



**Universidad de Valparaíso  
Facultad de Medicina  
Escuela de Obstetricia y Puericultura**

**“MORFOLOGÍA PLACENTARIA Y DISTRIBUCIÓN DE ENZIMAS  
PROOXIDANTES Y ANTIOXIDANTES EN RATAS CON Y SIN RESTRICCIÓN  
ALIMENTARIA”.**

**Tesis para optar al Grado de Licenciada en Obstetricia y Puericultura.**

**Profesores Guías: Dr. Sebastián San Martín H.  
Prof. Paula Oyarzún A.**

**Tesistas: Daniela Martínez Vargas  
Daniela Órdenes Retamales  
Jeanette Valdivia Liberona**

**2010**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al profesor Sebastián San Martín, por ser un excelente docente, compartir sus conocimientos e incentivarnos a seguir un camino diferente brindándonos la oportunidad para desarrollar esta tesis en el marco del proyecto DIPUV 07/2008.

A la profesora Paula Oyarzún, por su participación como guía de tesis, por impulsarnos a ser perseverantes y esforzarnos por nuestras metas.

Al Sr. Ricardo Ramírez, por apoyarnos en la realización de técnicas dentro del laboratorio e integrarnos a su grupo de trabajo, y a la Srta. Alejandra Möller quien participó al término de nuestra experiencia.

A Sra. Makarena González, por el tiempo dedicado en la orientación teórica y facilitación de material.

Al Sr. Felipe Almarza, por su participación profesional voluntaria en la creatividad y desarrollo del área gráfica de nuestra tesis.

Al equipo de trabajo del Laboratorio del Centro de Investigación Biología de la Reproducción de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso, por su buena disposición durante el desarrollo de esta tesis.

## DEDICATORIA

*A nuestros padres, familias y seres queridos, que nos brindaron su cariño y apoyo incondicional en la realización de esta tesis, además de darnos las herramientas y los valores necesarios para alcanzar nuestras metas y desarrollarnos tanto en lo personal como profesional.*

*A nuestros profesores guías, que nos incentivaron y participaron en esta experiencia, otorgándonos las bases teóricas y prácticas para emprender este proyecto y llevarlo a buen fin.*

## **FINANCIAMIENTO**

Los costos para el desarrollo de este trabajo fueron cubiertos completamente por los Proyectos DIPUV CI 05/2006, DIPUV REGULAR 07/2008 cuyo investigador responsable es el Dr. Sebastián San Martín y el proyecto ANILLO ACT-73 (Conicyt, Chile). Estos proyectos permitieron cubrir los costos relacionados con la obtención y proceso de las placentas. Además incluyó la compra de los reactivos necesarios para realizar los estudios de distribución proteica por inmunohistoquímica.

Esta tesis cuenta con el patrocinio del Centro Regional de Estudio en Alimentos Saludables, CREAS, Chile.

## RESUMEN

**Introducción:** La Restricción del Crecimiento Intrauterino alcanza una incidencia mundial del 3-10% de todos los embarazos, siendo responsable de una alta morbimortalidad perinatal. Entre sus etiologías, la restricción alimentaria promueve alteraciones en el aporte de nutrientes para el normal crecimiento y diferenciación de los tejidos. Esto condiciona modificaciones en el estatus oxidativo de la madre, la placenta y el feto, promoviendo alteraciones morfológicas y funcionales en estos tejidos. **Objetivo:** Caracterizar la morfología y la distribución de las enzimas prooxidantes y antioxidantes, en placentas de ratas en diferentes estadios de gestación en un modelo con y sin restricción alimentaria. **Material y Métodos:** Muestras de placentas de ratas entre los días 14, 17 y 20 de gestación fueron obtenidas de animales ***con y sin restricción alimentaria***. Los tejidos fueron procesados mediante técnicas histológicas convencionales para la descripción morfológica e inmunohistoquímica para la distribución de las enzimas Óxido Nítrico Sintasa Inducido (iNOS), Superóxido Dismutasa 1 (SOD1) y Glutación Peroxidasa (GPX). **Resultados:** En las placentas de animales con *restricción alimentaria* se observó una reducción cualitativa del tamaño placentario y la aparición precoz de células ricas en glicógeno. En placentas de animales sin restricción alimentaria SOD1 y GPX fueron observadas en todas las regiones de la placenta. Sin embargo, la distribución en la región del laberinto aumentó hacia el final de la gestación. En la región del espongiotrofoblasto sólo GPX mostró un aumento en su distribución. En la región de las células gigantes del trofoblasto ambas enzimas fueron observadas en todo el período de estudio con una distribución similar. A su vez, la distribución de iNOS disminuye a medida que avanza la gestación en todas las regiones placentarias localizándose en este período en los vasos sanguíneos fetales. En placentas de animales con *restricción alimentaria*, se observó una mayor distribución de las enzimas antioxidantes (GPX y SOD), a diferencia de iNOS cuya distribución fue menor. **Conclusión:** La restricción alimentaria materna induce alteraciones morfológicas placentarias e incrementa las defensas antioxidantes, lo que podría promover una respuesta compensatoria a esta alteración.

**Palabras Claves:** Placenta, Restricción Alimentaria, Restricción del Crecimiento Intrauterino, Enzimas Prooxidantes, Enzimas Antioxidantes.

## ABSTRACT

**Introduction:** Intrauterine growth restriction reaches a world incidence of 3-10% of total pregnancy number, being the cause of a high perinatal morbimortality. Among its etiologies, food restriction promotes alterations in the nutrient input for normal tissue growth and differentiation. This fact conditions some modifications that take place on the oxidative status of the mother, placenta and fetus. These modifications include morphological and functional alterations of the mentioned tissues. **Objective:** To characterize the morphology and the distribution of pro-oxidant and anti-oxidant enzymes in rat placenta at different gestational stages in a model with and without food restriction. **Material and Methods:** Placental samples were obtained from pregnant rats at days 14, 17 and 20 of gestation maintained with and without food intake. Tissues were processed using conventional histological techniques for the morphological description and immunohistochemistry to determine the tissue distribution of each of the following enzymes: induced nitric oxide synthase (iNOS), Superoxide dismutase 1 (SOD1) and glutathione peroxidase (GPX). **Results:** In the placentas from animals subjected to food restriction, a qualitative reduction of the placental size and the early appearance of glycogen rich cells was observed. In the placentas from animals without food restriction, SOD1 and GPX were observed throughout all placental regions. However, distribution in the labyrinth region increased at the end of gestation. In the spongiotrophoblast region, just GPX showed an increase in its distribution. In the region of the trophoblast giant cells both enzymes were observed in the hole period of study with a similar distribution. In turn, iNOS distribution decreases in all placental regions as gestation progresses being detectable in this period in fetal blood vessels. In placentas from animals with food restriction, a bigger distribution of antioxidant enzymes (GPX and SOD) was observed, oppositely to iNOS observation which was less distributed. **Conclusion:** Maternal food restriction induces placental morphological alterations and increases antioxidant defenses, which might promote a compensatory response to this alteration. **Key Words:** Placenta, Food restriction, Intrauterine growth restriction, pro-oxidant enzymes, anti-oxidant enzymes.

## DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

- **Placenta:** Órgano situado dentro del útero durante la gestación a través del cual se le proporcionan al feto los nutrientes esenciales y oxígeno, siendo además una vía de eliminación de los productos de excreción fetal.
  
- **Restricción Alimentaria:** Consiste en someter a un individuo a una reducción de ingesta diaria de los nutrientes necesarios que su metabolismo requiere en condiciones normales.
  
- **Enzimas Prooxidantes:** enzimas capaces de generar y/o promover la producción de radicales libres.
  
- **Enzimas Antioxidantes:** enzimas capaces de neutralizar la reactividad de los radicales libres sin desestabilizar su propia estructura, manteniendo el balance redox esencial para la supervivencia de los organismos y su salud.

## INDICE

### 1. INTRODUCCIÓN

1.1 Restricción del Crecimiento Intrauterino	1
1.2 Placenta Humana	6
1.2.1 Desarrollo placentario	8
1.2.2 Espacio Interveloso	10
1.2.3 Circulación Placentaria	11
1.3 Estrés Oxidativo	15
1.3.1 Radicales Libres	18
1.3.2 Especies Reactivas de Oxígeno	19
1.3.3 Especies Reactivas de Nitrógeno	25
1.3.4 Antioxidantes	28
1.4 Morfogénesis y Función Placentaria de Rata	34
1.4.1 Funciones de la Placenta	36
1.4.2 Placentación en Rata	36
1.4.3 Células Placentarias	41
1.4.4 Laberinto	43
1.4.5 Zona de Unión	46
1.4.6 Células Gigantes Trofoblásticas	48
1.4.7 Circulación Placentaria en Rata	49

### 2. FUNDAMENTACIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA, TIPO DE ESTUDIO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Fundamentación del Problema	51
2.2 Delimitación del Problema	51
2.3 Tipo de Estudio	52
2.4 Hipótesis	52
2.5 Objetivos	
2.5.1 Objetivo General	52
2.5.2 Objetivos Específicos	53

<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
3.1 Animales	54
3.2 Procedimientos Experimentales	57
3.3 Métodos	
3.3.1 Métodos Histológicos	60
3.3.2 Métodos Inmunohistoquímicos	60
3.4 Limitaciones del Estudio	62
<b>4. RESULTADOS</b>	
4.2 Descripción y Análisis Morfológica de Placentas de Animales Sin Restricción Alimentaria.	63
4.3 Descripción y Análisis Morfológica en Placentas de Animales Con Restricción Alimentaria.	64
4.4 Descripción y Análisis Inmunohistoquímico de Placentas de Animales Sin Restricción Alimentaria.	65
<b>5. DISCUSIONES</b>	95
<b>6. CONCLUSIONES</b>	102
<b>ANEXOS</b>	103
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	114

## ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICOS

	<b>Página</b>
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN</b>	
<b><u>Figuras</u></b>	
Fig. 1.1 Causas de Restricción de Crecimiento Intrauterino.	5
Fig. 1.2 Consecuencias a corto y largo plazo de la RCIU.	5
Fig. 1.3 Estructura Placentaria.	7
Fig. 1.4 Fases en Formación de las Vellosidades Coriónicas.	9
Fig. 1.5 Estructura y Circulación de la Placenta Humana Madura.	12
Fig. 1.6 Esquema de una Vellosidad Troncal y sus Ramificaciones en Vellosidades de Intercambio.	14
Fig. 1.7 Ejemplificación de Estrés Oxidativo.	15
Fig. 1.8 Metabolización del Oxígeno Molecular hasta Agua.	21
Fig. 1.9 Esquema de Formación de Radicales Hidroxilos.	22
Fig.1.10 Útero Bicorneo.	35
Fig. 1.11 Estructura Placentaria en la Rata.	41
Fig. 1.12 Esquema Representativo de los Linajes de las Células Trofoblásticas y su Localización en el Compartimiento Útero-Placentario Maduro en la Rata.	43
Fig. 1.13 Laberinto de Placenta de 17° DG en Animal Sin Restricción Alimentaria.	44
Fig. 1.14 Zona de Unión en Placenta 20° DG Sin Restricción Alimentaria.	46
Fig. 1.15 Células Gigantes del Trofoblasto en Placenta de 14° DG Sin Restricción Alimentaria.	48
<b><u>Gráficos</u></b>	
Gráfico 1.1 Curva de Crecimiento Intrauterino en Recién Nacidos Chilenos.	3
Gráfico1.2 Mortalidad Perinatal según Percentiles de Peso a Distinta Edad Gestacional, Chile.	4

## CAPÍTULO 3: MATERIAL Y MÉTODOS

### Figuras

Fig. 3.1 (A y B) Frotis Vaginal Positivo. 55

Fig. 3.2 Esquema Representativo de Escisión de los Cuernos Uterinos 58

### Tablas

Tabla 3.1 Anticuerpos Utilizados 61

### Gráficos

3.1.A. Distribución del Promedio de Pesos Maternos en Ratas sin Restricción Alimentaria. 56

3.1. B. Distribución del Promedio de Pesos Maternos en Ratas con y sin Restricción Alimentaria. 57

3.1. C. Distribución de los Promedios de Pesos Placentarios y Fetales de Ratas sin Restricción Alimentaria. 59

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

### Figuras

#### ***Hematoxilina-Eosina Sin restricción alimentaria:***

Fig. 4.1. Placenta 14 DG. 70

Fig. 4.2 Placenta 17 DG. 71

Fig. 4.3 Placenta 20 DG. 72

#### ***Hematoxilina-Eosina Con y Sin Restricción Alimentaria:***

Fig. 4.4 Estructuras Placentarias de 14 DG. 73

Fig. 4.5 Región del Laberinto. 74

Fig. 4.6 Zona de Unión. 75

Fig. 4.7 Región de las Células Gigantes del Trofoblasto 76

#### ***InmunoHistoquímica:***

#### ***Óxido Nítrico Sintasa Inducido***

Fig. 4.8 iNOS – Región del Laberinto. 77

Fig. 4.9 iNOS – Zona de Unión. 78

Fig. 4.10 iNOS – Región de las Células Gigantes del Trofoblasto.	79
Fig. 4.11 iNOS – Región del Laberinto (Con y Sin Restricción Alimentaria).	80
Fig.4.12 iNOS – Zona de Unión (Con y Sin Restricción Alimentaria).	81
Fig. 4.13 iNOS – Región de las Células Gigantes del Trofoblasto (Con y Sin Restricción Alimentaria).	82
<b><i>Glutación Peroxidasas:</i></b>	
Fig. 4.14 GPX - Región del Laberinto.	83
Fig. 4.15 GPX - Zona de Unión.	84
Fig. 4.16 GPX - Región de las Células Gigantes del Trofoblasto	85
Fig. 4.17 GPX - Región del Laberinto (Con y Sin Restricción Alimentaria).	86
Fig. 4.18 GPX – Zona de Unión (Con y Sin Restricción Alimentaria).	87
Fig. 4.19 GPX – Región de las Células Gigantes del Trofoblasto (Con y Sin Restricción Alimentaria).	88
<b><i>Superóxido Dismutasa 1:</i></b>	
Fig.4.20 SOD1 - Región del Laberinto.	89
Fig. 4.21 SOD1- Zona de Unión.	90
Fig. 4.22 SOD1 - Región de las Células Gigantes del Trofoblasto	91
Fig. 4.23 SOD1 - Región del Laberinto (Con y Sin Restricción Alimentaria).	92
Fig. 4.24 SOD1 – Zona de Unión (Con y Sin Restricción Alimentaria).	93
Fig. 4.25 SOD1 – Región de las Células Gigantes del Trofoblasto (Con y Sin Restricción Alimentaria).	94

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

### 1.1 RESTRICCIÓN DEL CRECIMIENTO INTRAUTERINO

Se define conceptualmente como **Restricción del Crecimiento Intrauterino** (RCIU) al fracaso del feto en alcanzar el potencial de crecimiento genéticamente determinado durante el período intrauterino (Gabbe et al., 2004; Scifres & Nelson, 2009; Tapia & Ventura-Juncá, 2008). Desde el punto de vista epidemiológico, corresponde al feto que posee una estimación de peso menor al percentil 10 para una población determinada a cierta edad gestacional (Biri et. al., 2007; Burton et. al., 2009; Gabbe et al., 2004; Hracsko et al. 2008; Nien et al., 2002; Moller, 2009; Pérez & Donoso, 1999).

Previamente los términos de restricción del crecimiento intrauterino y **pequeños para la edad gestacional** (PEG) a menudo se usaban indistintamente. En la actualidad se da cuenta de que los dos no son sinónimos, debido a que no todos los recién nacidos PEG identificados en la vida neonatal a partir de las distribuciones del percentil representan una restricción del crecimiento durante el embarazo (Burton et. al., 2009; Nien et. al., 2002). Actualmente, la estimación del peso fetal se realiza mediante ecografía y considera parámetros como diámetro biparietal, circunferencia craneana y abdominal, longitud del fémur u otros huesos largos. Esto permite clasificar la RCIU por **severidad** en leve, moderado y severo, según la ubicación del peso fetal en los percentiles 10, 5 y 2, respectivamente en la tabla de Juez et al., vigente desde 1989. Otras clasificaciones utilizadas son según el **momento de diagnóstico** de la RCIU; en **precoz** (antes de las 28 semanas de Edad Gestacional o EG) y **tardía** (después de las 28 semanas de EG). Finalmente, según el **grado de compromiso antropométrico** del feto: **Simétrico o proporcionado** el cual es producto de noxas que afectan etapas tempranas de la gestación, como: alteraciones genéticas, infecciones y enfermedades preconcepcionales de la madre. A su vez, el feto **asimétrico o desproporcionado** es aquel que presenta un menor peso, pero un tamaño

craneal y longitud normal debido a que la noxa afecta etapas avanzadas de la gestación (Nien et. al., 2002; Moller, 2009; Moore, 2003; Pérez & Donoso E., 1999; Tapia & Ventura-Juncá, 2008).

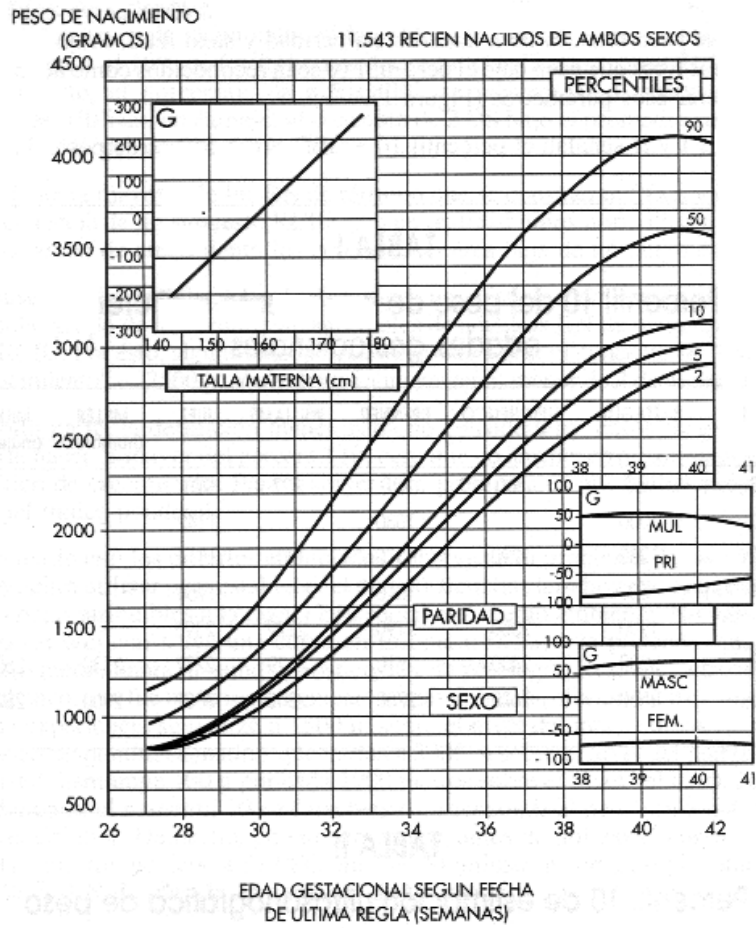
Para el diagnóstico, la combinación de la biometría fetal con la evaluación Doppler<sup>1</sup> de la arteria umbilical y cerebral media provee medios más precisos para identificar al feto con RCIU (Burton et al 2009; Scifres & Nelson, 2009; Tapia & Ventura-Juncá, 2008). Para la biometría fetal, la utilización de la curva de crecimiento intrauterina de nuestra población confeccionada por Juez et al. (1989) (**Gráfico 1.1**) combinada con los datos de Pittaluga et al. (2002), son los que suelen ser los referentes adecuados para determinar estas anomalías del crecimiento.

La incidencia de RCIU en Chile y en el mundo alcanzan entre el 3 al 10% de todos los embarazos (Hracsko et al., 2008; Nien et. al., 2002; Tapia & Ventura-Juncá, 2008), considerándose la segunda causa de mortalidad perinatal; y secuelas neurológicas en los recién nacidos, siendo su mortalidad de 6 a 10 veces superior con respecto a recién nacidos de crecimiento normal (Gabbe et al., 2004; Maulik, 2006; Hracsko et al. 2007; Nien et. al., 2002). Dicho riesgo es atribuible tanto para embarazos de término como de pretérmino. La mortalidad perinatal, es variable según los percentiles de peso a distinta edad gestacional (**Gráfico1.2**).

---

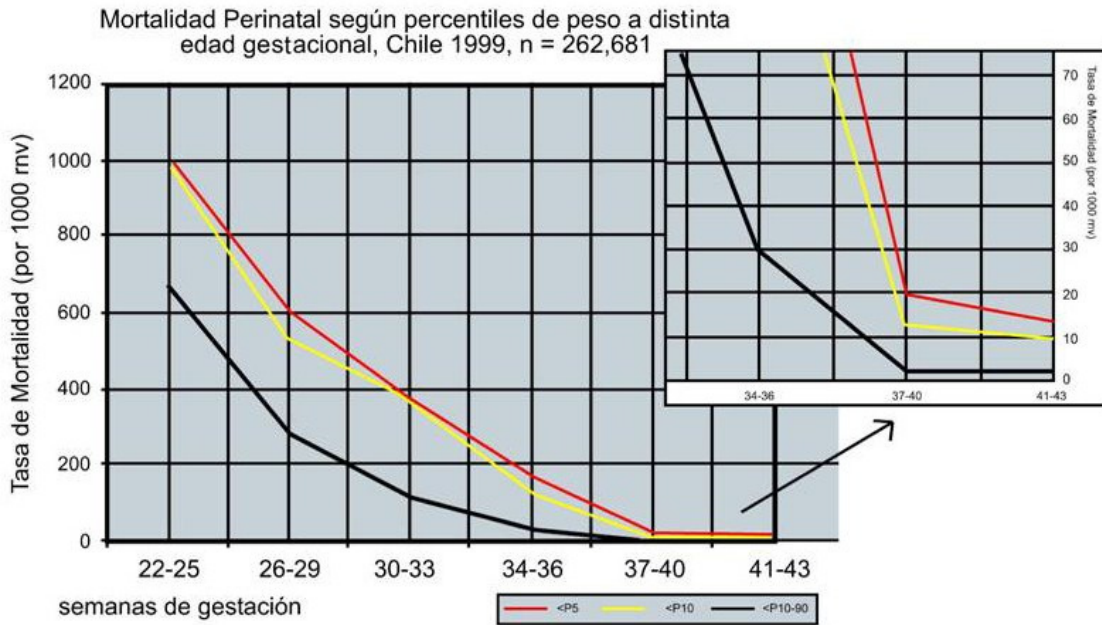
<sup>1</sup> **Doppler de Arterias uterinas:** evalúa la resistencia vascular de arterias tanto uterinas como cerebrales. Un incremento en la resistencia vascular (RV) se asocia a RCIU, ante un feto con estimación de peso fetal bajo p10 en ausencia de anomalía congénita y la presencia de líquido normal. La RV puede estar ausente o reversa cuando se eleva la RV Placentaria. (Tapia & Ventura-Juncá, 2008)

### CURVA DE CRECIMIENTO INTRAUTERINO EN RECIEN NACIDOS CHILENOS



**Grafico 1.1** Curva de Crecimiento Intrauterino en Recién Nacidos Chilenos.

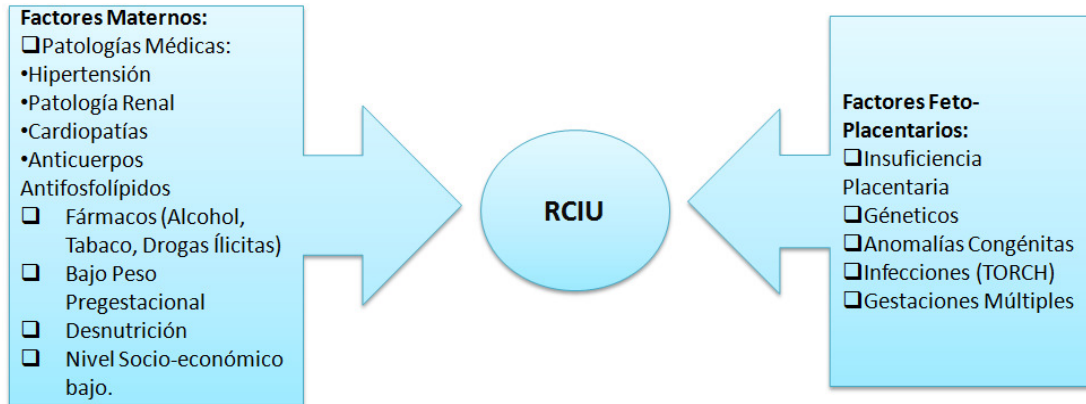
*Juez et al 1989.*



**Gráfico 1.2** Mortalidad Perinatal según percentiles de peso a distinta edad gestacional, Chile 1999.

*Nien et. al., 2002.*

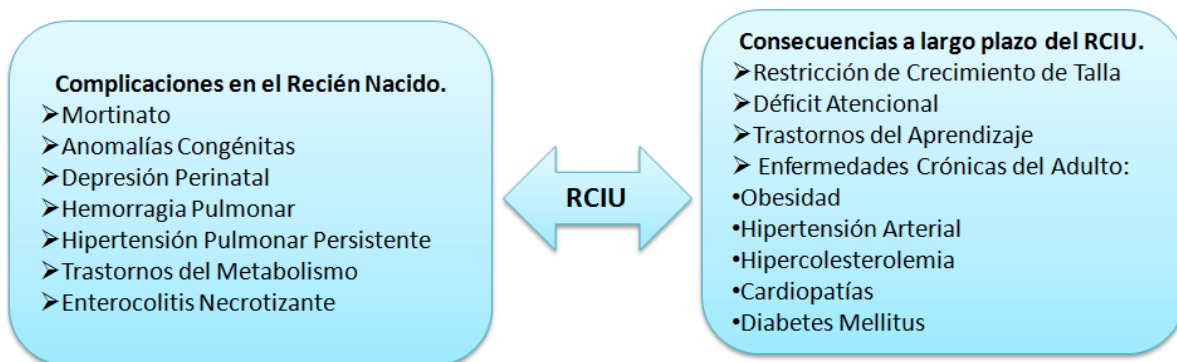
En la etiología y patogénesis de la RCIU se describen múltiples condiciones asociadas, pero principalmente se categorizan en un origen materno y origen feto-placentario, los cuales se dan a conocer en la (**Fig. 1.1**). El mecanismo común involucrado corresponde a alteraciones en el aporte de sustratos necesarios para la función celular normal y en los mediadores que regulan el crecimiento y diferenciación celular (Maulik, 2006; Tapia & Ventura-Juncá, 2008).



**Fig. 1.1** Causas de Restricción de Crecimiento Intrauterino.

*Adaptado de Nien et. al., 2002*

Entre las condiciones maternas asociadas a la RCIU aparece la **restricción alimentaria**, la cual puede tener efectos permanentes si ésta ocurre en un período crítico durante la etapa del desarrollo embrio-fetal, comprometiendo la supervivencia del feto y su adaptación neonatal. Estudios epidemiológicos sugieren que el estrés nutricional provocado por dicha restricción en la etapa prenatal, puede programar e incrementar el riesgo de sufrir enfermedades degenerativas que pueden ser observadas en la vida adulta (Albarrán et al, 2009; Barker et. al, 1989) resultando vital la óptima actividad placentaria (Krause et al., 2009). Las principales consecuencias a corto y largo plazo de la RCIU se observan en la (Fig. 1.2).



**Fig. 1.2** Consecuencias a corto y largo plazo de la RCIU.

*Adaptado de Tapia & Ventura-Juncá, 2008.*

## **1.2 PLACENTA HUMANA**

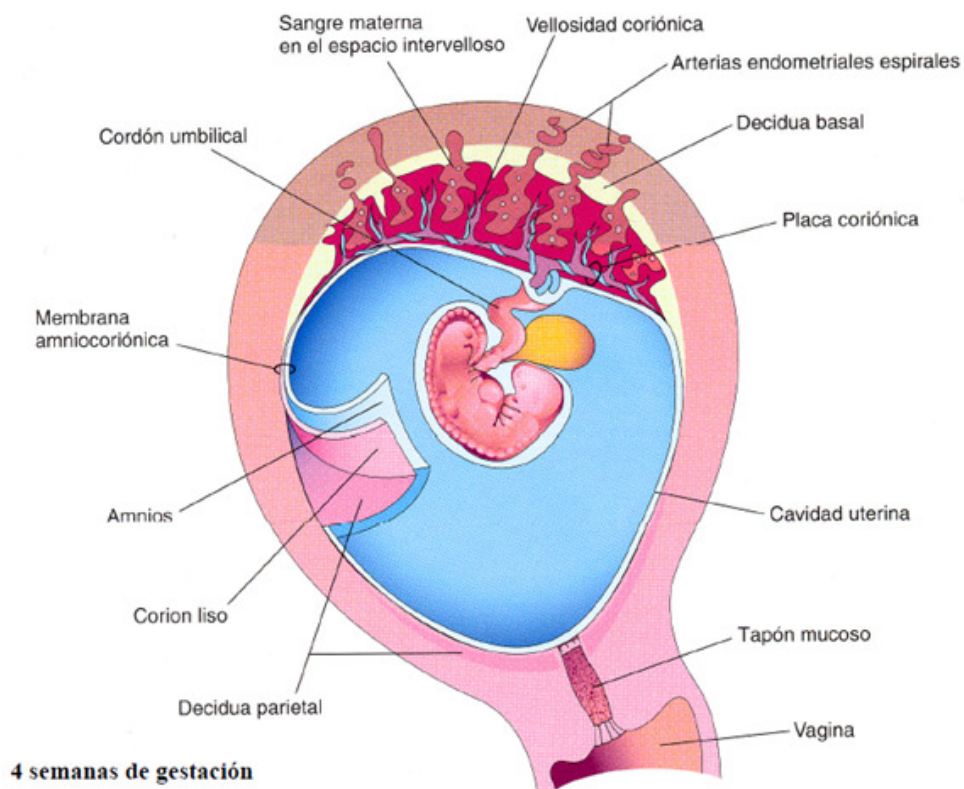
A los cuatro días post-fecundación, ocurre la cavitación de la **mórula**, la cual consiste en la formación de un espacio lleno de líquido llamado blastocele. En esta etapa de segmentación, el embrión se conoce como **blastocisto**, el cual consta de dos tipos de células: una capa superficial externa (**trofoblasto**), que rodea a un pequeño grupo interno de células llamadas **masa celular interna** o **embrioblasto**. Estas últimas células dan lugar al cuerpo del embrión propiamente tal más un número de estructuras extraembrionarias como: amnios, saco vitelino, alantoides y cordón umbilical. Por su parte las células del trofoblasto darán origen a la placenta y corión (Bruce M., 2003).

La **placenta** es un órgano que posee dos porciones; una **fetal** que se desarrolla a partir del saco coriónico, cuya apariencia es color gris brillante a causa de la membrana amniótica que lo cubre; y otra **materna**, la cual presenta una superficie rugosa de color rojo vinoso, que procede del endometrio, siendo este órgano el principal sitio de intercambio de nutrientes y gases entre la madre y el feto (**Fig. 1.3**) (Bruce M., 2003; Moore, 2004; Ross & Pawlina, 2007; Moller, 2009).

La placenta madura tiene forma de disco, con un grosor de 3 cm. y un diámetro aproximado de 20 cm., alcanzando normalmente al término de la gestación un peso de 500 grs. aproximadamente, siendo su rango normal entre 650 y 450 grs., correspondiendo a un sexto del peso fetal (Bruce M., 2003; Moller, 2009).

La **Cara Fetal** de la placenta está constituida por el corión, el que se une a la porción materna a través de la concha citotrofoblástica, que corresponde a una proliferación de células del citotrofoblasto, las cuales se extienden a través del sincitiotrofoblasto. Esta concha rodea completamente al embrión, saco coriónico y lo une al endometrio materno. Los vasos endometriales atraviesan las hendiduras de la concha citotrofoblástica, porción donde se inserta el cordón umbilical y es adyacente a la cavidad amniótica (Bruce M., 2003; Moller, 2009; Moore, 2004).

La **Cara Materna** de la placenta está constituida por la decidua basal y se adosa en el útero materno. Esta zona está subdividida hasta en 38 lóbulos. Los surcos entre los lóbulos están ocupados por tabiques placentarios, que surgen desde la decidua basal y se extienden hacia la placa coriónica. En el interior de cada lóbulo placentario hay varios cotiledones, cada uno de los cuales consta de una vellosidad principal en forma de tronco y sus ramas. El espacio intervelloso de cada lóbulo representa un compartimiento casi aislado de circulación materna hacia la placenta. (Bruce M., 2003; Moller 2009; Moore, 2004)



**Fig. 1.3** Estructura placentaria.

(Bosco, 2008)

Entre las **funciones de la placenta** se destacan la protección, nutrición, intercambio de gases, excreción y producción de hormonas. Respecto a la función de protección, en la placenta se producen cambios temporales a través de la gestación, en el primer trimestre hay seis capas en la barrera placentaria: sincitiotrofoblasto, capa citotrofoblástica interna discontinua, lámina basal del

trofoblasto, tejido conjuntivo, lámina basal del endotelio, endotelio de los capilares placentarios fetales de las vellosidad terciaria. Al término del embarazo sólo están presentes el trofoblasto, el endotelio capilar fetal y la lámina basal, la que disminuye su grosor, debido a la proliferación celular, acelerando el intercambio de nutrientes y desechos estimulado además por la creciente demanda fetal (Bruce M., 2003; Moller, 2009; Moore, 2004; Webster et al., 2008). Esta barrera protectora además de separar la sangre materna de la fetal también controla la transferencia placentaria ya que impide el paso libre e indiscriminado de sustancias (Bruce M., 2003; Moore, 2004).

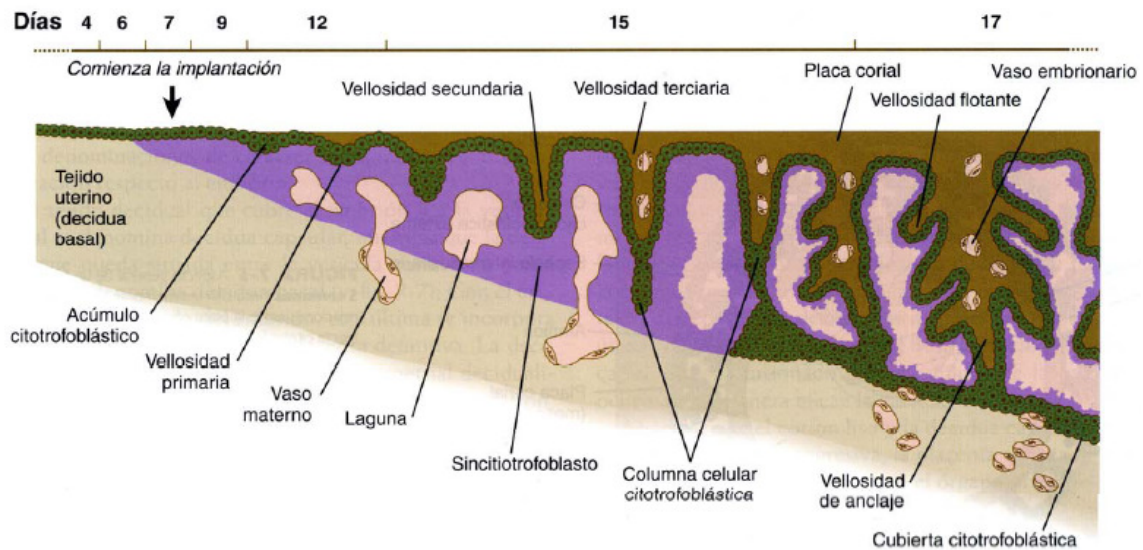
Hacia el final del embarazo, se forma el material fibrinoide en las superficies de las vellosidades que parece reducir la transferencia de nutrientes a través de la placenta (Moller, 2009; Moore, 2004).

### **1.2.1 Desarrollo Placentario:**

Hasta el comienzo de la octava semana, el saco coriónico a medida que crece, las vellosidades asociadas a la decidua capsular se comprimen, reduciendo su irrigación sanguínea. Estas vellosidades degeneran enseguida y originan una zona desnuda relativamente avascular denominado **corion liso**. Por otra parte, la zona que conserva las vellosidades, se denomina **corión frondoso**, siendo estas vellosidades las que se proyectan al espacio intervelloso que contiene la sangre materna. Por esta razón, la placenta humana se clasifica como **hemocorial** (Bruce M., 2003; Moore, 2004; Ross & Pawlina, 2007).

Estas vellosidades comienzan a formarse a partir de la segunda semana con las proyecciones del citotrofoblasto originando así las vellosidades primarias o primitivas. Posteriormente ocurre la invasión mesenquimática al principio de la tercera semana de gestación en el interior de la vellosidad en crecimiento. A partir de este momento pasan a denominarse vellosidades secundarias. Finalmente, hacia la tercera semana post- fecundación se forman las vellosidades terciarias

cuando en su núcleo mesénquimatoso se originan vasos sanguíneos y se ramifican en la tercera semana post fecundación. Éstos capilares se unen para formar una red arteriocapilar que se conecta con el corazón embrionario a través de los vasos del corion y el primordio del cordón umbilical. La sangre del embrión comienza a fluir lentamente a través de los capilares de las vellosidades coriónicas, por el corazón y los vasos sanguíneos del cuerpo del embrión (**Fig. 1.4**) (Bruce M., 2003; Moller, 2009).



**Fig. 1.4** Fases en la formación de las vellosidades coriónicas.

(Bosco, 2008)

La porción terminal de la vellosidad sigue siendo trofoblástica y consta de una masa sólida de citotrofoblasto denominada **columna de células citotrofoblásticas** y una cubierta relativamente delgada de sincitiotrofoblasto (Bruce M., 2003).

El desarrollo del vértice de la vellosidad ocurre en un ambiente hipóxico, donde crece la columna de células citotrofoblásticas distalmente, insertándose luego en la capa del sincitiotrofoblasto (Bruce M., 2003; Ross & Pawlina, 2007).

### **1.2.2 Espacio Interveloso:**

El corion formado por las vellosidades placentarias posee un revestimiento epitelial en el que se distinguen claramente dos capas derivadas del trofoblasto: Sincitiotrofoblasto y Citotrofoblasto. (Bruce M., 2003; González-Merlo, 2006; Young, 2008).

El ***sincitiotrofoblasto*** está constituido por una masa citoplásmica en la que no se distinguen límites celulares y los núcleos se distribuyen de manera uniforme. Contiene abundantes organelos y algunos productos de pinocitosis; con una importante actividad metabólica y endocrina. En el citoplasma se aprecian frecuentes vacuolas que contienen lípidos. Además sintetiza glucógeno, ácidos grasos y otras sustancias nutritivas utilizadas por el embrión mientras aún no se establece la circulación útero-placentaria. (Bruce M., 2003; González-Merlo, 2006; Ross & Pawlina, 2007; Scifres & Nelson, 2009).

En la superficie, el sincitiotrofoblasto posee microvellosidades de unos 3  $\mu\text{m}$  de longitud. El tamaño y la densidad de las microvellosidades no son constantes sino que cambian con la edad de la placenta y en función de las distintas condiciones ambientales. Por ejemplo, en casos de mala nutrición materna o transporte deficiente de oxígeno, el número de microvellosidades aumenta. *Una alteración en las microvellosidades del sincitiotrofoblasto puede estar asociada a recién nacidos con restricción del crecimiento intrauterino* (Bruce M., 2003; González-Merlo, 2006; Scifres & Nelson, 2009).

El ***citotrofoblasto*** está constituido por células de aspecto cuboide cuyos límites celulares son bien visibles, y provistas de núcleos redondos u ovoideos situados en el centro de la célula (Bruce M., 2003; González-Merlo, 2006).

En el interior de las vellosidades existe un estroma laxo escaso, con sustancia fundamental de aspecto mucoide y escasas células mesenquimáticas. Pueden

encontrarse células como fibroblastos, músculo liso, podocitos y en el estroma se observan células de morfología variable, redondas u ovoideas, denominadas **células de Hofbauer**. Éstas son macrófagos fetales de 10 a 30  $\mu\text{m}$  de diámetro y los cuales contienen gránulos y vacuolas. Se presume que desempeñan funciones inmunológicas ya que presentan receptores para inmunoglobulinas (Bruce M., 2003; González-Merlo, 2006; Moller, 2009).

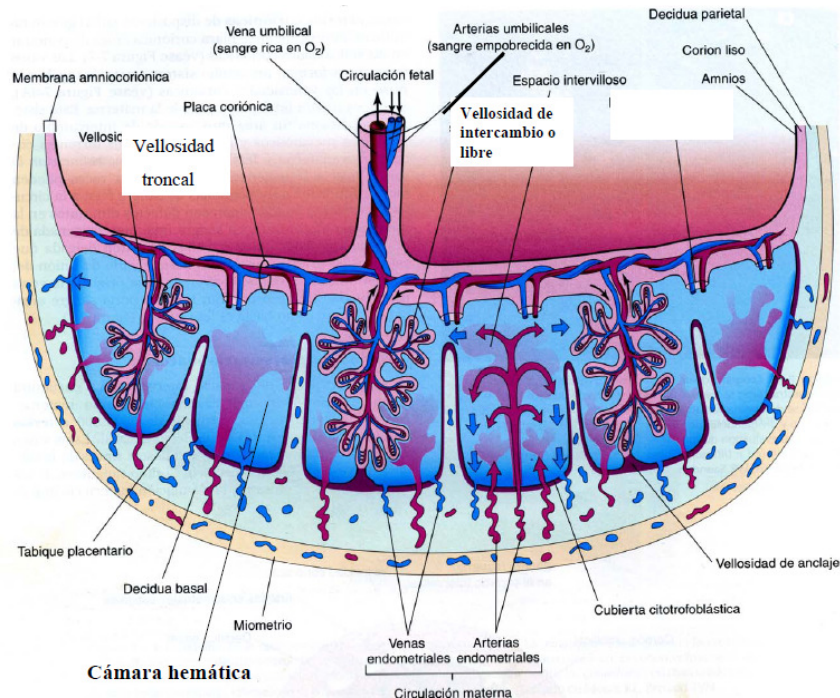
Los vasos de las vellosidades se desplazan a la periferia, y se observan zonas en la pared de éstas que se ponen en íntimo contacto con el sincitiotrofoblasto, constituyendo la membrana vasculosincitial, donde la sangre fetal y materna están separadas por una delgada capa de sincitiotrofoblasto, donde el endotelio vascular mide de 1 a 2  $\mu\text{m}$  de espesor (González-Merlo, 2006).

En el epitelio trofoblástico y separando a este del estroma, existe una membrana basal que se hace manifiesta desde la semana 34 al término de la gestación, y que se observa con un mayor espesor en las toxemias como hipertensión y diabetes, es decir, cuando existen una isquemia placentaria, pero probablemente el depósito de complejos antigénicos también participan en este aumento del grosor de la membrana basal (González-Merlo, 2006).

### **1.2.3 Circulación placentaria:**

Tanto el feto como la madre contribuyen a la circulación placentaria (**Fig 1.5**). La circulación fetal está compuesta por los vasos umbilicales y placentarios. La sangre fetal llega a la placenta a través de dos arterias umbilicales, ramificándose por toda la placa coriónica. Las ramas más pequeñas de dichas arterias entran en las vellosidades coriónicas y se dividen en redes de capilares y en las ramas terminales de las vellosidades coriónicas, logrando así el intercambio de nutrientes, gases y desechos con la sangre materna. Desde el lecho capilar velloso, los vasos sanguíneos se agrupan en ramas venosas, las cuales recorren

inversamente el camino a través de la placa coriónica hacia la vena umbilical única y hacia al feto (Bruce M., 2003).



**Fig. 1.5** Estructura y circulación de la placenta humana madura

(Bosco, 2008).

El abastecimiento de la sangre materna a la placenta es un flujo libre el cual no está limitado por paredes vasculares. Como resultado de la actividad invasora del trofoblasto, entre 80 y 100 arterias espirales uterinas se abren directamente a los espacios intervillosos, bañando las vellosidades con 150 ml de sangre materna aproximadamente, pudiendo llegar a contener hasta 600 ml/min, la cual se recambia 3 a 4 veces por minuto.(Bruce M., 2003; Moller, 2009).

Las arterias del endometrio experimentan cambios adaptativos durante la gestación con el fin de entregar un flujo sanguíneo óptimo a la placenta. Durante las primeras semanas del embarazo, las células trofoblásticas invaden las paredes vasculares reemplazando sus capas íntimas, elásticas y células musculares por el

material fibrinoide. Esto permite controlar el flujo sanguíneo que llega al embrión en desarrollo, ya que evita su desprendimiento por las posibles turbulencias del flujo sanguíneo. Este proceso aumenta entre la 9° y 14° semana de gestación, alcanzando incluso los vasos del miometrio lo que permite crear un sistema vascular de baja presión sin elementos contráctiles, y que por tanto no se ve influenciado por cambios hemodinámicos debido a vasopresores, lo que garantiza un flujo sanguíneo constante y adecuado para el feto en desarrollo (Moller, 2009).

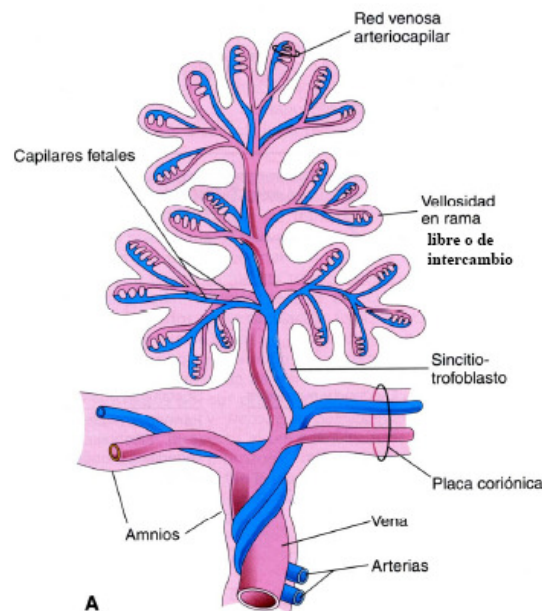
Una de las principales funciones fisiológicas de la conversión de las arterias espirales, es quitar el musculo liso del segmento terminal de éstas, lo que garantiza el flujo ininterrumpido de la placenta. De no hacerlo, la placenta tendría mayor riesgo de isquemia-reperusión de tipo injuria, que es un poderoso estímulo para la generación de estrés oxidativo el cual explicaremos más adelante (Burton et al., 2009).

La sangre materna entra en el espacio intervelloso a una presión reducida por los tapones de fibrina, formados en el sector abembrionario, del citotrofoblasto que ocluyen las arterias espirales. Sin embargo, la presión es suficiente para forzar el paso de la sangre arterial materna oxigenada hacia las bases de las ramificaciones vellosas de la placa coriónica. Desde este lugar, la sangre se filtra sobre las vellosidades terminales a medida que regresan hacia el drenaje venoso en la placa decidual de la placenta (Bruce M., 2003; Larsen, 2003).

El espacio intervelloso es una zona que se encuentra llena de sangre formada por la unión de las redes lacunares. La irrigación es proporcionada por las arterias endometriales, las cuales se encuentran en toda la superficie de la decidua basal, aportando oxígeno y nutrientes; y el drenaje ocurre a través de las venas endometriales, las cuales transportan los productos de desecho, como dióxido de carbono, sales y productos del metabolismo proteico (Bruce M., 2003; Moore, 2004).

El bienestar del embrión y del feto depende de una adecuada irrigación de las vellosidades por la sangre materna, la que debe ser de alto flujo y de baja resistencia. La reducción de la circulación útero-placentaria promueve consecuencias como la hipoxia fetal, restricción del crecimiento intrauterino, entre otros (Moore, 2004).

Este proceso ocurre en el espacio intervelloso a través de las membranas de las vellosidades secundarias, proporcionando la superficie de intercambio entre la circulación materno-fetal (**Fig.1.6**). Estas vellosidades en su estructura contiene el sistema arterio-capilar-venoso del cual se originan las arterias y vena umbilicales.



**Fig. 1.6** Esquema de una vellosidad troncal y sus ramificaciones en vellosidades de intercambio.

(Bosco, 2008)

### 1.3 ESTRÉS OXIDATIVO

El **estrés oxidativo** (EO) es la consecuencia de un desequilibrio intracelular dado por el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o la deficiencia de la capacidad de las defensas antioxidantes (**Fig. 1.7**). Dichas especies reactivas se pueden producir en un metabolismo aerobio incluso en condiciones basales (Abilés, 2007; Avello, 2006; Biri et. al., 2007; Castillo, 2005; Grupta et al., 2004; Hracsko et al. 2007; Myatt & Cui, 2004; Rukavina et. al., 2006; Saker et al., 2008; Umekawa et al., 2007; Valko et. al., 2007; Yuan et al., 2008).



**Fig. 1.7** Ejemplificación de Estrés Oxidativo.

El estrés oxidativo podría ser relevante para varios procesos metabólicos y modulación de señales, afectando la fisiopatología humana del desarrollo intrauterino y durante toda la vida (Gveric-Ahmetasevic et al., 2009).

El embarazo de por sí es un estado de estrés oxidativo debido a la mayor actividad metabólica de las mitocondrias de la placenta y dependiendo de la respuesta de compensación de los sistemas antioxidantes (Albarrán et al., 2009; Gutiérrez, 2005; Kressig et al., 2008; Myatt & Cui, 2004; Roberts et al., 2008; Saker et al., 2008; Umekawa et al. 2008).

Dicho incremento de la carga prooxidante, la magnitud y extensión de ésta en conjunto con la respuesta compensatoria antioxidante que desarrolla la madre y el feto es una de las principales diferencias entre un embarazo fisiológico o con alguna patología como Preclampsia (PE), Rotura Prematura de Membranas (RPM) y Restricción de Crecimiento Intrauterino (RCIU), Malformaciones Congénitas, pudiendo además estar relacionado con el éxito o fracaso de la gestación (Gutiérrez, 2005; Gveric-Ahmetasevic et al., 2009; Kressig et al., 2008; Myatt & Cui, 2004; Rukavina et. al., 2006).

En un embarazo normal se generan respuestas antioxidantes compensatorias ante el incremento de la carga prooxidante, surgiendo mecanismos antioxidantes no enzimáticos para la protección embrionaria en el líquido folicular y tubario, tales como: hipotaurina, taurina y ácido ascórbico. Además de un incremento en la actividad de las enzimas placentarias antioxidantes como CAT, GPX, SOD y gamma-glutamilcisteína sintetasa (Gutiérrez, 2005).

La placenta es la mayor fuente de radicales libres en el embarazo. Durante el embarazo temprano, la carga oxidativa materna está incrementada por la secreción de peróxidos lipídicos, resultando en un daño oxidativo en el compartimento materno que se amplifica al placentario mediante la reducción de la actividad enzimática antioxidante como SOD. Las altas concentraciones de peroxidasa lipídica en la placenta y cordón umbilical tienen correlación con la aparición de hipertensión inducida por el embarazo y RCIU (Biri et al., 2007; Saker et al., 2008).

Durante el embarazo se requiere de energía suplementaria para el crecimiento del feto, la placenta y los tejidos maternos, lo que lleva a su vez al incremento gradual del consumo de oxígeno. Entre la 8<sup>a</sup> y 12<sup>a</sup> semana de gestación ocurre un aumento de la presión parcial de oxígeno se eleva abruptamente en la circulación arterial materna coincidiendo con cambios morfológicos en las arterias uterinas, formación de residuos de nitrotirosina y la desorganización de las crestas

mitocondriales dentro del sincitiotrofoblasto; alteraciones que nos indican que mientras se establece la circulación materno-fetal ocurre un aumento del estrés oxidativo placentario (Gutiérrez, 2005; Myatt & Cui, 2004).

La placenta crece rápidamente durante el segundo o tercer trimestre cuando la capacidad antioxidante materna está limitada para hacer frente al estrés oxidativo adicional impuesto por la placenta. (Biri et al., 2007; Saker et al., 2008).

El aumento de la resistencia vascular en la placenta tiende a resultar en la reducción de la perfusión útero-placentaria, causando la hipoxia o isquemia placentaria en RCIU y Preeclampsia. Un estado de hiperoxia aumenta los niveles de ROS lo que conduce a un daño oxidativo del DNA. Por tanto, este daño es debido a la isquemia/reperfusión y/o hiperoxia pudiendo subyacer en el desarrollo del RCIU (Biri et al., 2007; Saker et al., 2008).

La producción excesiva de especies reactivas de oxígeno fisiológicamente puede producirse durante ciertos periodos del desarrollo placentario y patológicamente en asociación con condiciones como la PE, Diabetes, Tabaquismo, Deficiencia Nutricional, infección /Inflamación, Parto Prematuro, en las que el crecimiento del feto puede verse afectado (Roberts et al., 2009; Saker et al., 2008; Umekawa et al., 2008).

El estrés oxidativo podría ser la causa de la RCIU, es por esto que algunos autores plantean que el uso de una terapia antioxidante puede ser considerado como una modalidad profiláctica/terapéutica para la prevención de la RCIU secundaria a la malnutrición materna (Kumar et al., 2008).

La desnutrición implica no sólo la deficiencia de macronutrientes, es decir, grasas, proteínas, hidratos de carbono, sino también de la concentración de la mayoría de micronutrientes subfisiológicos. Muchos de los sistemas de defensa antioxidantes dependen de micronutrientes o lo son en sí mismos. Por lo que resulta

fundamental, la dieta equilibrada, ya que es la mayor fuente de nutrientes con propiedades antioxidantes o que resultan esenciales para la síntesis de éstos. Es por esto que la dieta materna, en particular, la ingesta de micronutrientes puede desempeñar un papel clave en determinar la eficiencia de las defensas antioxidantes de la placenta (Abilés, 2007; Burton et al., 2009).

### **1.3.1 Radicales Libres**

Los **radicales libres** son especies químicas que poseen un electrón desapareado de oxígeno molecular en su última capa, lo que le permite reaccionar con moléculas de todo tipo, primero oxidándolas y después modificando su estructura. Este electrón desapareado usualmente da un grado considerable de reactividad a los radicales libres (Myatt & Cui, 2004; Rukavina et. al., 2006; Valko et. al., 2006).

Numerosos sistemas biológicos son capaces de generar radicales libres *in vivo*, a través de enzimas que se activan en procesos fisiológicos favoreciendo la producción de metabolitos tóxicos del oxígeno, como por ejemplo: xantina oxidasa, NADPH/NADH oxidasas, acil CoA oxidasa, óxido nítrico sintetasa (NOS), entre otras. También se incluyen el citocromos P-450, pequeñas moléculas prooxidantes como las catecolaminas, quinonas tioles, flavoproteínas y organelos celulares en los que se incluyen mitocondrias, cloroplastos, la membrana plasmática y la acción fagocítica de macrófagos y monocitos (Abilés, 2007; Avello, 2006; Ceballos et al., 2006; Chen et al., 2009; Myatt & Cui, 2004).

Los radicales libres participan en diversas funciones biológicas, por ejemplo activan a las proteínas AP-1 y AP-2 los cuales modulan la proliferación celular y la morfogénesis, son capaces de modular la proteína quinasa C (PKC) que influye en el crecimiento celular, la activación de citocinas y la angiogénesis (Ceballos et al., 2006).

Existen además fuentes exógenas que contribuyen al aumento de los radicales libres tales como la exposición a rayos X, contaminación ambiental, humo de tabaco, hidrocarburos halogenados, antibióticos, quimioterapia, ácidos grasos trans, entre otros (Abilés, 2007; Avello, 2006).

El delicado balance entre los efectos beneficiosos y nocivos de los radicales libres es un aspecto muy importante en los organismos vivos, y esto es logrado por el mecanismo “Redox”, el cual protege a éstos del estrés oxidativo y mantiene la **homeostasis redox** (Gveric-Ahmetasevic et al., 2009; Valko et al., 2006), lo cual se detallará en el capítulo de antioxidantes.

Las moléculas susceptibles a la presencia de radicales libres son los lípidos, carbohidratos, proteínas y el DNA (Abilés, 2007; Albarrán et al., 2009; Avello, 2006; Hracsko et al., 2007; Kressig et al., 2008; Myatt & Cui, 2004; Rukavina et al., 2006; Saker et al., 2008).

Los radicales libres pueden clasificarse dependiendo de su origen molecular en: derivados de oxígeno (ROS), o de nitrógeno (RNS) (Rukavina et al., 2006; Valko et al., 2006).

### **1.3.2 Especies reactivas de oxígeno (ROS)**

La vida en condiciones aeróbicas tiene como consecuencia inevitable la producción de formas parcialmente reducidas del oxígeno (O<sub>2</sub>) llamadas **especies reactivas del oxígeno** (ROS), destacándose el anión superóxido, radicales de hidroxilo, peróxido, alcoholóxido, además de especies no radicalarias derivadas del oxígeno como lo es el peróxido de hidrógeno cuya alta reactividad y poder oxidante, las hacen nocivas para la célula (Castillo, 2005; Circu & Yee Aw; 2009; Ramírez & Pedraza- Reyes, 2005).

Los **efectos nocivos** de los radicales libres causan un potencial daño biológico que se denomina estrés oxidativo. El exceso de ROS puede dañar los lípidos celulares, proteínas o el DNA inhibiendo su funcionamiento normal (Castillo, 2005; Ramírez & Pedraza- Reyes, 2005; Rukavina et. al., 2006; Valko et al., 2006).

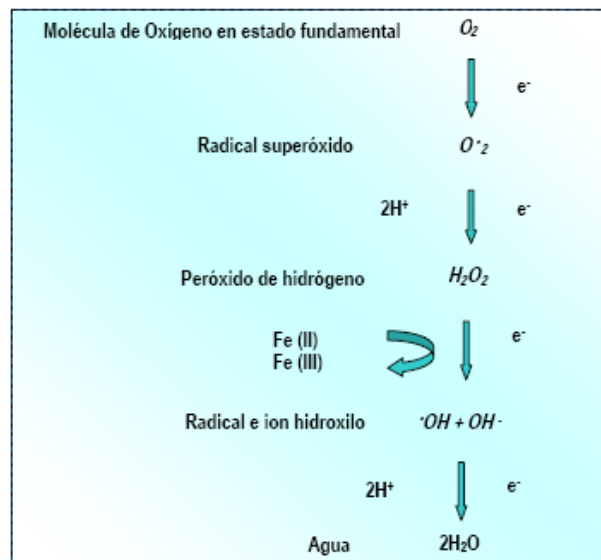
Una fuente orgánica productora de ROS es la placenta, en la cual se sintetiza el óxido nítrico, monóxido de carbono y peroxinitrito, los cuales con capaces de alterar la función placentaria, del trofoblasto y la reactividad vascular (Gutiérrez, 2005).

El metabolismo embrionario también es capaz de originar ROS, como el anión superóxido principalmente, que pueden ocasionar retardos en el desarrollo embrionario o blastocistos morfológicamente anormales (Gutiérrez, 2005; Myatt et. al., 2004; Rukavina et. al., 2006).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se caracterizan por tener un doble rol, ya sea por ejercer efectos nocivos o beneficiosos en los sistemas vivientes. Dentro de los **efectos beneficiosos** está su participación en la transducción de señales, en la inmunidad contra ciertos patógenos y respuesta celular a las noxas. Se han acumulado evidencias que afirman que los radicales libres y el conjunto de especies reactivas que se les asocian, juegan un papel central en nuestro equilibrio homeostático (Avello, 2006; Circu & Yee Aw; 2009; Myatt & Cui, 2004; Valko et al., 2006).

La mitocondria es la principal fuente de ATP y a su vez, la mayor fuente intracelular de ROS. Del total de oxígeno consumido en la mitocondria, el 1-3% es desviado para la formación de ROS en vez de contribuir a la reducción del oxígeno a agua (**Fig. 1.8**), para lo cual es necesario añadir 4 electrones (e-) y 4 protones (H+). Esto ocurre principalmente a nivel del complejo I y III de la cadena transportadora de electrones, una vez formados y al estar fuertemente cargados les simplifica cruzar el interior de la membrana mitocondrial. Los derivados de

oxígeno en la mitocondria son dismutados a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) por el superóxido manganeso dismutasa en la presencia de iones metálicos. La reactividad de los radicales hidroxilos se vuelve más alta por la reacción Fenton o Haber-Weiss, infligiendo un daño significativo para las proteínas, lípidos y DNA. (Abilés, 2007; Avello, 2006; Castillo, 2005; Ceballos et al., 2006; Circu & Yee Aw; 2009; Gutiérrez, 2005; Myatt & Cui, 2004; Rukavina et. al., 2006; Valko et al., 2006).



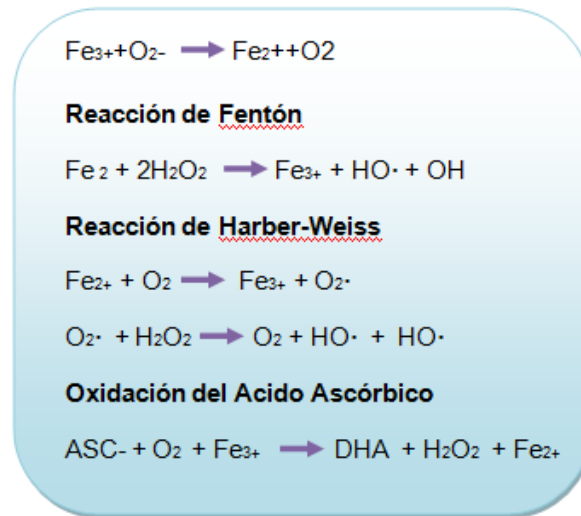
**Fig. 1.8** Metabolización del Oxígeno molecular hasta agua.

(Abilés, 2007)

El estado redox de las células es vinculado al hierro y cobre, los que aceleran procesos oxidativos, ya que contienen un electrón desapareado. La regulación del hierro asegura que no hay hierro libre intracelular, sin embargo, bajo condiciones de estrés, un exceso de superóxido libera hierro al plasma (Abilés, 2007; Avello, 2006; Ceballos et al., 2006; Valko et. al., 2006).

La liberación de  $Fe^{+2}$  puede participar en la reacción Fenton o Haber-Weiss (**Fig. 1.9**), donde el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en presencia de metales de transición en estado reducido como Fe (II), Cu (I) y Ni (II), es transformado en otra especie más reactiva, el radical hidroxilo ( $HO^*$ ), que corresponde uno de los agentes

oxidantes más potentes, actuando en sus sitios de formación, capaz de oxidar casi cualquier molécula biológica. A su vez ataca directamente los lípidos de membrana, e inicia su peroxidación, proceso que tiene como consecuencia la disminución en la fluidez de la membrana y, con ello, la alteración de sus propiedades e interacción con proteínas (Abilés, 2007; Avello, 2006; Castillo, 2005; Valko et. al., 2006).



**Fig. 1.9** Esquema de formación de radicales hidroxilos ( $\text{OH}\cdot$ ) debido al efecto catalítico del hierro.

(Morales et al., 2008)

En la reacción de Haber-Weiss bajo condiciones de estrés, el  $\text{O}_2^-$  actúa como oxidante del grupo de enzimas  $[4\text{Fe}-4\text{S}]$  lo cual facilita la producción de  $\cdot\text{OH}$  desde  $\text{H}_2\text{O}_2$  haciendo disponible el  $\text{Fe}^{+2}$  para la reacción de Fenton (Valko et. al., 2006).

La re-reducción y reciclaje de los iones hierro y cobre son catalizadas in vivo por el  $\text{O}_2^-$  y el ión ascorbato (Abilés, 2007; Avello, 2006).

La molécula de oxígeno ( $\text{O}_2$ ) es en sí mismo es un radical y tiene una configuración única. La adición de un electrón al  $\text{O}_2$  forma el anión superóxido

(O<sub>2</sub><sup>-</sup>) dentro de la mitocondria de la célula, específicamente por macrófagos, neutrófilos, leucocitos, fibroblastos, y células del endotelio vascular. El anión superóxido, deriva de cualquier proceso metabólico o como consecuencia de la activación del oxígeno por irradiación física, considerándose como **ROS primario**, el cual puede interactuar con otras moléculas para generar **ROS secundarios**, directa o prevalentemente por procesos catalizadores enzimáticos o por metales. (Abilés, 2007; Avello, 2006; Gutiérrez, 2005; Myatt & Cui, 2004; Valko et. al., 2006; Webster et al., 2008).

El **Superóxido** tiene un rol importante en la placenta, en particular regula la expresión de la sensibilidad de genes redox, implicados en los eventos de señales que regulan los factores de transcripción, producción de antioxidantes, angiogénesis, proliferación y remodelación de la matriz, involucrándolo en la fisiología de una variedad de enfermedades (Myatt & Cui, 2004; Valko et. al., 2006; Webster et al., 2008).

Las enzimas que generan superóxido son: la Nicotina adenina dinucleotida fosfato oxidasa (NAD(P)H) la (NOX), pero la mayor fuente de superóxido en muchos tipos de células es la xantina oxidasa (XO) y NOS (Myatt & Cui, 2004; Valko et. al., 2006; Webster et al., 2008).

La **NAD(P)H oxidasa** es la enzima prooxidante característica de los neutrófilos, macrófagos y monocitos, donde esta produce generadores de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, siendo donante de electrones para la reducción de glutatión reducido (GSH) y el estado redox *Tioredoxina* (TRX) (Circu & Yee Aw, 2009; Myatt & Cui, 2004; Valko et. al., 2006).

La **Xantina oxidasa** (XO) y la **xantina deshidrogenasa** (XD), que originan al anión superóxido y NADH respectivamente, son formas interconvertibles de la misma enzima conocida como xantina oxido-reductasa (XOR). En el catabolismo de las purinas, XOR cataliza la hidroxilación oxidativa de la hipoxantina a xantina y subsecuentemente de xantina a ácido úrico, un potente antioxidante y generador

de radicales libres, acompañado de la producción del anión superóxido. XOR tiene por tanto, funciones importantes como enzima protectora de las células contra el estrés oxidativo (Valko et. al., 2006).

Con el origen de las formas XO y XD, pero particularmente con la forma de XO, numerosos ROS y RNS son sintetizados. Así la síntesis de antioxidantes (ácido úrico) y numerosos radicales (ROS y RNS) hacen de XOR un importante regulador y protector del potencial redox de la célula (Biri et al., 2007; Ceballos et al., 2006; Myatt & Cui, 2004; Valko et. al., 2006).

La isquemia-reperfusión e hipoxia pueden aumentar la conversión de xantina deshidrogenasa a la forma oxidasa en el endotelio y en la placenta, y éste último promueve la producción de ROS durante la degradación de purinas (Biri et al., 2007).

Es sabido que los peroxisomas producen  $H_2O_2$ , pero no  $O_2^-$ , bajo condiciones fisiológicas, siendo el mayor sitio de consumo de oxígeno en la célula y participando en varias funciones metabólicas que usan oxígeno. (Biri et al., 2007; Ceballos et al., 2006; Myatt & Cui, 2004; Valko et. al., 2006).

El oxígeno consumido en los peroxisomas es un indicador de la producción de  $H_2O_2$ , el cual es usado para oxidar a varias moléculas. El peroxisoma también contiene catalasa, la que descompone el  $H_2O_2$  y presumiblemente previene de la acumulación de este tóxico componente, manteniendo este delicado balance (Valko et. al., 2006).

Cuando los peroxisomas son dañados, su consumo de  $H_2O_2$  y las enzimas reguladoras disminuyen. Libera  $H_2O_2$  en el citosol el cual es significativamente contribuyente al estrés oxidativo (Circu & Yee Aw, 2009; Myatt & Cui, 2004; Valko et. al., 2006;).

El radical hidroperóxido ( $\text{HO}^*_2$ ) es el ácido conjugado del anión superóxido, el cual participa en la formación del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a través de una reacción catalizada o no por la enzima superóxido dismutasa (SOD). Además, el  $\text{HO}^*_2$  es más reactivo frente a las moléculas siendo capaz de iniciar la peroxidación lipídica (Abilés, 2007; Avello, 2006).

El balance redox es importante para el desarrollo de numerosos procesos patológicos, en particular asociado con la peroxidación lipídica. (Gveric-Ahmetasevic et al., 2009).

Los productos de la peroxidación lipídica son medidos como un índice generador de radicales libres de oxígeno. Malondialdehído (MDA) es uno de esos subproductos generados en los tejidos por la lesión de los radicales libres durante la peroxidación lipídica. Su nivel se considera como el indicador de la intensidad del efecto de los radicales libres en el cuerpo (Biri et al., 2007; Grupta et al., 2004; Karowicz et al., 2007; Rukavina et. al., 2006).

Durante los embarazos complicados por la RCIU, la concentración de MDA en el líquido amniótico es elevada y la capacidad antioxidante normal en el plasma es menor que en un embarazo normal. El estrés oxidativo induce a tener un recién nacido PEG y a su vez su madre manifiesta un incremento en la peroxidación lipídica y daño en las proteínas (Saker et al., 2008).

### **1.3.3 Especies Reactivas de Nitrógeno (RNS)**

El **óxido nítrico** ( $\text{NO}^\bullet$ ) es una pequeña molécula que contiene un electrón desapareado, por tanto un radical. El  $\text{NO}^\bullet$  es generado de manera biológica por tejidos, el óxido nítrico sintasa (NOS), el cual convierte la L-arginina en presencia de oxígeno en L-citrulina y NO. Se han aislado tres isoformas de óxido nítrico sintasa: enzima neuronal constitutiva (nNOS), isoforma inducible (iNOS) y la

enzima constitutiva endotelial (eNOS). (Alemán et al., 2008; Rukavina et. al., 2006; Valko et. al., 2006).

La nNOS y eNOS se expresan constitutivamente y su actividad está regulada por la concentración intracelular de calcio, la isoforma iNOS es expresada en macrófagos con estimulación de los lipopolisacáridos, citoquinas y otros agentes. (Valko et. al., 2006).

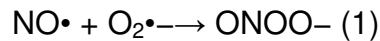
NO• tiene una vida media de solo algunos segundos en medio acuoso. El NO• presenta una gran estabilidad en su desarrollo con una baja concentración de oxígeno. Sin embargo, por su origen acuoso y medio lipídico, éste fácilmente difunde por el citoplasma y el plasma de las membranas. El NO• reacciona con el oxígeno y con el agua para formar los aniones nitrato y nitrito. (Valko et. al., 2006).

El óxido nítrico (NO•) es un radical reactivo muy abundante el cual actúa en importantes oxidaciones biológicas, señalización de moléculas en una gran variedad de procesos biológicos, incluyendo la neurotransmisión, neuromodulador del sistema nervioso central y periférico, la regulación de la presión sanguínea, mecanismos de defensa, la relajación muscular y la regulación inmunológica (Calderón- Cortés et. al., 2005; Valko et. al., 2006).

Por otro lado, participa en la invasión trofoblástica extravascular de la decidua y miometrio, y la apoptosis trofoblástica, regula el flujo sanguíneo útero-placentario y feto-placentario, induce a la vasodilatación, inhibe la agregación de neutrófilos, además de la adhesión de plaquetas a las células endoteliales (Valko et. al., 2006).

El óxido nítrico tiene una función antioxidante, aunque en procesos inflamatorios, éste compite con la superóxido dismutasa (SOD) por reaccionar, rápidamente en una difusión controlada, con el anión superóxido, dando lugar a la formación del **peroxinitrito** (ONOO<sup>-</sup>), un prooxidante más poderoso incluso que sus dos

moléculas originarias, el NO y O<sub>2</sub>. Éste tiene como función estimular diferentes procesos proinflamatorios, oxidando lípidos y proteínas (Abilés, 2007; Castillo, 2005; Gutiérrez, 2005; Myatt, 2004; Roberts et al., 2009; Valko et. al., 2006; Webster et al., 2008)



Durante su formación los niveles de NO• se agotan a nivel placentario y particularmente en la vasculatura fetal-placentaria. Ésta puede ser localizada de forma indirecta a este nivel a partir de la presencia de residuos de nitrotirosina. (Valko et. al., 2006; Webster et al., 2008).

Su reactividad, al ser limitada con la mayoría de las moléculas, hace que sea extraordinariamente selectiva como oxidante. (Alemán et al., 2008; Karowicz et al., 2007; Valko et. al., 2006; Webster et al., 2008).

El peroxinitrito puede causar fragmentación del DNA, nitrando las bases de éste, como en el caso de la guanina; también puede originar la oxidación lipídica e interviene en la etapa de nitración de los residuos de la tirosina sobre las proteínas al cambiar la configuración y función. (Abilés, 2007; Alemán et al., 2008; Gutiérrez, 2005; Karowicz et al., 2007; Myatt, 2004; Roberts et al., 2009; Valko et. al., 2006; Webster et al., 2008).

A partir de lo anteriormente mencionado, se puede decir que el balance o interacción entre el superóxido y el óxido nítrico es importante en la determinación de los efectos fisiológicos del NO (Webster et al., 2008).

Las **especies reactivas de nitrógeno** (RNS) son productos del metabolismo celular. Las RNS son bien reconocidas por jugar un doble rol como originadores de especies deletéreas y beneficiosas. En bajas a moderadas concentraciones cumple un rol fisiológico en la respuesta celular a las noxas como por ejemplo en

la defensa contra agentes infecciosos, en función de un número notable de vías de celulares, y de inducir respuestas mitogénicas (Valko et. al., 2006).

A la sobreproducción de éstas se llama **Estrés Nitrosativo** (EN). Esto evento ocurre cuando la generación de las RNS en un sistema es superior a los mecanismos para neutralizarlos y eliminarlos. El EN dirige las reacciones de nitrociación que puede alterar las estructuras protéicas y también inhibir su funcionamiento normal. (Valko et. al., 2006; Webster et al., 2008).

### **1.3.4 Antioxidantes**

Los **antioxidantes** son sustancias endógenas o exógenas capaces de neutralizar la reactividad de los radicales libres sin desestabilizar su propia estructura, manteniendo el balance esencial para la sobrevivencia de los organismos y su salud (Abilés, 2007; Avello, 2006; Castillo, 2005; Valko et. al., 2006).

Los mecanismos de defensas contra los radicales libres inducidos por el estrés oxidativo involucran: mecanismo de prevención y reparación, defensa física y antioxidantes de defensa (Valko et. al., 2006).

El sistema de primera línea o **antioxidantes primarios** contra las ROS son de *carácter enzimático* los que actúan protegiendo el citoplasma, la membrana celular y el núcleo, mediante un **sistema de óxido-reducción** (redox) eliminando principalmente el  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  antes de que interactúen y originen el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) (Gutiérrez, 2005; Grupta et al. 2004; Valko et. al., 2006).

En estas enzimas se incluyen la **Superóxido Dismutasa** (SOD), **Catalasa** (CAT), **Glutathion Peroxidasa** (GPX) y **Tioredoxina** (TRX) (Abilés, 2007; Biri et al., 2007; Castillo, 2005; Closs, 2006; Grupta et al. 2004).

La SOD se encarga de mantener concentraciones no tóxicas del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) al transformarlo por dismutación en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el cual es removido por la GPX o CAT. Se ubica en todo el organismo, a nivel del citoplasma y está en forma de proenzima que dependiendo de los iones metálicos que contienen en su centro activo originará tres isoformas: en presencia del ion manganeso (Mn) activa el complejo MnSOD el cual se encuentra en la matriz mitocondrial; en presencia de Zinc (Zn) y Cobre (Cu) activa el complejo CuZnSOD ubicándose en el citosol celular; y una isoforma extracelular ECSOD en la superficie de las membranas celulares (Abilés, 2007; Biri et al., 2007; Castillo, 2005; Closs, 2006; Grupta et al. 2004; Myatt & Cui; 2004; Roberts et al., 2009).

El estrés oxidativo puede ser reflejado por la disminución de SOD, al igual que el incremento de su actividad como mecanismo compensatorio a dicho estrés. Cuando esto último ocurre, puede inducir la actividad del glutatión reducido-glutatión peroxidasa (GSH-GPX), y a su vez la actividad **Catalasa** podría disminuir como mecanismo de compensación (Abilés, 2007; Biri et al., 2007; Closs, 2003; Grupta et al. 2004; Roberts et al., 2009).

La **Glutatión Peroxidasa** requiere de la presencia de Selenio en su núcleo activo. Esta enzima es altamente abundante en el citosol, en el núcleo y en la mitocondria, siendo el antioxidante más soluble en los compartimentos celulares (Valko et. al., 2006).

**GPX** y **CAT** convierten al peróxido de hidrógeno en agua. El equilibrio entre CAT y SOD es fundamental para mantener la función redox. En la placenta, la actividad de la CAT y la GPX es más alta en el centro de las vellosidades periféricas (Castillo, 2005; Closs, 2006; Myatt & Cui; 2004; Saker et al., 2008; Valko et. al., 2006).

El sistema de segunda línea o **antioxidantes secundarios** contra las ROS son de carácter no Enzimáticos lipofílicos e hidrofílicos. Bajo condiciones normales, hay

un balance entre ambas actividades y los niveles intracelulares de estos antioxidantes (Closs, 2006; Saker et al., 2008; Valko et. al., 2006).

El **sistema de antioxidantes no enzimáticos lipofílicos** interviene o previene la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados. Se destaca la Coenzima Q10 (CoQ10) y su forma reducida (CoQ10H<sub>2</sub>); que transporta protones y electrones en la mitocondria y evita la peroxidación lípidica, anticipándose a la acción del ácido ascórbico (vitamina C) o el glutatión reducido. Los tocoferoles se reconocen por interrumpir la cadena de la peroxidación lípidica. La vitamina C es capaz de reducir a la  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) cuando ingresa al área hidrófila de la membrana celular. El Retinol (vitamina A), beta caroteno y licopenos son antioxidantes del oxígeno molecular (Chen et al., 2006; Closs, 2003; Kumar et al., 2008).

En el **sistema de antioxidantes no enzimáticos hidrofílicos**, se destacan el glutatión reducido (GSH), grupos tioles, vitamina C, ácido úrico y albúmina. El GSH se caracteriza por su función sulfidriilo (SH) con alta capacidad de reducir al glutatión oxidado (GSSG). Los tioles son altamente reductores y la albúmina está constituida por este grupo. La vitamina C en conjunto con la vitamina E son altamente antioxidantes (Closs, 2003; Kumar et al., 2008).

El **Glutatión** (GSH) en el núcleo mantiene el estado redox de las proteínas con grupos sulfidrilos que son necesarias para la reparación y expresión del DNA. El glutatión oxidado es acumulado dentro de la célula y la relación de GSH/GSSG es una buena medida de estrés oxidativo de un organismo. También altas concentraciones de GSSG (Glutatión oxidado) quizás dañen muchas enzimas a través del daño oxidativo (Valko et. al., 2006; Circu & Yee Aw, 2009).

La forma oxidada de la glutatióna (GSSG) se genera al oxidarse el grupo tiol (R-SH) del residuo de cisteína y formar un puente disulfuro con otra molécula de GSH. La oxidación se revierte gracias a la actividad de la enzima glutatióna

reductasa (GR) que reduce la GSSG a GSH utilizando a NADPH como dador de electrones. El sistema de la glutatona es importante para la eliminación de peróxidos y para mantener reducidos los grupos tioles (R-SH) de muchas proteínas; este sistema de la glutatona participa de forma indirecta en la eliminación de peróxidos al actuar como cofactor de actividades enzimáticas como la glutatona peroxidasa (GPX) (Castillo, 2005; Valko et. al., 2006).

El glutatión, además es capaz de regenerar los más importantes antioxidantes como vitamina C y E, devolviéndolos a sus formas activas; el glutatión puede reducir el tocoferol radical de la vitamina E directa o indirectamente, vía reducción de semidehidroascorbato a ascorbato. La incapacidad del glutatión para regenerar los dichos antioxidantes es un indicador de estrés oxidativo al haber un aumento en la proporción (GSSG/2GSH). (Castillo, 2005; Valko et. al., 2006).

La respuesta antioxidante que genera el organismo contra el estrés oxidativo puede evaluarse de manera indirecta a través de la cuantificación de la actividad antioxidante, siendo analizadas principalmente la actividad de las enzimas SOD, CAT y GPX; proteínas como albúmina, ceruplasmina y ferritina; y moléculas antioxidantes como ácido ascórbico, ácido úrico,  $\alpha$ -tocoferol, beta-caroteno, GSH y bilirrubina. Siendo las enzimas SOD, CAT y GPX, al igual que antioxidantes no enzimáticos como el glutatión reducido (GSH), ascorbato y  $\alpha$ -tocoferol importantes en el sistema celular al eliminar el anión superóxido (Ceballos, 2006; Kumar et al., 2008; Webster et al., 2008).

El mayor sistema antioxidante incluido en la placenta son MnSOD y Cu/ZnSOD, CAT, GSH, GPX, glutatión S-transferasa, tioldisulfido óxido-reductasa y la vitamina C y E.

Respecto a la isoforma MnSOD mitocondrial es apenas expresado en el sincitiotrofoblasto, sin embargo predomina en la vellosidad vascular del endotelio; mientras que en el citosol la isoforma Cu/ZnSOD es intensamente expresada en

las vellosidades del estroma, probablemente en las células de Hofbauer y escasamente en el trofoblasto (Myatt & Cui, 2004).

La **Tioredoxina** (TRX) es una pequeña proteína antioxidante endógena, rica en residuos de cisteína, la que posee varias acciones en las que se incluyen la protección contra el estrés oxidativo, el control del crecimiento y la regulación de la apoptosis. Ésta también se ha detectado en la decidua y el trofoblasto humano donde puede proteger al cigoto y al trofoblasto de los efectos citotóxicos de los radicales derivados del oxígeno. Además está involucrado en el mantenimiento normal del embarazo. La TRX tiene un rol importante en la implantación así como en el crecimiento fetal durante el embarazo tardío. Se examinó la presencia de TRX en los tejidos fetales humanos, y se sugirió que podría desempeñar un rol importante en la regulación redox durante el desarrollo del feto. Se ha determinado que TRX esta presente en los núcleos de las células de la decidua, espongiotrofoblastos y laberinto de la placenta de rata (Castillo, 2005; Umekawa et al., 2008).

La homeostasis redox o amortiguador redox se fundamenta principalmente por la tioredoxina, al igual que el glutatión (el par 2GSH/GSSG), siendo éste el mejor representante del amortiguador celular redox y por tanto, es el indicador más representativo del desarrollo redox en la célula (Castillo, 2005; Valko et. al., 2006).

La relación de la reducción entre GPX y TRX son mantenidas por la actividad de GSH y la TRX reductasa respectivamente, ambos amortiguadores redox, del sistema tiol, contrarrestan al estrés oxidativo; adicionando antioxidantes al funcionamiento celular, que a su vez desarrollan el proceso de señalización celular (Valko et. al., 2006).

El GSH juega un rol en el rescate de células desde la apoptosis; la depleción de GSH, hace que el entorno celular sea más oxidante. Generalmente el aumento de la reducción al mantenerse elevados los niveles de glutatión y tioredoxina de las

células estimula la proliferación y un ligero cambio hacia la oxidación del medio, dando inicio a la diferenciación celular.

Además del GSH y la TRX, hay otras moléculas relativamente de bajo peso molecular que son antioxidantes, las que se presentan en altas concentraciones y pueden contribuir significativamente a controlar la actividad total de las ROS. Entre éstos se incluyen aminoácidos libres, péptidos y proteínas (Valko et. al., 2006).

Como se menciona los antioxidantes pueden ser endógenos y exógenos. Estos últimos provienen de alimentos como: carnes, pescados, cereales integrales, productos lácteos, legumbres de color verde, ajo, té verde, aceites y frutos de olivo, uvas, frutos rojos y cítricos, soya, maíz, maní, zanahorias, entre otros. Por ejemplo, las proteínas proporcionan aminoácidos para la síntesis de las enzimas de defensa antioxidante como la glutatión reducido (GSH) y la albúmina (Avello, 2006; Gutiérrez, 2005).

Entonces la dieta tendría un efecto importante en reducir el efecto oxidante propio del embarazo, especialmente en aquellos embarazos con factor de riesgo de desarrollar patologías asociadas al estrés oxidativo (Abilés, 2007; Avello, 2006; Burton et al., 2009; Gutiérrez, 2005).

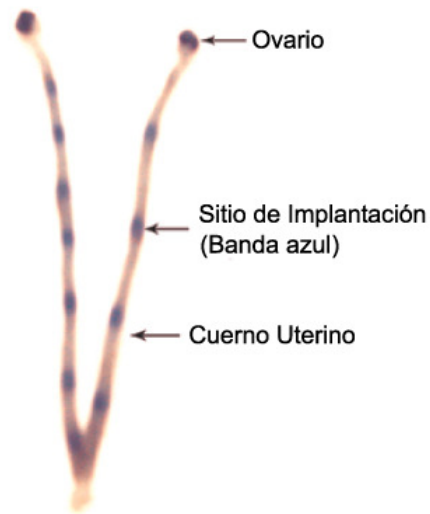
Es así como suplementos de micronutrientes en las mujeres embarazadas, que están en mayor riesgo de tener un feto con RCIU, podría reducir el estrés oxidativo y promover los mecanismos de defensa antioxidante, potenciando un aumento de tamaño al nacer y una disminución de la morbilidad neonatal y la mortalidad, especialmente en las primeras semanas de vida (Kumar et al., 2008).

#### **1.4 MORFOGÉNESIS Y FUNCIÓN PLACENTARIA DE RATA**

La gestación en la rata tiene una duración aproximadamente de 20 días. De igual modo que en humanos, el órgano de anidación del feto es el útero. El útero de rata, anatómicamente está compuesto por dos cuernos uterinos; derechos e izquierdos. Estos son recubiertos por el mesotelio (capa serosa), el mesometrio (Ligamento conectivo). La capa muscular es el miometrio; y a su vez con la mucosa uterina, la cual está cubierta por epitelio cilíndrico simple que contiene tanto células ciliadas como células secretoras además de una lámina basal con fibroblastos. Finalmente, cada cuerno se funde en la región del cuello para desembocar en una cavidad común que es la vagina (Carriel, 2006).

El útero en roedores sufre drásticos cambios morfológicos en los sitios de implantación, permaneciendo inalterado los sitios de interimplantación. Dichos cambios pueden ser observados histológicamente y ser divididos en dos regiones: región mesometrial (adyacente al mesometrio) y región antimesometrial (opuesta a la anterior). La región mesometrial se caracteriza por la presencia de grandes vasos arteriales y venosos (Carriel, 2006).

Después de la fecundación, de igual modo que en humanos, en el oviducto ocurre la segmentación y posteriormente la formación del blastocisto (Bruce, 2003; Moore, 2003; Sadler, 2004). En la rata, el blastocisto se mantiene suspendido por un corto período de tiempo en la cavidad uterina (24-48hrs), tiempo en que son distribuidos por contracciones del mesometrio en ambos cuernos uterinos (**Fig. 1.10**) para orientarse en los sitios de implantación cercano al 6<sup>to</sup> día de gestación (Carriel, 2006).



**Fig. 1.10** Útero Bicorneo con sitios de implantación en azul.

*(Hunt et al., 2006).*

La respuesta del endometrio a la implantación se traduce en el aumento de la permeabilidad vascular lo que lleva a la formación de edema en el estroma endometrial, siendo limitada a solo los sitios de implantación (Carriel, 2006).

El blastocisto se posiciona en la región antimesometrial de la cripta de implantación: la masa celular interna se orienta en sentido mesometrial contactando el epitelio uterino con las células trofoblásticas murales (Carriel, 2006).

Las células trofoblásticas emiten proyecciones citoplásmicas que penetran entre las células de revestimiento hasta que la capa completa de células trofoblásticas quedan sobre la lámina basal. Al transcurrir la implantación la lámina basal es perforada por el trofoblasto mural, continuando hacia los polos del blastocisto. Esto es asociado con muerte de las células epiteliales por apoptosis, siendo fagocitadas por el trofoblasto (Carriel, 2006).

El contacto del trofoblasto mural con el epitelio superficial desencadena la reacción decidual del estroma subepitelial, reacción que genera acumulación de

glicógeno y lípidos con el objetivo de integrar al embrión, situación similar que en la mucosa uterina humana. (Bruce, 2003; Carriel, 2006; Moore, 2003; Sadler, 2004). Por lo que la interfase materno-fetal, está formada por células de ambos individuos que interactúan, para formar parte del proceso de placentación, el cual abarca la formación y desarrollo de la placenta, y se asocia con las modificaciones anatómicas de los tejidos maternos que soportan este órgano, facilitando la actividad metabólica, el intercambio de gases así como la eliminación de residuos del feto (Carriel, 2006; Georgiades et al 2001; Watson & Cross, 2005).

#### **1.4.1 Funciones de la placenta**

La placenta es un órgano materno-fetal, encargado de la nutrición, intercambio gaseoso, remoción de toxinas y desechos provenientes del feto y brindar una respuesta inmunológica y hormonal adecuada para el normal crecimiento y desarrollo fetal. Funciones dependiente de las modificaciones propias del lecho vascular que incluye una irrigación aumentada y constate permitiendo un intercambio entre ambas circulaciones. Dichas funciones ocurren de similar forma en la placenta humana (Carriel, 2006; Cox et al., 2009; Georgiades et al., 2001; Ain et al., 2003; Watson & Cross, 2005).

#### **1.4.2 Placentación en Rata**

El desarrollo placentario es un proceso complejo y dinámico (Natale et al, 2006) que implica el desarrollo de tres regiones distintas anatómica y fisiológicamente las cuales son en roedores: el **laberinto**, la **zona de unión** y las **células gigantes del trofoblasto** (Astorga & Godoy, 2007; Carriel, 2006; Georgiades et al., 2001).

El desarrollo placentario comienza en el blastocisto en el día 3.5<sup>º</sup> de gestación cuando la capa del trofoectodermo se diferencia de la masa celular interna. En el momento de la implantación, el trofoectodermo mural, el cual no está en contacto con la masa celular interna, se convierte en células gigantes que son análogas a

las células humanas de las vellosidades citotrofoblásticas que invaden al útero. (Carriel, 2006; Natale et al., 2006; Watson & Cross, 2005).

En contraste, dos líneas se originan del trofoectodermo polar en respuesta a señales mitógenicas desde el epiblastos para formar el ectoderma extraembrionario proximal y el **cono ectoplacentario** (CEP) distal. Subsecuentemente, el **ectoderma extraembrionario** (trofoectodermo) desarrollará células del trofoblasto, de la capa coriónica, y posteriormente el laberinto. El desarrollo del laberinto es apoyado estructuralmente por el CEP. El cono ectoplacentario ocupa el polo embrionario por lo tanto, la placenta se formará en el lado mesometrial del útero (Astorga & Godoy, 2007; Natale et al., 2006; Watson & Cross, 2005).

La población de células madres del trofoblasto residen en el compartimento del ectoderma extraembrionario, mientras que las células del cono ectoplacentario tienen un potencial de proliferación más limitado y también se diferencian en células gigantes secundarias (Natale et al, 2006).

En el día 6,5 de gestación, el ectoderma extraembrionario comienza a separarse del epiblasto debido a la migración del mesodermo y forma una placa plana de células llamada corión (Natale et al., 2006).

En el día 8 de gestación la región mesometrial entra en contacto directo con los tejidos uterinos, originando el cono ectoplacentario (CEP), el cual posteriormente constituirá a la placenta (Carriel, 2006). A su vez, se origina la porción vascular placentaria del mesodermo extraembrionario (alantoides), la cual se extiende del extremo posterior del embrión. En el 8,5 día de gestación, el alantoides y el corión se unen en un proceso llamado unión *corionalantoidea*, siendo necesaria la correcta formación del corión y el alantoides. La unión de estas estructuras constituye la etapa inicial para la formación del laberinto; defectos en este proceso

son las causas más comunes de mortalidad embrionaria en la mitad de la gestación (Watson & Cross, 2005).

Hacia el día 9 de gestación, ocurre lo que se conoce como la **invasión vascular del corión** donde comienzan a desarrollarse las vellosidades primarias, fluyendo sangre entre los espacios intervillositarios. Este proceso requiere la participación activa del corión trofoblástico alantoideo y el mesodermo (Watson & Cross, 2005).

Las células del CEP provienen del trofoectodermo, conocido también como ectodermo extraembrionario y se caracterizan por una alta proliferación celular, un tamaño pequeño, citoplasma basófilo y una ubicación central. En el trofoectodermo, se encuentran las células gigantes primarias que migran hacia el polo abembrionario y regiones murales y células individuales que delimitan los márgenes del CEP y desarrollan las células gigantes secundarias, involucradas en la invasión de la placenta en el endometrio materno.

Las células gigantes secundarias sirven para expandir el área del saco vitelino placentario durante el período entre la implantación y la formación de la placenta corioalantoica (Carriel, 2006).

En el día 10 de gestación, la región del CEP es ocupada por el citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto. Éstas invaden los tejidos uterinos y la red arterial, promoviendo la formación de sinusoides (lagunas llenas de sangre maternas), por los que ingresa la sangre materna, la cual entra en contacto directo con las células trofoblásticas. (Carriel, 2006).

Células del mesodermo del embrión migran a la superficie interna del endodermo visceral, originando células vasculares y primitivos vasos vitelinos. En esta etapa el intercambio es asegurado por esta zona vascularizada. Las células del mesodermo, también forman el mesénquima del alantoides, que posteriormente entra en contacto con el corión del CEP entre los días 9 y 10 de gestación. En la

placenta corioalantoica, el mesénquima del alantoides gradualmente invade las células trofoblásticas y establece una red de vasos sanguíneos fetales formando el laberinto. La región basal de la placenta, donde se insertan los vasos del cordón umbilical se denomina capa coriónica. (Carriel, 2006).

El endodermo se diferencia de la masa celular interna del embrión. Células del endodermo parietal migran hacia la superficie basal de la capa trofoblástica y depositan una extensa membrana basal entre las células gigantes primarias y las células del endometrio parietal (porción parietal del saco vitelino). Esta membrana se forma el día 6.5 de gestación y se denomina Membrana del Reichert (MR), que actúa como una capa protectora extraembrionaria y se encuentra exclusivamente en roedores (Astorga & Godoy, 2007; Carriel, 2006).

Esta membrana rodea la superficie alrededor del embrión exceptuando la región del CEP, que está en contacto con la mucosa uterina. La MR se caracteriza por ser una delgada capa homogénea, acidófila, compuesta por glicoproteínas, lípidos y elastina. Presenta variaciones en la coloración al transcurrir la gestación, rompiéndose entre los días 15 y 16 de gestación. (Astorga & Godoy, 2007; Carriel, 2006).

El saco vitelino absorbe nutrientes de la sangre materna a través de canales capilares de la decidua, los que gradualmente forman senos entre las células gigantes primarias y la MR (Astorga & Godoy, 2007; Carriel, 2006).

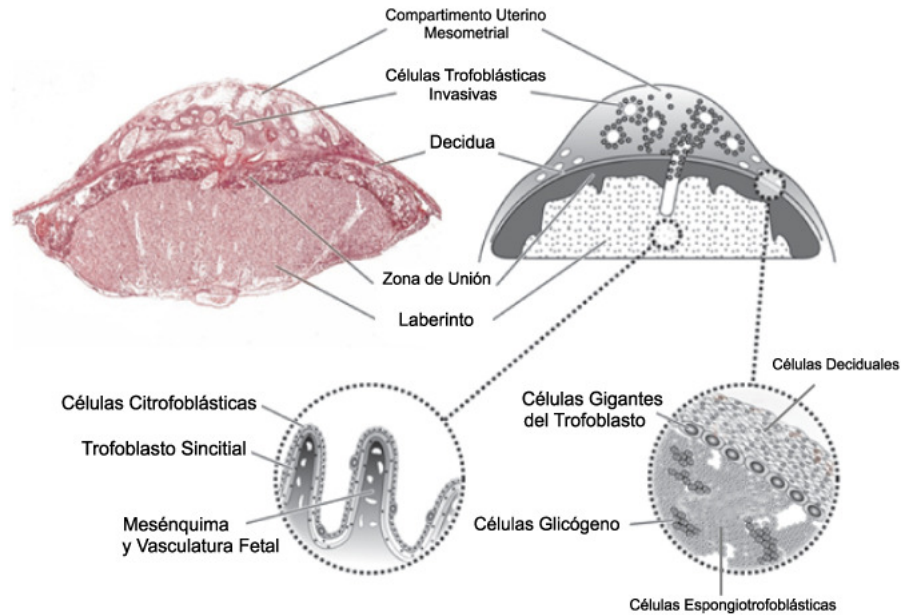
El día 14 de gestación es posible distinguir el miometrio y el estroma uterino. El miometrio contiene células grandes vacuoladas con núcleos de gran tamaño, además de grandes vasos sanguíneos invadidos por células trofoblásticas y rodeadas por numerosas células granulosas del triángulo metrial (Carriel, 2006).

El triángulo metrial, morfológicamente, es una región limitada por la capa muscular longitudinal externa y la capa muscular circular interna, semejando éstas a un

triángulo ubicado en la región mesometrial cercana a la inserción del mesometrio (Carriel, 2006).

Los cambios morfológicos culminan al final de la gestación, pero las capas morfológicas que componen la unidad útero-placentaria ya están presentes en el día 12 de gestación. Comenzando desde el lado materno, se encuentra una capa fuertemente decidualizada del miometrio con algunas células granulosas, de gran tamaño del triángulo metrial; luego continúa una moderada capa de células estromales decidualizadas (12 a 15  $\mu\text{m}$ ), con un citoplasma eosinófilo y granular. Próximo a la placenta estas células poseen una cantidad moderada de vacuolas; se encuentran algunas células metriales y vasos sanguíneos. La tercera capa es la que separa los tejidos de origen embriofetales y maternos, compuesta por las células gigantes secundarias (CG); se continúa con una estrecha capa de células con alta proliferación llamada espongiotrofoblasto (EP) acompañada de canales por donde circula la sangre materna. Más cercano al lado fetal, se encuentra una amplia capa compuesta por numerosas lagunas, que en el día 12 de la gestación están llenas de sangre materna, y algunas pequeñas con sangre fetal. Esta capa es denominada región del laberinto. La región basal de la placenta es la capa coriónica, que comunica el laberinto con el cordón umbilical (Carriel, 2006).

La placenta definitiva (**Fig. 1.11**) está alrededor del día 12.5 de gestación siendo un órgano funcional y sus diferentes tipos celulares son capaces de obtener los nutrientes desde la sangre materna y transportarlos al feto. (Carriel, 2006; Georgiades et al 2001).



**Fig. 1.11** Estructura Placentaria en la rata.

(Hunt et al., 2006)

### **1.4.3 Células placentarias**

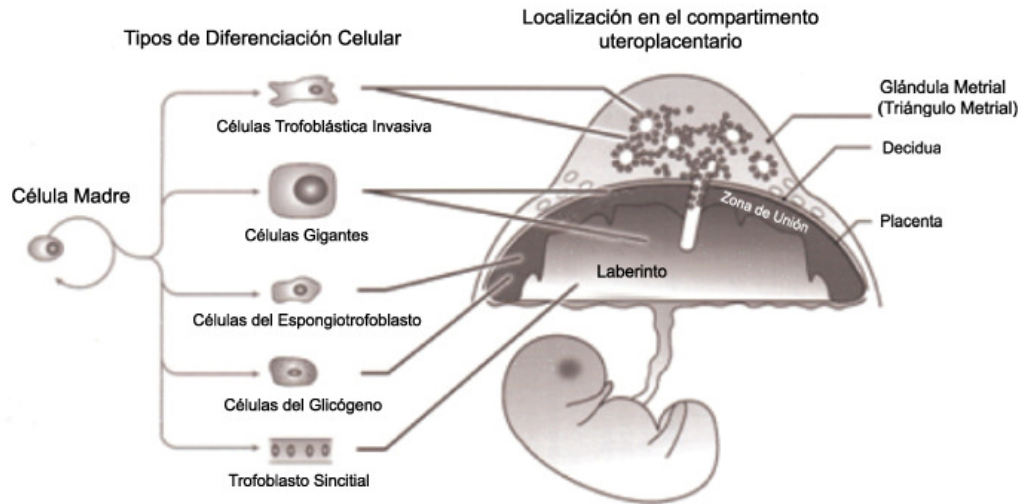
Las poblaciones celulares presentes en la placenta tienen dos orígenes: las células derivadas del cigoto y las células maternas (Georgiades et al, 2001).

Las células derivadas del cigoto incluyen el trofoblasto, que deriva del trofoectodermo polar; vasos sanguíneos fetales y mesénquima, ambos derivados del alantoides que en sí es un derivado del ectodermo primitivo de la masa celular interna (Georgiades et al 2001; Carriel, 2006). Aunque la placenta del ratón es claramente un órgano extraembrionario, sus células derivadas del cigoto son ambas de origen embrionario y extraembrionario (Georgiades et al 2001).

Las células de origen materno incluyen las células uterinas y células de la sangre materna (Georgiades et al, 2001).

Las células trofoblásticas tienen la capacidad de diferenciarse a lo largo de una vía de múltiples linajes (**Fig. 1.12**), organizándose en la placenta o fuera de ella colonizando e invadiendo la pared uterina, característica propia de la placentación hemocorial. En la rata, las células trofoblásticas exhiben una extensa **invasión intersticial y endovascular** en la decidua y en la glándula metrial, donde realiza una íntima asociación con la vasculatura (Ain et al., 2003).

La *invasión trofoblástica de tipo intersticial es desarrollada por las células ricas en glicógeno*, éstas penetran en el estroma uterino situándose en localizaciones perivasculares, mientras que la *invasión trofoblástica de tipo endovascular es generada por las células gigantes* las que ingresan en los vasos sanguíneos sustituyendo a las células endoteliales. Esta proximidad sugiere una relación funcional, por lo que una aberración en la regulación de las células trofoblásticas pueden resultar en ausencia de invasión y clínicamente puede manifestarse con desórdenes asociados al embarazo como la preeclampsia y la restricción de crecimiento intrauterino. La **glándula metrial** es un sitio rico en vasculatura uterina y consecuentemente rico en nutrientes para la placenta y el feto, siendo la invasión trofoblástica dirigida a esta zona. El potencial de invasión de las células trofoblásticas suele ser regulado por las **células natural killers** (NK), las que son un componente prominente de la glándula metrial (Natale et al., 2006; Ain et al., 2003).



**Fig. 1.12** Esquema representativo del linaje de las células trofoblásticas y su localización en el compartimento útero-placentario maduro en la rata.

(*Hunt et al., 2006*).

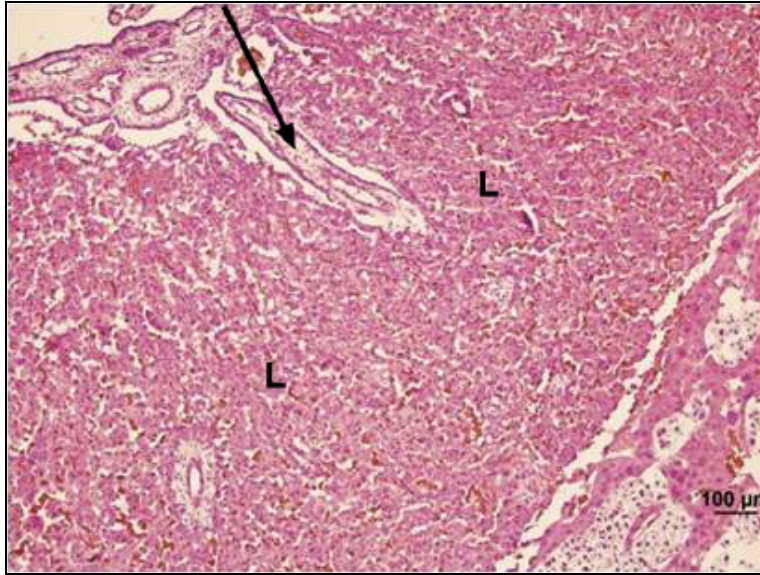
#### **1.4.4 Laberinto**

Es una zona compuesta por canales de sangre materno-fetal las cuales son revestidas por células madres capaces de diferenciarse en células citotrofoblásticas o en fusionarse en células del sincitiotrofoblasto. Esta región está ubicada hacia la superficie fetal, siendo dentro de estos canales donde la sangre materna y fetal circula en forma independiente y a su vez permite el intercambio fisiológico de nutrientes y residuos entre ambos. (Astorga & Godoy, 2007; Georgiades et al 2001; Ain et al., 2003;).

No todas las regiones del laberinto están involucradas en el intercambio fisiológico, pues es en las regiones terminales de los vasos sanguíneos donde ocurre el intercambio. A esta región se le denomina zona íntima. (Carriel, 2006).

El laberinto (**Fig. 1.13**) tiene una morfología celular típicamente extraembrionaria del ectodermo y corión trofoblástico, cuyas células, están soportadas por una matriz extracelular (MEC) conocida como lámina o placa coriónica. Aquí se inserta

el cordón umbilical (CU), arterias y venas derivadas del mesénquima del alantoides las cuales se ramifican. (Carriel, 2006; Georgiades et al 2001; Natale et al., 2006; Watson & Cross, 2005).



**Fig.1.13** Laberinto de Placenta de 17 DG en Animal sin Restricción Alimentaria.  
*Flecha indica un vaso sanguíneo.*

Después de la unión del corion alantoideo, alrededor del 9 DG, en la superficie de la placa coriónica surgen muchas ramificaciones interconectadas formando un patrón similar a un laberinto conocido como vellosidades coriónicas primarias, estas vellosidades se alargan y se desarrolla en un complejo de ramas secundarias y la más terminal se conoce como vellosidades trofoblásticas que entran en contacto con los vasos sanguíneos, siendo comparables con la vellosidades coriónicas humanas. Su núcleo interno está formado por alantoides, mesénquima y vasos que se continúan con el del cordón umbilical. La vascularización alantoidea y la asociación con el sistema circulatorio sanguíneo dentro del feto, en sí, constituye la **circulación feto-placentaria**. La capa trofoblástica de las vellosidades coriónicas son directamente bañadas en sangre materna la cual es llevada y dejada en la porción fetal de la placenta/laberinto a través de las arterias y los senos venosos de la placa basal, zona de unión y de

tejidos uterinos adyacentes. (Carriel, 2006; Georgiades et al 2001; Natale et al., 2006).

Tanto la placenta de rata como la humana son consideradas como del tipo **hemocorial** por tener una interfaz para las interacciones feto-maternas entre las dos circulaciones de sangre producto de la interacción física directa entre la sangre materna y del trofoblasto coriónico (Astorga & Godoy, 2007; Carriel, 2006;).

Las células mononucleares del trofoblasto conocidas como citotrofoblasto tienen como función invadir al lumen de los sinusoides maternos. Estas células, al fusionarse originan al sincitiotrofoblasto, células multinucleadas sin límites definidos que rodean a los capilares del endotelio fetal. (Natale et al., 2006).

La unidad funcional del laberinto, algunos autores la definen como **hemotricorial**, ya que posee dos capas sincitiotrofoblásticas (I y II) en contraste con la capa individual del sincitiotrofoblasto de los seres humanos. En ratas, las células de la capa sincitial que limitan con la sangre materna es mononuclear y no posee microvellosidades. Estas tres capas en conjunto con el mesénquima del alantoides forman la **barrera placentaria**. Se cree que las capas del sincitiotrofoblasto I y II actúan como barrera física para sustancias hidrofílicas entre ambas circulaciones y se cree que son una sola estructura ya que presentan entre ellas uniones comunicantes que permite la comunicación directa entre sus respectivos citoplasmas. (Carriel, 2006; Georgiades et al 2001; Natale et al, 2006).

En el caso de que el laberinto no sea adecuadamente vascularizado con patrones apropiados como ramificación y dilatación, se verá afectada la perfusión placentaria, lo que resulta en una pobre difusión de oxígeno y nutrientes. (Watson & Cross, 2005).

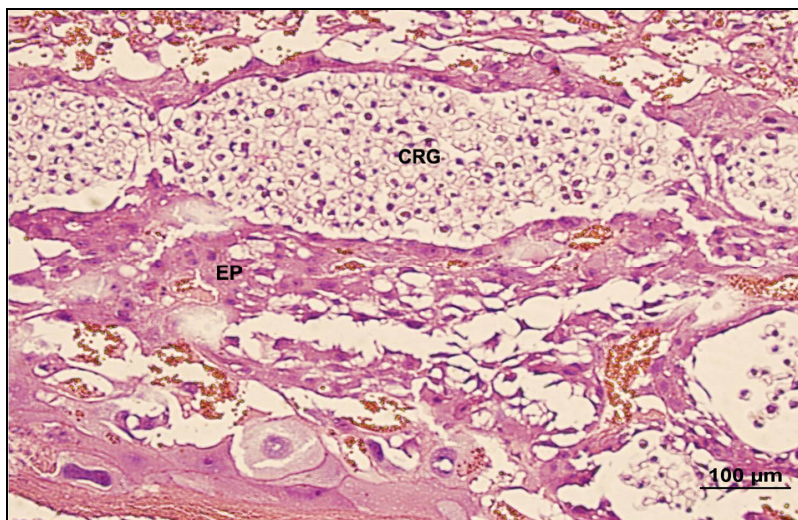
Al término de la gestación la placenta incrementa su desempeño, con o sin un aumento proporcional en el tamaño. Al inicio de la gestación el incremento de la

masa placentaria es importante quizás porque aumenta su eficiencia funcional, que se ve reflejada en el crecimiento fetal. En los últimos cuatro días de gestación el tamaño de la placenta se mantiene relativamente constante, mientras que el feto incrementa su tamaño en un 200%. Esto refleja una desproporción entre el desarrollo de la placenta y el feto. (Carriel, 2006).

#### **1.4.5 Zona de Unión.**

Es también conocida como zona basal, trofoespongiosa o espongiotrofoblasto. (Georgiades et al., 2001).

La zona de unión (**Fig.1.14**) es limitada hacia el lado materno por las células gigantes secundarias derivadas del cigoto y hacia el lado fetal por el laberinto. Esta zona posee dos tipos de células trofoblásticas: espongiotrofoblasto (EP) y células ricas en glicógeno (CRG). Las CRG son células trofoblásticas de origen embrio-fetal (no sincitiales). En esta región no se encuentran vasos ni sangre fetal. Es una zona discontinua debido a la presencia de la línea arterial trofoblástica y canales venosos (Carriel, 2006; Georgiades et al 2001; Ain et al., 2003).



**Fig. 1.14** Zona de Unión en Placenta 20 DG Sin Restricción Alimentaria.

Las células EP están localizadas inmediatamente por debajo de las células gigantes del trofoblasto, tienen un citoplasma eosinófilo y contienen escasa cantidad de glicógeno, mientras que las CRG se sugiere que derivan del EP, siendo altamente vacuoladas y con grandes cantidades de glicógeno, histológicamente se aprecian con citoplasma claro. (Carriel, 2006; Georgiades et al 2001; Ain et al., 2003).

Las CRG aparecen en racimos alrededor de la arteria central materna al día 13 de gestación, donde inician la invasión en la decidua basal, incrementando su población hasta los días 15,5 y 18,5 de gestación; sin extenderse al miometrio. No está claro si esta invasión incluye la migración o la proliferación celular mediada por la extensión hacia la zona de unión, así como se desconoce como éstas células disminuyen en número a finales de la gestación (Carriel, 2006; Georgiades et al., 2001).

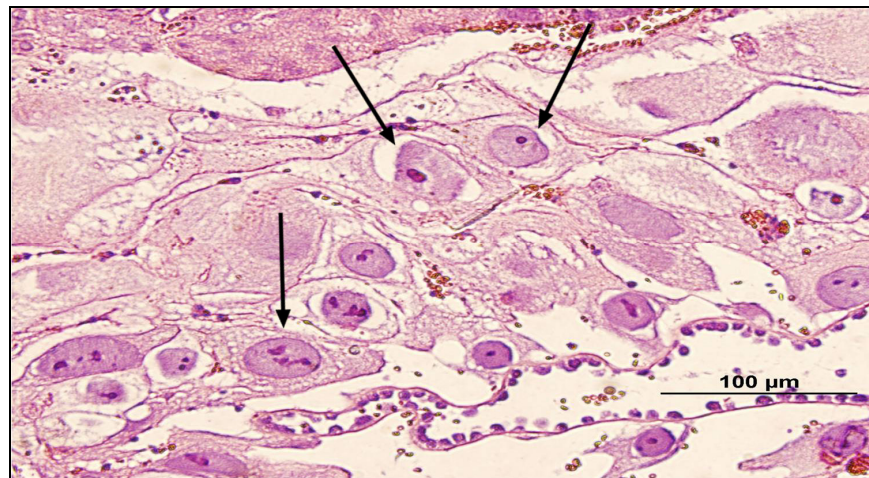
La función de ésta zona no está completamente comprendida, pero se requiere para la viabilidad del feto y su ausencia o disrupción se asocia con muerte fetal. (Carriel, 2006; Georgiades et al., 2001).

Estas células al ser derivadas del trofoblasto tienen capacidad de sintetizar hormonas de tipo proteicas de la familia de las prolactinas, las cuales pueden modificar el metabolismo materno, similar al lactógeno placentario humano. Sin embargo, son las CRG las que poseen una mayor actividad secretora hormonal, entre la que se destaca la hormona proteica IGF2 (Factor de Crecimiento Insulínico-2) lo que podría influir en las interacciones feto-maternas. (Carriel, 2006; Georgiades et al., 2001; Ain et al., 2003).

### **1.4.6 Células Gigantes Trofoblásticas.**

Las células gigantes del Trofoblasto (**Fig.1.15**) surgen por endoreplicación, se sitúan en la superficie materna-placentaria y son una de las mayores células endocrinas de la placenta. Sintetizan hormonas esteroidales y péptidas. Curiosamente, tanto las células gigantes secundarias como las células ricas en glicógeno expresan IGF2. (Carriel, 2006; Georgiades et al 2001; Ain et al., 2003).

Estas tienen propiedades invasivas y fagocíticas. La invasión es determinada por la expresión de la proteína proteolítica uPA (activador del plasmógeno tipo uroquinasa) antes de la aparición de las CRG y el comportamiento fagocítico sobre la decidua materna comienza antes de establecerse la placenta funcional. (Carriel, 2006; Georgiades et al., 2001).



**Fig. 1.15** Células Gigantes del Trofoblasto en Placenta de 14 DG Sin Restricción Alimentaria.

Las células gigantes primarias y secundarias son indistinguibles fenotípicamente, poseen un voluminoso citoplasma basófilo que contiene gránulos o vesículas y el núcleo tiene múltiples y prominentes nucléolos, así como pliegues regulares e inclusiones. (Carriel, 2006).

Se desconoce una estructura homologa a las células gigantes en la placenta humana. (Georgiades et al., 2001).

En roedores existen dos tipos de células gigantes con funciones diferentes. Las primeras aparecen alrededor de los días 5-6 de gestación, en el polo abembrionario (trofoectodermo mural), es decir, la porción del trofoectodermo que no está en contacto con las células de la masa celular interna. Estas células migran y experimentan un dramático incremento de tamaño, alcanzando su máximo tamaño entre los días 9 y 10 de gestación, sin contribuir a la formación de la placenta definitiva. (Carriel, 2006).

Las células individuales ubicadas en los márgenes del cono ectoplacentario se diferencian en las células gigantes secundarias, las cuales alcanzan su tamaño máximo entre los días 10 y 12 de gestación. Éstas poseen un gran núcleo poliploide; al parecer la replicación ocurre en ausencia de condensación cromosómica y otros eventos de mitosis. (Carriel, 2006; Georgiades et al 2001; Watson & Cross, 2005).

Las células gigantes secundarias permiten la expansión de la zona de unión, ya que durante esta etapa son las únicas células derivadas del cigoto que tienen acceso directo a la decidua basal antes de la aparición de las células ricas en glicógeno. (Carriel, 2006).

#### **1.4.7 Circulación placentaria en rata**

La irrigación materna, proviene del útero por las arterias radicales que se ramifican entre 5 a 10 arterias espirales, las que experimentan vasodilatación y angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos), además, el componente endotelial es sustituido por células trofoblásticas que entran en contacto con la sangre materna, dando su origen hemocorial. Esta transformación es crítica para

mantener las funciones endocrinas y de intercambio con adecuado crecimiento y desarrollo del embrión. (Carriel, 2006).

Las arterias espirales al ingresar a la capa de CG llevan sangre a la base de la placenta (lado fetal) por medio de 1 a 4 canales rectos, está es filtrada y luego regresa a la cara apical de la placenta (lado materno). A nivel del laberinto, los vasos se anastomosan y vuelven tortuosos formando sinusoides, los que atraviesan tanto la zona de unión como las CG. (Carriel, 2006).

Desde el cordón umbilical se proyectan las arteriolas feto-placentarias en dirección al laberinto de los cuales originaran los capilares fetales, que posteriormente se anastomosan en la base de la placenta y convergen para formar las venas que retornan al cordón umbilical. (Carriel, 2006).

## **CAPÍTULO 2: FUNDAMENTACIÓN, DELIMITACIÓN, TIPO DE ESTUDIO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.**

### **2.1 FUNDAMENTACIÓN DEL PROBLEMA**

Durante el desempeño profesional de la Matrona y Matrón, la aparición de la RCIU, patología que genera intrínsecamente un aumento de la morbimortalidad perinatal, es un desafío que frecuentemente se debe manejar en el área obstétrica, cabe destacar que a pesar de los avances perinatales en este tema, no se ha logrado reducir significativamente su incidencia. Por lo cual, se considera fundamental expandir las investigaciones científicas en esta patología para aportar información con respecto a su prevención y manejo.

Actualmente, se plantea el estrés oxidativo como precursor y/o consecuencia de variadas condiciones o patologías, siendo la RCIU una de éstas.

Lo anteriormente señalado, nos impulsa a realizar este estudio, con la finalidad de comprender las facultades de la placenta para promover y/o contrarrestar el estrés oxidativo, buscando a su vez los agentes involucrados. Y así aportar las bases que determinen el uso de terapias antioxidantes en la gestante, capaces de compensar este desequilibrio orgánico y prevenir o revertir la RCIU.

### **2.2 DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA**

Análisis y comparación de la morfología y distribución de enzimas prooxidantes y antioxidantes en placentas de ratas en los días 14, 17 y 20 de gestación en un modelo experimental con y sin restricción alimentaria.

## **2.3 TIPO DE ESTUDIO**

El siguiente estudio se clasifica de acuerdo a la investigación en ciencias básicas como experimental y descriptivo-analítico.

- Experimental: pues se cumplen con los siguientes requisitos:
  - Variable Dependiente: Placenta de Rata.
  - Manipulación de la Variable Independiente: restricción alimentaria.
  - Viabilidad de medir el efecto de la Variable Independiente sobre Variable Dependiente.
  - Prospectivo.
- Descriptivo y Analítico: se realizará la descripción tanto de la morfología placentaria como la distribución de las enzimas oxidantes y antioxidantes en este tejido. Y analítico ya que se realizará la interpretación de los resultados obtenidos.

## **2.4 HIPOTESIS**

La restricción alimentaria inducida experimentalmente provoca alteraciones morfológicas y en la distribución de enzimas oxidantes y antioxidantes en placentas de ratas.

## **2.5 OBJETIVOS**

### **2.5.1 OBJETIVO GENERAL**

- Caracterizar la morfología y la distribución de las enzimas prooxidantes y antioxidantes, en placentas de ratas durante los diferentes estadios de la gestación en un modelo animal de restricción alimentaria materna y compararlo con placentas de animales control.

## **2.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Describir y analizar, a través de la técnica Hematoxilina-Eosina, la morfología de placentas de un modelo animal con restricción alimentaria materna entre los días 14, 17 y 20 de gestación y compararlo con placentas de animales control.
  
- Describir y analizar, través de técnicas inmunohistoquímicas, la distribución de la enzima prooxidante Óxido Nítrico Sintasa Inducible (iNOS), y las enzimas antioxidantes Glutación Peroxidasa (GPX) y Superóxido Dismutasa 1 (SOD1) en placentas de un modelo con restricción alimentaria materna entre los días 14, 17 y 20 de gestación, y compararlo con placentas de animales control.

## CAPÍTULO 3: MATERIAL Y MÉTODOS

La siguiente tesis para optar al Grado de Licenciado/a en Obstetricia y Puericultura forma parte de un proyecto multidisciplinario en colaboración con la “*Universidad de Sao Paulo*”, Brasil. El desarrollo del modelo animal con restricción alimentaria fue realizado en el “Laboratorio de Hipertensión del Departamento de Farmacología del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Sao Paulo” (ICB-USP), Brasil. El modelo animal sin restricción alimentaria, así como los estudios histológicos e inmunohistoquímicos fueron realizados en el “Centro de Investigación en Biología de la Reproducción de la Escuela de Medicina de la Universidad de Valparaíso”.

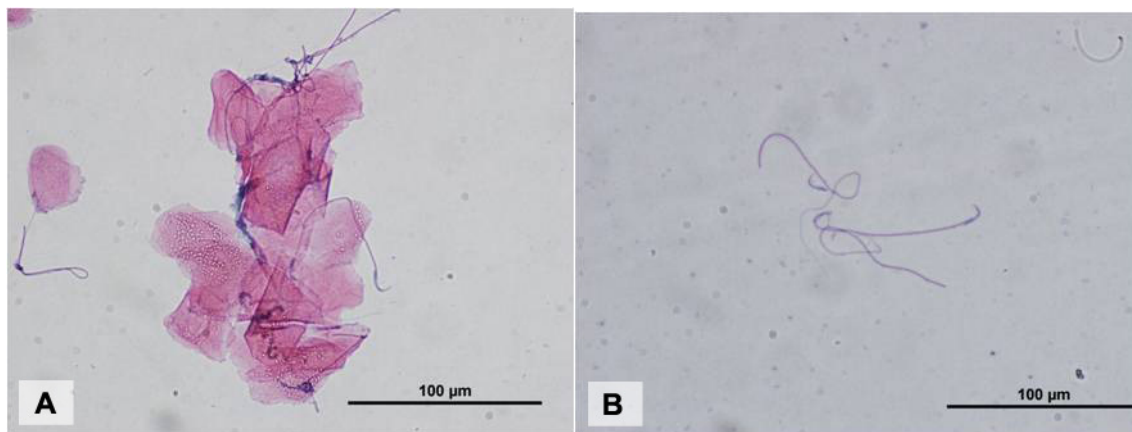
El desarrollo de la tesis se desprende del proyecto de investigación “*Evaluación de Enzimas Pro y Antioxidantes en Tejidos Placentarios y Fetales en un Modelo de Desnutrición Materna. Efecto de la Administración de Antioxidantes en la Dieta*”. Cuenta con el financiamiento del DIPUV 07/2008, CI 05/2006 (División de Investigación y Postgrado de la Universidad de Valparaíso), el proyecto ANILLO CONICYT (ACT-73), Chile. Esta tesis ha sido patrocinada por el Centro Regional de Estudios en Alimentos Saludables (CREAS, CONICYT).

### 3.1 ANIMALES

En este estudio se utilizaron ratas Wistar de 9 semanas de edad para el grupo ***sin restricción alimentaria*** (n=9), provenientes del “Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile”, las cuales se mantuvieron en la “Unidad de Mantención de Animales del “Centro de Investigación en Biología de la Reproducción de la Escuela de Medicina de la Universidad de Valparaíso”, bajo un ambiente de fotoperíodo (12 horas de luz, 12 horas de oscuridad) con agua y alimentación a libre demanda, hasta el momento de su sacrificio y posterior recolección de los tejidos placentarios.

Las ratas Wistar para el grupo **con restricción alimentaria** (n=3) se mantuvieron en el “Laboratorio de Hipertensión del Departamento de Farmacología del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Sao Paulo” (ICB-USP), Brasil, en iguales condiciones ambientales que el grupo sin restricción alimentaria. Se proporcionó agua a libre demanda y la alimentación se restringió en un 50% respecto a la ración diaria hasta el día del sacrificio. Posteriormente, las muestras placentarias fueron embebidas en parafina y enviadas vía aérea a Chile y recepcionadas en el Centro de Investigación en Biología de la Reproducción de la Escuela de Medicina de la Universidad de Valparaíso.

Para realizar el período de cruce de las ratas **sin restricción alimentaria** se dispuso de una jaula con 1 macho y 3 hembras escogidos aleatoriamente a partir de las 18:00 hrs. hasta las 8:00 hrs. del día siguiente. En la mañana del día siguiente se realizó un frotis vaginal para verificar la presencia de espermatozoides al microscopio (**Fig. 3.1.**), considerándose éste hallazgo como el día 1 de gestación (DG). Para visualizar la muestra adecuadamente se realizó la técnica de Tinción de PAP (Ver Anexo A).

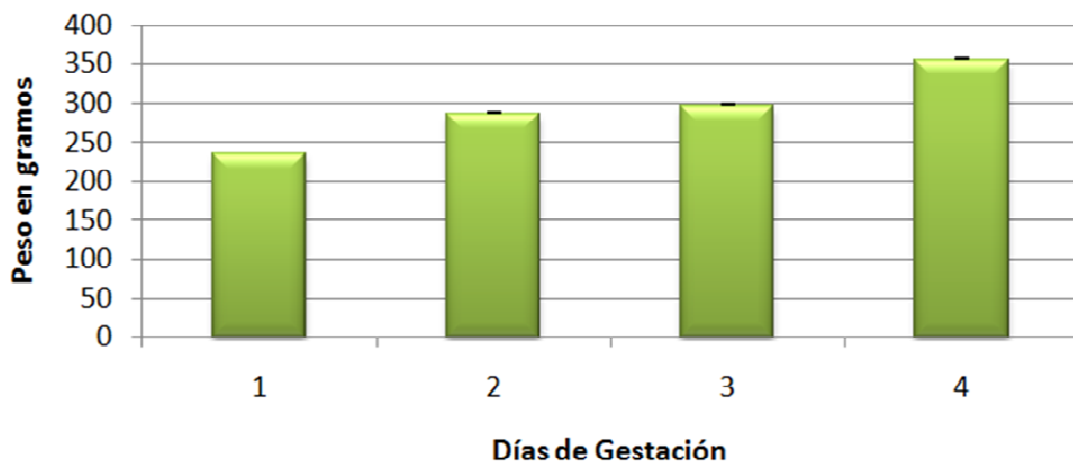


**Fig. 3.1.** Frotis Vaginal Positivo

Las ratas gestantes utilizadas fueron pesadas en una balanza digital, en el día 1 de gestación y posteriormente en los días 14, 17 y 20 de gestación respectivamente (**Gráfico 3.1.A; Gráfico 3.1.B**).

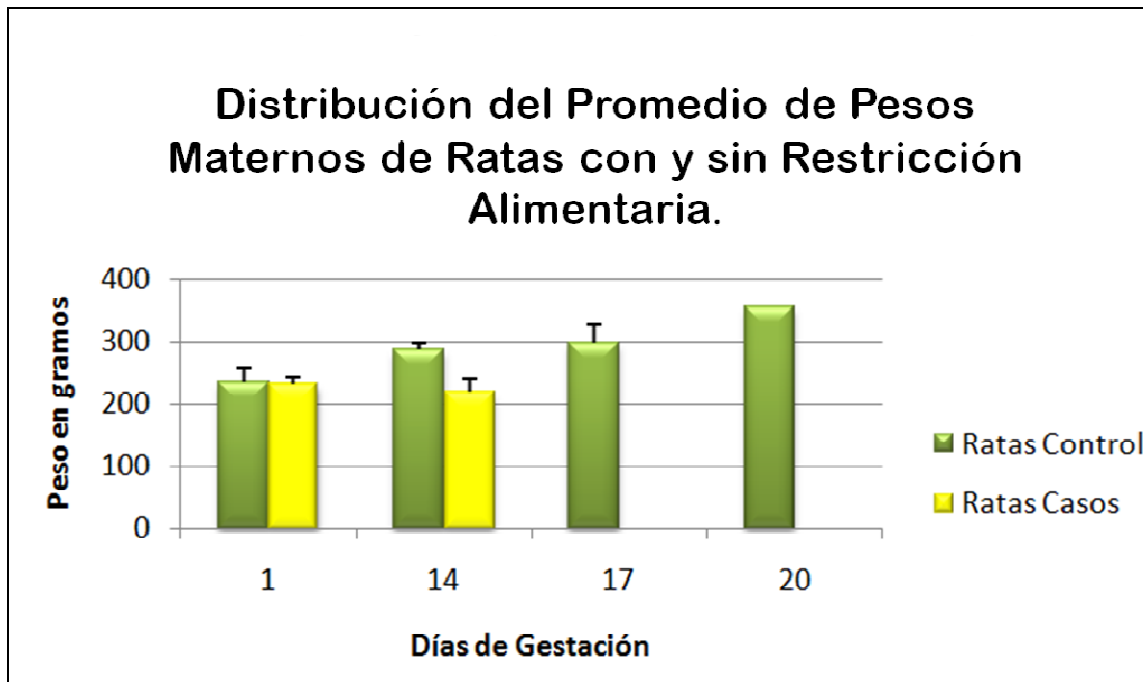
El procedimiento anteriormente descrito, se realizó de igual forma para el grupo **con restricción alimentaria** en el Laboratorio de Hipertensión del Departamento de Farmacología del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Sao Paulo (ICB-USP), Brasil.

### Distribución del Promedio de Pesos Maternos en Ratas sin Restricción Alimentaria.



**Gráfico 3.1.A**

A medida que avanza la gestación se observa el incremento de peso entre el día 1 de gestación y su pertinente día de sacrificio.



**Gráfico 3.1.B**

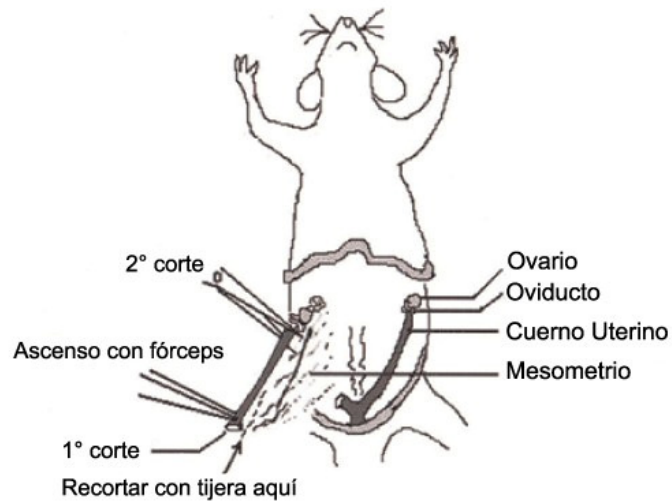
Se observa un incremento del peso promedio con el avance de la gestación en las ratas sin restricción alimentaria, disminuyendo en las ratas con restricción alimentaria hasta el día 14 DG.

### **3.2 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES**

Los protocolos para la manipulación de animales en experimentación han sido aprobados por la Comisión de Ética en Experimentación Animal (CEEA) del ICB-USP (Protocolos 115/2000; 107/2000) y cumplen con los principios éticos de la experimentación animal, establecidos por el Colegio Brasileiro de Experimentación Animal (COBEA). Además este estudio ha sido aprobado por el Comité de Bioética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso (Enero, 2009).

Los materiales utilizados en esta investigación corresponden a tejidos de placentas de ratas Wistar de ambos modelos, los que fueron recolectados entre los meses de octubre 2009 a Enero 2010.

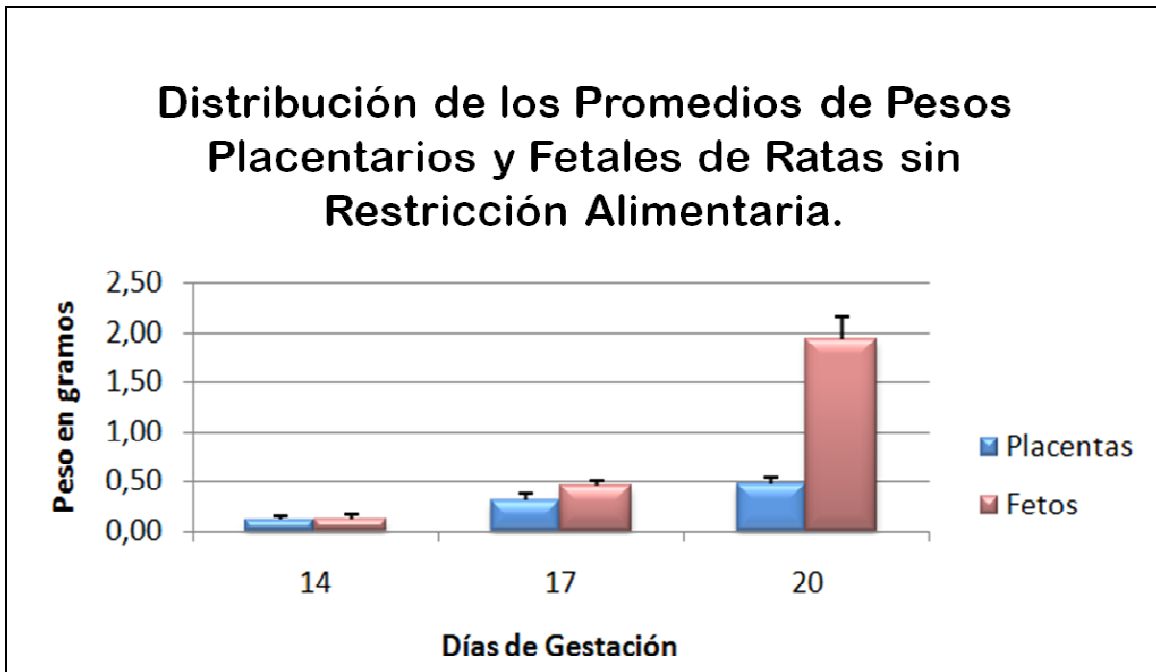
Los animales fueron sacrificados por sobredosis de anestesia y posteriormente a través de laparotomía abdominal se seccionaron ambos cuernos uterinos de los cuales se obtuvieron los tejidos placentarios asociados a cada sitio de implantación (**Fig.3.2.**).



**Fig.3.2.** Esquema representativo de escisión de los cuernos uterinos.

*Hunt et al., 2006.*

Una vez obtenidas las placentas y fetos, éstos fueron pesados en una balanza digital y posteriormente fijados aleatoriamente en paraformaldehído al 4% por un período de 48 horas (**Gráfico 3.1.C**).



**Gráfico 3.1.C**

En este gráfico se observa un peso promedio fetal similar al peso placentario en estadio inicial. Sin embargo, a partir del día 17 de gestación se comienza a reflejar un mayor peso fetal, alcanzando un peso hasta 4 veces mayor que la placenta.

Posteriormente a este período, las placentas fueron deshidratadas en una batería de etanoles ascendente, diafanizadas en Xilol e incluidas en parafina a 58°C. Los bloques obtenidos fueron cortados a 5 µm en un micrótopo (Leitz) tomando los planos transversales de la muestra. Los cortes fueron adheridos a portaobjetos pretratados con Poly-L-Lysine al 0,1% y posteriormente, se llevaron a la estufa de secado durante una hora a 60°C. (Anexo D)

Los mismos procedimientos, bajo los mismos protocolos, fueron realizados para los tejidos placentarios del grupo **con restricción alimentaria**, en las dependencias del “Laboratorio de de Hipertensión del Departamento de Farmacología del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Sao Paulo” (ICB-USP).

### 3.3 MÉTODOS

Todos los protocolos utilizados en los tejidos placentarios, **Hematoxilina-Eosina** e **Inmunohistoquímica** empleados en este estudio han sido adaptados y estandarizados en el “Centro de Investigación en Biología de la Reproducción de la Escuela de Medicina de la Universidad de Valparaíso” (CIBR).

#### 3.3.1 Métodos Histológicos

Los cortes fueron teñidos con la técnica de **Hematoxilina-Eosina** para realizar una caracterización morfológica del desarrollo placentario en ratas.

Para ésta técnica, las secciones fueron desparafinadas e hidratadas en una batería de xiloles y etanoles descendentes, por 10 y 5 minutos respectivamente, para terminar en agua destilada por 5 minutos. Posteriormente, se llevo a cabo la tinción nuclear con hematoxilina de Mayer (Dipping), el viraje se realizo en agua corriente por 5 minutos. Nuevamente agua destilada por 5 minutos, seguido de un lavado rápido en etanol de 95° y la tinción con eosina, aplicada por 30 segundos.

Por último se procedió con la deshidratación y montaje de las placas, en una batería de etanoles ascendentes y xiloles, con 2.5 y 5 minutos respectivamente (*ver anexo E*).

#### 3.3.2 Métodos Inmunohistoquímicos

Los cortes histológicos fueron desparafinadas en xilol e hidratadas en etanoles descendentes por un período de 20 minutos cada uno. Para terminar en agua destilada por un periodo de 20 minutos (*Ver anexos F, G y H*).

Todos los cortes fueron incubados en una solución de peróxido de hidrógeno (Merck) al 3% en PBS, durante 30 minutos con agitación, para el posterior bloqueo de peroxidasa endógena.

Para reducir la marcación de sitios antigénicos inespecíficos (background) las láminas fueron incubadas con Cas-Block (Zymed), un bloqueador universal por 30 minutos y suero normal de cabra por 30 min.

Las secciones fueron incubadas inmediatamente después con el anticuerpo primario correspondiente (Ver Tabla 3.1.), durante toda la noche (18 horas) a 4°C en cámara húmeda. El control negativo consistió en una lámina incubada en PBS/Tween 20 al 0.3%, y el uso de suero normal de cabra, ambas en forma paralela a la incubación del anticuerpo primario. En ambos casos la inmunomarcación fue abolida. Además se realizaron controles con tejidos positivos internos y externos.

<b>Anticuerpo Primario (Chemicon)</b>	<b>Dilución en PBS/Tween 20 al 0,3%</b>	<b>Anticuerpo Secundario (Rockland)</b>	<b>Dilución PBS</b>
Anti INOS de rata hecho en conejo	1:250	Anti-IgG de conejo hecho en cabra con HRP	1:500
Anti GPX de rata hecho en conejo	1:250	Anti-IgG de conejo hecho en cabra con HRP	1:500
Anti SOD1 de rata hecho en conejo	1:50	Anti-IgG de conejo hecho en cabra con HRP	1:500

**Tabla 3.1.** Anticuerpos Utilizados

Al día siguiente se dejaron a temperatura ambiente (25° C) durante 15 minutos, se lavaron 3 veces con Buffer PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario Anti-IgG de conejo hecho en cabra con HRP (Rockland) por 1 hora a temperatura ambiente.

Nuevamente se realizaron 3 lavados con buffer PBS, para eliminar los complejos que no se encuentran unidos de manera específica, mientras se preparaba la solución de revelado con cromógeno, el que fue aplicado por 1.5 minutos. Luego de la revelación se realizó un lavado con agua destilada y la contratinción nuclear con Hematoxilina de Mayer (Merck) por 10 segundos. Posteriormente, fueron deshidratados, aclarados en xilol y montados con Permount.

Los cortes fueron visualizados en un microscopio Olympus CX81, con una cámara fotográfica Olympus DP71, que permitió la captura de los resultados obtenidos para cada determinación inmunohistoquímica.

Con el fin de realizar una secuencia de imágenes de la placenta en los distintos planos de profundidad del molde, fueron obtenidas imágenes al microscopio óptico de la secuencia del laberinto, zona de unión y espongiotrofoblasto con ayuda del programa Adobe photoShop.

### **3.4 Limitaciones del Estudio:**

La principal limitación de este estudio fue que no se dispuso con la totalidad del material biológico proveniente del Laboratorio de Hipertensión del Departamento de Farmacología del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Sao Paulo (ICB-USP), Brasil. Tal situación impidió la obtención de placentas con restricción alimentaria en los 17 y 20 DG, su posterior análisis y comparación con placentas sin restricción alimentaria de similar estadio.

## CAPITULO 4: RESULTADOS

### 4.2 DESCRIPCIÓN Y ANÁLISIS MORFOLÓGICA DE PLACENTAS DE ANIMALES SIN RESTRICCIÓN ALIMENTARIA.

El proceso de placentación en roedores se caracteriza por el desarrollo de regiones especializadas que componen la unidad útero-placentaria. Estas regiones placentarias cuyo orden en un corte transversal desde el feto a los tejidos maternos es el siguiente: región del laberinto, zona de unión y la región de células gigantes del trofoblasto.

#### **Placenta 14 DG:**

En este día de la gestación, fue posible observar toda la estructura placentaria y sus regiones, destacándose la región del laberinto con sus espacios sanguíneos maternos y los vasos sanguíneos fetales. Éstos últimos rodeados por las células trofoblásticas que conforman la barrera placentaria en esta especie (**Fig. 4.1.A**). Esta región se continuó con la zona de unión que en este día estaba conformada por células del espongiotrofoblasto (**Fig.4.1.B**). En esta región no se observaron células ricas en glicógeno, así como vasos sanguíneos maternos. Finalmente, adyacente al tejido decidual, se observaron las células gigantes del trofoblasto (CGT), organizadas de manera paralela al plano de corte y con una espesura aproximada de cuatro capas celulares (**Fig. 4.1.C**).

#### **Placenta 17 DG:**

Al día 17 de la gestación, fue posible observar la región del laberinto como una zona predominante en la arquitectura placentaria con abundantes espacios sanguíneos maternos y vasos sanguíneos fetales. Destacando en esta zona los vasos coriónicos que ingresan a través del laberinto en dirección de la zona de unión (**Fig. 4.2.A**). Dicha zona, además de las células del espongiotrofoblasto, se observaron las células ricas en glicógeno (CRG) (**Fig. 4.2.B**). Las células gigantes

del trofoblasto (CGT), se observaron en un menor número de capas celulares, las que invadieron la decidua materna (DM) (**Fig. 4.2.C**).

#### **Placenta 20 DG:**

En este día de la gestación, el laberinto (L) fue más abundante y estructuralmente organizado respecto a sus etapas anteriores, abundaron en él una gran cantidad de vasos sanguíneos. Se observó en varios cortes que las CGT presentaron una tendencia a agruparse en dirección al laberinto, perdiendo esta región su organización histológica (**Fig.4.3.A**). En la zona de unión, disminuyó la presencia de células ricas en glicógeno (CRG), manteniéndose las células del espongiotrofoblasto. Sin embargo, la zona de unión presentó una menor proporción tisular respecto a las etapas anteriores (**Fig. 4.3. B**). Las células gigantes del trofoblasto (CGT), se observaron en un menor número de capas celulares, e invadieron la decidua materna (DM), así como la zona de unión, perdiendo la organización observada en etapas anteriores (**Fig.4.3.C**).

### **4.3 DESCRIPCIÓN Y ANÁLISIS MORFOLÓGICA EN PLACENTAS DE ANIMALES CON RESTRICCIÓN ALIMENTARIA.**

En el 14 DG, las placentas se observaron cualitativamente de menor tamaño y de forma ovalada respecto a las del grupo sin restricción alimentaria, con el tejido fetal (placenta) disminuido respecto a una predominante decidua materna (DM) (**Fig.4.4**). La región del laberinto (L) se observó con poca organización y menor amplitud, conteniendo los vasos sanguíneos fetales (VS) dispersos en él y en menor cantidad (**Fig.4.5**).

En las placentas de animales con restricción alimentaria, se observaron células ricas en glicógeno en la zona de unión y un menor desarrollo de las células del espongiotrofoblasto (**Fig.4.6**), a diferencia de lo encontrado en placentas de animales sin restricción alimentaria.

Se observaron escasas células gigantes del trofoblasto (CGT) con forma más ovalada y de menor tamaño (**Fig.4.7**), las que tendieron a alinearse en lugar de mantener varias capas como ocurre en la condición sin restricción alimentaria.

#### **4.4 DESCRIPCIÓN Y ANÁLISIS INMUNOHISTOQUIMICO DE PLACENTAS DE ANIMALES SIN RESTRICCIÓN ALIMENTARIA.**

##### **4.4.1. Óxido Nítrico Sintasa Inducible (iNOS)**

La inmunomarcación de iNOS fue observada principalmente en la zona de unión y el laberinto, así como en las células gigantes del trofoblasto, pero con una inmunomarcación más débil que las otras zonas en los diferentes días estudiados (14 DG, 17 DG y 20 DG).

La región del laberinto presentó una inmunomarcación positiva muy intensa en el día 14DG (**Fig. 4.8.A**) en todos los tipos celulares presentes en esta región. A medida que progresó la gestación, esta inmunomarcación se volvió más débil, como se observó a partir del 17 DG (**Fig.4.8.B**). En el día 20 DG la inmunomarcación fue observada exclusivamente en el endotelio de los vasos sanguíneos fetales al 20 DG (**Fig.4.8.C**).

La Zona de Unión tuvo una inmunomarcación positiva e intensa en los dos primeros estadios (**Fig.4.9.A; Fig.4.9.B**), siendo débil al término de la gestación (**Fig.4.9.C**). La intensidad de la inmunomarcación fue heterogénea en los tipos celulares observados. Las células ricas en glicógeno presentaron una inmunomarcación más débil respecto a las células del espongiotrofoblasto (**Fig.4.3.B**).

En la región de las Células Gigantes la inmunomarcación disminuye a medida que progresa la gestación, siendo muy débil, en el estadio de 20 DG (**Fig.4.10.C**). Esta marcación fue distribuida preferentemente alrededor del núcleo.

### **- Óxido Nítrico Sintasa Inducible (iNOS) en placenta de animales desnutridas en el 14 DG**

La inmunomarcación de iNOS en las placentas de 14 DG con restricción alimentaria, se observó en todas las regiones placentarias.

En la región del Laberinto se observó una inmunomarcación heterogéneamente distribuida, principalmente en las células del sincitiotrofoblasto, siendo negativa en las células del citotrofoblasto asociado a los espacios sanguíneos maternos. Respecto al sin restricción alimentaria la intensidad de la inmunomarcación fue menor (**Fig.4.11**) respecto al sin restricción alimentaria.

La Zona de Unión presentó una inmunomarcación positiva más homogénea en las células del espongiotrofoblasto, sin embargo, en las células ricas en glicógeno, la distribución de la inmunomarcación para iNOS se observó preferentemente en la membrana celular de éstas (**Fig.4.12**).

En la región de las Células Gigantes del trofoblasto, la inmunomarcación a diferencia de las placentas de animales sin restricción alimentaria, fue distribuida en todo el citoplasma con una mayor intensidad para la innumarcación (**Fig.4.13**).

#### **4.4.2. Glutación Peroxidasa (GPX)**

La inmunomarcación de GPX fue observada principalmente en la región de las células gigantes del trofoblasto, con una menor intensidad en la zona de unión y el laberinto en los diferentes días de la gestación (14 DG, 17 DG y 20 DG).

En la región del Laberinto la inmunomarcación fue positiva en los dos últimos grupos estudiados (17 y 20 DG). Sin embargo, ésta innumarcación a medida que progresó la gestación aumentó en intensidad. La localización de GPX en el Laberinto estuvo dada principalmente en el endotelio de los vasos sanguíneos fetales (**Fig.4.14**).

En la Zona de Unión la inmunomarcación fue positiva en los tres grupos estudiados, con progresión ascendente a medida que avanzó la gestación. En las células ricas en glicógeno GPX se propagó en el citoplasma, siendo esta marcación más débil en las células del espongiotrofoblasto (**Fig.4.15**).

En la región de las Células Gigantes del trofoblasto, la inmunomarcación fue positiva en los tres estadios, siendo la distribución homogénea en el citoplasma, y aumentando la intensidad de la inmunomarcación a medida que progresó la gestación (**Fig.4.16**).

#### **.- Glutación Peroxidasa (GPX) en placenta de animales con restricción alimentaria.**

La inmunomarcación para GPX fue distribuida en las tres regiones de la placenta de animales desnutridas.

En la región del Laberinto, la inmunomarcación fue observada principalmente en el sincitiotrofoblasto, asociado a los vasos sanguíneos fetales, y con una mayor intensidad respecto a placentas de animales sin restricción alimentaria (**Fig.4.17**).

En la Zona de Unión, las células espongiotrofoblásticas y ricas en glicógeno presentaron inmunomarcación en su citoplasma, de manera homogénea, presentando una mayor intensidad respecto al sin restricción alimentaria (**Fig.4.18**).

La inmunomarcación de GPX en las Células Gigantes del trofoblasto, fue observada de manera homogénea en el citoplasma, siendo más intensa la inmunomarcación respecto a la misma región de placentas de animales sin restricción alimentaria (**Fig.4.19**).

#### **4.4.3. Superóxido Dismutasa 1 (SOD1)**

La inmunomarcación para SOD 1 se observó en las tres regiones de la placenta, con diferencias en la intensidad, en los tres grupos estudiados: 14 DG, 17 DG y 20 DG.

La zona del Laberinto mantuvo una inmunomarcación positiva en los diferentes tipos celulares en el estadio 14 DG (**Fig.4.20.A**) y 17 DG (**Fig.4.20.B**), sin embargo en el 20 DG, se observó una mayor intensidad y localización en los vasos sanguíneos del feto. (**Fig.4.20.C**).

La Zona de Unión mostró una inmunomarcación positiva, la que predominó en el 14 DG (**Fig.4.21.A**). En los siguientes estadios, tanto 17 DG (**Fig.4.21.B**) como 20 DG (**Fig.4.21.C**) se observó una marcación débil pero homogénea en el citoplasma de las células del espongiotrofoblasto. En el 17 DG, la presencia de SOD1 fue localizada en la membrana celular de las células ricas en glicógeno (**4.21.B**).

En la región de las Células Gigantes del trofoblasto, se observó una inmunomarcación positiva para SOD1 en los diferentes estadios de las placentas, con una distribución heterogénea e intensidad moderada (**Fig.4.22.A, 4.22.B y 4.22.C**).

#### **.- Superóxido Dismutasa 1 en placenta de animales con restricción alimentaria.**

La inmunomarcación para SOD1 fue distribuida en las tres regiones de la placenta de animales desnutridas.

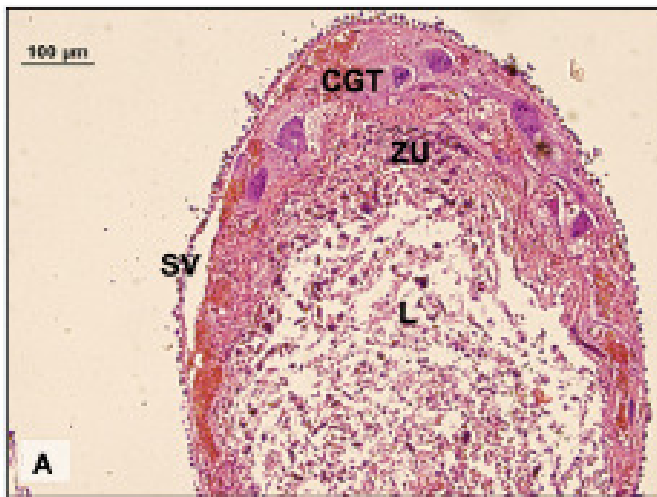
En la región del Laberinto la inmunomarcación fue observada de manera homogénea en todos los tipos celulares y con una mayor intensidad respecto al laberinto de placentas de animales sin restricción alimentaria (**Fig.4.23**).

En la Zona de Unión la marcación fue observada tanto en las células del espongiotrofoblasto y células ricas en glicógeno, sin presentar diferencias en cuanto a intensidad con las placentas de animales sin restricción alimentaria **(Fig.4.24)**.

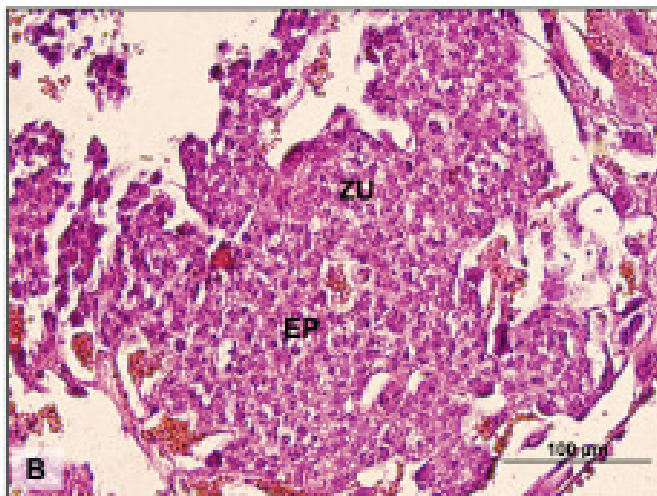
En la región de las Células Gigantes del trofoblasto, la inmunomarcación fue positiva con una intensidad mayor respecto al sin restricción alimentaria y con distribución citoplasmática y nuclear. **(Fig.4.25)**.

CAPITULO 4: RESULTADOS

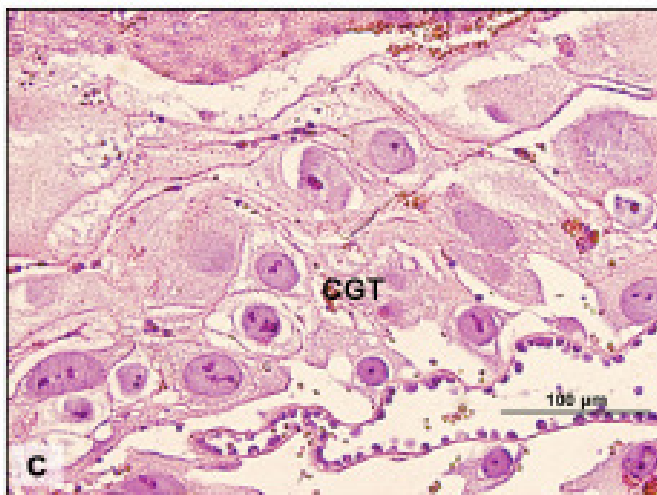
Documentación de Figura Hematoxilina-Eosina sin Restricción Alimentaria



A: Se observa toda la estructura placentaria y sus regiones, siendo el laberinto (L) la región que predomina en esta placenta.



B: La zona de unión (ZU) está compuesta sólo por células espongiotrofoblásticas (EP) sin la presencia de células ricas en glucógeno (CRG).

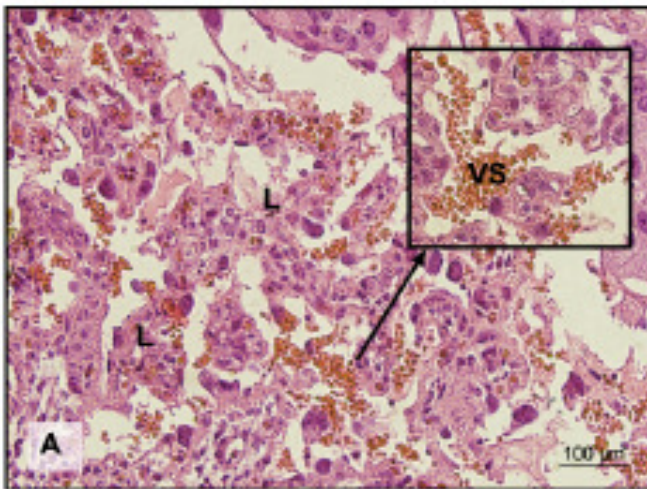


C: Se observan cuatro capas de células gigantes del trofoblasto (CGT) adyacentes al tejido decidual.

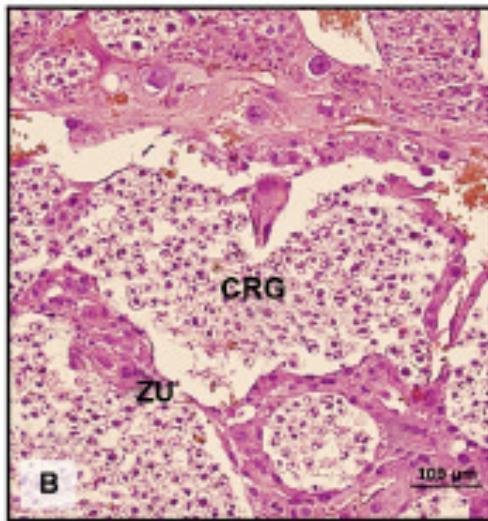
Figura 4.1: Placenta 14 DG

CAPITULO 4: RESULTADOS

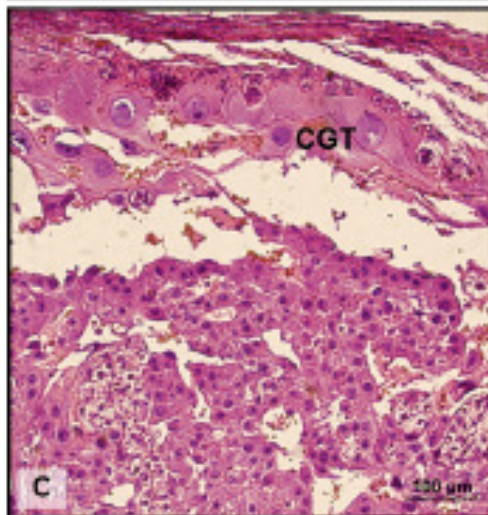
Documentación de Figura Hematoxilina-Eosina sin Restricción Alimentaria



**A:** Se observa la región del laberinto (L) con abundantes espacios sanguíneos maternos y fetales (VS).



**B:** En la zona de unión (ZU) se observan abundantes células ricas en glucógeno (CRG).

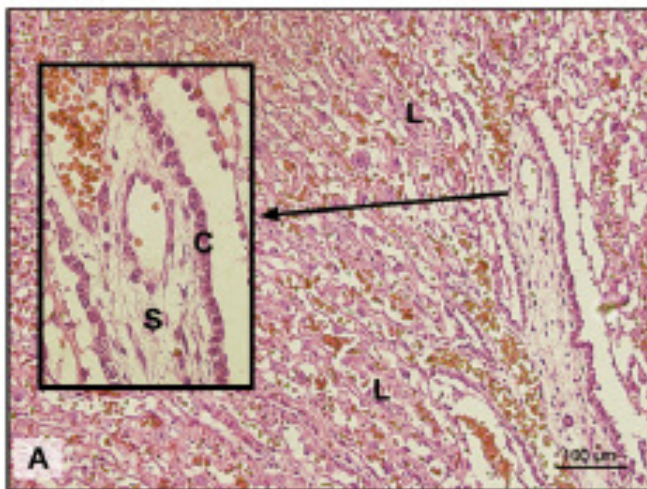


**C:** Las células gigantes del trofoblasto (CGT), se observan en un menor número de capas celulares.

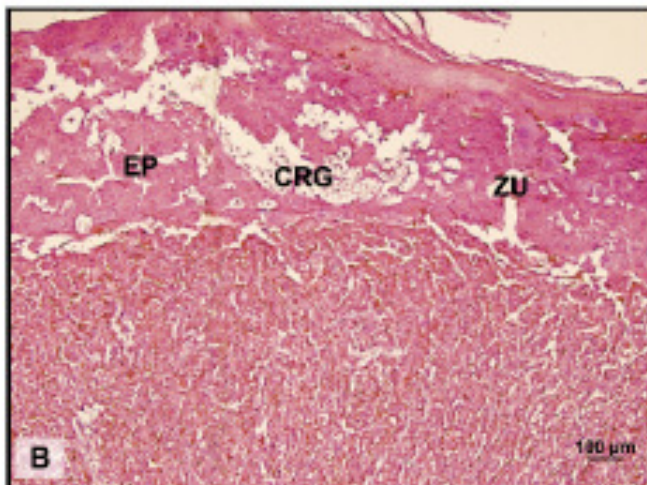
Figura 4.2: Placenta 17 DG

**CAPITULO 4: RESULTADOS**

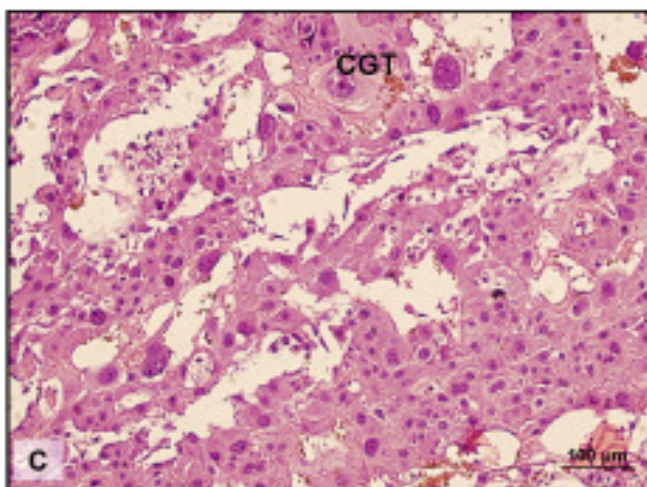
Documentación de Figura Hematoxilina-Eosina sin Restricción Alimentaria



**A:** Se observa la región del laberinto (L) abundante y organizado con la presencia de un vaso fetal constituido externamente por una capa de citotrofoblasto (C) e internamente varias capas de sinciotrofoblasto (S).



**B:** Se observa una menor proporción celular del espongiotrofoblasto (EP) y células ricas en glucógeno (CRG) en la zona de unión (ZU).

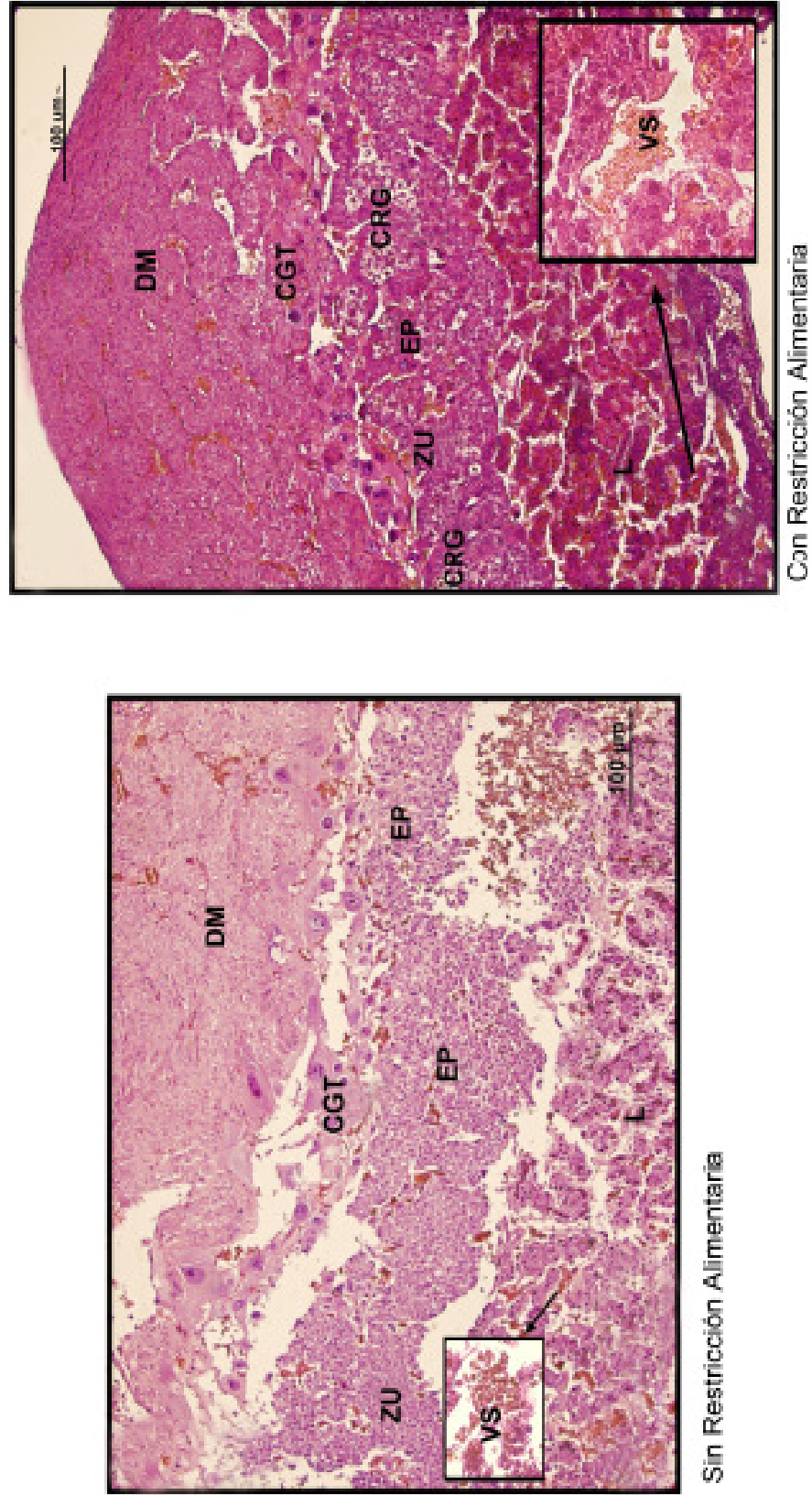


**C:** Se observa un reducido número de capas de células gigantes del trofoblasto (CGT).

Figura 4.3: Placenta 20 DG

**CAPÍTULO 4: RESULTADOS**

Documentación de Figura de Hematoxilina - Eosina con y sin Restricción Alimentaria

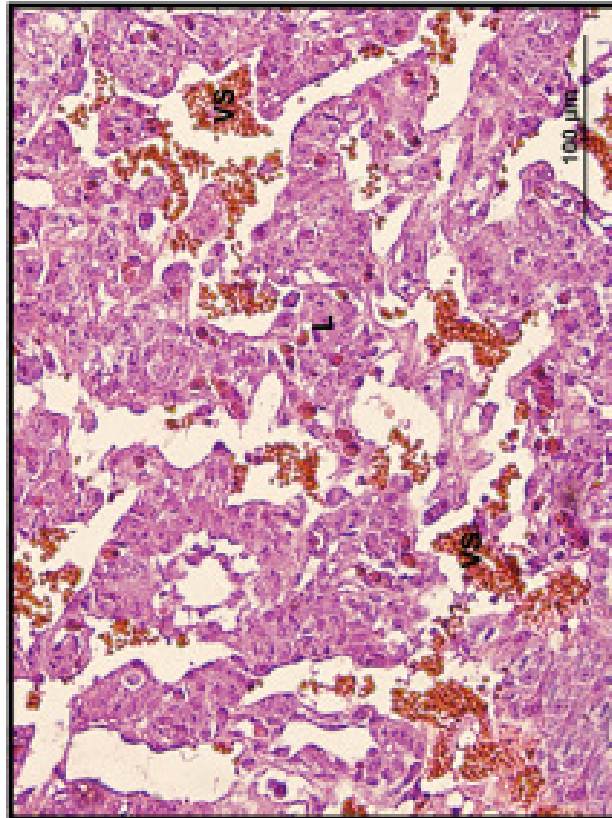


La placenta con restricción alimentaria se observa cualitativamente de menor tamaño respecto a la placenta sin dicha restricción.

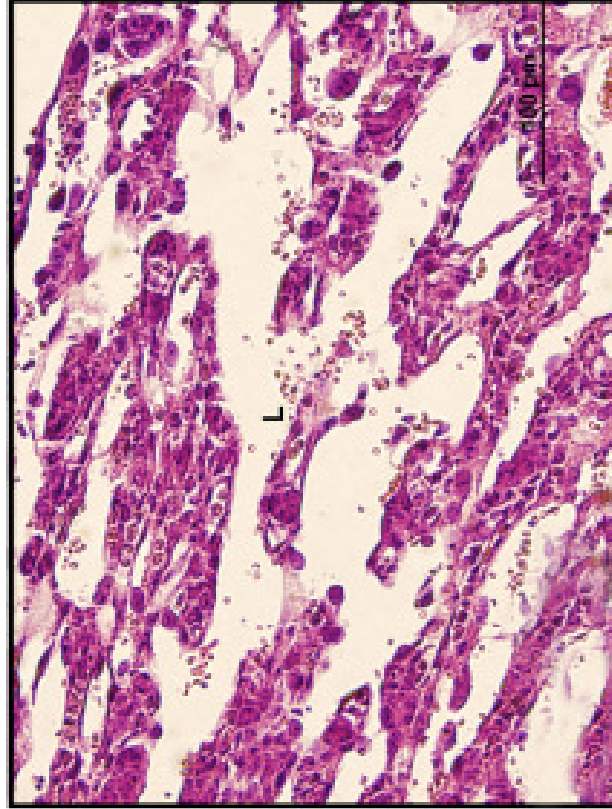
Figura 4.4: Estructuras Placentarias de 14 DG

### CAPÍTULO 4: RESULTADOS

Documentación de Figura de Hematoxilina - Eosina con y sin Restricción Alimentaria



Sin Restricción Alimentaria



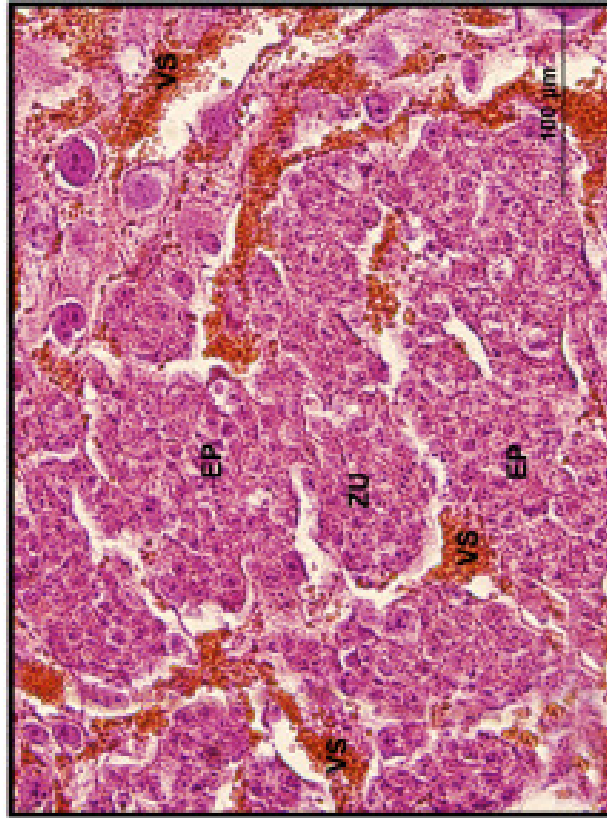
Con Restricción Alimentaria

*Se observa la región del laberinto (L) de placentas con restricción alimentaria con poca organización, menor amplitud y escasos vasos sanguíneos (VS) fetales respecto a la placenta sin dicha condición.*

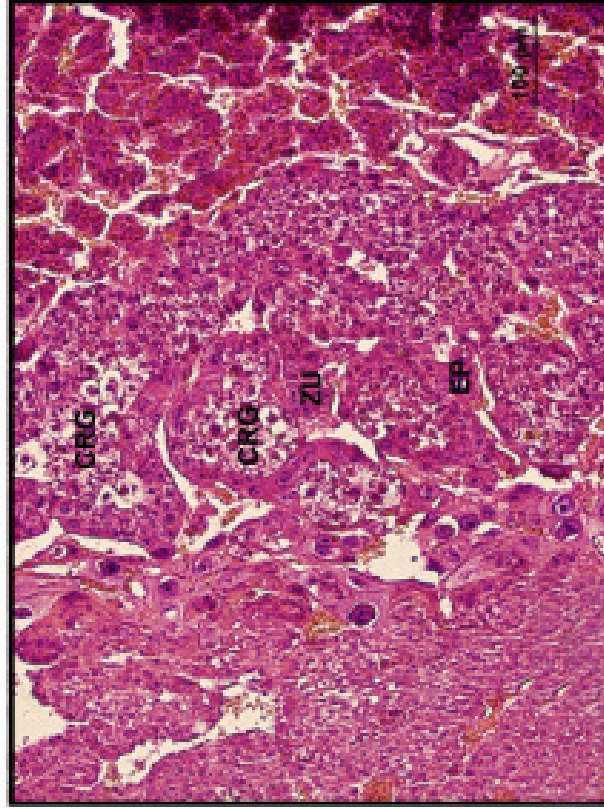
Figura 4.5 Región del Laberinto

**CAPÍTULO 4: RESULTADOS**

Documentación de Figura de Hematoxilina - Eosina con y sin Restricción Alimentaria



Sin Restricción Alimentaria



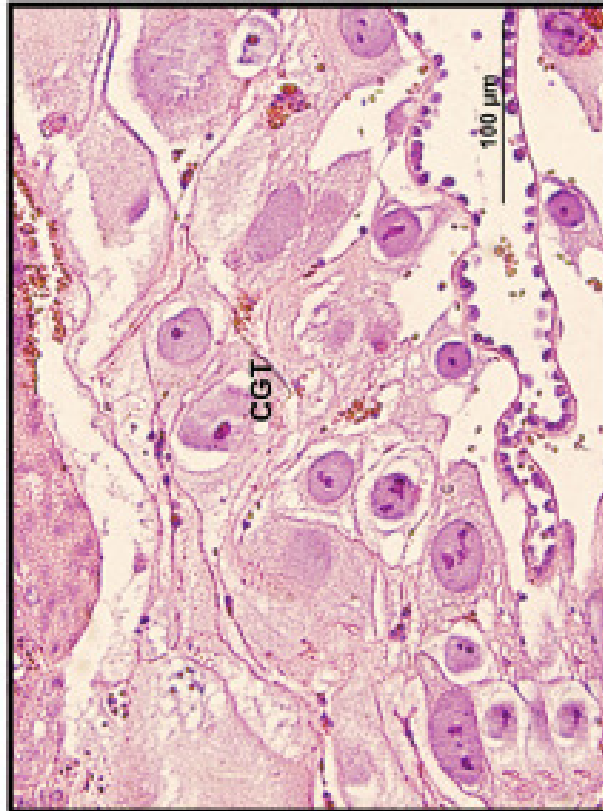
Con Restricción Alimentaria

*La zona de unión (ZU) de la placenta con restricción alimentaria presenta células ricas en glucógeno (CRG) y un menor desarrollo de las células del espongiotrofoblasto (EP) respecto a la placenta sin restricción.*

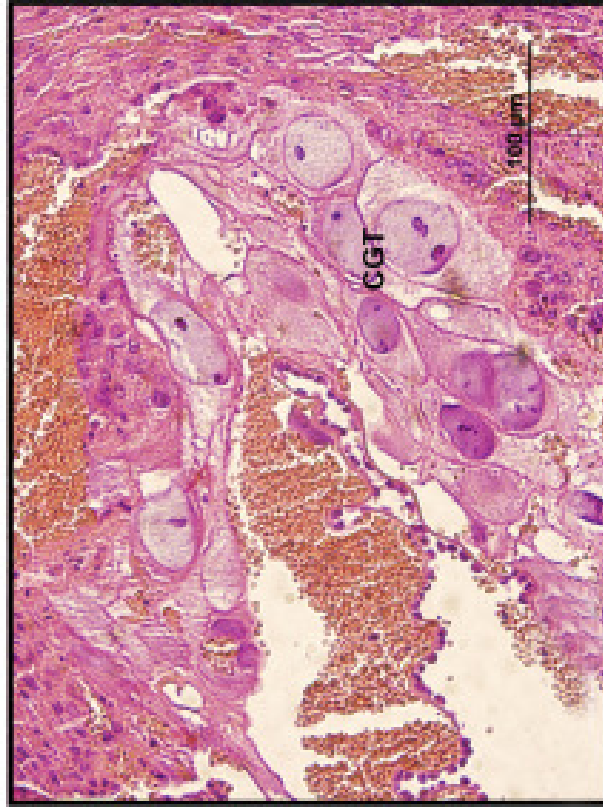
Figura 4.6: Zona de Unión

**CAPÍTULO 4: RESULTADOS**

Documentación de Figura de Hematoxilina - Eosina con y sin Restricción Alimentaria



Sin Restricción Alimentaria



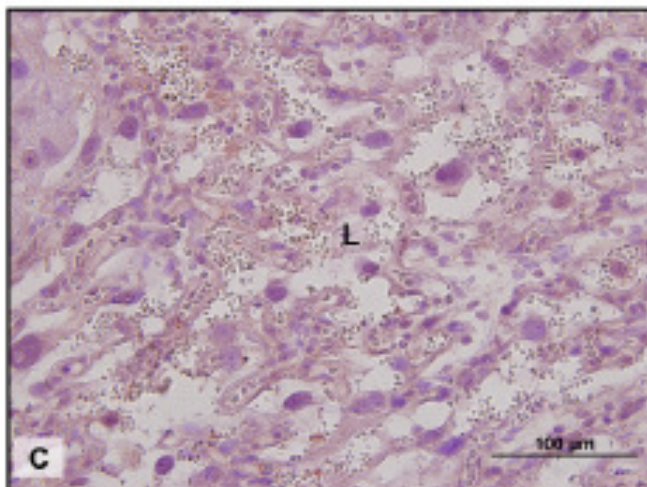
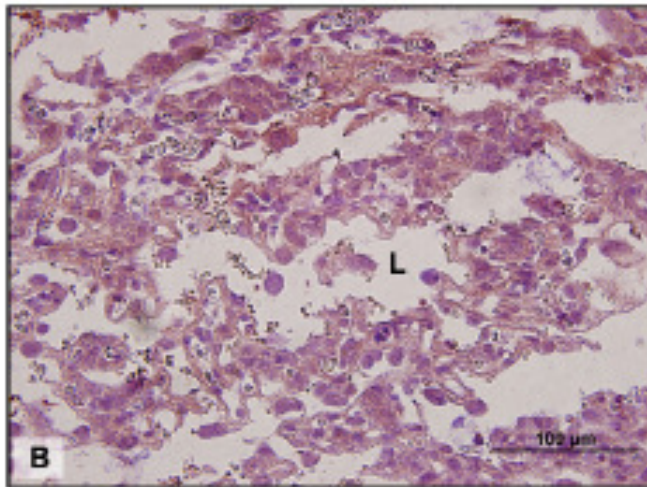
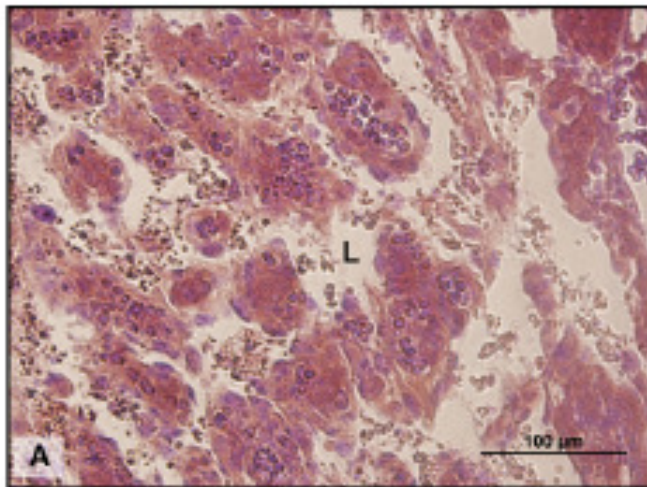
Con Restricción Alimentaria

*Se observan escasas células gigantes del trofoblasto (CGT) alineadas, de forma ovalada y de menor tamaño, respecto a la placenta sin restricción alimentaria.*

Figura 4.7: Región de las Células Gigantes del Trofoblasto

**CAPÍTULO 4: RESULTADOS**

Documentación de Figura de Inmunohistoquímica sin Restricción Alimentaria

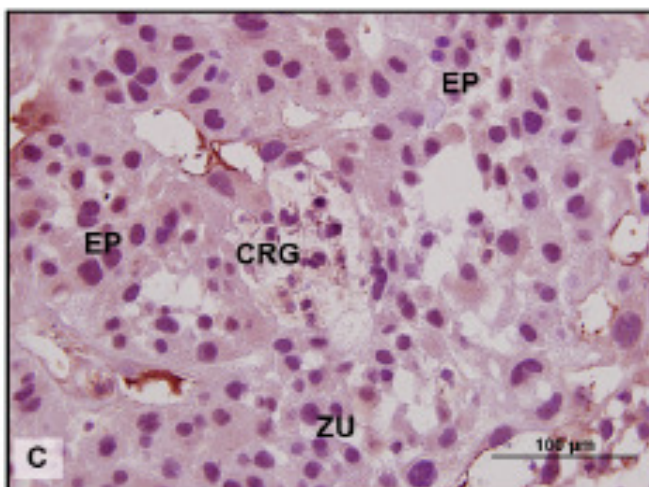
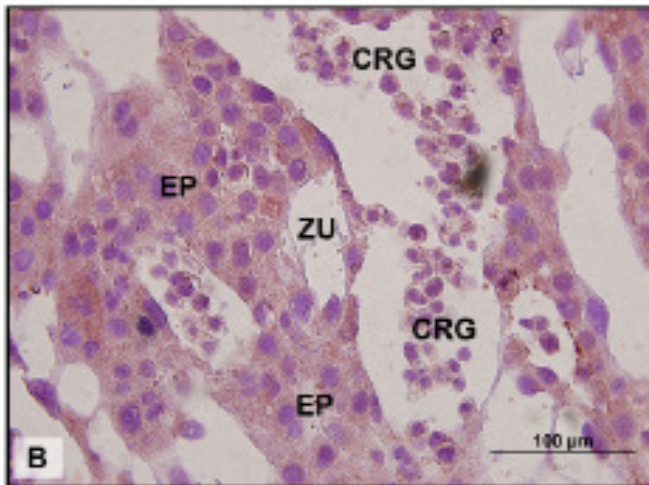
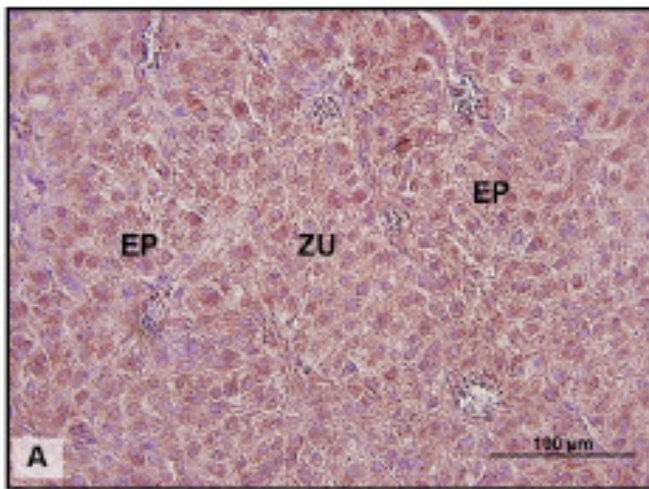


Se observa en **A**, **B** y **C** una inmunomarcación débil a medida que progresa la gestación.

Figura 4.8: iNOS - Region del Laberinto

### CAPÍTULO 4: RESULTADOS

Documentación de Figura de Inmunohistoquímica sin Restricción Alimentaria

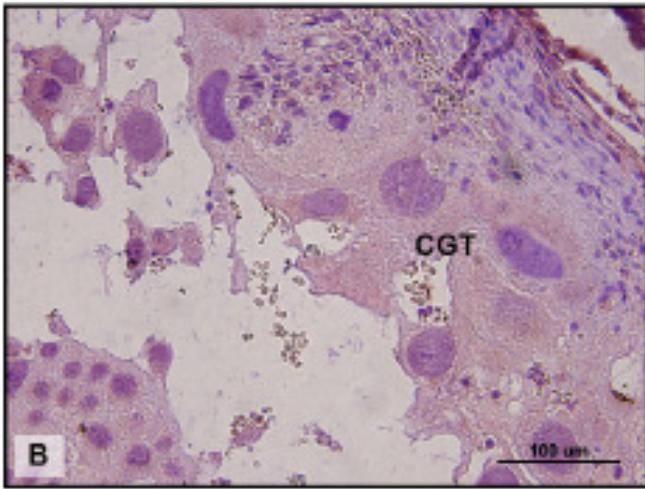
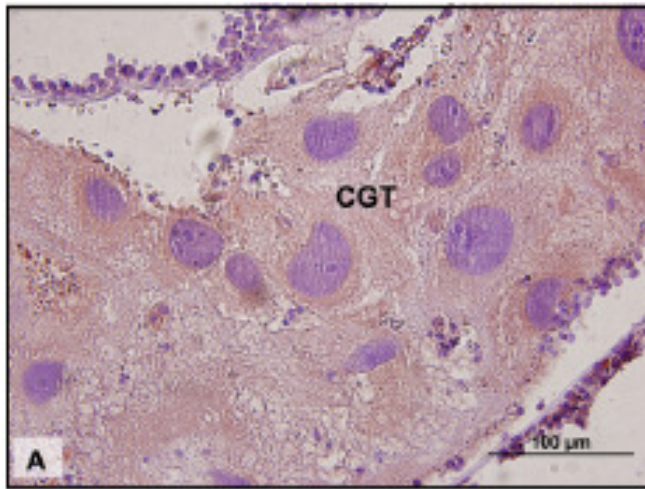


En la zona de unión (ZU) se aprecia tanto en A, B y C una marcación uniforme del anticuerpo en las células espongiotrofoblásticas (EP), siendo débil a medida que progresa la gestación. En B y C se observa la tinción de la membrana celular de las células ricas en glucógeno (CRG).

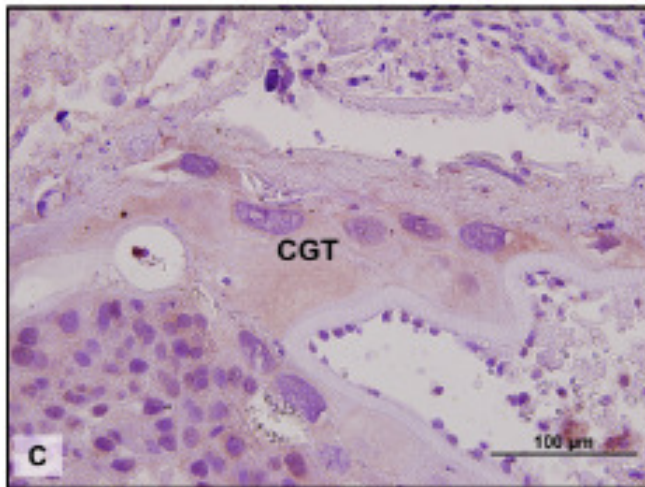
Figura 4.9: iNOS - Zona de Unión

**CAPÍTULO 4: RESULTADOS**

Documentación de Figura de Inmunohistoquímica sin Restricción Alimentaria



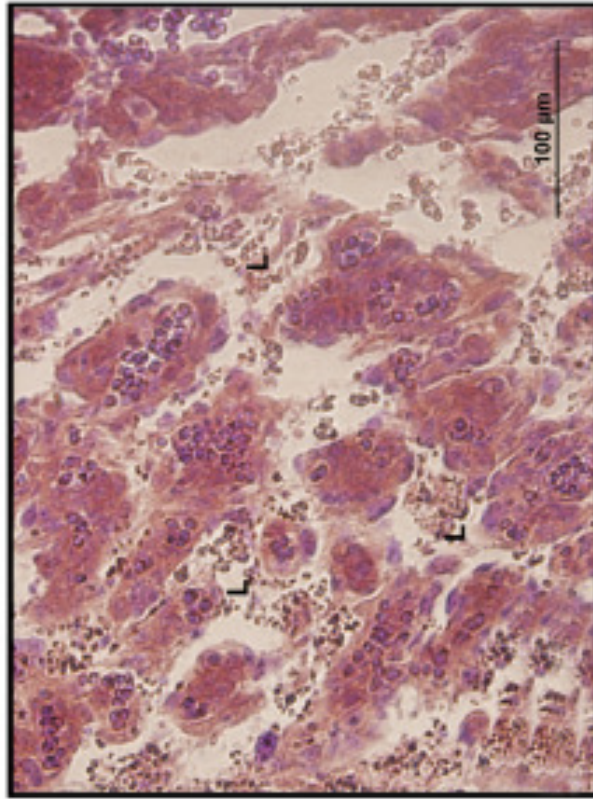
*En A, B y C se ilustran células gigantes del trofoblasto (CGT) cuya marcación del anticuerpo disminuye con el progreso de la gestación.*



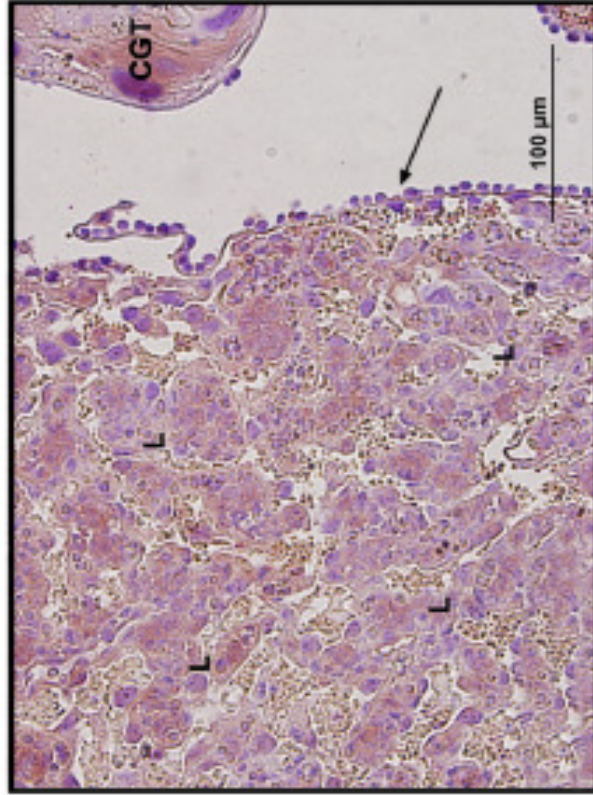
*Figura 4.10: iNOS - Región de las Células Gigantes del Trofoblasto*

**CAPÍTULO 4: RESULTADOS**

Documentación de Figura de Inmunohistoquímica con y sin Restricción Alimentaria



Sin Restricción Alimentaria



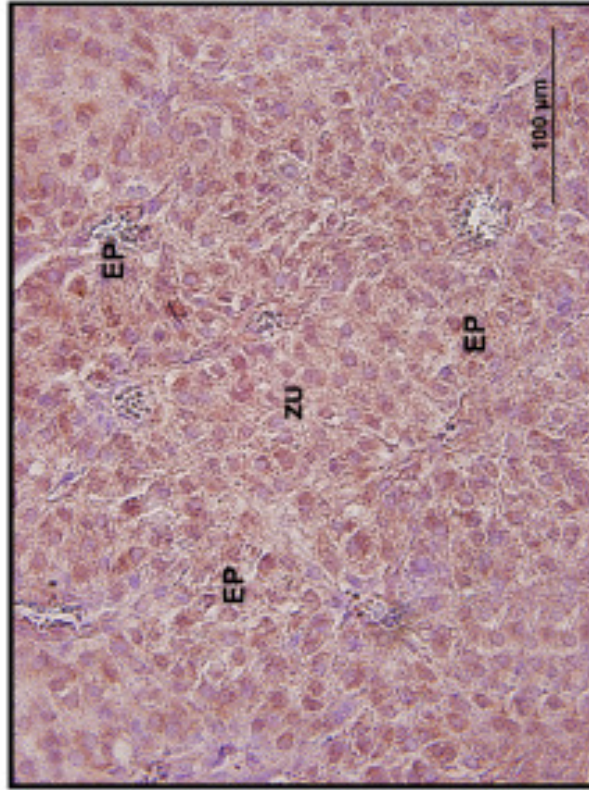
Con Restricción Alimentaria

*La intensidad de la marcación es menor en la placenta con restricción alimentaria respecto a la placenta sin dicha condición.*

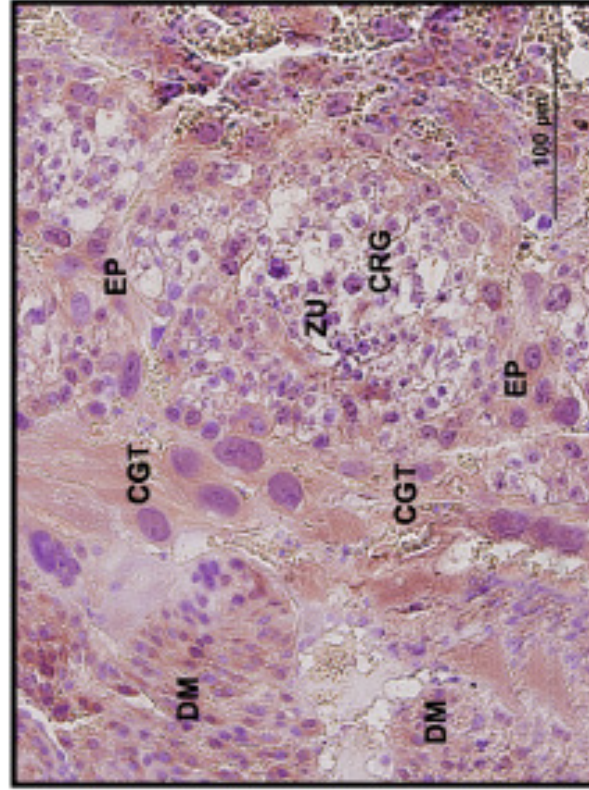
*Figura 4.11: iNOS - Región del Laberinto*

### CAPÍTULO 4: RESULTADOS

Documentación de Figura de Inmunohistoquímica con y sin Restricción Alimentaria



Sin Restricción Alimentaria



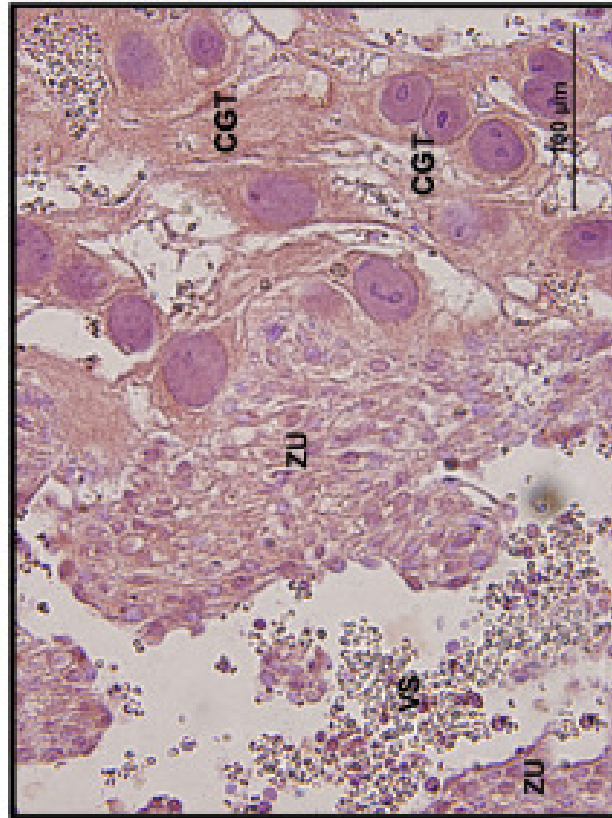
Con Restricción Alimentaria

*En ambas condiciones, la inmunomarcación se distribuye homogéneamente en las células espongiotrofoblásticas (EP). La placenta con restricción alimentaria posee células ricas en glicógeno (CRG) con marcación en su membrana celular.*

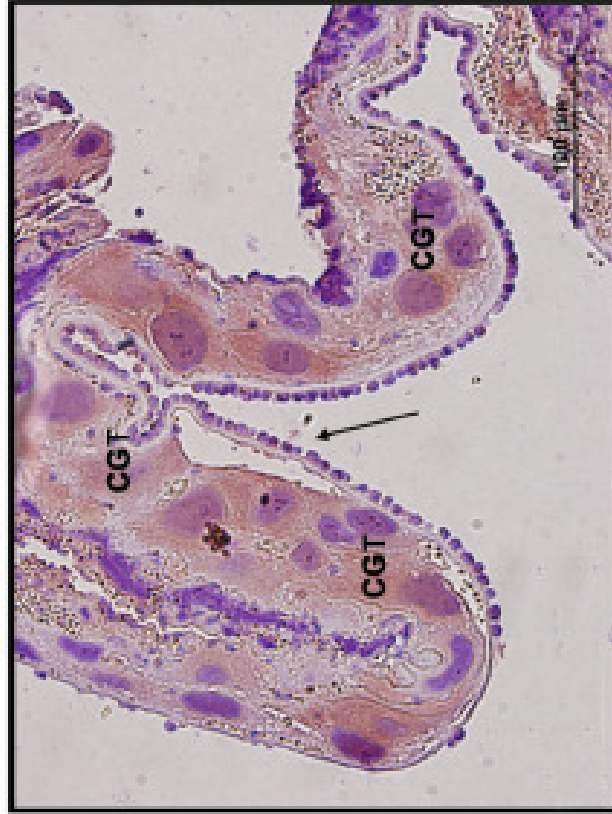
Figura 4.12: iNOS - Zona de Unión

### CAPÍTULO 4: RESULTADOS

Documentación de Figura de Inmunoquímica con y sin Restricción Alimentaria



Sin Restricción Alimentaria



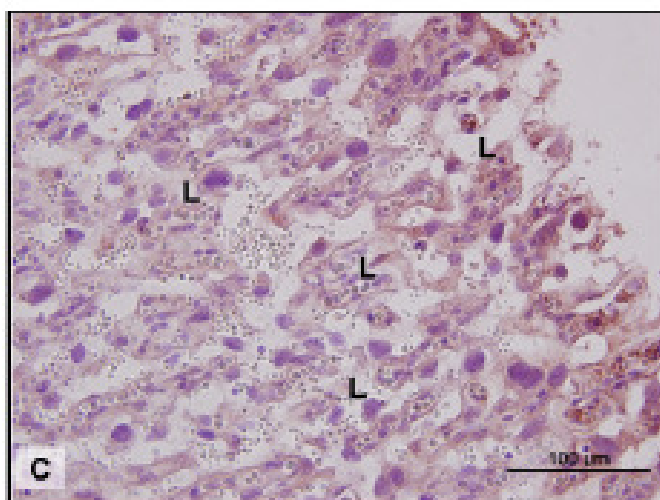
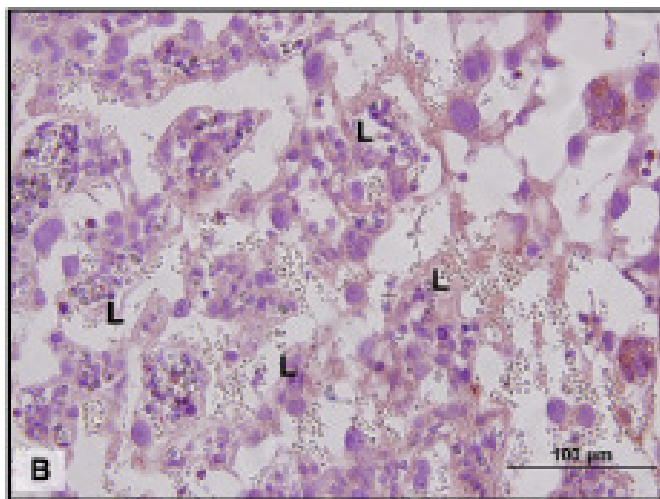
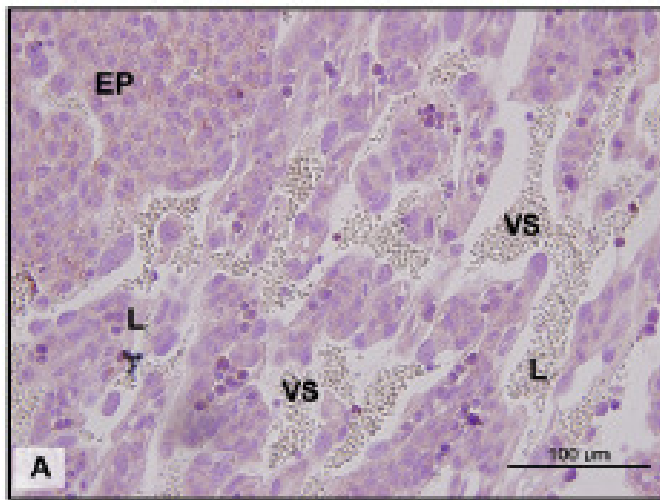
Con Restricción Alimentaria

La inmunomarcación es más intensa en las células gigantes del trofoblasto (CGT) de la placenta sometida a restricción alimentaria, abarcando todo su citoplasma a diferencia de la placenta sin restricción.

Figura 4.13: iNOS - Región de las Células Gigantes del Trofoblasto

### CAPÍTULO 4: RESULTADOS

Documentación de Figura de Inmunohistoquímica sin Restricción Alimentaria

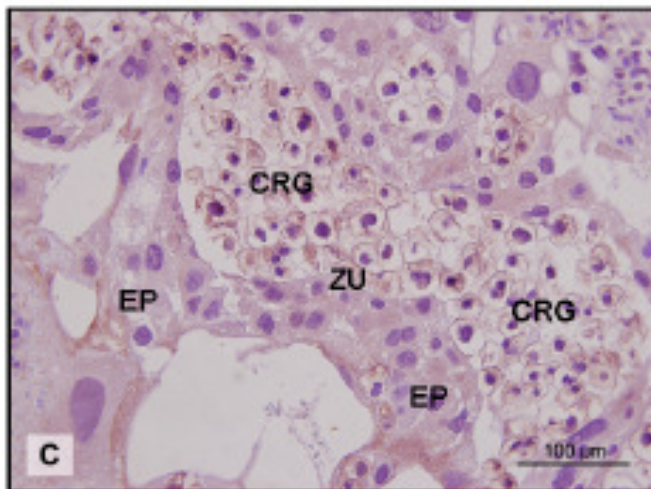
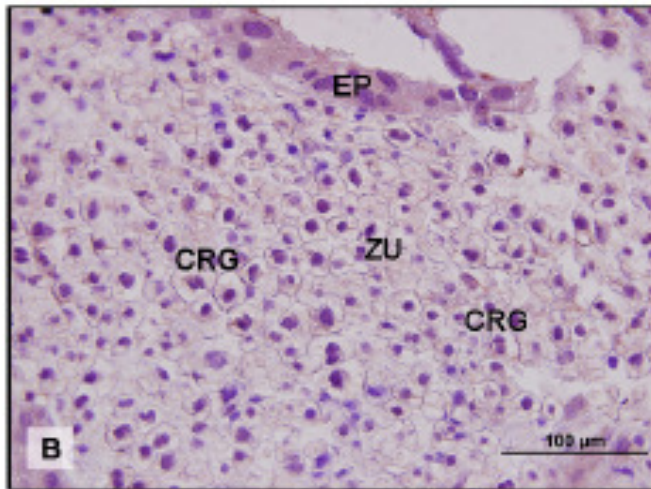
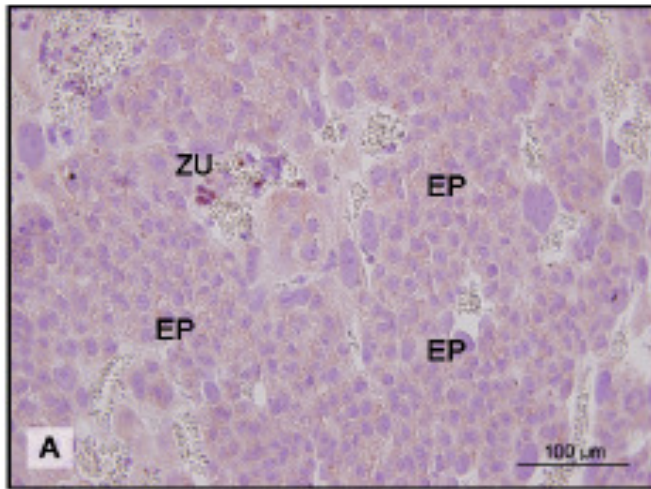


*En la región del laberinto (L), se aprecia en A, B y C una mayor intensidad de la inmunomarcación la cual progresa con el avance de la gestación.*

Figura 4.14: GPX - Región del Laberinto

### CAPÍTULO 4: RESULTADOS

Documentación de Figura de Inmunohistoquímica sin Restricción Alimentaria

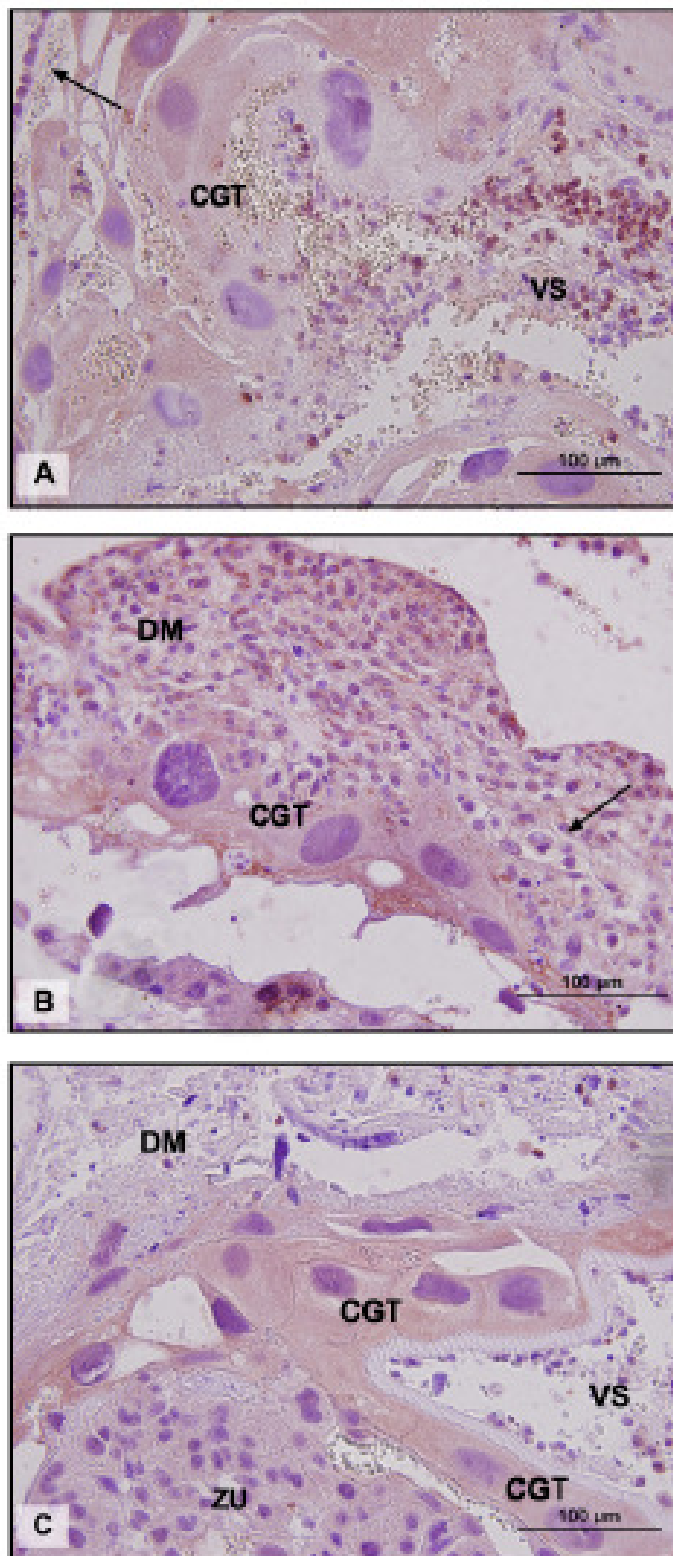


*En la zona de unión (ZU) la inmunomarcación en A, B y C aumenta a medida que avanza la gestación. En B y C, la inmunomarcación de las células ricas en glicógeno (CRG) se distribuye en el citoplasma, siendo más débil en las células del espongiotrofoblasto (EP).*

Figura 4.15: GPX - Zona de Unión

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

Documentación de Figura de Inmunohistoquímica sin Restricción Alimentaria

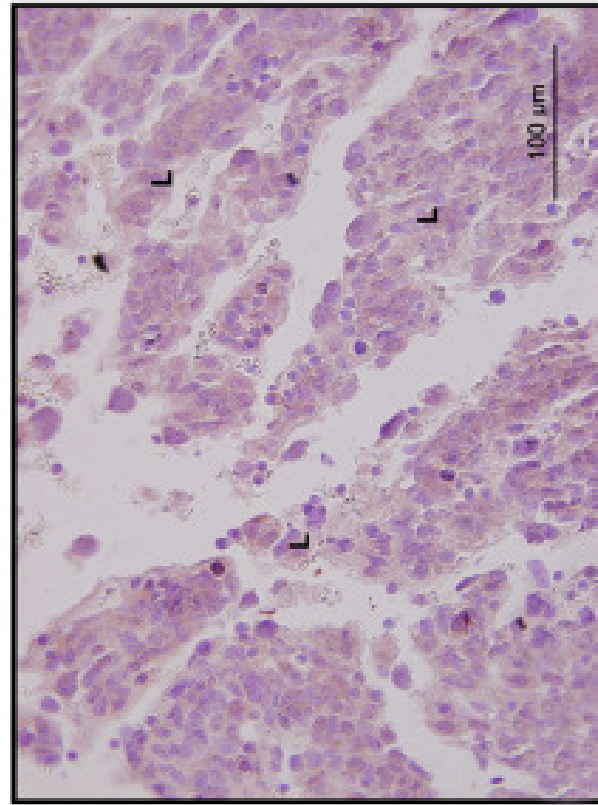


*En A, B y C la distribución de la inmunomarcación fue homogénea en el citoplasma acorde con el progreso de la gestación.*

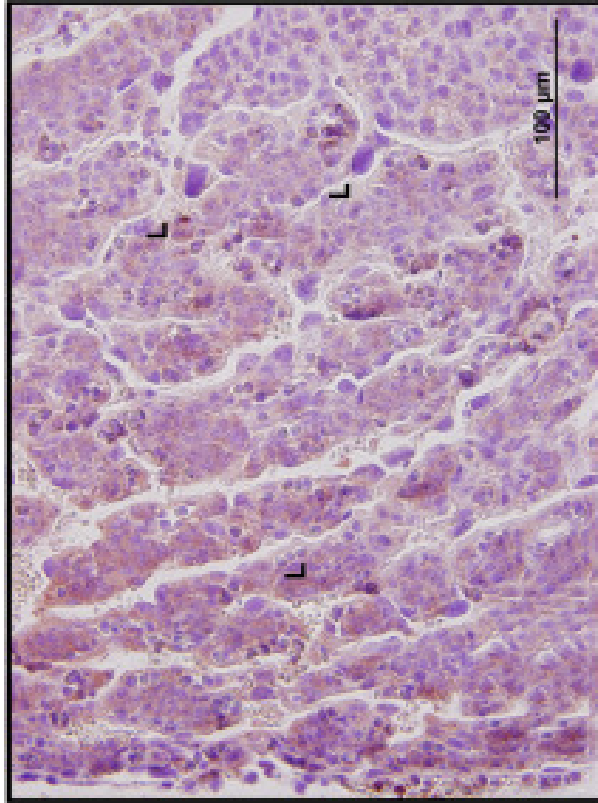
Figura 4.16: GPX - Región de Células Gigantes del Trofoblasto

### CAPÍTULO 4: RESULTADOS

Documentación de Figura de Inmunohistoquímica con y sin Restricción Alimentaria



Sin Restricción Alimentaria



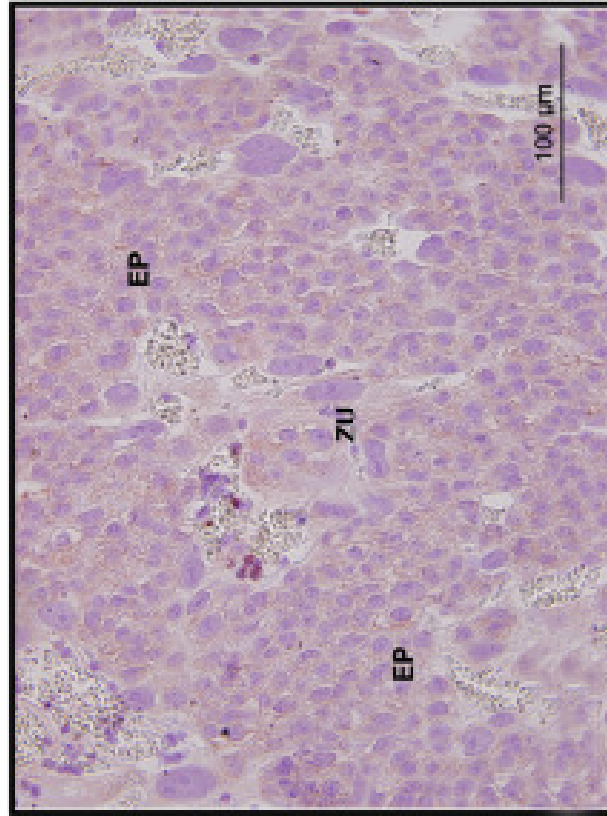
Con Restricción Alimentaria

*En la región del laberinto (L), la inmunomarcación se observa principalmente en el sincitiotrofoblasto, siendo más intensa en la placenta con restricción alimentaria a diferencia de la placenta sin restricción.*

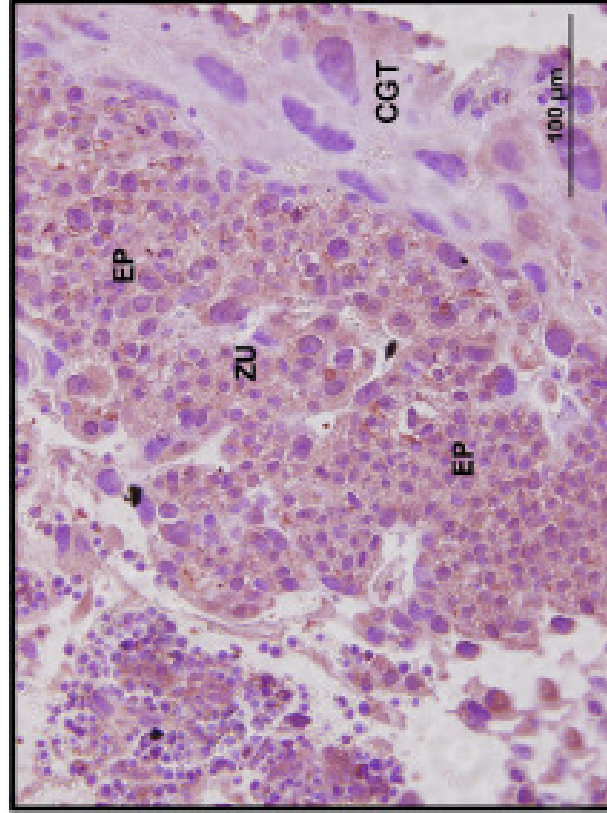
Figura 4.17: GPX - Región del Laberinto

**CAPÍTULO 4: RESULTADOS**

Documentación de Figura de Inmunohistoquímica con y sin Restricción Alimentaria



Sin Restricción Alimentaria



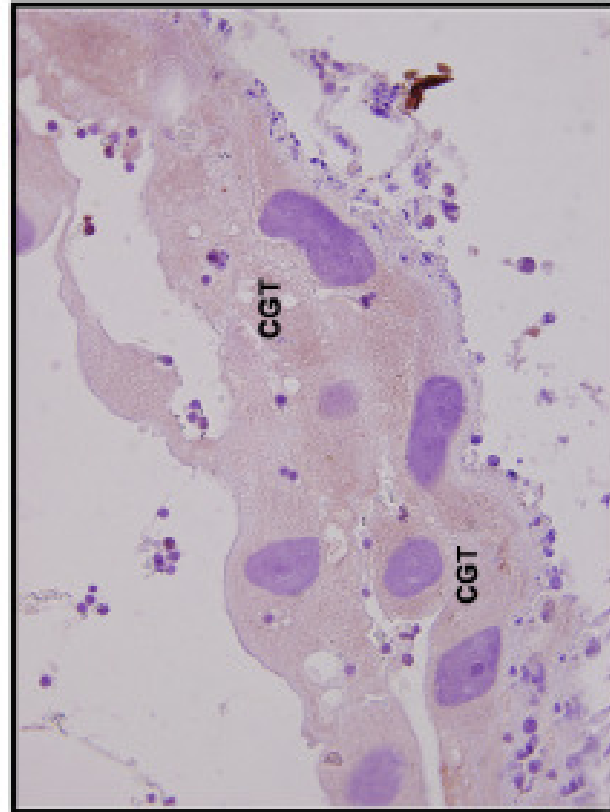
Con Restricción Alimentaria

*En la zona de unión (ZU) de la placenta con restricción alimentaria, las células espongiotrofoblásticas (EP) y las células ricas en glicógeno (CRG) presentan inmunomarcación homogénea en su citoplasma, presentando una mayor intensidad respecto a la placenta sin restricción.*

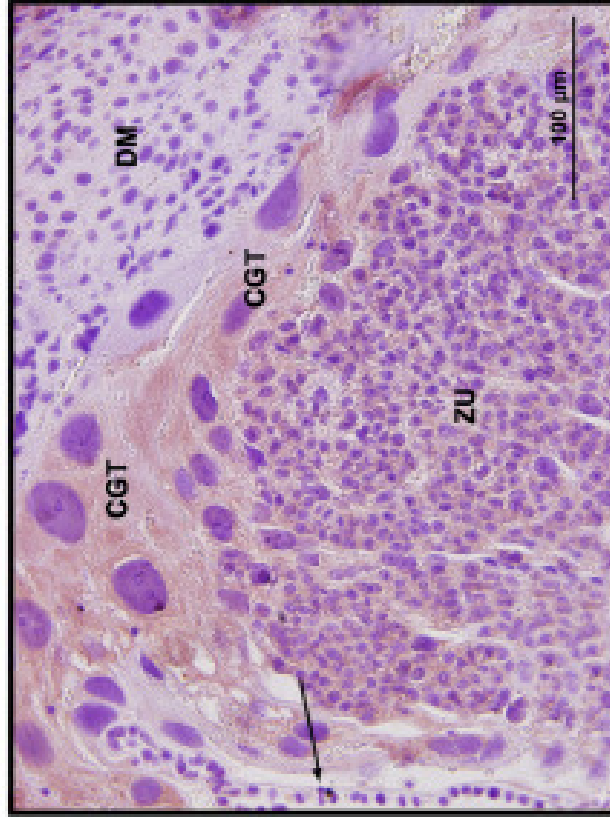
Figura 4.18: GPX - Zona de Unión

### CAPÍTULO 4: RESULTADOS

Documentación de Figura de Inmunohistoquímica con y sin Restricción Alimentaria



Sin Restricción Alimentaria



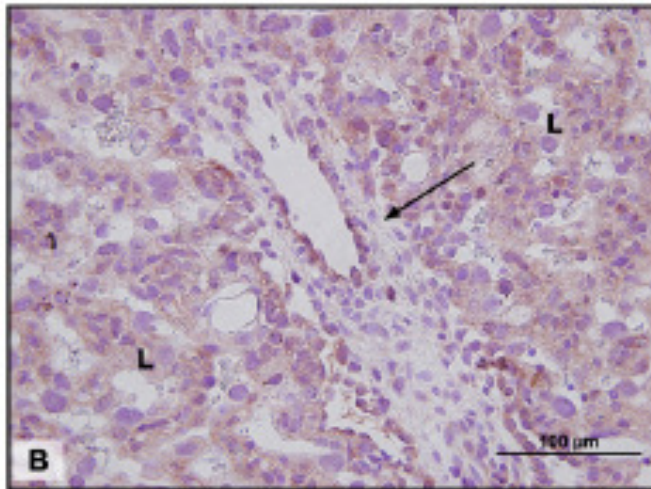
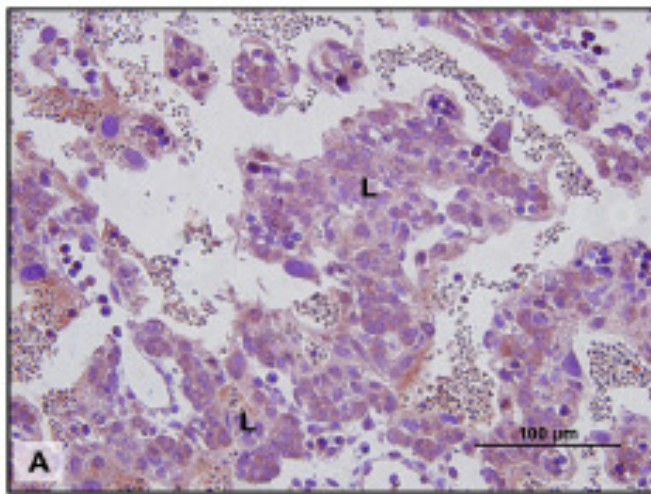
Con Restricción Alimentaria

*En la región de las células gigantes del trofoblasto (CGT) de la placenta con restricción alimentaria, presentan inmunomarcación homogénea en su citoplasma, presentando una mayor intensidad respecto a la placenta sin restricción.*

Figura 4.19: GPX - Región de las Células Gigantes del Trofoblasto

### CAPÍTULO 4: RESULTADOS

Documentación de Figura de Inmunohistoquímica sin Restricción Alimentaria



La región del laberinto (L) mantuvo una inmunomarcación heterogénea siendo en C donde se observa una mayor intensidad y localización en los vasos sanguíneos del feto.

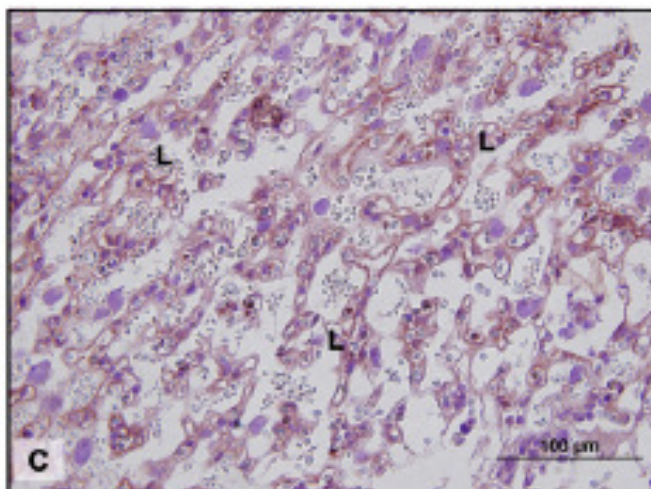
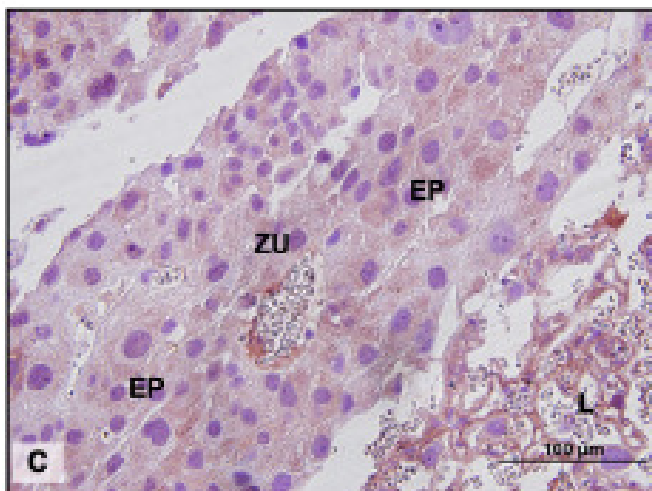
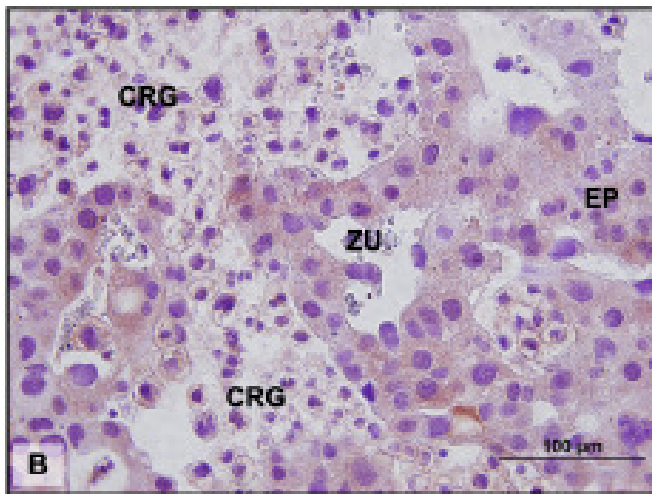
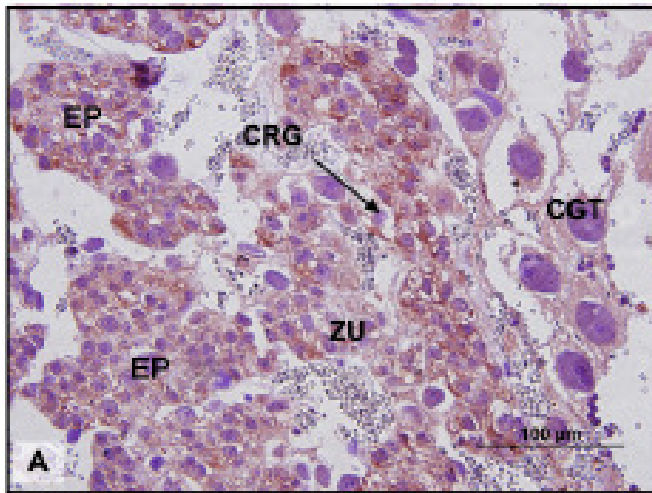


Figura 4.20: SOD - Región del Laberinto

### CAPÍTULO 4: RESULTADOS

Documentación de Figura de Inmunohistoquímica sin Restricción Alimentaria

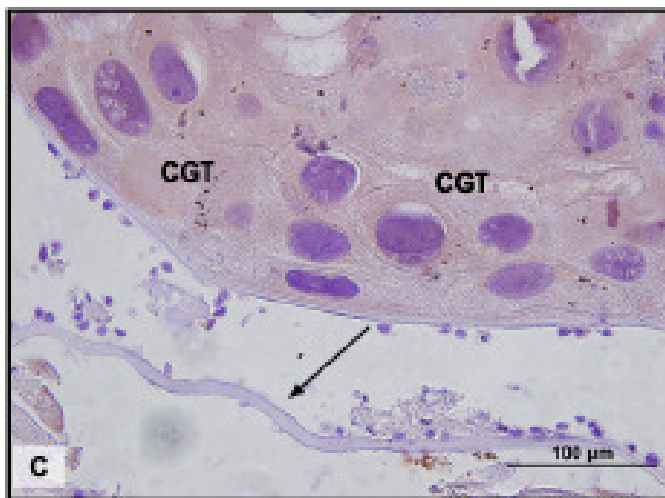
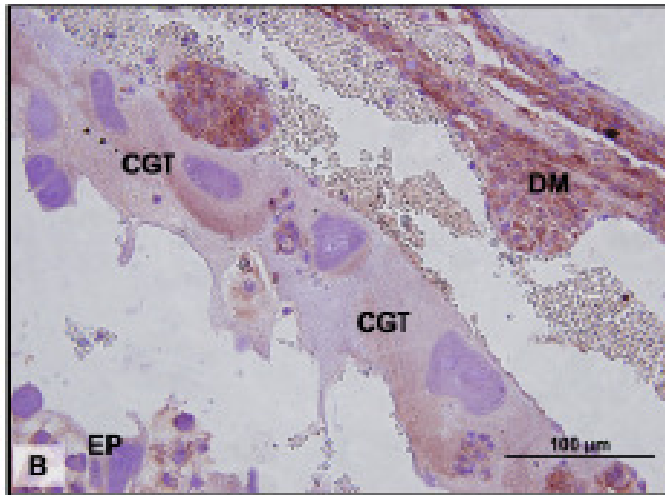
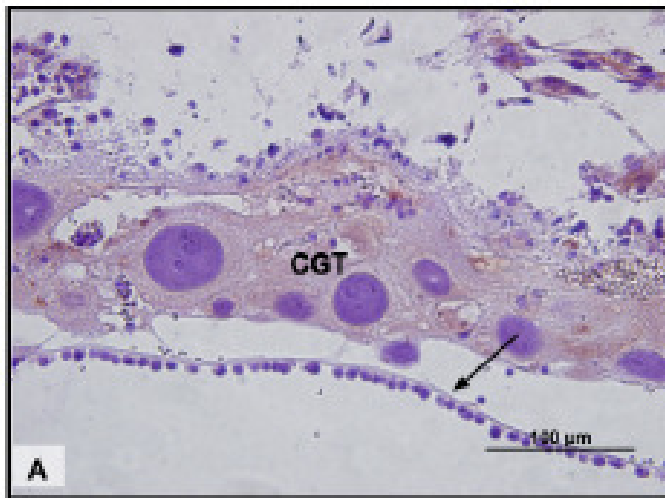


La zona de unión (ZU) muestra una inmunomarcación homogénea tanto en B como en C pero más débil que en A. En B, la inmunomarcación es localizada en la membrana celular de las células ricas en glicógeno (CRG).

Figura 4.21: SOD - Zona de Unión

**CAPÍTULO 4: RESULTADOS**

Documentación de Figura de Inmunohistoquímica sin Restricción Alimentaria

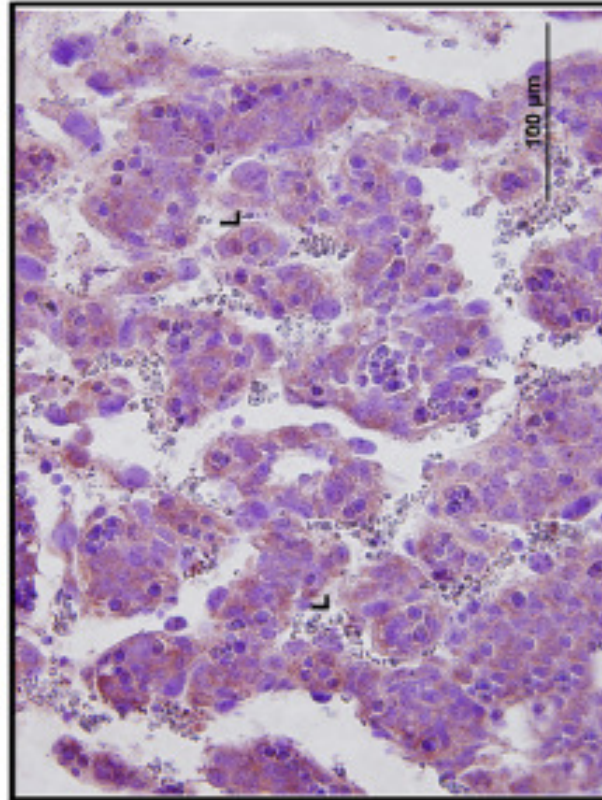


*En la región de las células gigantes del trofoblasto (CGT), se observa una inmunomarcación heterogénea y de intensidad moderada.*

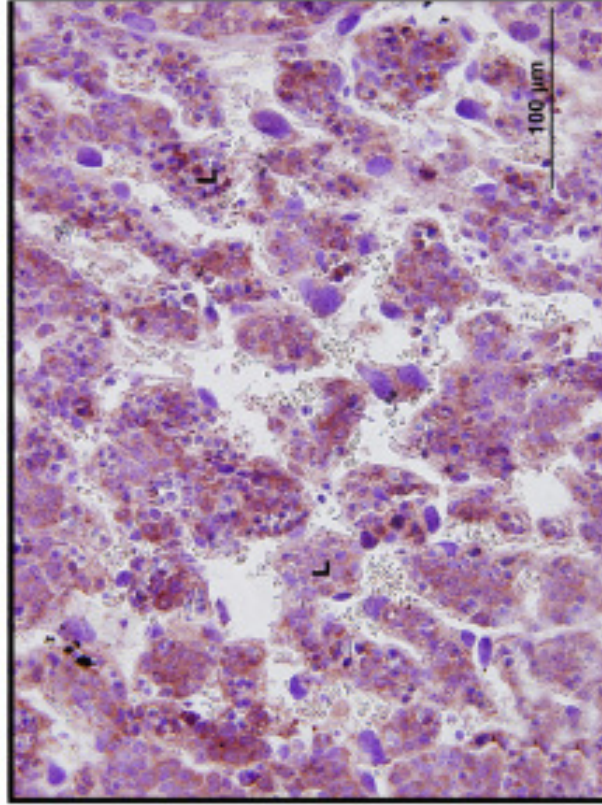
*Figura 4.22: SOD - Región Células Gigantes del Trofoblasto*

**CAPÍTULO 4: RESULTADOS**

Documentación de Figura de Inmunohistoquímica con y sin Restricción Alimentaria



Sin Restricción Alimentaria



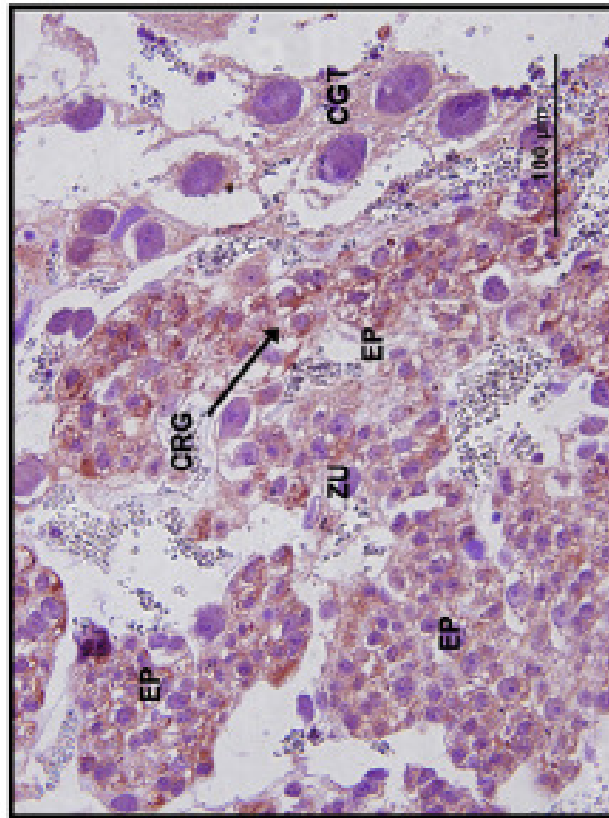
Con Restricción Alimentaria

*La inmunomarcación es homogénea en la región del laberinto (L), siendo más intensa en la placenta con restricción respecto a la placenta sin dicha condición.*

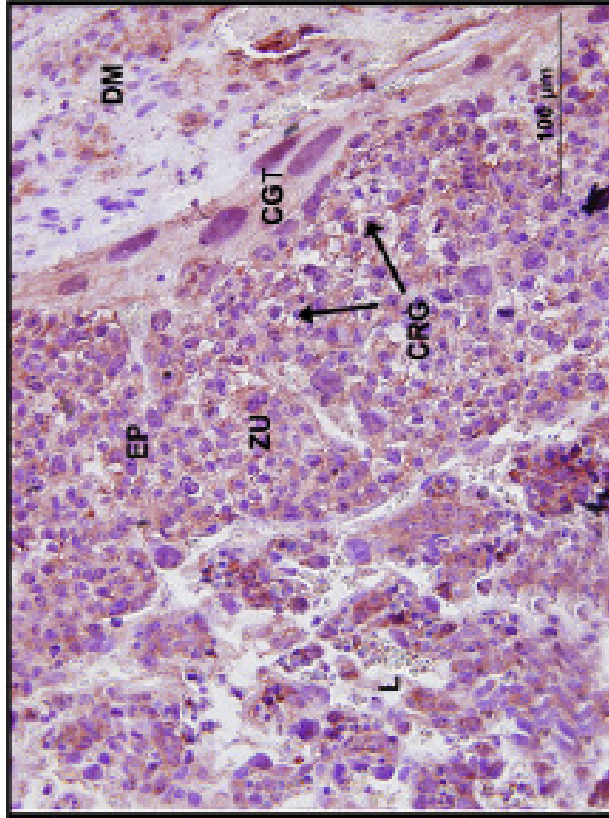
Figura 4.23: SOD1 - Región del Laberinto

**CAPÍTULO 4: RESULTADOS**

Documentación de Figura de Inmunohistoquímica con y sin Restricción Alimentaria



Sin Restricción Alimentaria



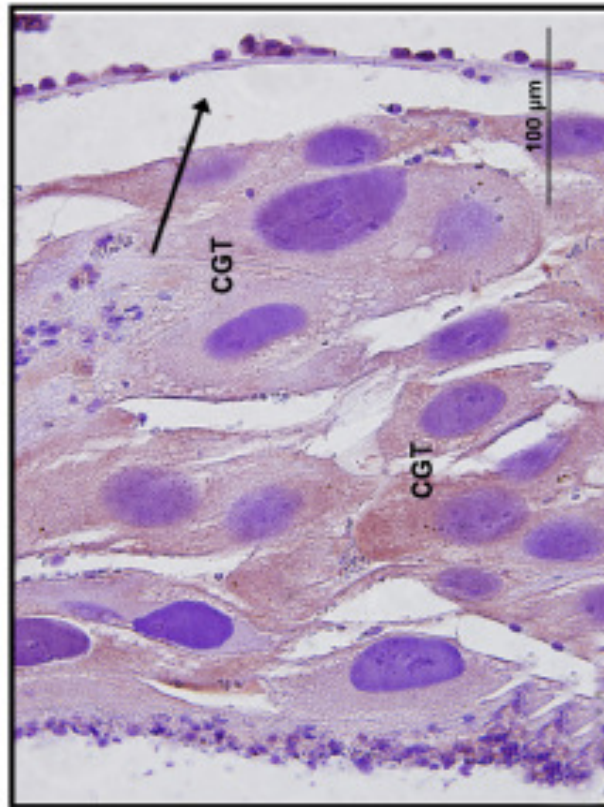
Con Restricción Alimentaria

*La inmunomarcación en la zona de unión (ZU) es positiva en ambas placentas sin presentar diferencias en cuanto a la intensidad.*

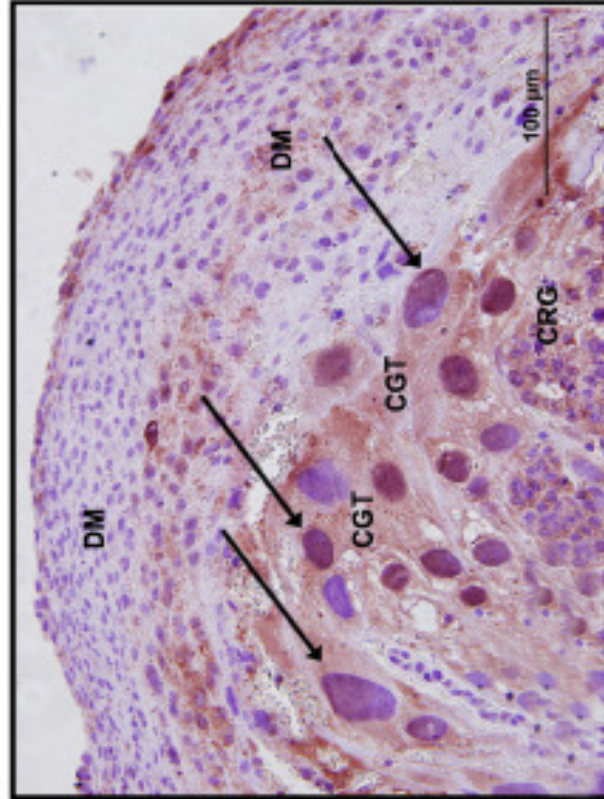
Figura 4.24: SOD1 - Zona de Unión

### CAPÍTULO 4: RESULTADOS

Documentación de Figura de Inmunohistoquímica con y sin Restricción Alimentaria



Sin Restricción Alimentaria



Con Restricción Alimentaria

*En la región de las células gigantes del trofoblasto (CGT), la inmunomarcación tiene distribución citoplasmática y nuclear, siendo más intensa en la placenta con restricción alimentaria respecto a la placenta sin restricción. Decidua Materna (DM).*

Figura 4.25: SOD1 - Región de las Células Gigantes del Trofoblasto

## CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN

La desnutrición materna es una de las principales causas que influyen la RCIU, condición tal, que predisponen a una alta morbilidad perinatal y conduce al desarrollo de patologías crónicas del adulto (Baker et al., 1989; Nien et. al., 2002; Tapia & Ventura-Juncá, 2008).

A su vez, se han iniciado varios estudios que intentan explicar la etiopatogenia de la RCIU atribuido el efecto del estrés oxidativo en dicha condición patológica (Gutiérrez, 2005; Gveric-Ahmetasevic et al., 2009; Kressig et al., 2008; Myatt & Cui, 2004; Rukavina et. al., 2006), los cuales han logrado determinar una elevación de los niveles de estrés oxidativo y su daño en diferentes estructuras celulares.

Actualmente, la condición de RCIU puede ser inducida experimentalmente en modelos animales mediante la manipulación de la dieta materna (Coan et al., 2009), intervención llevada a cabo en este estudio, con la finalidad de determinar cambios morfológicos e inmunohistoquímicos asociados a enzimas del estado redox, en placentas de ratas. Debido a las limitaciones de este estudio, la restricción alimentaria fue concretada únicamente en el estadio 14 DG, por lo que esto restringe los alcances de los resultados, discusión y conclusiones.

Con respecto a los pesos placentarios, estudios realizados por Prieto et al., (2008), en placentas humanas normales comparadas con placentas de recién nacidos PEG, demostraron que el promedio del peso placentario normal es de 495 grs. siendo menor el peso promedio de las placentas de RN PEG con un promedio de 386,15 grs., lo cual indica un reducción en un 22% del peso placentario. Estos resultados se asemejan a datos aún no publicado realizado por San Martín et al., en el cual se comparan placentas de ratas con y sin restricción alimentaria en estadios de 14, 17 y 20 DG. En este estudio se observó una reducción del peso

placentario de alrededor de un 25% en el grupo con restricción respecto a aquellas ratas no sometidas a esta condición.

Así mismo, Coan et al., (2009), observaron en el día 19 DG, que los pesos placentarios y fetales disminuyeron en ratones desnutridos, 9% y 13% respecto al control.

Considerando lo anteriormente expuesto, condiciones desfavorables para la gestación como la RCIU, PE, desnutrición materna, entre otras; reducen significativamente la transferencia de nutrientes, reflejándose en una disminución del peso placentario y fetal.

En relación a la morfología placentaria, el laberinto en los diferentes estadios, es la región que predominó en la estructura placentaria. Esta región permite el intercambio materno-fetal acompañada de una progresiva angiogénesis.

La ZU disminuyó su proporción tisular a medida que avanza la gestación. En el 17 DG se visualizó un gran número de CRG las que disminuyeron al término de la gestación. Frente al déficit alimentario materno, estas células aparecen precozmente, lo que podría ser interpretado como una forma de aumentar las reservas energéticas del feto.

Las CGT se observaron invadiendo la decidua materna. Su número de capas celulares disminuyó con el progreso de la gestación, lo que se explica por la menor invasión hacia el término de la gestación.

Coan et al, (2009), mostró diferencias en la morfología placentaria entre ratones desnutridos y controles en diferente días de la gestación. Entre el día 16 y 19 DG observó una reducción significativa del volumen placentario en comparación con el control, lo que también fue observado de manera cualitativa en nuestro estudio.

A pesar de los datos morfológicos obtenidos en placentas de ratones desnutridos, Coan et al., (2009) plantean que éstas placentas transportan más nutrientes de la madre al feto, por gramo de tejido, a pesar de que el volumen y la superficie de la zona del laberinto, se redujo considerablemente en animales desnutridos.

Las placentas de los animales con restricción alimentaria estudiadas fueron de menor tamaño y de forma ovalada. El laberinto fue menos organizado y de menor amplitud. A los 14 DG, la zona de unión ya presentó CRG y su EP fue menos desarrollado. Las CGT fueron escasas y de menor tamaño, tendiendo a alinearse en vez de formar varias capas. La DM predominó con respecto al tejido placentario. Lo anterior nos indica que la condición de restricción alimentaria materna, como observado en nuestro estudio, promueve cambios importantes en la morfología placentaria en etapas tempranas de su desarrollo.

Con respecto a la angiogénesis, Coan et al., (2009) mostró que a pesar de que en etapas tempranas no se observaron diferencias significativas, al 19 DG se observó una disminución de los espacios sanguíneos maternos y vasos sanguíneos fetales. A pesar de lo descrito por Coan et al (2009), observamos que en el estadio de 14 DG al comparar ambos grupos, se observó cualitativamente un menor número de vasos sanguíneos en el grupo con restricción alimentaria,, indicando que en rata, las alteraciones vasculares podrían originarse en etapas tempranas respecto al modelo de ratón, lo cual deberá ser comprobado a través de otros estudios.

Cabe destacar que en los resultados de nuestra investigación en el 20 DG en placentas sin restricción alimentaria, en la región del laberinto se observó una abundante cantidad de vasos sanguíneos. A partir de lo señalado, podemos inferir que la restricción alimentaria, generaría una condición de RCIU del feto, debido a que el déficit de nutrientes altera la morfología normal de la región del laberinto, región donde ocurre la transferencia de oxígeno y nutrientes entre la madre y el

feto, por lo que si ésta modificación es tan precoz se esperaría un RN con menor peso y sometido a mayor estrés oxidativo a medida que progresa la gestación.

Respecto a las enzimas asociadas al estado redox placentario analizadas en nuestro estudio, existen evidencias que han demostrado por ejemplo la presencia de iNOS en las siguientes estructuras placentarias en humanos: amnios, corion, decidua y en tejido miometrial (Kakui et al., 2003). En nuestra investigación la presencia de iNOS fue observada en las tres regiones placentarias, predominando en la ZU y laberinto. En la región del laberinto la inmunomarcación fue más intensa en etapas tempranas de la gestación, predominando hacia el 20 DG en los endotelios de los vasos sanguíneos fetales. En la ZU, la tinción fue heterogénea, pero más intensa en los dos primeros estadios. El núcleo de las CGT estuvo rodeado por la inmunomarcación, pero fue más débil respecto a las otras zonas.

Con respecto a las placentas de los animales sometidos a restricción alimentaria, de la cual solamente se obtuvo la placenta de 14 DG con su respectivo control, determinamos que la inmunomarcación en la región del laberinto presentó una menor intensidad respecto al control, sin embargo fue selectiva sólo para el sincitiotrofoblasto. En la ZU, el EP tuvo una inmunomarcación homogénea, y en las CRG predominó en la membrana celular. En las CGT, la intensidad de la inmunomarcación fue mayor respecto al control abarcando en su totalidad al citoplasma.

Consideramos que la presencia de iNOS en la región del laberinto se debe principalmente a que es un sitio de intercambio materno-fetal y que su localización en la gestación tardía en el endotelio fetal se debe más bien a un rol fisiológico como vasodilatador y regulador del flujo feto-placentario, como ha sido demostrado en su participación como regulador del flujo sanguíneo útero-placentario y feto-placentario, induciendo la vasodilatación, inhibiendo la agregación de neutrófilos y la adhesión de plaquetas a las células endoteliales (Valko et. al., 2006)

Por otra parte, existen datos en la literatura que demuestran la participación de iNOS en la invasión del trofoblasto extraveloso, así como la apoptosis de las células del trofoblasto (Vasko et al, 2006), indicando un rol más amplio en el desarrollo placentario.

La menor presencia de iNOS en el laberinto y de las CGT de placentas de ratas con restricción alimentaria, como observado en nuestro estudio, podría estar relacionada a alteraciones vasculares y morfológicas con consecuencias negativas al normal desarrollo de éste órgano y del propio feto.

Dos estudios realizados en placentas humanas con técnicas inmunohistoquímicas, mostraron las diferentes isoformas de SOD en el tejido vellositario, sinciciotroblasto, células del estroma, así como en células endoteliales, amnios, corion, decidua y trofoblasto extraveloso (Telfer et al., 1997; Myatt & Cui, 2004). En nuestro estudio, SOD1 fue observada en las tres regiones placentarias. En el laberinto la inmunomarcación fue positiva en los tres estadios, sin embargo al 20 DG predominó principalmente en los vasos sanguíneos fetales. En la ZU la inmunomarcación se destacó en el 14 DG y en las CRG fue marcada en su membrana celular. La región de las CGT mantuvo una inmunomarcación heterogénea con intensidad moderada en los tres estadios. Con respecto a las placentas de los animales sometidos a restricción alimentaria de la cual solamente se obtuvo la placenta de 14 DG con su respectivo control, determinamos que la inmunomarcación en el laberinto y las CGT fue más intensa respecto al control. En la ZU la inmunomarcación no presentó diferencias respecto al control.

SOD1, permite la degradación del anión superóxido en peróxido de hidrógeno, el cual sería finalmente eliminado entre otras enzimas antioxidantes como la GPX (Abilés, 2007; Biri et al., 2007; Castillo, 2005; Closs, 2006; Grupta et al. 2004). Consideramos que la presencia moderada en los tres estadios de la gestación de SOD1 en la región del laberinto podría estar relacionada con una defensa antioxidante de la placenta, una vez que esta región presenta un importante flujo

sanguíneo, con la subsecuente generación de radicales libres derivados del oxígeno.

La presencia de SOD1 en los vasos sanguíneos fetales fue más intensa, lo que probablemente apoya nuestra hipótesis respecto a la función placentaria de esta enzima antioxidante.

Tanto en las regiones del laberinto y CGT en placentas de animales con restricción alimentaria, consideramos que fue más intensa la inmunomarcación para SOD1, lo que nos podría sugerir que bajo esta condición experimental, la placenta podría estar sometida a una mayor presencia de radicales libres generados del oxígeno, apoyando la hipótesis que placentas de madres con restricción alimentaria estarían bajo un mayor estrés oxidativo. Sin embargo, esta hipótesis deberá ser corroborada con futuros estudios.

Finalmente en nuestro estudio, la enzima antioxidante GPX, en placentas de animales sin restricción alimentaria, se observó predominantemente en las CGT con una distribución homogénea en el citoplasma y su inmunomarcación aumentó con la gestación. En el laberinto la inmunomarcación fue progresiva observándose principalmente en los endotelios de los vasos sanguíneos fetales. En la Zona de Unión la inmunomarcación fue ascendente observándose principalmente en el citoplasma de las CRG. En las placentas de los animales con restricción alimentaria la inmunomarcación fue más intensa en las distintas zonas respecto al grupo sin restricción alimentaria. Planteamos que el aumento progresivo de GPX es debido al aumento propio del estrés oxidativo durante la gestación. En condiciones normales y principalmente bajo la condición experimental existiría un incremento en la presencia de GPX de la misma forma que se observó SOD1.

La restricción alimentaria probablemente promueve un desbalance en el estado redox placentario, lo que implicaría que la placenta debe generar los mecanismos

asociados a un aumento de sus defensas antioxidantes para compensar este estado desfavorable para la gestación.

Una vez que nuestros datos son morfológicos y descriptivos, sugerimos realizar estudios futuros centrándose en la actividad y efectos de estas enzimas pro y antioxidantes en placentas y fetos en este modelo experimental, lo que podría confirmar los hallazgos observados en el presente estudio.

## **CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES**

Existe una desproporción en el desarrollo feto-placentario, favoreciendo el desarrollo fetal en desmedro del crecimiento de la placenta, ya sea en condiciones normales o patológicas.

Las enzimas prooxidantes iNOS disminuye y las antioxidantes SOD1 y GPX, aumentan progresivamente en los diferentes compartimientos placentarios a medida que avanza la gestación en condiciones normales.

En placentas de 14 DG con restricción alimentaria son cualitativamente de menor tamaño, presentan una presencia precoz de células ricas en glicógeno, una mayor presencia de SOD1 y GPX y una menor presencia de iNOS.

Las alteraciones morfológicas e inmunohistoquímicas para SOD1, GPX e iNOS fueron observadas en el laberinto de placentas de ratas con restricción alimentaria en el estadio 14 DG.

Las modificaciones placentarias observadas en el modelo experimental en el estadio 14 de gestación, pueden estar relacionadas con la generación de un ambiente desfavorable para el crecimiento normal del feto, asociadas a la generación de estrés oxidativo y cambios en el peso placentario y fetal, lo que presumimos como una tendencia que se perpetuaría en estadios posteriores.

## ANEXOS

### ANEXO A: Protocolo de Tinción Citológica (PAP)

Fijar con Etanol	3 minutos
Secar al aire	2 minutos
Lavar en agua corriente	5 minutos
Teñir con Hematoxilina Eosina	2 minutos
Virar en agua corriente	5 minutos
OH 95° I	30 segundos
OH 95° II	30 segundos
Orange 30	30 segundos
OH 95° I	30 segundos
OH 95° II	30 segundos
EASO	30 segundos
OH 96° I	30 segundos
OH 96° II	30 segundos
OH 100° I	30 segundos
OH 100° II	30 segundos
OH 100° III	30 segundos
OH-Xilol	30 segundos
Xilol I	30 segundos
Xilol II	30 segundos
Xilol III	30 segundos

## **ANEXO B: Preparación de Fijadores.**

### **Preparación de Methacarn:**

Metanol (alcohol metílico) 60% 30ml. para 50ml. volumen final.

Cloroformo 30% 15ml. para 50ml. volumen final.

Ácido Acético 10% 5ml. para 50 ml. volumen final.

### **Preparación de Paraformaldehído:**

40 grs. de paraformaldehído en 500 cc. de agua destilada.

Disolver y calentar hasta 60° C.

Luego agregar gotas Na OH 1N hasta aclarar preparación.

### **ANEXO C: Protocolo Methacarn**

Etanol 100° I	30 minutos
Etanol 100° II	30 minutos
Etanol 100° III	30 minutos
Xilol I	15 minutos
Xilol II	15 minutos
Xilol III	15 minutos
Parafina I	30 minutos
Parafina II	30 minutos
Parafina III	30 minutos

\*el tejido se mantiene en este fijador durante 4 a 8 horas.

## **ANEXO D: Protocolo Paraformaldehído**

Etanol 50°	30 minutos
Etanol 70°	30 minutos
Etanol 80°	30 minutos
Etanol 96° I	30 minutos
Etanol 96° II	30 minutos
Etanol 100° I	30 minutos
Etanol 100° II	30 minutos
Etanol 100° III	30 minutos
Xilol I	15 minutos
Xilol II	15 minutos
Xilol III	15 minutos
Parafina I	30 minutos
Parafina II	30 minutos
Parafina III	30 minutos

\*El tejido se mantiene en este fijador durante 24 a 48 horas.

## ANEXO E: Protocolo de Hematoxilina-Eosina

### Desparafinación:

Xilol I	10 minutos
Xilol II	10 minutos
Xilol III	10 minutos

### Hidratación:

Alcohol 100° I	5 minutos
Alcohol 100° II	5 minutos
Alcohol 95°	5 minutos
Alcohol 70°	5 minutos
Agua destilada	5 minutos

### Coloración con hematoxilina de

#### Mayer:

	Dipping
	5 minutos
Viraje en agua corriente	5 minutos
Agua destilada	Dipping
Alcohol 95°	10 segundos

### Coloración con Eosina

<b>Alcohólica:</b>	2.5 minutos
--------------------	-------------

### Deshidratación y Montaje:

	2.5 minutos
Alcohol 100° I	2.5 minutos
Alcohol 100° II	5 minutos
Alcohol –Xilol	
Xilol I	

## **ANEXO F: Protocolo Inmunohistoquímica INOs**

### **Desparafinación**

Xilol I	20 minutos
Xilol II	20 minutos
Xilol III	20 minutos

### **Hidratación**

Alcohol 100º II	20 minutos
Alcohol 100º I	20 minutos
Alcohol 95º	20 minutos
Alcohol 70º	20 minutos
Agua destilada	20 minutos

**Recuperación antigénica** 15 minutos, 90°C  
(Buffer Citrato de sodio, pH 6.0, 10 mM)

Reposo en Buffer Citrato	20 minutos, t° ambiente
Agua destilada	10 minutos
3 Baños en PBS 0.1M	5 minutos c/u, T° ambiente

**Bloqueo Peroxidasa endógena** 30 minutos, T°  
H2O2 3% en PBS: 3 ml H2O2 30%  
97 ml PBS 0.1M

3 Baños en PBS 0.1M 5 minutos c/u  
**Bloqueo Sitios Inespecíficos (Cas-Block)** 30 minutos

**Bloqueo Suero normal de cabra** 30 minutos

**Incubación Anticuerpo 1º** Overnight, 4°C  
- Anti **INOS** de rata hecho en conejo  
(Dilución 1:250 PBS Tween 20)

3 Baños en PBS 0.1M 5 minutos c/u  
**Incubación Anticuerpo 2º** 1 hora, T°

Anti-IgG de conejo hecho en cabra con HRP (Dilución 1:500 en PBS) 3 Baños en PBS 0.1M	ambiente  5 minutos c/u 1.5 minutos.
<b>Revelación Peroxidasa</b> (Sustrato Cromógeno Nova-Red)	
H <sub>2</sub> O dest. + 1 + 2 + 3 + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
2.5 ml      75 ul    50 ul    50 ul    50 ul	
1.25 ml     38 ul    25 ul    25 ul    25 ul	
0.5 ml      9.6 ul    6.4 ul    6.4 ul    6.4 ul	
 Agua destilada	 5 minutos, T <sup>o</sup> ambiente
<b>Contraste coloración Hematoxilina</b> (ver hematoxilina)	10 segundos
Viraje en agua corriente	5 minutos
<b>Deshidratación</b>	
Alcohol 95 <sup>o</sup>	2.5 minutos
Alcohol 100 <sup>o</sup> I	2.5 minutos
Alcohol 100 <sup>o</sup> II	2.5 minutos
Alcohol / Xilol	2.5 minutos
<b>Aclaración y Montaje</b>	
Xilol I	5 minutos
Xilol II	5 minutos

## **ANEXO G: Protocolo Inmunohistoquímica GPX**

### **Desparafinación**

Xilol I	20 minutos
Xilol II	20 minutos
Xilol III	20 minutos

### **Hidratación**

Alcohol 100º I	20 minutos
Alcohol 100º II	20 minutos
Alcohol 95º	20 minutos
Alcohol 70º	20 minutos
Agua destilada	20 minutos

**Recuperación antigénica** 15 minutos, 90°C  
(Buffer Citrato de sodio, pH 6.0, 10 mM)

Reposo en Buffer Citrato 20 minutos, t°  
ambiente

Agua destilada 10 minutos

3 Baños en PBS 0.1M 5 minutos c/u, T°  
ambiente

**Bloqueo Peroxidasa endógena** 30 minutos, T°  
H2O2 3% en PBS: 3 ml H2O2 30%  
ambiente

97 ml PBS 0.1M

3 Baños en PBS 0.1M 5 minutos c/u

**Bloqueo Sitios Inespecíficos (Cas-Block)** 10 minutos

**Bloqueo Suero normal de cabra** 20 minutos

**Incubación Anticuerpo 1º** Overnight, 4°C

- Anti **GPX** de rata hecho en conejo  
(Dilución 1:250 PBS Tween 20)

3 Baños en PBS 0.1M 5 minutos c/u

**Incubación Anticuerpo 2º** 1 hora, T°

Anti-IgG de conejo hecho en cabra con HRP	ambiente
<b>(Dilución 1:500 en PBS)</b>	
3 Baños en PBS 0.1M	5 minutos c/u
<b>Revelación Peroxidasa</b>	1.5 minutos.
(Sustrato Cromógeno Nova-Red)	
H <sub>2</sub> O dest. + 1 + 2 + 3 + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
2.5 ml      75 ul    50 ul    50 ul    50 ul	
1.25 ml     38 ul    25 ul    25 ul    25	
	ul
0.5 ml      9.6 ul    6.4 ul    6.4 ul    6.4	
	ul
Agua destilada	5 minutos, T <sup>º</sup> ambiente
<b>Contraste coloración Hematoxilina</b>	10 segundos
(ver hematoxilina)	
Viraje en agua corriente	5 minutos
<b>Deshidratación</b>	
Alcohol 95 <sup>º</sup>	2.5 minutos
Alcohol 100 <sup>º</sup> I	2.5 minutos
Alcohol 100 <sup>º</sup> II	2.5 minutos
Alcohol / Xilol	2.5 minutos
<b>Aclaración y Montaje</b>	
Xilol I	5 minutos
Xilol II	5 minutos

## ANEXO H: Protocolo Inmunohistoquímica SOD1

### Desparafinación

Xilol I	20 minutos
Xilol II	20 minutos
Xilol III	20 minutos

### Hidratación

Alcohol 100º I	20 minutos
Alcohol 100º II	20 minutos
Alcohol 95º	20 minutos
Alcohol 70º	20 minutos
Agua destilada	20 minutos

### Recuperación antigénica

(Buffer Citrato de sodio, pH 6.0, 10 mM)	15 minutos, 90°C
--	------------------

Reposo en Buffer Citrato	20 minutos, t° ambiente
--------------------------	-------------------------

Agua destilada	10 minutos
----------------	------------

3 Baños en PBS 0.1M	5 minutos c/u, T° ambiente
---------------------	----------------------------

### Bloqueo Peroxidasa endógena

<u>H2O2 3% en PBS</u> : 3 ml H2O2 30%	30 minutos, T° ambiente
---------------------------------------	-------------------------

97 ml PBS 0.1M

3 Baños en PBS 0.1M	5 minutos c/u
---------------------	---------------

### Bloqueo Sitios Inespecíficos (Cas-Block)

Bloqueo Suero normal de cabra	20 minutos
-------------------------------	------------

### Incubación Anticuerpo 1º

- Anti **SOD1** de rata hecho en conejo

(Dilución 1:50 PBS Tween 20)

3 Baños en PBS 0.1M	5 minutos c/u
---------------------	---------------

<b>Incubación Anticuerpo 2º</b>	1 hora, T° ambiente
Anti-IgG de conejo hecho en cabra con HRP	
(Dilución 1:500 en PBS)	
3 Baños en PBS 0.1M	5 minutos c/u
<b>Revelación Peroxidasa</b>	1.5 minutos.
(Sustrato Cromógeno Nova-Red)	
H <sub>2</sub> O dest. + 1 + 2 + 3 +	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
2.5 ml      75 ul    50 ul    50 ul	
	50 ul
1.25 ml     38 ul    25 ul    25 ul	
	25 ul
0.5 ml      9.6 ul    6.4 ul    6.4 ul	
	6.4 ul
Contraste coloración Hematoxilina	10 segundos
(ver hematoxilina)	
Viraje en agua corriente	5 minutos
Deshidratación	
Alcohol 95º	2.5 minutos
Alcohol 100º I	2.5 minutos
Alcohol 100º II	2.5 minutos
Alcohol / Xilol	2.5 minutos
<b>Aclaración y Montaje</b>	
Xilol I	5 minutos
Xilol II	5 minutos

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABILÉS J. (2007) Memoria Estrés Oxidativo y Su Relación Con El Aporte de Antioxidantes Nutricionales en el Paciente Crítico, Departamento de Fisiología, Universidad de Granada.
- AIN R., CANHAM L. & SOARES M. (2003) Gestation stage-dependent intrauterine trophoblast cell invasión in the rat and mouse: novel endocrine phenotype and regulation. *Development Biology* 260: 176-190.
- ALEMÁN I., ALEX R., RAMÍREZ M., HUNG A. & RAMÍREZ C. (2008) Expresión de las óxido nítrico sintasas constitutiva endotelial e inducible en pacientes venezolanas con preeclampsia. *Invest Clin* 49(3): 321 – 330.
- ALBARRÁN S., PÉREZ R., CALDERÓN E., CORTÉS C., MANZO S., CLEMENTE M., MERCADO R. & SAAVEDRA A. (AÑO) Restricción Calórica Prenatal y Perinatal: Efectos sobre el Estrés Oxidativo y Nitrosativo a Nivel Mitocondrial. Instituto de Investigaciones Químico. Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. AÑO
- ASTORGA S. Y GODOY P. (2007) Análisis Morfológico del Útero durante la Absorción Embrionaria en un Modelo Animal de un Aborto Espontáneo. Tesis presentada en la Universidad de Valparaíso para la obtención del Grado Académico de Licenciado en Tecnología Médica.
- AVELLO M. & SUWALSKY M. (2006) Radicales Libres, Estrés Oxidativo y Defensa Antioxidante Celular. *Ciencia Ahora*. 9 (17) 8-13.

- BARKER D., OSMOND D., GOLDING J., KUH D., WADSWORTH M. (1989) Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *Br Med J.* 298: 564-567.
- BIRI A., BOZKURT N., TURP A., KAVUTCU M., HIMMETOGLU Ö. & DURAK I. (2007) Role of Oxidative Stress in Intrauterine Growth Restriction, *Gynecol Obstet Invest*;64:187–192
- BRUCE M. (2003) *Embriología Humana y Biología del Desarrollo*, 2º Edición, Editorial Harcourt.
- BURTON G., YUNG H., CINDROVA T. & CHARNOCK D. (2009) Placental Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress in the Pathophysiology of Unexplained Intrauterine Growth Restriction and Early Onset Preeclampsia, *Placenta* 30(S): 43–48.
- CALDERÓN E., CLEMENTE M., CORTÉS C., SIERRA E., GAONA F., VILLALOBOS R., SAAVEDRA A. (2005) Caracterización funcional de la óxido nítrico sintasa en mitocondrias de cerebro durante la hipertensión y el envejecimiento. *Ciencia Nicolaita* No. 40. México.
- CARRIEL V. (2006) Caracterización morfológica y de componentes de la matriz extracelular durante el desarrollo placentario en roedores. Tesis presentada en la Universidad de Valparaíso para la obtención del Grado Académico de Licenciado en Tecnología Médica.
- CASTILLO E. (2005) Tesis Doctoral: Regulación por estrés oxidativo de la actividad del factor de transcripción Pap1 de *Schizosaccharomyces pombe*. Departament de Ciències, Experimentals i de la Salut, Programa de Doctorat en Ciències de la Salut i de la Vida, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona.

- CEBALLOS G., RAMÍREZ I., CALZADA C. & OLIVARES I. (2006) Disfunción endotelial y estrés oxidativo, *Revista de Endocrinología y Nutrición* Vol. 14, No. 4 pp 233-236.
- CHEN Y., XU D.X., ZHAO L., WANG H., WANG J. & WEI W. (2006) Ascorbic acid protects against lipopolysaccharide-induced intra-uterine fetal death and intra-uterine growth retardation in mice. *Toxicology* 217: 39-45.
- CHEN Q., JONES D., STONE P., CHING L. & CHAMLEY L. (2009) Vitamin C Enhances Phagocytosis of Necrotic Trophoblasts by Endothelial Cells and Protects the Phagocytosing Endothelial Cells from Activation. *Placenta* 30: 163-168.
- CLOSS M. (2006). Antioxidantes y Marcadores del Estrés Oxidativo, DHA Centro Médico. 1-7.
- COAN P., VAUGHAN O., SEKITA Y., FINN S., BURTON G., CONSTANCIA M. & FOWDEN A. (2009) Adaptations In Placental Phenotype Support Fetal Growth During Undernutrition Of Pregnant Mice. Department of Physiology, Development and Neuroscience, University of Cambridge.
- COX B., KOTLYAR M., EVANGELOU A., IGNATCHENKO A., WHIETELEY K., JURISICA I., LEE S., ROSSANT J. & KISLINGER T. (2009) Comparative systems biology of human and mouse as a tool to guide the modeling of human placental pathology. *Molecular Systems Biology* 5; 279.
- GABBE, NIEBYL & SIMPSON. (2004) *Obstetricia*. Editorial Marbán, 4ª Edición, 2004.

- GEORGIADES P., FERGUSON A. & BURTON G. (2001) Comparative Developmental Anatomy of the Murine and Human Definitive Placentae. *Placenta* 23, 3-19.
- GONZÁLEZ-MERLO J., LAILLA J., FABRE E., GONZÁLEZ M. (2006) *Obstetricia*. 5ª Edición, Editorial Masson.
- GUPTA P., NARANG M., BANERJEE B. & BASU S. (2004) Oxidative stress in term small for gestational age neonates born to undernourished mothers: a case control study, *BMC Pediatrics* 4:14.
- GUTIÉRREZ A. (2005) Estrés oxidativo en la gestación: ¿una nueva óptica en la atención a la embarazada?, Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara "Serafín Ruiz de Zarate Ruiz".
- GVERIC S., BOROVIC S., SKALA H., ANDRISIC L., STROSER M., ZARKOVIC K., SKRABLIN S., TATZBER F., CIPAK A., JAGANJAC M. WAEG G., GVERIC T. & ZARKOVIC N. (2009) Oxidative stress in small-for-gestational age (SGA) term newborns and their mothers, *Free Radical Research*; 43(4): 376-384.
- HRACSKO Z., ORVOS H., NOVAK Z., PAL A. & VARGA I. (2008) Evaluation of oxidative stress markers in neonates with intra-uterine growth retardation, *W. S. Maney & Son Ltd, Redox Report* Vol. 13, No. 1; 11-15.
- HUNT J. & SOARES J. (2006) Phenotypic Analysis of the Mouse Placenta. *Methods in Molecular Medicine*, Vol. 121: Placenta and Trophoblast: Methods and Protocols, Vol 1.

- JUEZ G., LUCERO E., VENTURA-JUNCÁ P., GALLEGUILLOS J. (1989) Crecimiento intrauterino en recién nacidos chilenos de clase media. *Rev Chil Pediatr* 1989; 60: 198-202.
- KAROWICZ A., KEDZIORA K., & BARTOSZ G. (2007) Indices of oxidative stress in pregnancy with fetal growth restriction. *Free Radical Research*; 41(8): 870–873.
- KRAUSE ET AL. (2009) Krause et al. Papel de la placenta en la programación fetal de las enfermedades crónicas del adulto. Impacto del Crecimiento y Desarrollo Temprano sobre la Salud y Bienestar de la Población. Perspectivas y Reflexiones desde el Cono Sur. Instituto Danone Argentina, Chile, Uruguay. (CD)
- KRESSIG P., BEINDER E., SCHWEER H., ZIMMERMANN R. & VON MANDACH U. (2008) Post-delivery oxidative stress in women with preeclampsia or IUGR, *J. Perinat. Med.* 36; 310-315.
- KUMAR A., RANJAN R., BASU S., KHANNA H. & BHARGAVA V. (2008) Antioxidant Levels in Cord Blood of Low Birth Weight Newborns. *Indian Pediatrics*. Volume 45: 583-585.
- KUNZ L. & KING J. (2007) Impact of maternal nutrition and metabolism on health of the offspring, *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*. 12, 71-77.
- LARSEN W. (2003). *Embriología humana*, 3° Edición, Elsevier Science.
- MAULIK D. (2006) Fetal Growth Restriction: The Etiology. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, Volume 49, Number 2; 228-235.

- MAULIK D. (2006) Management of Fetal Growth Restriction: An Evidence-Based Approach, *Clinical Obstetrics and Gynecology*, Volume 49, Number 2; 320-334.
- MOLLER A. (2009) Distribución Inmunohistoquímica de proteínas del eje somatotrófico en placenta de niños con alteraciones en el crecimiento intrauterino. Tesis presentada en la Universidad de Valparaíso para la obtención del Grado Académico de Licenciado en Tecnología Médica.
- MOORE P. (2003) *Embriología Clínica; el Desarrollo del Ser humano*, 7° Edición en español, Editorial El Sevier.
- MORALES F.J., JIMENEZ S. & RIOPÉREZ J. (2008) Development and application of new bioactive compounds in milk-based formulas enriched in iron. Instituto del Frío, Ministerio de Ciencias y Tecnología, España.
- MYATT L. & CUI X. (2004). Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol* (2004) 122:369–382
- NATALE D., STAROVIC M. & CROSS J. (2006) Phenotypic Analysis of the Mouse Placenta. *Methods in Molecular Medicine*, Vol. 121: Placenta and Trophoblast: Methods and Protocols, Vol 1.
- NIEN J., GONZÁLEZ R., VIVIANI P. & GÓMEZ R. (2002) Boletín Perinatal Restricción de Crecimiento Intrauterino, Unidad de Alto Riesgo Obstétrico y Centro de Diagnóstico e Investigaciones Perinatales (CEDIP), Hospital Dr. Sótero del Río, Volumen 2; 23-39.
- PÉREZ A. & DONOSO E. (1999) *Obstetricia*, Tercera Edición, Editorial Mediterráneo.

- PITTALUGA P., DÍAZ A., MENA N. et al: Curva de crecimiento intrauterino para prematuros entre 23 a 36 semanas de edad gestacional. Rev Chil Pediatr 2002; 73 (2): 135-41. ISSN 0370-4106.
- PRIETO R., MATAMALA F. & ROJAS M. (2008) Características morfológicas y morfométricas de la placenta de término, en recién nacidos pequeños para la edad gestacional (PEG) en la ciudad de Temuco-Chile. Int. J. Morphol., 26(3):615-621.
- RAMÍREZ M. & PEDRAZA-REYES M. (2005) Inducción de la Expresión del Gen ytkD (mutTA) de Bacillus Subtilis durante la Germinación y Bajo Condiciones que Generan Estrés. Instituto de Investigación en Biología Experimental, Facultad de Química. Universidad de Guanajuato. Guanajuato, Gto.
- ROBERTS V., SMITH J., McLEA S., HEIZER A., RICHARDSON J. & MYATT L. (2008) Effect of Increasing Maternal Body Mass Index on Oxidative and Nitrate Stress in The Human Placenta. Placenta 30: 169-175.
- ROSS & PAWLINA. (2007) Histología, texto y atlas color con Biología Celular y Molecular. 5° Edición, Editorial Médica Panamericana. pp 855-860.
- RUKAVINA D. & CHAOUAT G. (2006) Embryo implantation: from basics to clinics. Proceedings of the first EMBIC Summer School. Eds. University of Rijeka Press, 2006. Am. J. Reprod. Immunol. 57:495-496.
- SADLER T.W. (2004) Langman Embriología Médica con Orientación Clínica. 9° Edición, Editorial Médica Panamericana.

- SAKER M., SOULIMANE N., AHMED S., MERZOUK H., BELARBI B. & NARCE M. (2008) Oxidant and antioxidant status in mothers and their newborns according to birthweight. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 141; 95–99.
- SCIFRES C. & NELSON M. (2009) Intrauterine growth restriction, human placental development and trophoblast cell death, *J Physiol* 587.14; pp 3453-3458.
- STEPAN H., HEIHOFF-KLOSE A. & FABER R.(2004) Reduced antioxidant capacity in second-trimester pregnancies with pathological uterine perfusión, Department of Obstetrics and Gynecology, University of Leipzig, Leipzig, Germany, *Ultrasound Obstet Gynecol*; 23: 579–583
- TAPIA J. & VENTURA-JUNCÁ P. (2008) *Manual de Neonatología*. III Edición, Santiago, Editorial Mediterráneo. pp 45-55.
- TAKAGI Y., NIKAIDO T., TOKI T., KITA N., KANAI M., AHIDA T., OHIRA S. & KONISHI I. (2004) Levels of oxidative stress and redox-related molecules in the placenta in preeclampsia and fetal growth restriction. *Virchows Arch* 444: 49-55.
- UMEKAWA T., SUGIYAMA T., KIHIRA T., MURABAYASHI N., ZHANG L., NAGAO K., KAMIMOTO Y., MA N., YODOI J. & SAGAWA N. (2007) Overexpression of Thioredoxin-1 Reduces Oxidative Stress in the Placenta of Transgenic Mice and Promotes Fetal Growth via Glucose Metabolism. *Endocrinology* 149(8):3980–3988.
- VALKO M., LEIBFRITZ D., MONCOL J., CRONIN M., MAZUR M. & TELSER J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological

functions and human disease, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39: 44-84.

- WATSON E. & CROSS J. (2005) Development of Structures and Transport Functions in the Mouse Placenta. *Physiology* 20: 180-193.
- WEBSTER R., ROBERTS V. & MYATT L. (2008) Protein Nitration in Placenta – Functional Significance. *Placenta* 29: 985-994.
- YOUNG B. (2008) Wheather's *Histología Funcional (texto y atlas)*, 4<sup>o</sup> Edición en Español, Editorial Mosby. pp 358-367.
- YUAN B., OHYAMA K., BESSHO T., UCHIDE N. & TOYODA H. (2008). Imbalance between ROS production and elimination results in apoptosis induction in primary smooth chorion trophoblast cells prepared from human fetal membrane tissues. *Life Sciences* 82: 623-630.