene dudas al respecto de sus derechos como participante en este proyecto de investigación se puede comunicar con el Dr. Emiliano Soto, Presidente del Comité Ético Científico del SSMC al 5748922 o con el Comité de Ética en Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile al 9786923.

Estoy dispuesta a participar voluntariamente y sin presiones en este estudio.

NOMBRE \_\_\_\_\_

RUT \_\_\_\_\_ FIRMA : \_\_\_\_\_

TESTIGO \_\_\_\_\_ FECHA: \_\_\_\_\_



**Dr. Ariel Fuentes**  
Director IDIMI

## Anexo 2 Preparación de los tacos de parafina

Los tejidos serán fijados en formalina para luego seguir el siguiente protocolo.

<b>Etapas</b>	<b>Solución</b>	<b>Tiempo</b>
<b>Deshidratación</b>	Alcohol 50%	30 minutos
	Alcohol 70%	30 minutos
	Alcohol 95% I	30 minutos
	Alcohol 95% II	30 minutos
	Alcohol 100% I	30 minutos
	Alcohol 100% II	30 minutos
	Alcohol 100% III	30 minutos
<b>Aclaramiento</b>	Xilol I	15 minutos
	Xilol II	15 minutos
	Xilol III	15 minutos
<b>Impregnación a 60 °C</b>	Parafina I	30 minutos
	Parafina II	30 minutos
	Parafina III	30 minutos

Luego, las muestras se llevarán a un dispensador de parafina líquida que tiene una temperatura de 60 °C, en el cual mediante moldes metálicos se generarán los tacos de parafina.

---

## Anexo 3 Desparafinado/Hidratación

<b>Proceso</b>	<b>Solución</b>	<b>Tiempo</b>
<b>Desparafinado</b>	Xilol I	10 minutos
	Xilol II	10 minutos
	Xilol III	10 minutos
<b>Hidratación</b>	Alcohol 100 I	10 minutos
	Alcohol 100 II	10 minutos
	Alcohol 95%	10 minutos
	Alcohol 70%	10 minutos
	Agua destilada	10 minutos

## Anexo 4

### - Preparación de buffer citrato a pH 6.

Solución A: Disolver 2,31 g de ácido cítrico en 110 mL de agua destilada.

Solución B: Disolver 14,7 g de citrato de sodio en 500 mL de agua destilada.

Para preparar 500 mL de buffer mezclar 450 mL de agua destilada, 9 mL de solución A y 41 mL de solución B. Ajustar a pH 6.

### -Preparación PBS 0.1 Molar, pH 7.2-7.2

<b>PBS Stock</b>	<b>Reactivos</b>
	87,9 g NaCl
	2,74 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	1,35 g de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

Diluir en 100 de agua destilada, filtrar, aforar a 1L con agua destilada y almacenar.

Para la solución de trabajo, diluir 100 mL de PBS stock en 900 mL de agua destilada. Ajustar pH 7.2-7.4

## Anexo 5 Preparación Hematoxilina de Harris

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
<b>Hematoxilina</b>	5 g
<b>Alcohol 100%</b>	50 cc
<b>Alumbre de amonio</b>	100 g
<b>Agua destilada</b>	1000 mL
<b>Óxido de Mercurio rojo (HgO)</b>	2,5 g
<b>Ácido Acético Glacial</b>	40 mL

\*Previo a su uso se debe filtrar.