



**Universidad de Concepción
Facultad de Farmacia**

**CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA OXITOCINÉRGICO Y
TIROIDEO EN EXPLANTES PLACENTARIOS HUMANOS
SEGÚN TIPO DE PARTO**

POR JAVIERA IGNACIA APPEL RUBIO

Tesis presentada a Facultad de Farmacia de la Universidad de
Concepción para optar al grado de Magister de Bioquímica Clínica e
Inmunología

Profesor Guía y Patrocinante

Enrique Guzmán-Gutiérrez
Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Julio, 2023

Concepción, Chile

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, le agradezco a mis padres, Paola e Iván, quienes siempre me han brindado su apoyo incondicional para cumplir cada uno de mis objetivos personales, académicos y profesionales. Los que me han impulsado a salir adelante y jamás darme por vencida, sin importar las adversidades. Y quienes también me han brindado el soporte material y económico para poder concentrarme en mis estudios y perfeccionarme para ser la profesional que anhelo ser. Ellos han sido y serán los pilares fundamentales que guían mi vida. Es a ustedes a quienes dedico este trabajo de investigación, gracias por apoyarme y creer en mis capacidades.

A mi hermana, Fernanda, quien es mi cable a tierra cada vez que me abstraigo de la vida por mis estudios, permitiéndome disfrutar de esta y de las personas que me rodean.

A Gaspar, quien llegó nuestras vidas a iluminarlas, por enseñarme el amor más puro que puede existir.

A mis amigas, quienes han sido mis compañeras en lo académico, como también en el esparcimiento. Por todos los cafecitos que me invitaron para recargar las energías necesarias para continuar con mis responsabilidades.

A mi tutor, Enrique, por su apoyo y consejos tanto académicos como personales. Y también, a cada una de las enseñanzas que me entregó durante los años transcurridos desde que nos conocemos.

A todas aquellas personas, que en algún momento de mi vida fueron de apoyo, ya sea con su sabiduría o con los ánimos necesarios para continuar esforzándome.

A todos ellos, infinitas gracias.

Javiera

TABLA DE CONTENIDOS

INDICE DE TABLAS.....	iv
INDICE DE ILUSTRACIONES.....	v
RESUMEN.....	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Placenta.....	2
1.2. Funciones de la placenta	3
1.2.1. Función de transporte	3
1.2.2. Función inmunológica	3
1.2.3. Función endocrina.....	4
1.2.4. Función metabólica	5
1.3. Parto	6
1.3.1. ¿Qué es el parto?.....	6
1.3.2. ¿Cómo se describe un Parto Fisiológico?	6
1.3.3. ¿Cuáles son los tipos de parto?	7
1.4. Oxitocina	11
1.5. Oxitocina y tipos de parto	19
1.6. Hormonas Tiroideas	21
1.7. Hormonas Tiroideas y tipos de parto.....	28
2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	31
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	31
4. HIPOTESIS	31
5. OBJETIVO GENERAL	32
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
7. MATERIALES Y MÉTODOS	33
7.1. Población de estudio.....	33
7.2. Recolección de las muestras.....	35
7.3. Cultivo de explantes placentarios	36
7.4. Ensayo de viabilidad	38
7.5. Histología e Inmunohistoquímica.....	40
7.6. Extracción de proteínas, cuantificación de proteínas totales y Western blot	45
7.7. Extracción de RNA, cuantificación de RNA total, transcripción reversa y qPCR.....	48
7.8. Análisis estadístico	51
7.9. Aspectos éticos y de bioseguridad	53
8. RESULTADOS.....	54
8.1. Ensayo de viabilidad celular	54
8.2. Histología y evaluación morfométrica	57
8.3. Efecto de Oxitocina sobre la expresión del receptor de Oxitocina	60
8.4. Efecto de Oxitocina sobre la fosforilación de eEF2.	68
8.5. Efecto de L-Tiroxina sobre la expresión de genes.....	71

9. DISCUSIÓN.....	77
9.1. Sistema oxitocinérgico:	77
9.2. Sistema tiroideo:.....	85
9.3. Fortalezas y debilidades:	91
10. CONCLUSIÓN	93
11. BIBLIOGRAFÍA.....	95
12. ABREVIACIONES.....	102
13. ANEXOS	104
14. FIGURAS COMPLEMENTARIAS:	106

INDICE DE TABLAS

7.6 - 1 Listado de partidores para RT-qPCR	Pág. 49
8.2 – 2 Evaluación morfométrica de los explantes placentarios según tipo de parto	Pág. 59

INDICE DE ILUSTRACIONES

1.4 – 1 Representación de maquinaria de contractibilidad estimulada por oxitocina en tejido y vías de señalización involucradas en la contracción uterina	Pág. 13
1.4 - 2 Representación esquemática de las vías de señalización de oxitocina en células cardíacas	Pág. 14
1.4 - 3 Representación esquemática de las vías de señalización de oxitocina en células de miometrio	Pág. 17
1.4 - 4 Representación esquemática de las vías de señalización de oxitocina	Pág. 18
1.6 – 5 Representación esquemática del efecto genómico de las hormonas tiroideas	Pág. 26
1.6 – 6 Representación esquemática del efecto no genómico de las hormonas tiroideas	Pág. 27
7.8 – 7 Diagrama de flujo para análisis estadístico de comparación de medias entre grupos	Pág. 51
8.1 – 8 Control de muerte celular	Pág. 55
8.1 – 9 Efecto de tiempo y concentración de Oxitocina y L-Tiroxina en explantes placentarios humanos	Pág. 56
8.2 – 10 Vellosidades coriónicas presentes en explantes placentarios según tipo de parto	Pág. 58
8.3 – 11 Controles de tejido	Pág. 63
8.3 – 12 Expresión basal del receptor de oxitocina en explantes placentarios humanos según tipo de parto	Pág. 64
8.3 – 13 Efecto de Oxitocina sobre la expresión del receptor de oxitocina (OXTR) en explantes placentarios humanos provenientes de parto espontáneo, parto acelerado, cesárea urgencia y cesárea electiva	Pág. 65
8.3 – 14 Efecto de oxitocina sobre la expresión del receptor de oxitocina en explantes placentarios según tipo de parto de acuerdo a la intensidad de marcación.	Pág. 66
8.4 – 15 Efecto del tipo de parto sobre la fosforilación de eEF2 en explantes placentarios humanos provenientes de distintos tipos de parto.	Pág. 69
8.4 – 16 Efecto de Oxitocina sobre la fosforilación del factor eEF2 y expresión de eEF2 total en explantes placentarios humanos provenientes de diferentes tipos de parto.	Pág. 70
8.5 – 17 Efecto de L-Tiroxina sobre la expresión relativa de Endotelina en explantes placentarios humanos según tipo de parto	Pág. 74
8.5 – 18 Efecto de L-Tiroxina sobre la expresión relativa de Endotelina - 1 en explantes placentarios humanos	Pág. 75
8.5 – 19 Efecto de L-Tiroxina sobre la expresión relativa de HIF-1 α en explantes placentarios humanos	Pág. 76
9.1 – 20 Vías de señalización propuestas para sistema oxitocinérgico vía OXTR en placenta humana	Pág. 89
9.2 – 21 Vías de señalización propuestas para sistema tiroideo en placenta humana	Pág. 90

RESUMEN

Introducción: La Oxitocina y la L-Tiroxina son dos hormonas fundamentales durante el embarazo y el parto. Existe evidencia de un incremento de ambas hormonas y de sus respectivos receptores de membrana expresados en placenta, conforme avanza la gestación. Y, además, existen diferencias en los niveles hormonales de acuerdo con el tipo de parto cursado. Sin embargo, su función y mecanismos de señalización en el tejido placentario aún son desconocidos. El objetivo general de esta investigación fue caracterizar el sistema oxitocinérgico y tiroideo en explantes placentarios humanos según el tipo de parto.

Metodología: A partir de placentas clasificadas según tipo de parto, se prepararon explantes placentarios humanos a los que se les administró, por un lado, oxitocina a dosis crecientes (0 a 10^9 M), Se evaluó la expresión de OXTR por medio de inmunohistoquímica y, la expresión del efector eEF2 por medio de Western Blot. Mientras que, por otro lado, a los explantes placentarios se les administró tiroxina 2 pM, y posteriormente se les evaluó la expresión de sus posibles efectores, tanto de las vías genómicas, como no genómicas, END-1 y

HIF-1 α , respectivamente. Los datos fueron analizados por Mann-Whitney, t-test o ANOVA, considerando significancia valor $p < 0,05$.

Resultados: En parto espontáneo disminuye la expresión de OXTR, conforme aumenta la concentración de oxitocina hasta alcanzar los 1nM, luego de ello la expresión de OXTR se mantendría elevada. En cambio, en partos de tipo acelerado, la expresión de OXTR se mantiene elevada a dosis crecientes de oxitocina. La expresión de OXTR en cesáreas presenta una tendencia a la disminución conforme aumenta la concentración de oxitocina. En parto espontáneo eEF2 se encuentra completamente inactivado a diferencia de los demás tipos de parto. En cuanto al sistema tiroideo, se observó que los explantes placentarios provenientes de parto acelerado presentan una mayor expresión de mRNA de END-1. También se observó que la exposición de L-tiroxina induce la expresión de END-1 en parto espontáneo y cesárea de urgencia. Mientras que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de mRNA de HIF-1 α por tipo de parto ni frente a exposición de L-tiroxina.

Conclusiones: Los tipos de parto presentan diferencias en la expresión del receptor y señalización del sistema oxitocinérgico y tiroideo, en placentas humanas. Esta diferencia se observa de manera basal y también, en respuesta a la exposición de oxitocina y L-tiroxina. Para el sistema oxitocinérgico, el tejido

proveniente de parto espontáneo sería sensible a los cambios de oxitocina dentro de los rangos fisiológicos, mientras que en rangos suprafisiológicos OXTR se desensibiliza e inactiva la ruta de señalización, aumentando la fosforilación de eEF2. Mientras que, en el sistema tiroideo, los resultados sugieren que existe activación exclusiva de la vía de señalización genómica, la cual se activa diferenciadamente según tipo de parto. Esta es la primera investigación que evalúa ambos sistemas de señalización en placenta humana.

1. INTRODUCCIÓN

La placenta corresponde al principal órgano encargado de la comunicación entre la madre y feto. Si bien la principal función estudiada de la placenta es el intercambio materno-fetal [1], existen otras funciones recientemente descritas, como es la función metabólica [2], endocrina [3, 4], inmunológica [5-9], de balance hídrico [10, 11] y hematopoyética [12]. Es por esto, por lo que en los últimos años se ha podido establecer que la placenta cumpliría un rol principal y fundamental en el desarrollo del embarazo, y con ello del feto. Sin embargo, dada su naturaleza transitoria existen mecanismos y funciones aún desconocidas para el ser humano.

1.1. Placenta

Su formación comienza durante la fase de pre-implantación del blastocisto a partir del trofotodermo, donde células denominadas trofoblastos recubrirán el blastocisto [13]. Luego, durante el proceso de implantación, los trofoblastos que estén en contacto con el tejido materno se diferenciarán a células de trofoblasto extravelositario las cuales poseen una función invasiva sobre la decidua materna. Estas células migrarán hasta alcanzar las arterias espiraladas maternas, donde realizarán la remodelación de los vasos sanguíneos por medio de su diferenciación a trofoblasto endovascular. De este modo facilitarán la implantación y permitirán aumentar el flujo sanguíneo de los vasos maternos hacia el feto, para lograr su desarrollo [14]. Por otro lado, las células de trofoblasto también permiten la formación de las vellosidades coriónicas flotantes, las cuales corresponden a la unidad funcional de la placenta y permiten el intercambio materno-fetal [13]. Para permitir esto, las células de trofoblasto se diferenciarán a células de citotrofoblasto veloso, las cuales proliferarán y realizarán un proceso de sincialización, perdiendo sus uniones célula a célula, y formando células multinucleadas denominadas sincitiotrofoblasto. Estas células recubrirán los capilares fetales, por lo que estarán en contacto directo con la sangre materna que llega desde las arterias espiraladas hasta el espacio intervelloso. Las sustancias provenientes desde la sangre materna serán transportadas a través de las células de sincitiotrofoblasto hasta el capilar fetal [3].

1.2. Funciones de la placenta

Dada la estructura que posee la placenta, su principal función corresponde al intercambio de sustancias entre madre y feto. Sin embargo, hacia los últimos años se han descrito nuevas funciones fundamentales para el desarrollo del embarazo, dejando atrás la creencia de que placenta es un órgano inerte que solo realiza transporte de sustancias [15]. Algunas de las funciones que cumple la placenta son:

1.2.1. Función de transporte

Se han descrito transportadores expresados en placentas, para diferentes hormonas y metabolitos. Algunos de ellos corresponden al transporte de: hormonas tiroideas, transporte de aminoácidos, glucosa y colesterol, entre otros metabolitos. [2, 16, 17]

1.2.2. Función inmunológica

Para permitir la gestación debe ocurrir una inmunosupresión del sistema inmunológico materno, ya que el embrión posee aloantígenos provenientes desde el padre, que pueden ser reconocidos y atacados por el sistema inmune

materno, dando fin al embarazo. Para evitar este proceso, las células NK uterinas se encargan de reconocer a las moléculas de MHC de clase I presentes en las células de trofoblasto extravelositarias, lo cual inhibirá la función citotóxica de las células NK y promoverá la función de remodelamiento vascular, permitiendo así la invasión de las células de trofoblasto en la decidua materna [6, 8]. Al mismo tiempo que existe la tolerancia inmunológica para permitir el desarrollo del embrión, el sistema inmunológico materno debe actuar de forma intacta frente a patógenos externos para asegurar la protección tanto de la madre, como del feto [18]. Otra función descrita es la adquisición de la inmunidad natural por parte del feto y la transferencia de anticuerpos de clase IgG por medio del receptor Fc neonatal [9].

1.2.3. Función endocrina

Existen publicaciones que señalan que la placenta es capaz de secretar hormonas como: estrógenos, progesterona, lactógeno placentario, gonadotropina coriónica, factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas, hormona liberadora de gonadotropinas, entre otras [19].

1.2.4. Función metabólica

Actualmente se tiene conocimiento de que la placenta requiere de más del 50% del total de consumo de ATP para la síntesis de proteínas y transporte de nutrientes, la cual obtiene desde la glucosa proveniente desde la circulación materna, donde solo un 20% de esta es transferida hacia el feto, y la demás es metabolizada en la placenta [20]. La alta demanda energética durante el embarazo explica las adaptaciones metabólicas maternas que ocurren durante el periodo de gestación de forma fisiológica, como es el aumento del suministro de nutrientes, con ello el aumento de las reservas energéticas, trabajo cardiovascular materno y flujo uterino sanguíneo, lo que también está acompañado de ganancia de peso y resistencia a la insulina transitoria [21].

Si bien se han podido describir variadas funciones a nivel placentario, ciertamente aún falta por dilucidar nuevos posibles roles de la placenta, y cómo estos varían durante la gestación y/o por el tipo de parto.

1.3. Parto

1.3.1. ¿Qué es el parto?

El parto corresponde al momento en el cuál un mamífero expulsa naturalmente las crías que fueron desarrolladas en su vientre durante la gestación [22]. En el caso de los humanos, este proceso ocurre alrededor de la semana 37 de gestación, y a partir de esta fecha se considera un parto de término.

1.3.2. ¿Cómo se describe un Parto Fisiológico?

Un trabajo de parto y nacimiento fisiológico normal es aquel que está impulsado por la capacidad humana innata de la mujer y el feto. Este nacimiento tiene la peculiaridad de ser seguro y saludable sin necesidad de intervención externa que interrumpa los procesos fisiológicos normales [23].

Dentro de las características de un trabajo de parto fisiológico o normal se tiene que: inicia de forma espontánea e incluye las condiciones biológicas y psicológicas que promueven un parto efectivo, dando como resultado el parto vaginal del bebé y la placenta, con una pérdida de sangre fisiológica, y facilitando

la transición óptima del recién nacido a través del contacto piel con piel con la madre. Lo que permite mantener juntos a la madre y al bebé durante el período posparto y apoyar el inicio temprano de la lactancia materna [23].

1.3.3. ¿Cuáles son los tipos de parto?

Dado el avance de la tecnología, hoy en día se realizan continuamente diferentes intervenciones en el embarazo para facilitar el trabajo de parto y nacimiento del bebé. Dentro de las posibles intervenciones del embarazo, se tiene, la inducción del trabajo de parto y la realización de cesárea.

La inducción del trabajo de parto corresponde a la administración de oxitocina sintética para permitir las contracciones uterinas, con el fin de facilitar el trabajo de parto vía vaginal. Este procedimiento está indicado cuando el riesgo de continuar con el embarazo es mayor que la propia inducción del trabajo de parto. Alguna de las condiciones en las que se presenta esto es en pacientes nulíparas que hayan cumplido 37 semanas de gestación las cuales cursen con trabajo de parto prolongado, o pacientes que cursen con 41 o más semanas de gestación [24].

Si bien esta intervención del embarazo se realiza facilitar el parto y evitar consecuencias adversas, la misma inducción lleva consigo un alto riesgo para el bebé y/o la madre. Dentro de las consecuencias que se describe en la Guía Clínica Perinatal del Ministerio de Salud de Chile, se encuentra: el fallo en lograr el trabajo de parto, hiperestimulación uterina con compromiso fetal, mayor riesgo de parto quirúrgico y riesgo de rotura uterina [24]. Estas consecuencias estarían asociadas a una considerable mayor concentración de oxitocina en circulación materna en mujeres que se les realiza inducción del trabajo de parto en contraste con mujeres que cursaron con trabajo de parto espontáneo o fisiológico [25].

Otra de las intervenciones que se realizan durante el embarazo corresponde a la cesárea. Esta corresponde a un procedimiento de cirugía mayor en la cual se realiza una incisión abdominal y uterina, con el fin de extraer al bebé y la placenta [26]. Chile presenta una alta tasa de realización de cesárea, alcanzando una tasa de 76% en el Sistema Privado y en el Sistema Público un 40,5% el 2013 [24].

Si bien el avance de la medicina permite realizar este tipo de procedimientos cada vez con mayor facilidad, esto no elimina el riesgo consigo asociado. Algunas de las complicaciones secundarias a las cesáreas son: el riesgo anestésico,

riesgo de infección, hemorragia, trombo embolismo venoso o incluso la muerte [24].

Es por esta razón que este procedimiento debe ser realizado de manera controlada y solo cuando esté indicado, evitando así, la realización de cesáreas innecesarias. De este modo, se puede clasificar las cesáreas en dos subgrupos: cesárea de urgencia y cesárea electiva.

Las cesáreas de urgencia se realizan en mujeres que en un principio cursaron con parto espontáneo o inducido, sin embargo, debido a complicaciones durante el trabajo de parto, se debió realizar la intervención quirúrgica. Algunas de las condiciones en las que se realiza son cuando se cursa con riesgo de pérdida de bienestar fetal (ritmo sinusoidal, bradicardia mantenida), fracaso de inducción, detención en la progresión del trabajo de parto, cuando exista imposibilidad de extraer el feto por vía vaginal, tras una prueba de parto instrumental fallida, prolapso de cordón, hemorragia vaginal activa durante el proceso de dilatación, sospechosa de patología placentaria que compromete el estado materno, eclampsia con indicación de extracción fetal inmediata, entre otros [24].

Mientras que, por otro lado, aquellas situaciones en donde se debe realizar una cesáreas programada o electiva son: presentación de tronco, presentación podálica, placenta previa oclusiva, embarazadas portadoras de VIH, embarazadas portadoras de condilomas acuminados, que afecten extensivamente al canal blando del parto, embarazadas con dos cesáreas anteriores, embarazadas con infección genital activa, demostrada por virus del herpes en las últimas seis semanas antes del parto, embarazadas sometidas a cirugía uterina previa en las que se haya abierto la cavidad endometrial, gestaciones múltiples, compromiso fetal demostrado y contraindicación de inducción del parto en partos prematuros, feto macrosómico y embarazadas que cursen con diabetes gestacional. [24]

1.4. Oxitocina

La oxitocina es un nonapéptido principalmente secretado por la neuro-hipófisis en el núcleo supraóptico y paraventricular, y genera una amplia gama de reacciones corporales con efectos generalizados. Dentro de estos, una de las principales funciones descritas es la modulación de las interacciones sociales positivas [27].

En el marco de las funciones que ejerce la oxitocina en nivel perinatal, se encuentra la facilitación del parto por medio de la estimulación de la contracción muscular, la reducción de la ansiedad y dolor materno. Así como también la facilitación de la eyección de la leche durante la lactancia. Y, en ambas instancias modula el comportamiento social denominado bounding o apego materno-fetal. [28-30]

Durante el trabajo de parto fisiológico o, también conocido como parto espontáneo, la secreción de oxitocina va en aumento, alcanzando el doble de los niveles basales previos al trabajo de parto. Se conoce que esta secreción de oxitocina al torrente sanguíneo materno facilitaría el trabajo de parto por medio de la estimulación de la contracción muscular y, por ende, la dilatación del cérvix.

Esta secreción ocurre de manera pulsátil incrementando la frecuencia y amplitud conforme progresa el trabajo de parto, respondiendo al denominado reflejo de Ferguson. El cual sostiene que a medida que ocurre la secreción de oxitocina y se estimula la salida del bebé, este mismo proceso envía señales a nivel de la neurohipófisis para estimular una mayor secreción de oxitocina hasta lograr el nacimiento. [27, 28]

El mecanismo de acción que tiene la oxitocina a nivel muscular se encuentra ampliamente descrito. Se conoce que la oxitocina (OXT) se une a su receptor (OXTR), el cual se encuentra acoplado a proteína G, ubicado en la membrana plasmática de la célula [31]. Este estimula a la fosfolipasa C (PLC), vía subunidad $\alpha_q/11$, para inducir la formación de Diacilglicerol e inositol trifosfato (IP3). Así, por un lado, estimular la fosforilación de proteínas necesarias para la contractibilidad muscular. Y, por otro lado, permitir el influjo de calcio al citosol, el cual activará la maquinaria contráctil de la célula (**Figura 1 y 2**). De este modo, la oxitocina permitirá la contracción del músculo [25]. Esto ha sido principalmente estudiado mediante modelos animales de células excitables como es el caso de células de músculo liso, cardiomiocitos o neuronas [25, 32-37].

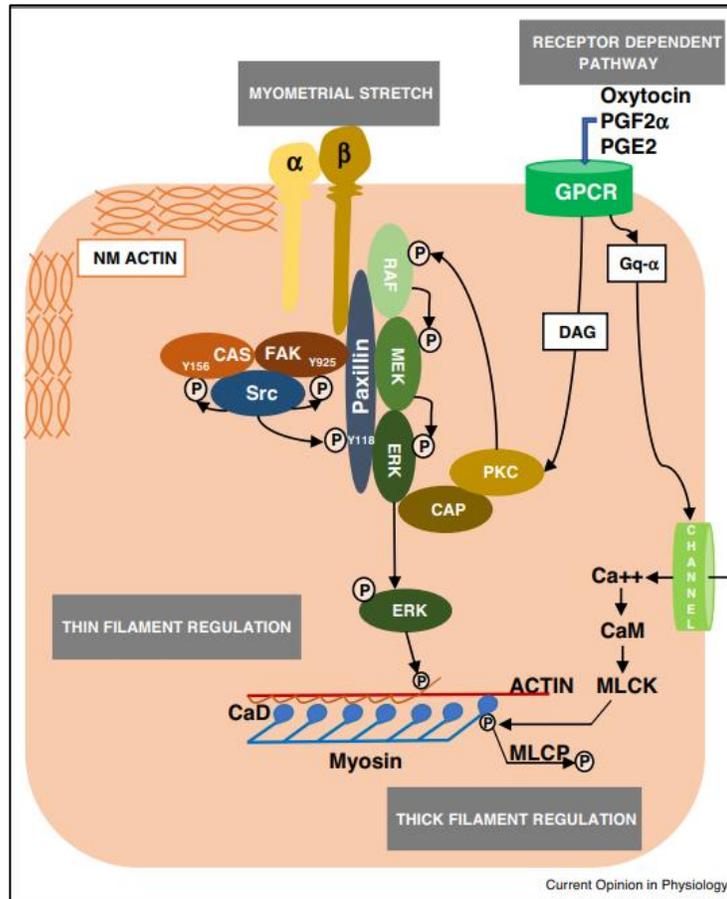


Figura 1: Representación de maquinaria de contractibilidad estimulada por oxitocina en tejido y vías de señalización involucradas en la contracción uterina. Imagen perteneciente a: Kajuluri et al (2020) "The uterine myocyte, contractile machinery and proteins of the myometrium and their relationship to the dynamic nature of myometrial function"

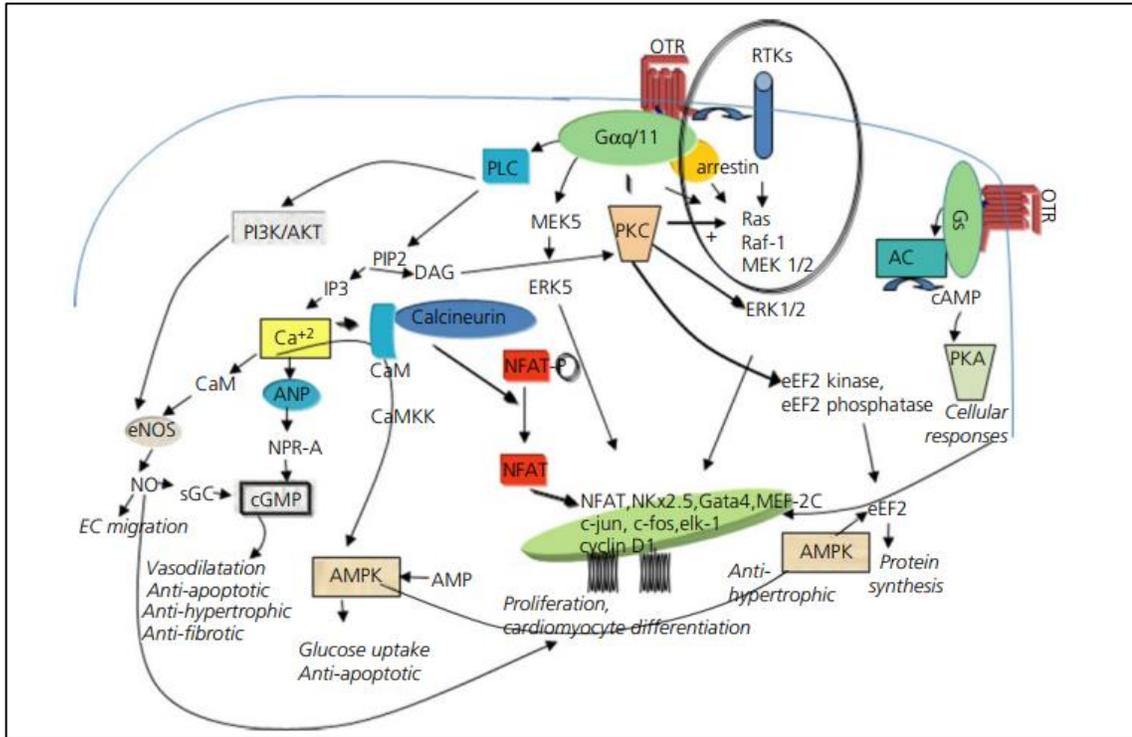


Figura 2: Representación esquemática de las vías de señalización de oxitocina en células cardíacas. Imagen perteneciente a: Gutkowska et al (2012) "Oxytocin Revisited: Its Role in Cardiovascular Regulation".

Si bien, la acción y señalización de oxitocina a nivel muscular ha sido el principal foco de investigación, también existen otros estudios que reconocen otro tipo de roles perinatales que puede ejercer la oxitocina [38-43]. Algunas de estas publicaciones señalan que la oxitocina además estimular la vía de señalización de calcio para producir contracción muscular, actuaría a nivel del miometrio vía PKC y vía MAPK, como vías alternativas para estimular la contracción muscular [38]. También existen publicaciones que señalan que el receptor de oxitocina se encontraría no solo en miometrio, sino que en otros tejidos periféricos como es el caso de la decidua o amnios. En donde la oxitocina al unirse a su receptor estimularía la producción de prostaglandinas en estos tejidos, con el fin de estimular la contracción muscular del miometrio (**Figura 3**) [38, 39, 42-44].

También existen publicaciones que señalan que la oxitocina tendría una importante función en la síntesis de novo de proteínas, ya que la oxitocina induciría la desfosforilación del factor de elongación eucariota 2 (eEF2), el cual está encargado de promover la traducción de mRNA [45-48]. Por lo cual la oxitocina tendría un rol importante en la contracción muscular, la síntesis de proteínas y proliferación celular (**Figura 4**) [47].

Del mismo modo, una publicación del año 2017 de Kim y colaboradores, señalan que existe la expresión de oxitocina y su receptor OXTR en

citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto. Y que, además esta expresión es dependiente de la edad gestacional de las embarazadas, es decir, que existe una mayor expresión de ambas proteínas al finalizar el embarazo. [49] Por lo que estos resultados entregarían un primer indicio sobre nuevas posibles funciones de oxitocina en placenta y durante el final del embarazo o parto, las cuales aún no han sido estudiadas.

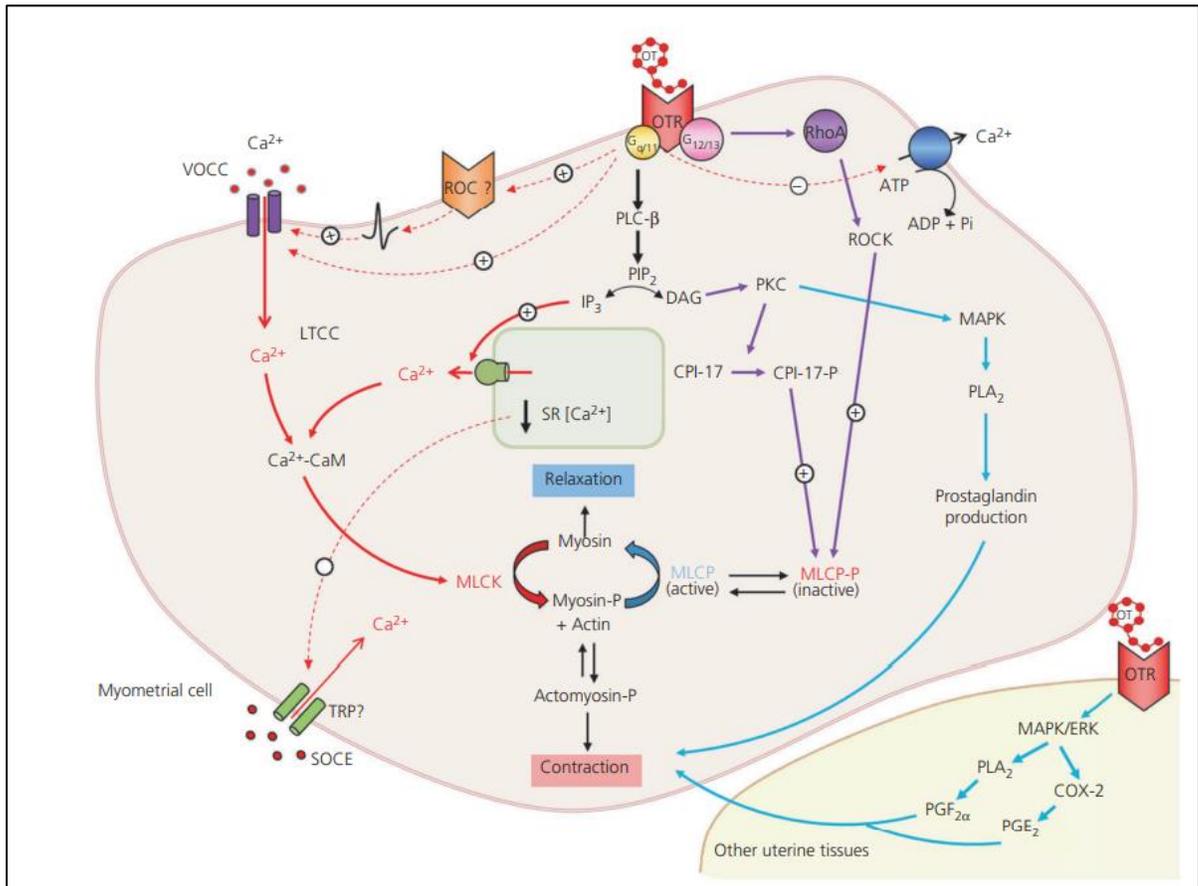


Figura 3: Representación esquemática de las vías de señalización de oxitocina en células de miometrio. Imagen perteneciente a: Arrowsmith et al (2014) "Oxytocin: Its Mechanism of Action and Receptor Signalling in the Myometrium"

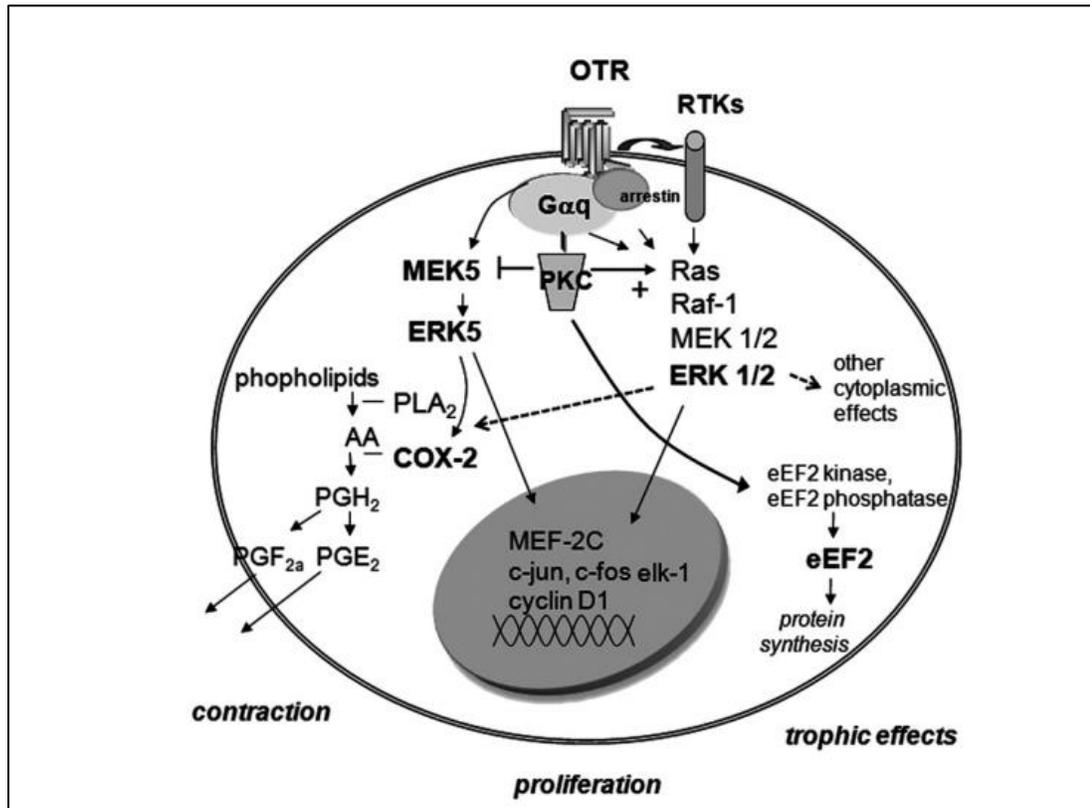


Figura 4: Representación esquemática de las vías de señalización de oxitocina y sus posibles efectores. Imagen perteneciente a: Devost et al (2008) "Oxytocin receptor signalling"

1.5. Oxitocina y tipos de parto

La inducción del trabajo de parto es un procedimiento frecuente utilizado en nuestro país, cuya administración está bien detallada en la Guía Clínica Perinatal del Ministerio de Salud de Chile publicada en el año 2015 [24]. La administración de oxitocina permite las contracciones uterinas con el fin de facilitar el trabajo de parto, sin embargo, al ser una administración externa produce que los niveles de oxitocina en circulación materna sean considerablemente mayores y de concentración constante que en comparación de los niveles de oxitocina en un trabajo de parto espontáneo [25].

También se han demostrado diferencias estadísticamente significativas de los niveles de oxitocina entre parto espontáneo y cesárea electiva, en donde esta última cursaría con niveles considerablemente menores que un parto fisiológico [50, 51]. Por lo que se sabe que en los distintos tipos de parto existen diferentes niveles de oxitocina en circulación materna, lo que produce que la exposición en las células de sincitiotrofoblasto frente a oxitocina en la placenta también sea diferente y con ello los niveles de oxitocina en circulación fetal [51].

Los efectos de oxitocina en el feto han sido asociados al alivio del dolor, efecto antiinflamatorio, reparación tisular producto de la hipoxia producida por el proceso de parto y la modulación del *bonding* o apego madre-hijo [27]. Existe evidencia que señala que la oxitocina además tendría un importante rol en las características fisiológicas y comportamientos de largo plazo del recién nacido y su madre. Algunos de los beneficios a largo plazo corresponden a mayores habilidades sociales, niveles reducidos de estrés y mejor salud. Es por esto por lo que se recomienda fortalecer el apego madre-hijo mediante el contacto piel a piel, lo que estimularía una mayor secreción de oxitocina. Esta información reforzaría la importancia de la participación de oxitocina en parto, pudiendo incluso tener un rol asociado a cambios en la expresión de proteínas o cambios epigenéticos, lo cual aún está en investigación [28].

1.6. Hormonas Tiroideas

Dentro de las hormonas que son transportadas desde la circulación materna a circulación fetal, y que son fundamentales para el desarrollo del feto, se tienen a las hormonas tiroideas: T3 y T4; L-3,5,3'triyodotironina y tetrayodotironina (L-tiroxina), respectivamente. Estas hormonas son sintetizadas por el feto humano aproximadamente a partir de la semana 18 de gestación, por lo que los niveles de circulación fetales de T3/T4 hasta esa semana de gestación dependen exclusivamente de la secreción materna y del intercambio materno-fetal dado a nivel de la placenta [52].

Para lograr este intercambio, es necesario que las hormonas tiroideas sean transportadas desde la circulación materna hacia la circulación fetal por medio transportadores de hormonas tiroideas expresadas en las células de trofoblasto. Algunos de los transportadores hallados en placenta son: MCT8, MCT10, OATP1A2, OATP4A1 y LAT1, descritos en células de sincitiotrofoblasto, y MCT8, MCT10 y OATP1A2 en células de citotrofoblasto [53, 54].

Del mismo modo es necesaria la expresión de enzimas denominadas deiodinasas, las cuales regulan los niveles intra placentarios de T3 y T4 [55]. Se han descrito en el cuerpo humano tres principales enzimas deiodinasas: D1, D2 y D3. De las cuales, las últimas dos estarían altamente expresadas en el tejido placentario. D2 se encarga de la conversión de T4 a T3, mientras que D3 realiza la conversión de T3 en T2 y la conversión de T4 en la forma inactiva de T3, T3r. [56, 57].

Además, existen estudios que han evaluado como la expresión de los transportadores y las enzimas son reguladas con condiciones patológicas del embarazo, como es el caso de la diabetes gestacional. En donde, la disponibilidad de las hormonas tiroideas desde la circulación materna modifica la expresión de los transportadores permitiendo la mayor adquisición de las hormonas a nivel placentario y su transferencia a circulación fetal. Mientras que, al mismo tiempo existe una disminución de la expresión de las deiodinasas, evitando la conversión a la forma inactiva de las hormonas tiroideas. Todo esto con el fin de suplir concentraciones fetales necesarias para su desarrollo [57, 58].

Por lo cual, se sabe que la placenta es un tejido que responde a cambios de concentración de las hormonas tiroideas y modifica su metabolismo de acuerdo con fisiología del embarazo. Sin embargo, se desconoce si las hormonas

tiroideas poseen o no, otras rutas de señalización o actividades metabólicas que también sean moduladas por las hormonas tiroideas en tejido placentario.

Dentro de los mecanismos de acción de las hormonas tiroideas, se conocen dos efectos que estas hormonas ejercen. Por un lado, el efecto genómico, el cual es descrito por una acción directa de las hormonas tiroideas en la transcripción de genes, y, por otro lado, los efectos no genómicos.

El efecto genómico, comienza por el ingreso de las hormonas tiroideas a la célula, en la cual T4 posterior a su ingreso, se convierte en T3 por medio de la regulación de D2. Una vez convertido en T3, esta hormona se une a los receptores nucleares de hormonas tiroideas (TR), los que en conjunto se unen a la región promotora de genes target **(figura 5)** [53, 59]. Por ejemplo, genes necesarios para la producción de la proteína básica de mielina en el sistema nervioso central [60], o genes como: Endotelina-1 y fibronectina, en células endoteliales de vena de cordón umbilical (HUVEC) [58].

Mientras que los efectos no genómicos, comienzan por la unión de las hormonas tiroideas a su receptor de membrana, integrina $\alpha v \beta 3$. Desde el cual ocurre la activación de la cascada de señalización que resulta en la activación de señales de proliferación celular, angiogénesis, secreción de factores de crecimiento en la membrana de eritrocitos, leucocitos o hepatocitos, tráfico

intracelular de proteínas, entre otras funciones [61-63]. Se ha descrito que tanto T3 como T4, pueden unirse al receptor $\alpha\text{v}\beta_3$, pero que esta unión se llevará a cabo en diferentes dominios, activando vías de señalización diferentes [64]. T3 se une al dominio S1, el cual activa al fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K) promoviendo vía TR α la transcripción del factor inducible de hipoxia-1 α (HIF-1 α). Mientras que en el dominio S2 se uniría tanto T3 como T4, y ambos activarían a la kinasa reguladora de señalización extracelular (ERK1/2), la cual vía TR β 1 favorecería la proliferación celular [65]. También se ha descrito que la propia subunidad αv del receptor en respuesta de T4, ingresaría hasta el núcleo celular para unirse a la región promotora de los genes HIF-1 α , TR- β 1 y COX-2 y favorecer su transcripción (**Figura 6**) [63].

Aunque los estudios de los efectos y señalización de las hormonas tiroideas han sido realizado en tejidos distintos al placentario, existen publicaciones que describen la expresión del receptor $\alpha\text{v}\beta_3$ en cultivos de línea celular de trofoblastos como es HTR8-Svneo [66] y en cultivos primarios realizados desde muestras de placentas humanas [67]. Esta información en conjunto con el incremento de los niveles de T3 durante la etapa final del embarazo hace suponer que las hormonas tiroideas pudieran estar involucradas en la expresión de proteínas que permitan el incremento y mantención de T3 durante la etapa previa al parto. Como por ejemplo, la modulación de la actividad de las enzimas deiodinasas [68]. Por consiguiente, la caracterización de la función de estas

hormonas a nivel placentario es una temática novedosa que propone conocer el rol que cumplen las hormonas tiroideas en tejido placentario y las implicancias que estas producen a nivel endocrino en el recién nacido.

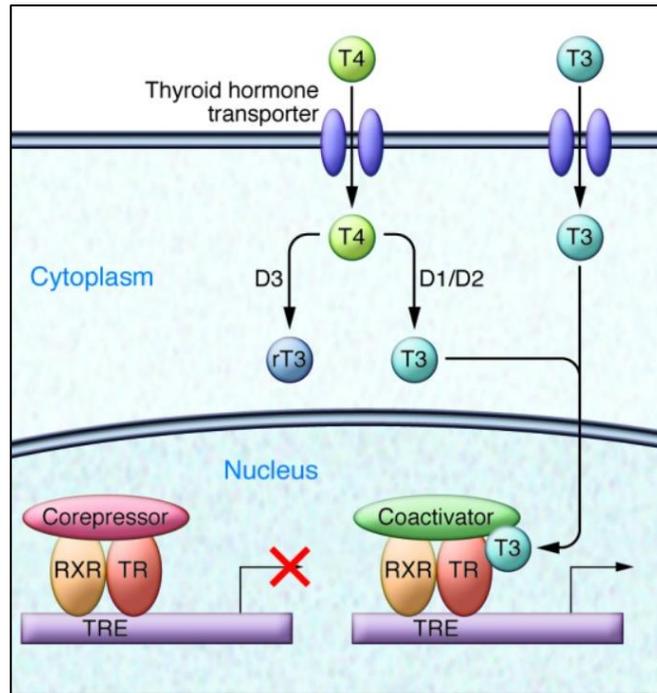


Figura 5: Representación esquemática del efecto genómico de las hormonas tiroideas. Imagen modificada, perteneciente a: Brent. G, (2012) "L Mechanisms of thyroid hormone action"

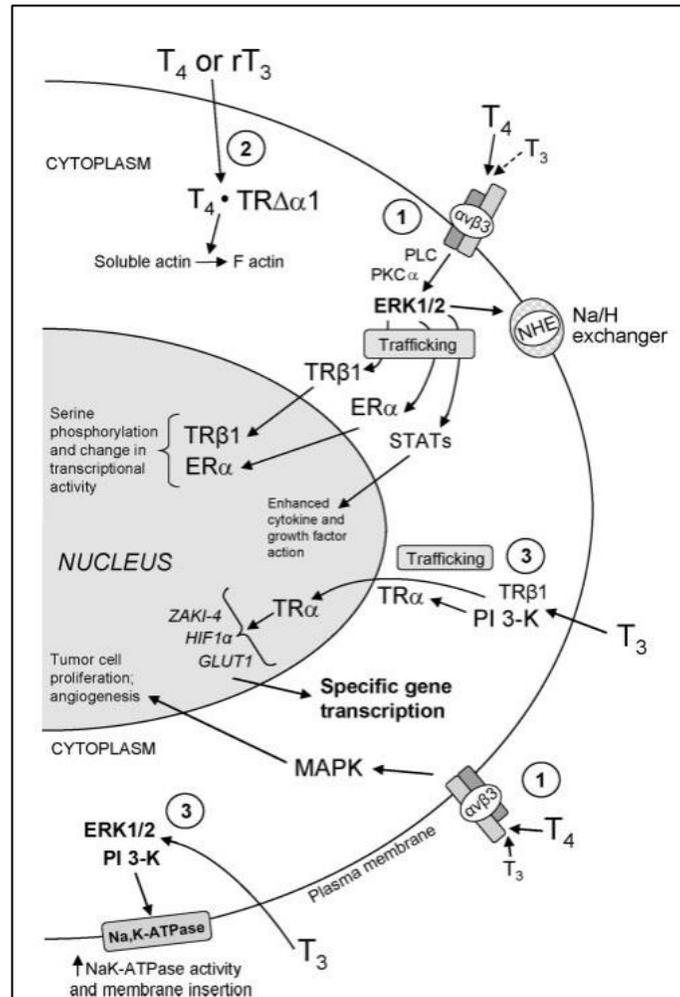


Figura 6: Representación esquemática del efecto no genómico de hormonas tiroideas. Imagen perteneciente a: Cheng, et al (2010) "Molecular Aspects of Thyroid Hormone Action"

1.7. Hormonas Tiroideas y tipos de parto

Se ha descrito que las hormonas tiroideas no solo cumplirían un rol crítico y fundamental durante el crecimiento y desarrollo del feto, sino que también durante su vida neonatal [69]. Es conocido que durante el embarazo se requiere de niveles adecuados de hormonas tiroideas para el neurodesarrollo del feto, ya que niveles insuficientes de estas hormonas durante el embarazo estarían asociados problemas cognitivos durante la vida del recién nacido [70, 71]. Para cumplir con este requerimiento, existen numerosos transportadores de hormonas tiroideas y enzimas que modulan su concentración a nivel placentario. Por lo que existe toda una maquinaria involucrada con el transporte y metabolismo de las hormonas tiroideas en la placenta [53].

Durante el final del embarazo existen diferentes procesos fisiológicos en el feto, para permitir su supervivencia inmediatamente después del nacimiento. Algunos de estas adaptaciones ocurren a nivel del sistema respiratorio, cardiovascular, hepático y en la placenta [72]. A nivel respiratorio, las hormonas tiroideas incrementarían la expresión de transportadores, además de la síntesis y liberación de proteínas surfactantes, y la maduración de los pulmones producto del incremento de la expresión de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) en los alveolos. Mientras que a nivel cardiovascular promueve el crecimiento y

diferenciación de los cardiomiocitos, además del incremento de la glucogenogénesis y expresión de transportadores de glucosa a nivel hepático [72]. Y también se ha descrito una modulación de la actividad de las enzimas deiodinasas y con ello los niveles de T3 durante el final del embarazo [68]. Por lo cual, las hormonas tiroideas no solo cumplirían un rol fundamental durante el comienzo del desarrollo del feto, sino que también próximo a su nacimiento.

En cuanto a los tipos de parto, existe evidencia que señala alteraciones en el metabolismo lipídico, estrés oxidativo y apoptosis, cuando se comparan muestras provenientes de parto espontáneo y cesárea electiva [73, 74]. La publicación de Hacioglu y colaboradores en 2021, señala que existen cambios bioquímicos asociados al tipo de parto tanto en sangre materna como en muestras de tejido placentario. Estos cambios estarían relacionados a una mayor carga oxidativa y capacidad antioxidante en partos espontáneos en comparación con cesárea, un aumento de la expresión de proteínas responsables del transporte y empaquetamiento de lípidos en muestras provenientes de parto espontáneo, y, una mayor inducción de las vías de señalización pro-apoptóticas en muestras provenientes de cesáreas electivas [73]. Ya que una de las funciones de las hormonas tiroideas es regular el metabolismo, esta alteración en el metabolismo lipídico podría estar relacionada con cambios en la

concentración de estas hormonas. Sin embargo, la relación que tendrían las hormonas tiroideas, con respecto a los tipos de parto aun es desconocida.

2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

En la actualidad se conoce que, tanto la hormona oxitocina como, las hormonas tiroideas cumplen un rol fundamental durante el embarazo y parto. Sin embargo, no han sido caracterizadas sus receptores, ni sus vías de señalización en placentas humanas. Y tampoco ha sido caracterizado según los distintos tipos de parto, frente a niveles hormonales de oxitocina y L-tiroxina.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuánto modifican los tipos de parto la señalización de oxitocina y tiroxina en placentas humanas?

4. HIPOTESIS

Existen diferencias en las rutas de señalización frente a oxitocina y tiroxina en placentas humanas dependiendo del tipo de parto.

5. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el sistema oxitocinérgico y tiroideo en explantes placentarios humanos según el tipo de parto.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Establecer la localización de **OXTR** y **$\alpha v\beta 3$** en tejido placentario humano, y evaluar su expresión según el tipo de parto frente a oxitocina y tiroxina.
- 2.- Evaluar la expresión de **peEF2/eEF2** total mediada por oxitocina en tejido placentario según tipo de parto y según concentraciones de oxitocina.
- 3.- Evaluar el efecto de tiroxina en la expresión de mRNA para **Endotelina-1** y **HIF-1 α** en tejido placentario según tipo de parto.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Población de estudio

Estudio transversal, analítico, experimental y retrospectivo. Como población de estudio se incluyeron 27 placentas provenientes de embarazos de bajo riesgo atendidos en el servicio de Obstetricia y ginecología del hospital Grant Benavente de Concepción.

Los criterios de inclusión que se utilizaron fueron los siguientes:

- Placentas de mujeres con antecedentes de gestación de bajo riesgo y con examen de COVID-19 negativo.
- Placentas de mujeres cuyo parto fue: vaginal espontáneo sin uso de oxitocina exógena durante su trabajo de parto y parto; vaginal acelerado con oxitocina exógena durante su trabajo de parto y parto; cesárea electiva sin trabajo de parto previo, cesárea urgencia con buen resultado materno y neonatal posterior a la intervención.

Los criterios de exclusión que se utilizaron fueron los siguientes:

- Placentas de mujeres con antecedentes de haber contraído COVID-19 independiente de su sintomatología.

- Placentas de mujeres que cursaron con patologías del embarazo, tales como: Síndrome hipertensivo severo, infección ocular, restricción del crecimiento intrauterino, diabetes mellitus gestacional, preeclampsia y eclampsia, malformaciones severas y mortinatos.
- Placentas de mujeres que cursaron con complicaciones obstétricas durante el trabajo de parto, cuyo parto debió resolverse con cesárea de urgencia o parto instrumentalizado con resultado materno y/o neonatal adverso.

7.2. Recolección de las muestras

Las placentas fueron almacenadas inmediatamente después de su recolección en el servicio de obstetricia y ginecología del Hospital Regional de Concepción. Este procedimiento fue realizado por el personal de la sala de parto responsable de esta función, previa indicación de la matrona y/o médico tratante. Para ello se utilizaron bolsas y recipientes debidamente identificadas en la sala de parto, dentro de los cuales se guardaron las placentas en bolsas cerradas.

Las muestras fueron recogidas a la brevedad una vez ocurrido el parto, contando con un tiempo máximo de 1 hora para comenzar el procesamiento de la muestra. Las muestras fueron transportadas en una nevera hasta el Laboratorio de Patologías del Embarazo del Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción.

7.3. Cultivo de explantes placentarios

Desde la muestra de placenta, se extrajeron cortes de 1 cm de tejido de vellosidades de al menos 5 cotiledones diferentes, ubicados a una distancia media entre la placa basal y la placa coriónica. A estos cortes se les retiró el tejido conectivo, vasos sanguíneos y depósito de calcio visibles, y se disgregó el tejido hasta obtener explantes de 6-8mm de longitud. Luego se lavaron los explantes con PBS 1X hasta eliminar restos visibles de sangre.

Posteriormente los explantes fueron colocados individualmente en los pocillos de una placa de cultivo de 24 pocillos, añadiendo 500 μ L de Medio 199 (Marca Gibco REF:31100-019 LOT:1842236) suplementado con 10% de SFB y 1% de penicilina-estreptomicina en cada pocillo, e incubados durante 8-10 horas a 37°C al 5% de CO₂ en el periodo denominado estabilización.

Finalmente, a los explantes se les cambió el medio y se les agregó medio fresco con las condiciones a evaluar. Por una parte, se utilizaron concentraciones de 1×10^{-15} M a 1×10^{-3} M de oxitocina y, por otra parte, se utilizaron concentraciones de 2×10^{-12} M a 2×10^{-8} M de L-tiroxina.

Estas condiciones fueron aplicadas cada ocho pocillos utilizando un volumen de 500 μ L en cada uno de ellos. Los explantes fueron incubados durante 12 horas a 37°C al 5% CO₂. Finalizado el tiempo de incubación las muestras para análisis de proteínas y biología molecular fueron almacenadas a -80°C hasta su procesamiento. Mientras que las muestras histológicas fueron procesadas inmediatamente.

7.4. Ensayo de viabilidad

Se midió la concentración de la enzima Lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio sobrenadante de los cultivos de explantes placentarios, como método para evaluar la viabilidad celular. Para ello se tomaron alícuotas de 100µL del medio de cultivo de los explantes a los tiempos: 0, 1.5, 3, 6, 12 horas post cultivo. Estas alícuotas se almacenaron a -20°C hasta la cuantificación.

Cuando finalizó el cultivo de los explantes placentarios en sus respectivas condiciones, se masaron cada uno de los explantes a los cuales se les retiró la alícuota de medio sobrenadantes, para normalizar el valor de concentración de LDH por la masa respectiva de los explantes placentarios.

De forma paralela, se preparó un control de muerte celular. Para ello se incubaron explantes placentarios utilizando diferentes agentes químicos: Dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%v/v y 200µM peróxido de hidrógeno (H₂O₂), para evaluar su efecto citotóxico sobre el cultivo. [75, 76]. Y una vez, definido el control de muerte celular, se realizó la medición de LDH a los mismos tiempos de cultivo que las muestras evaluadas.

Para la cuantificación de LDH se utilizó el kit de cuantificación: LDH SCE mod. Liqui UV (REF: 12014) de Human® realizando una incubación de 60s y una lectura durante 180s a 340 nm y 37°C. Esta medición se realizó siguiendo las indicaciones del kit, mediante el uso del espectrofotómetro BTS-350 N°serie 801755670. Como calibrador se utilizó el Calibrador AUTOCAL Lot: 0018B (REF: 13160), como controles se utilizaron: Humatrol N Lot: 0006R (REF: 13511) y Humatrol P Lot: 0005F (REF: 13512).

7.5. Histología e Inmunohistoquímica

Una muestra de explante placentario representativa de cada condición fue fijada en 500 μ L de paraformaldehído 4% durante un periodo de 3 días (Paraformaldehyde solution 4% in PBS sc-281692 LOT:G2118). Posterior a este periodo de tiempo, los explantes se almacenaron en 500 μ L de etanol al 70% a 4°C. Las muestras fueron deshidratadas en una batería de alcoholes de concentraciones crecientes: etanol 70%, etanol 95% y Etanol absoluto, pasando por dos baños de 20 minutos en cada uno de ellos. Posterior a ello, las muestras fueron sumergidas en Xilol durante dos baños de 20 minutos, para finalmente ser embebidas en parafina, en dos baños de 20 minutos cada uno de ellos.

Para la inclusión de las muestras se utilizó un centro de inclusión, en donde se prepararon los bloques de parafina que contenían las muestras. Estos fueron cortados con un ángulo de 5° y un espesor de 3 micrones utilizando el micrótopo LEICA RM2125RT. Posteriormente, los cortes de tejido fueron montados en un portaobjetos que fue tratado previamente con silane al 2% en acetona para evitar el desprendimiento de los cortes en los pasos posteriores de la técnica.

Para el análisis morfométrico, las láminas se desparafinaron mediante baños de Xilol y luego, se hidratación en una batería descendiente de etanoles:

etanol absoluto, etanol de 95%, 70% y agua destilada, en baños de 1 minuto, para cada uno. Los núcleos y estructuras ácidas se tiñeron con Hematoxilina de Harris durante 2 minutos y luego, las láminas se lavaron con abundante agua destilada. Posteriormente, las láminas se sumergieron en etanol 70% durante 2 minutos, para luego ser sumergidas en Eosina durante 2 minutos, con el fin de teñir estructuras básicas como el citoplasma y estroma del tejido.

Por otro lado, aquellas láminas destinadas para la inmunohistoquímica debieron ser tratadas para la recuperación antigénica de las mismas. Para ello, las láminas fueron desparafinadas en Xilol durante 10 minutos, y luego hidratadas en alcoholes de concentraciones decrecientes, desde etanol absoluto hasta agua destilada. Una vez hidratadas las muestras, se realizó la recuperación antigénica utilizando el método HIER (Heat-Induced Epitope Retrieval). Para ello, se contó con una olla digital Decloaking Chamber BIOCARE MEDICAL la cual fue llenada con 500 mL de agua destilada. Dentro de esta, se agregaron cubetas que contenían los canastillos con láminas de las muestras hidratadas. Estas cubetas fueron llenadas con buffer citrato de Sodio 0,01M pH 6.0 y buffer Tris-EDTA pH 9.0 según corresponda, para luego, utilizar un programa de 110°C durante 4 segundos y 90°C durante 10 segundos. Finalizado el proceso anterior, se dejaron enfriar las láminas con agua destilada, y luego fueron secadas con papel absorbente.

Los cortes fueron delimitados con lápiz hidrófobo templado a 60°C, y luego las láminas fueron colocadas en el soporte húmedo, en el cual se trabajó el proceso de incubación de las muestras. Se realizó el bloqueo de las muestras con peróxido de hidrógeno acuoso al 3% durante 10 minutos, luego se lavó con agua destilada 3 veces. Se incubó con PBS Tween durante 5 minutos, y luego se incubó con Anticuerpo Primario. Para este paso se estandarizó la incubación en cuanto al tiempo y temperatura de incubación: overnight a 2-9°C o 45-30 minutos a temperatura ambiente. También se estandarizó la concentración de anticuerpo utilizada: 1:900, 1:400, 1:350, 1:250, 1:50. Para la detección del receptor de oxitocina (OXTR) se utilizó el anticuerpo Anti-Oxytocin R Polyclonal Antibody: bs-1314R BLOSS Antibody. Para la detección de la integrina $\alpha V/\beta 3$ se utilizó el anticuerpo monoclonal Anti-integrin $\alpha V/\beta 3$ (23C6): sc-7312. Para la detección de CD34 se utilizó el anticuerpo Anti-CD34 Antibody [QBEnd-10] (PE) (A85663). Para la detección de hCG se utilizó el anticuerpo rabbit polyclonal Anti-hCG de Bio SB.

Posterior a la incubación del anticuerpo primario, las láminas se lavaron con PBS tween, para luego incubar las láminas con el anticuerpo secundario del sistema de detección: Anti-Rabbit/Mouse PolyDetector Plus DAB HRP Brown Detection System de Bio SB (BSB 0257S) durante 20 minutos a temperatura

ambiente. Terminada la incubación, se lavó nuevamente con PBS Tween y se incubó con el polímero conjugado a HRP durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se lavó con PBS Tween y se reveló con el revelador (2mL de Reactivo Tampón + 1 gota de DAB (3,3-diaminobencidina)) durante 2 minutos. Finalizado este tiempo, se revisaron rápidamente las láminas bajo microscopio óptico con aumento 10X para verificar la correcta coloración, revisar la ubicación de la marcación de manera general y comprobar que no hubiese precipitado. De ser así se eliminó el precipitado con PBS.

Se lavaron las láminas con agua destilada y se tiñeron los núcleos de las muestras con Hematoxilina durante 20 segundos. Se lavaron nuevamente las láminas con agua destilada y luego con agua de la llave para azular la tinción. Se observaron las láminas bajo microscopio para verificar que la tinción de núcleos no opacara la IHC. Luego, se deshidrataron las muestras mediante baños de alcoholes de concentraciones crecientes y se finalmente se montaron las muestras.

Las imágenes, tanto para histología como para inmunohistoquímica fueron adquiridas por medio del microscopio LEICA DM500 acoplado a la cámara LEICA ICC50W, utilizando aumentos de 40X y 100X.

Para la elección de las imágenes se buscaron campos visuales que contuviesen cortes transversales de vellosidades maduras que se encontraran aisladas del tronco de la vellosidad.

A estas imágenes se les realizó mediciones de: área, perímetro y número de vasos sanguíneos de las vellosidades, así como también, diámetro de los vasos sanguíneos. Para ello se utilizó un Calibrador Slide con el cual se calibraron las mediciones por medio del programa Image J.

En cuanto a la cuantificación de la IHC, se utilizó el programa Image J y su plug-in llamado Color Deconvolution2 v2.1, utilizando los vectores H DAB a 8bit de transmitancia. Y ajustando manualmente el threshold de cada imagen utilizando la imagen original como referencia.

7.6. Extracción de proteínas, cuantificación de proteínas totales y Western blot

La extracción de proteínas de los explantes placentarios se realizó mediante acción mecánica por medio del uso de mortero sobre hielo, en el cual se maceró cada muestra junto a 200µL Buffer de Extracción: 196 µL de Buffer RIPA + 4 µL de inhibidor de proteasas-EDTA 1:10. (Halt Protease Inhibitor Single-Use Cocktail (100X) REF: 78430 LOT: WI334574). Luego el macerado se traspasó a un tubo eppendorf y se centrifugó a 12.000rpm durante 5 minutos (Centrifuge 5430R de Eppendorf). Finalmente, el sobrenadante se rotuló y almacenó a -80°C.

Para la cuantificación de proteínas se preparó una curva de calibración de BSA preparada a partir de Albúmina de Suero Bovino (BSA) al 1% (Lot#41177 Code#BSA-50). Para la medición tanto de las muestras como de la curva de calibración se utilizó el kit de cuantificación de BioRad Protein Assay modificado para microplaca 96 pocillos. (Añadiendo 25µL de reactivo A y 200 µL de reactivo B en cada muestra). Para, posteriormente se midió la absorbancia a 750 nm por medio del Lector de Microplaca (Lector de microplaca multimodal Synergy 2 de BioTek). Finalmente, por medio de la curva de calibración y la absorbancia de cada muestra, se extrapola la concentración de proteínas totales presentes en cada una de estas.

Para el western blot, primero se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% bajo condiciones desnaturalantes, utilizando 100 µg de proteínas, las cuales fueron sometidas a un campo eléctrico de 120 V constantes, junto al control de peso molecular (Blue Protein Standard Broad Range P7718S New England BioLabs Lot.10108418). Para la transferencia de las muestras a la membrana de PVDF (PVDF Blotting Membrane Amersham™Hybond™ P 0.45 PVDF catalogue No 10600023 Lot NoA29432317 de GE Healthcare) se utilizó un amperaje de 50mA durante 17 horas sobre hielo, utilizando en ambos casos la fuente de poder de BioRad POWER PAC 1000.

Posteriormente, membranas fueron bloqueadas durante 2 horas a temperatura ambiente con solución leche-TBST 5%, se lavaron con TBST 1X y luego, se incubó con anticuerpo primario anti-peEF2 1:500 (peEF2: (thr56) PA597417 polyclonal rabbit ab) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se volvió a lavar con TBST 1X y, se incubó 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti- rabbit IgG 1:2500 (Ms mAB to Rb IgG HRP sc-2357 lot#2622). Una vez realizado el revelado se obtuvieron las imágenes y se realizó el stripping de las membranas. Nuevamente se bloquearon las membranas durante 2 horas a temperatura ambiente con solución leche-TBST 5%. Luego, se lavaron con TBST 1X y se incubaron con el anticuerpo primario anti-eEF2 1:1000

(C-9: sc-166415 mouse monoclonal) durante 2 horas. Se lavaron con TBST 1X y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-mouse IgG 1:2000 (goat anti-mouse invitrogen LOT XC348800).

Para el revelado de las muestras se utilizaron los reactivos de detección Atto Molar (SuperSignal™ West Atto Ultimate Sensitivity Chemiluminiscent Substrate REF: A38554 LOT: XK369509 de ThermoFisher) y el reactivo Femto molar (ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagents Amersham™. LOT: 17614733 Pack: 17614733), para p-eEF2 y eEF2, respectivamente. Y se realizaron las lecturas en el lector de quimioluminiscencia LI-COR scanner.

Se utilizó como control de carga la tinción de la membrana en Rojo Ponceau. Los resultados se presentaron como: expresión total de eEF2 normalizada con Rojo Ponceau y, como: fosforilación de eEF2 (phospo-eEF2/ eEF2 total) normalizada con Rojo Ponceau. Análisis realizado mediante el software Image J.

7.7.Extracción de RNA, cuantificación de RNA total, transcripción reversa y qPCR

A las muestras de explantes placentarios, que habían sido almacenadas a -80°C en $500\ \mu\text{L}$ de Trizol (Invitrogen®), se les realizó el proceso de homogenización. Para ello, mediante el instrumento Precellys Evolution junto a los tubos: Precellys Lysing Kit Soft Tissue homogenizing CK14_7mL REF: P000940-LYSK0-A.0, se procesaron las muestras durante 4 ciclos de 30 segundos cada uno, con pausas de 30 segundos entre ellos, a una velocidad de 6500 rpm en tubos de 7mL. Posterior a ello, el homogenizado se traspasó a tubos Eppendorf de 1,7mL para centrifugar 1 minuto a 12.000rpm (Centrífuga Tabletop High-speed Refrigerated Micro CentrifugeD1524R No:9013111121) y obtener así, el sobrenadante de las muestras. A este sobrenadante se le realizó la extracción de RNA por columna, mediante el kit de extracción: Extracción Kit NucleoSpin® REF: 740956.250 LOT:2005/007 Macherey-Nagel.

La cuantificación de RNA total de las muestras, se realizó mediante Qubit 3.0, en conjunto con el kit Qubit RNA Broad-range Assay kit Q10211 Lot 2471158. Conociendo la concentración de RNA total presente en las muestras se continuó con la transcripción reversa de estas.

Para la reacción de transcripción reversa se utilizaron alícuotas que contenían 1 µg de RNA total de las muestras, utilizando el kit Reverse Transcription System de Promega REF: A3500 LOT: 0000507004 y el termociclador de eppendorf mastercycler personal AG 22331 Hamburg No. 5332 45161, contando con un volumen final de reacción de 20 µL. El programa utilizado fue el siguiente: Calentar Mix2 a 70°C durante 10 minutos, añadir 10,1 µL de Mix1 a las muestras de 9,9 µL de Mix2. Alineamiento de primers 10 minutos a 20°C, polimerización del DNA 60 minutos a 42°C y Desactivación de la enzima 95°C durante 5 minutos.

Posterior a ello, se realizó la amplificación de las secuencias de interés mediante q-PCR utilizando el termociclador Applied Biosystems 7500 No.275011916. Utilizando primers específicos para 28S, Endotelina-1 y HIF-1α (**tabla 1**).

Tabla 1. Listado de partidores para RT-qPCR				
Target	Secuencia		Tamaño de amplicón (nucleótidos)	Temperatura alineamiento (°C)
28S	forward	[5'-TTGAAAATCCGGGGGAGAG-3']	100	54
	reverse	[5'-ACATTGTTCCAACATGCCA-3']		
END-1	forward	[5'-CCGAGCACGTTGTTCCGTAT-3']	113	56
	reverse	[5'-TTGGCTAGCACATTGGCATC-3']		
HIF-1α	forward	[5'-CAAGTCACCACAGGACAG-3']	167	53
	reverse	[5'-AGGGAGAAAATCAAGTCG-3']		

La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando el reactivo 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) en conjunto a los primers de interés, siguiendo el protocolo de amplificación siguiente: denaturación inicial 94°C por 10 minutos, 40 ciclos de: 95°C por 30 segundos, alineamiento a 53-56°C por 30 segundos y, extensión a 72°C por 30 segundos. Luego de ello, una extensión final a 72°C por 10 minutos. Para finalmente, realizar la Curva de Melting de 50°C a 95°C.

Para cada par de partidores se realizó un proceso de estandarización para determinar la concentración de partidores y temperatura de alineamiento ideal de trabajo. También se realizó una curva de calibración a partir de la una dilución seriada de la muestra de concentración conocida, para calcular la eficiencia de la PCR, mediante la fórmula (1):

$$(1) \quad E = 10^{-1/m}$$

Donde, E: Eficiencia, y m: pendiente de la curva de calibración.

Luego para el cálculo de la expresión relativa (expR) se utilizó el método de Pfaffl [77] siguiendo la siguiente fórmula (2):

$$(2) \quad \text{expR} = \frac{(E_{GI})^{(Ct_{GI} \text{ grupo control} - Ct_{GI} \text{ grupo experimental})}}{(E_{GRef})^{(Ct_{GRef} \text{ grupo control} - Ct_{GRef} \text{ grupo experimental})}}$$

Donde, GI: Gen de interés, Gref: Gen de referencia.

7.8. Análisis estadístico

Análisis estadístico fue realizado utilizando el programa GraphPad Prism 9. Los resultados fueron expresados como media \pm error estándar. Se utilizaron los test estadísticos según el número de grupos a evaluar y su distribución, siguiendo el esquema de la **Figura 7**. Considerando como estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

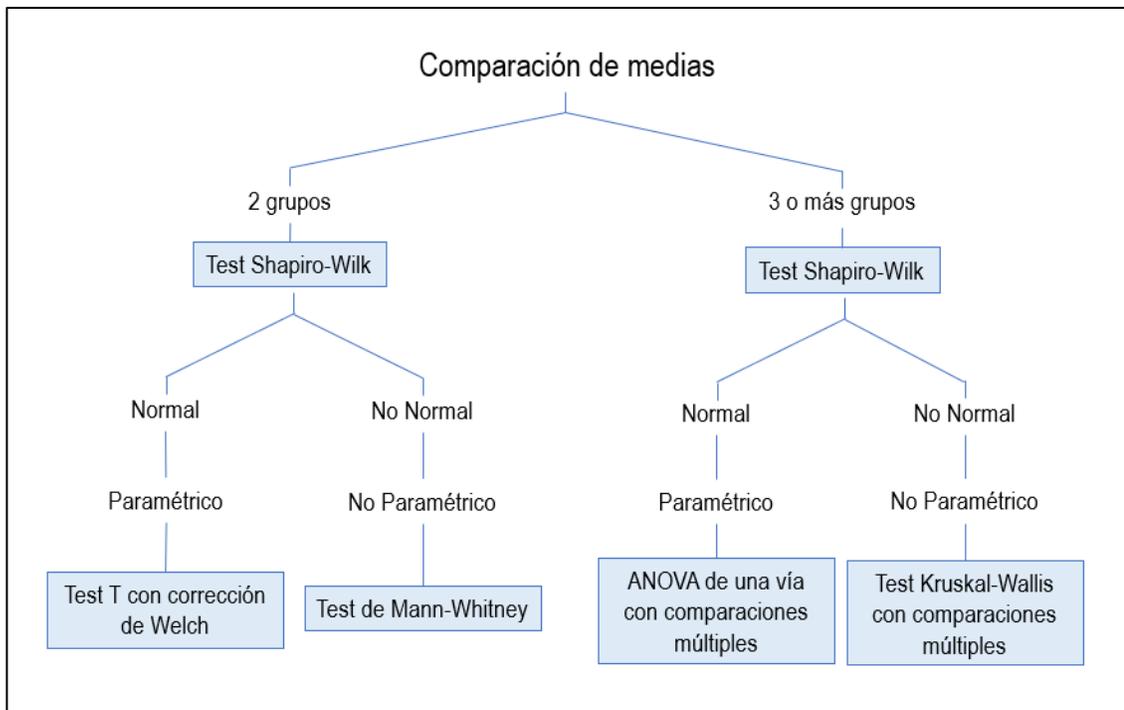


Figura 7: Diagrama de flujo para análisis estadístico de comparación de medias entre grupos.

Para el análisis dosis-respuesta de los explantes placentarios, se evaluó la regresión no lineal de las muestras, hasta obtener la curva que más se ajustara a las muestras en cuestión según la estabilidad de la curva.

7.9. Aspectos éticos y de bioseguridad

Los tejidos fueron utilizados como material de investigación eliminándolos según las normas de Bioseguridad y Ética de la Universidad de Concepción, siempre guardando la confidencialidad de los nombres de las participantes de este estudio, quienes firmaron voluntariamente el consentimiento informado para ser parte del estudio (**Anexo 1**). Tanto el consentimiento informado como la investigación propiamente tal fueron realizadas posterior a la aprobación del comité Ético-científico del Servicio de Salud de Concepción, de la Facultad de Medicina y de la Vicerrectoría de la Universidad de Concepción.

La eliminación del material biológico se realizó según los protocolos establecidos por MATPEL de acuerdo con el reglamento de Manejo de residuos peligrosos del año 2005 (**Anexo 2**).

8. RESULTADOS

8.1. Ensayo de viabilidad celular

Los resultados fueron presentados en la **Figura 8**, en donde se compara la concentración de LDH normalizada, en medio 199 en comparación con cada agente químico y, con ambos en conjunto. Con estos resultados se determinó que el control de muerte celular para los explantes placentarios corresponde a DMSO al 10%v/v.

Teniendo definido el control de muerte celular, se procede a realizar el ensayo de viabilidad celular en explantes placentarios cultivados con las condiciones experimentales de trabajo. Para ellos se tomaron alícuotas de sobrenadante a las 0, 1.5, 3, 6 y 12 horas de cultivo, tanto para L-tiroxina como para Oxitocina.

Al evaluar el efecto de tiempo de exposición y efecto de concentración frente a las incubaciones con L-tiroxina y Oxitocina, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control de muerte celular (**Figura 9**). Mientras que no se encontraron diferencias entre las diferentes condiciones de cultivo, con lo cual se determinó que no existiría un efecto citotóxico en las condiciones de cultivo experimentales.

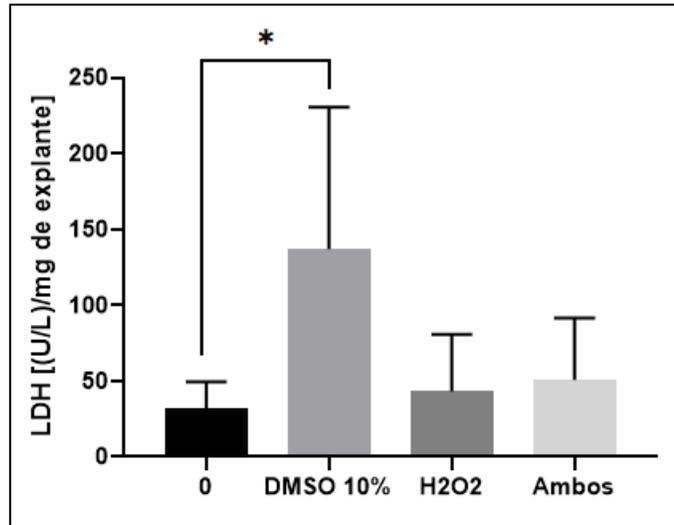


Figura 8: Control de muerte celular. Comparación de concentración de LDH en medio sobrenadante de los cultivos de explantes placentarios utilizando: medio 199 (n=20), medio 199 con 10%v/v de DMSO (n=4), medio 199 con 200 μ M de H₂O₂ (n=4) y, medio 199 con ambos agentes químicos (n=4). El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA de una vía, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo de DMSO 10% con un valor *p<0.05 como significativo.

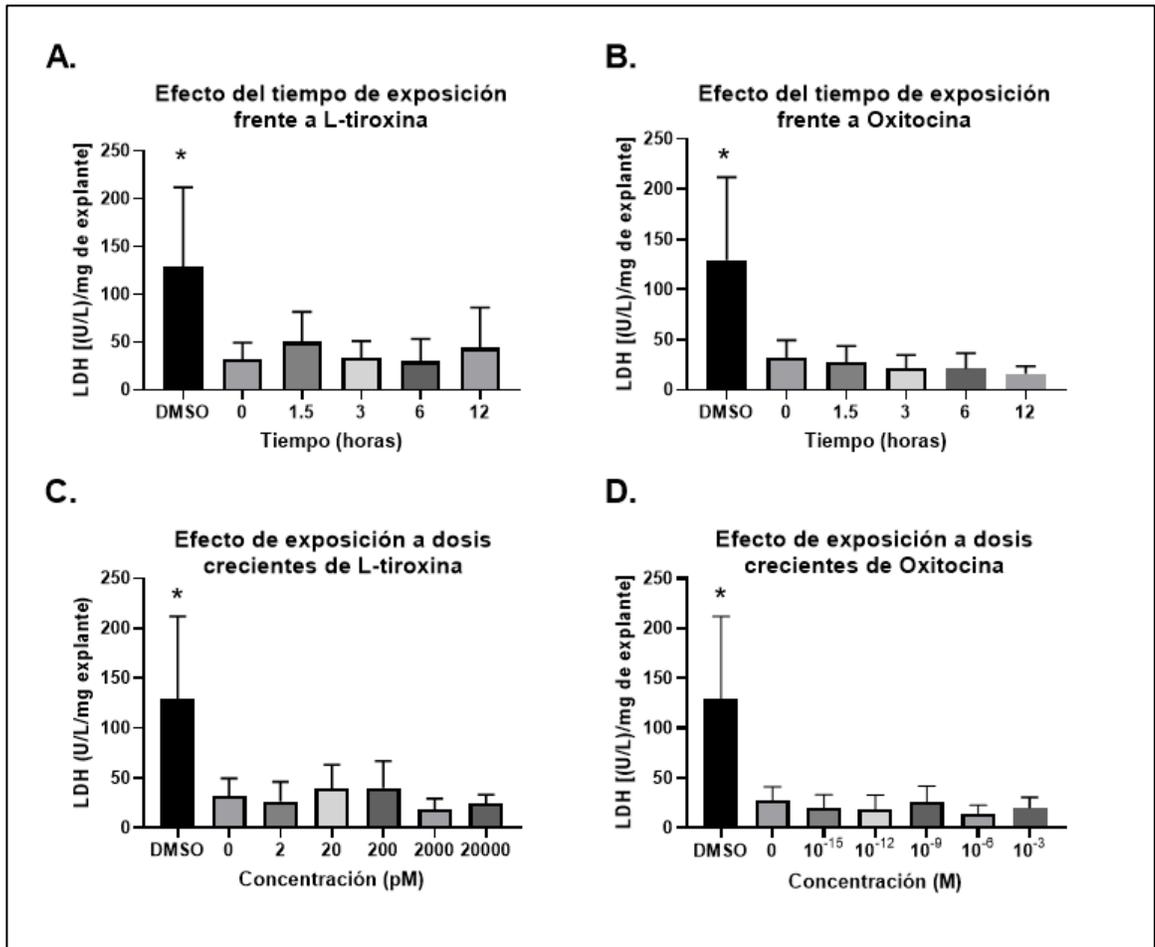


Figura 9: Efecto de tiempo y concentración de Oxitocina y L-Tiroxina en explantes placentarios humanos. En **A.** se observa el efecto del tiempo frente a la exposición de L-tiroxina de muestras entre 2×10^{-12} M a 2×10^{-8} M. En **B.** Se observa efecto del tiempo frente a la exposición de oxitocina de muestras entre 2×10^{-12} M a 2×10^{-8} M. En **C.** se observa el efecto de la exposición a dosis crecientes de L-tiroxina incubados hasta por 12 horas. En **D.** Se observa el efecto de la exposición a dosis crecientes de oxitocina hasta por 12 horas. El análisis estadístico del efecto de tiempo fue realizado mediante la comparación de DMSO frente a cada grupo de estudio utilizando el Test t con corrección de Welch y test de Mann-Whitney, según corresponda. Para el análisis del efecto de concentración se realizó el Test ANOVA de una vía con comparaciones múltiples ($n=12$). Para todo lo anterior se consideró como estadísticamente significativo un valor de $*p<0.05$.

8.2. Histología y evaluación morfométrica

Al comparar las vellosidades presentes en las muestras de tejido placentario provenientes de los distintos tipos de parto, no se observan diferencias en cuando a la organización y/o estructura celular (**Figura 10**). Del mismo modo, al realizar la evaluación de la morfometría de estos tejidos, tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tejidos provenientes de los distintos tipos de parto, en cuánto al área y perímetro de las vellosidades, así como tampoco, para el número y diámetro de los vasos sanguíneos (**Tabla 2** y **Figura complementaria 1**). La similitud tanto histológica como morfométrica entre los grupos de estudios también se mantuvo al comparar la vía de parto clasificando vía vaginal y cesárea. (**Figura complementaria 2**)

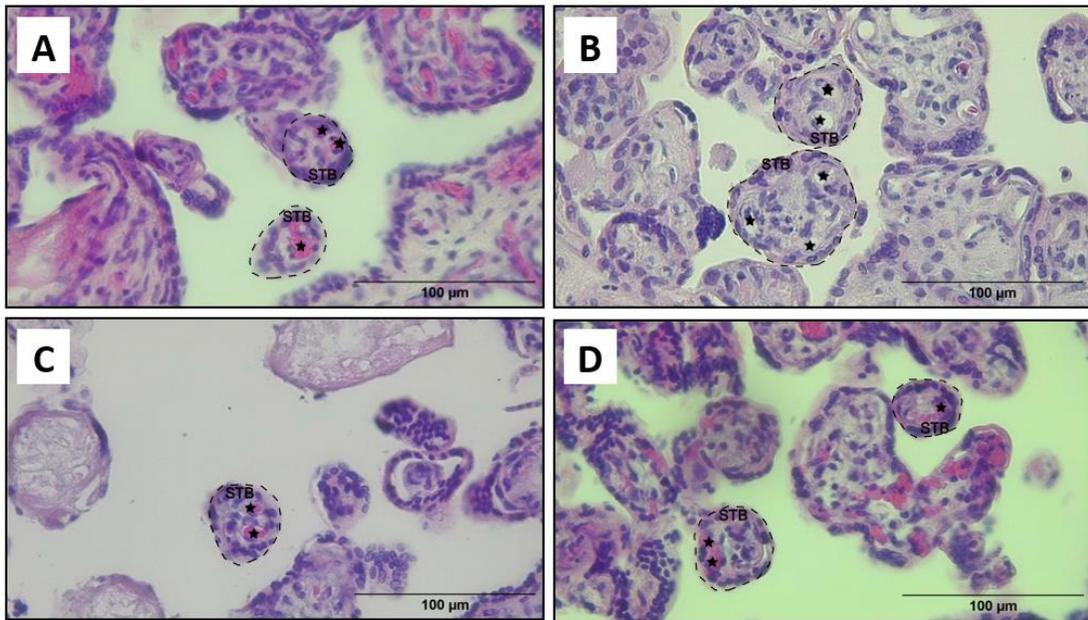


Figura 10: Vellosidades coriónicas presentes en explantes placentarios según tipo de parto. Imágenes representativas del tejido placentario según tipo de parto. En **A.** Parto espontáneo, en **B.** Parto acelerado, en **C.** Cesárea urgencia y en **D.** Cesárea electiva. (Magnificación original x40) ★ vasos sanguíneos; STB: sincitiotrofoblasto; línea punteada delimita una vellosidad. Magnificación original 100X. Scale Bar de 100µm.

TABLA 2: EVALUACIÓN MORFOMÉTRICA DE LOS EXPLANTES PLACENTARIOS SEGÚN TIPO DE PARTO

	Área vellosidad (μm^2)	Perímetro de vellosidad (μm)	N° vasos sanguíneos/vellosidad (unidades)	Diámetro del vaso sanguíneo (μm)	Diámetro menor (μm)	Diámetro mayor (μm)
Parto espontáneo (n=5)	10130 ± 3901	142,8 ± 29,17	3 ± 1	8,19 ± 2,55	4,9	13,4
Parto acelerado (n=4)	10823 ± 9143	143,6 ± 54,97	2 ± 1	9,23 ± 3,69	4,1	20,7
Cesárea urgencia (n=4)	7569 ± 2518	124,4 ± 22,21	3 ± 1	8,06 ± 2,52	4,3	14,24
Cesárea electiva (n=3)	6666 ± 3472	101,9 ± 40,51	2 ± 1	8,50 ± 3,85	4,7	16,3

Prueba ANOVA de una vía. Valor $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

8.3. Efecto de Oxitocina sobre la expresión del receptor de Oxitocina

Para la estandarización del trabajo de inmunohistoquímica (IHC) se realizaron controles de tejido: el control negativo, cuya incubación se realizó sin ningún anticuerpo primario, el marcador CD34 para el reconocimiento del endotelio vascular, y la proteína gonadotropina coriónica humana (hCG) como marcador de células de trofoblasto. (**Figura 11**).

Por medio del proceso de estandarización (**Figura complementaria 3 y 4**), se definió el título de anticuerpo ideal de trabajo, con el cual se pudiese diferenciar la localización, intensidad y tipo de granulosidad de la marcación sobre el tejido. Es así como se decidió utilizar la dilución de anticuerpo anti-OXTR en 1:1500, obteniendo los resultados presentados en la **Figura 12-A y Figura 13**. En estos se observa la marcación del receptor de Oxitocina sobre la vellosidad placentaria, cuya marcación es de tipo granular, y está expresada tanto, en membrana como, de forma citoplasmática. Y esta marcación se encuentra presente principalmente sobre el sincitiotrofoblasto para todas las vellosidades provenientes de los distintos tipos de parto.

En cuanto a la intensidad de marcación y área de marcación de OXTR en el STB de manera basal según tipo de parto, no se observan diferencias entre los grupos

de estudio (**Figura 12**). Cuando se evalúa el efecto de oxitocina sobre la expresión del receptor de Oxitocina en las muestras de explantes placentarios según tipo de parto, se obtienen las imágenes presentadas en la **Figura 13**. Al cuantificar esta expresión de acuerdo con su intensidad de marcación se observa que en el parto de tipo espontáneo existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y dosis mayores de oxitocina (**Figura 14-A**), sin embargo, cuando se grafica la regresión no lineal de la capacidad de respuesta del tejido frente a oxitocina, se observa que para parto espontáneo (**Figura 14-E** en verde), el explante placentario aumenta la expresión del OXTR frente a dosis crecientes de oxitocina. En cuanto a los demás tipos de parto, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre la intensidad de marcación de OXTR a diferentes dosis de oxitocina (**Figura 14 B-D**). Sin embargo, al evaluar el parto acelerado (**Figura 14-E** en azul), existe una expresión de OXTR significativamente mayor que para los demás tipos de parto, principalmente en el rango fisiológico de oxitocina durante trabajo de parto (recuadro verde). Por otro lado, para cesárea de urgencia se observa que la respuesta del tejido es contraria a los partos por vía vaginal, ya que a mayor dosis de oxitocina existe una tendencia a una menor expresión de OXTR (**Figura 14-E** en rosado). Mientras que, para cesárea electiva, la expresión de OXTR permanece constante (**Figura 14-E** en morado).

Cuando se evalúa el porcentaje de área que ocupa la marcación de OXTR sobre el Sincitiotrofoblasto y sobre la vellosidad placentaria, no se observan diferencias estadísticamente significativas frente a dosis crecientes de oxitocina. (**Figura complementaria 5 y 6**).

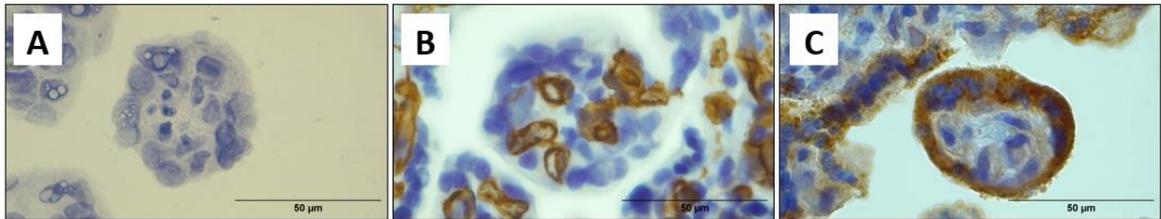


Figura 11: Controles de tejido. En **A.** Control negativo incubado sin anticuerpo primario, en **B.** Marcación de CD34 en endotelio vascular (Incubación 1:400). **C.** Marcación de hCG sobre sincitiotrofoblasto (Incubación 1:400). Magnificación original 100X. Scale Bar de 50µm.

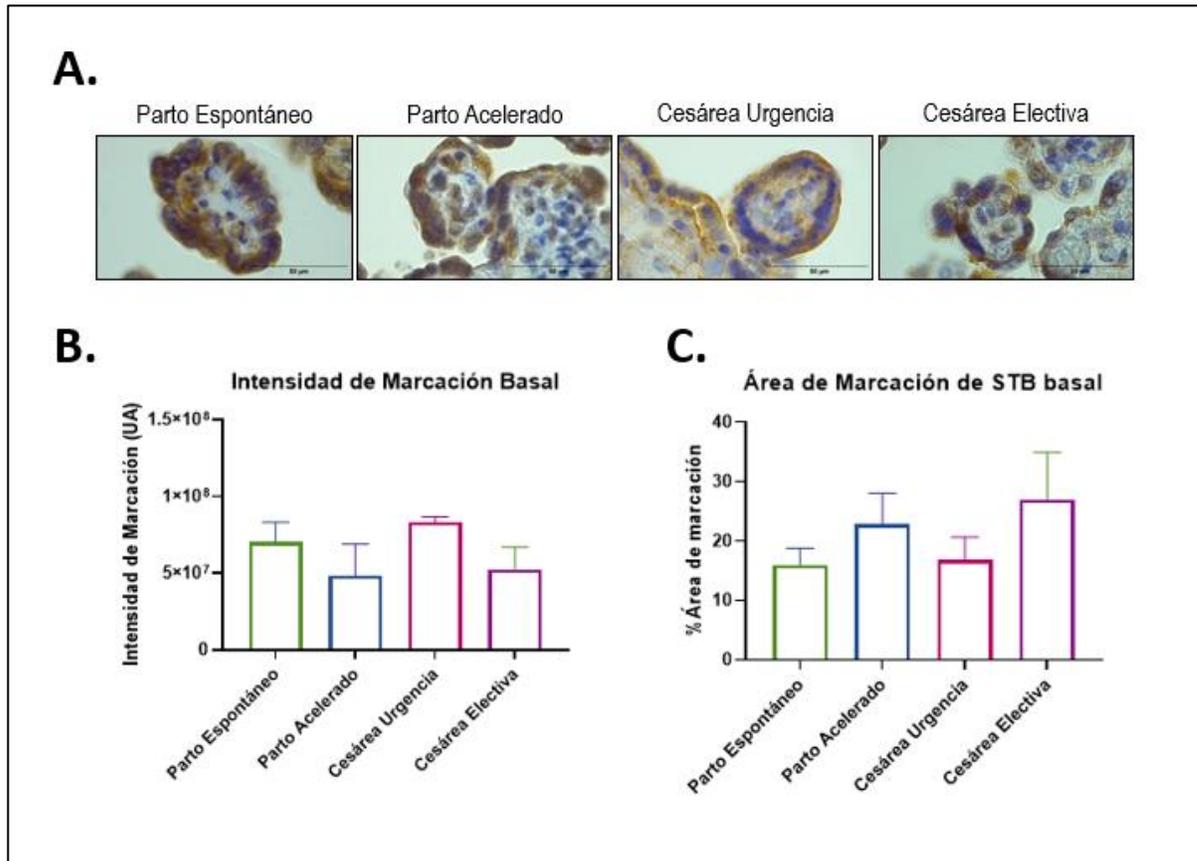


Figura 12: Expresión basal del receptor de oxitocina en explantes placentarios humanos según tipo de parto. **A.** Inmunohistoquímica de muestras de explantes placentarios provenientes de los distintos tipos de parto. Magnificación original 100X. Scale Bar de 50µm. **B.** Intensidad de marcación de OXTR de forma basal según tipo de parto. **C.** Área de marcación de OXTR en el sincitiotrofoblasto según tipo de parto. Valor corresponde a media ± SEM. ANOVA de una vía con comparaciones múltiples, *p<0.05, n = 3-5 por grupo.

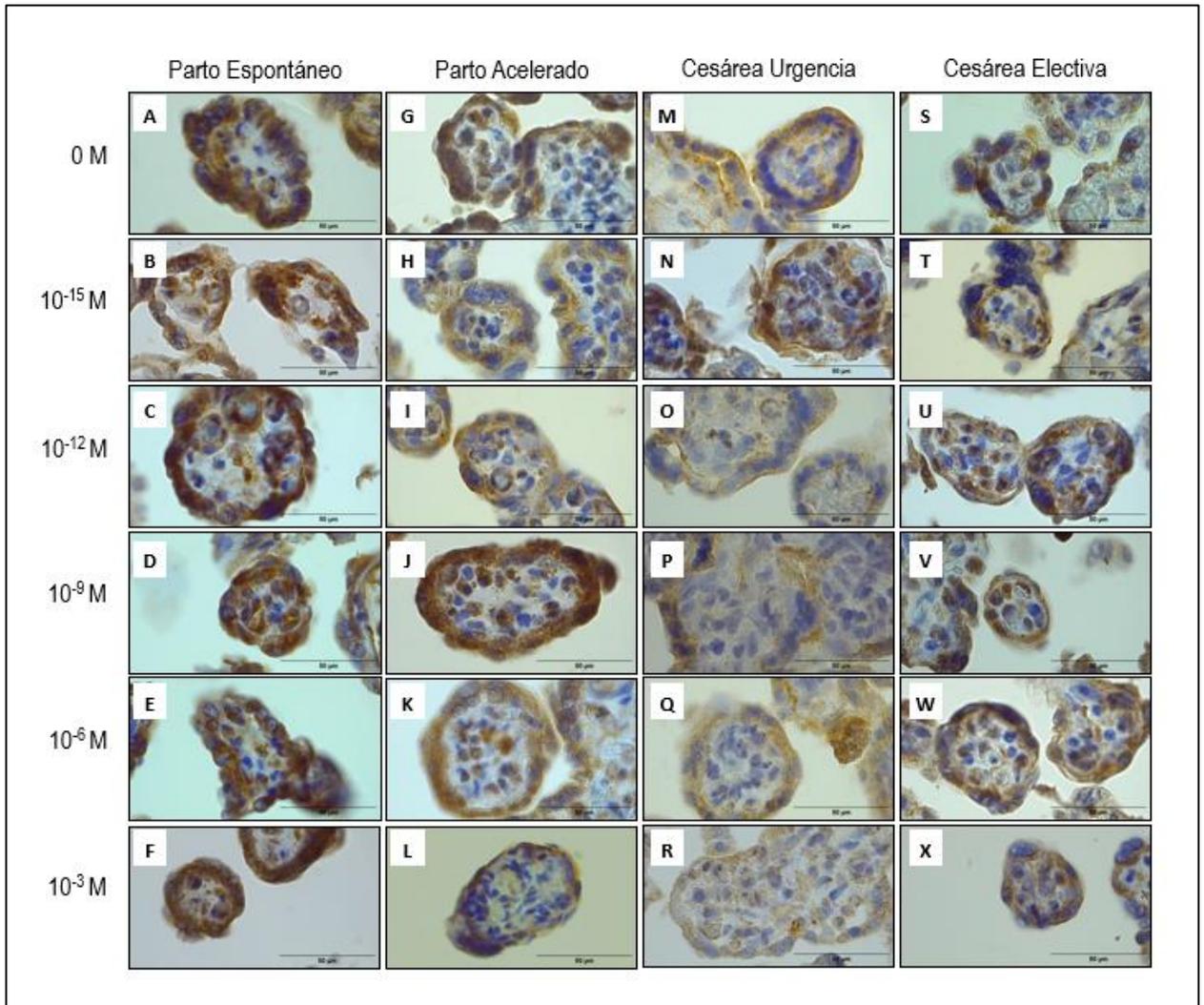


Figura 13: Efecto de Oxitocina sobre la expresión del receptor de oxitocina (OXTR) en explantes placentarios humanos provenientes de parto espontáneo, parto acelerado, cesárea urgencia y cesárea electiva. Inmunohistoquímica para receptor de oxitocina mediante incubación de anticuerpo 1:1500. En vertical, dosis crecientes de oxitocina a la cual estuvieron expuestos los explantes placentarios. En horizontal, tipos de parto. En **A-F**, grupo de parto espontáneo. En **G-L**, grupo de parto acelerado. En **M-R**, grupo de cesárea urgencia. En **S-X**, grupo de cesárea electiva. Magnificación original 100X, escale bar 50 μ m.

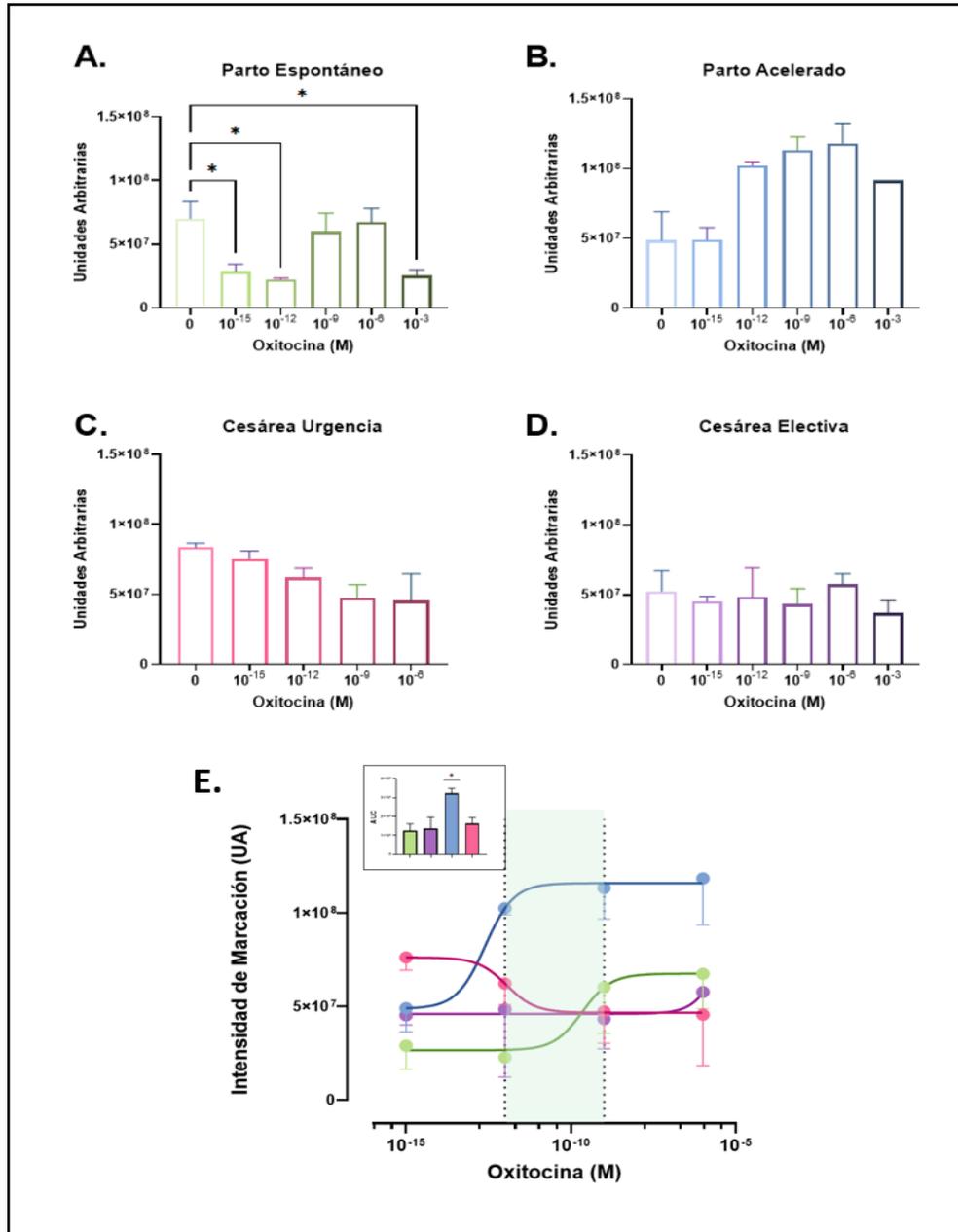


Figura 14: Efecto de oxitocina sobre la expresión del receptor de oxitocina en explantes placentarios según tipo de parto de acuerdo a la intensidad de marcación. En **A.** Intensidad de marcación del grupo de parto espontáneo. **B.** intensidad de marcación del grupo de parto acelerado. **C.** Intensidad de marcación del grupo de cesárea urgencia. **D.** Intensidad de marcación del grupo de cesárea electiva. **A-D.**

Valores corresponden a media \pm SEM., ANOVA de una vía con comparaciones múltiples, *P<0.05, n = 3-5 por grupo. **E.** Regresión no lineal de la Intensidad de marcación de acuerdo con dosis crecientes de oxitocina. Valores corresponden a media \pm SD, *p<0.05.

8.4. Efecto de Oxitocina sobre la fosforilación de eEF2.

Al evaluar la expresión proteica de manera basal por tipo de parto se observa una disminución estadísticamente significativa de la fosforilación de eEF2 en explantes placentarios provenientes de Parto Acelerado, Cesárea de Urgencia y Cesárea Electiva, con respecto al grupo de Parto Espontáneo **(Figura 15 A-B)**. Mientras que aquellos explantes placentarios provenientes de Cesárea Electiva poseen una expresión 2,5 veces mayor del factor de elongación eEF2 total, que, en las demás muestras provenientes de los diferentes tipos de parto, observando un aumento significativo solo con respecto a parto espontáneo **(Figura 15-C)**.

Al evaluar el efecto de Oxitocina sobre la fosforilación de eEF2 de manera basal por tipo de parto, se observa que en placentas provenientes de Parto Espontáneo existe un aumento de la fosforilación de eEF2 a dosis crecientes de Oxitocina **(Figura 16 A-B)**, mientras que la expresión total de la proteína presentaría una tendencia a la disminución **(Figura 16-C)**. Mientras tanto, muestras provenientes de Parto Acelerado como en las muestras provenientes de Cesáreas, no existiría capacidad de respuesta de parte del tejido tanto para la fosforilación como, para la expresión total de la proteína **(Figura 16 D-L)**.

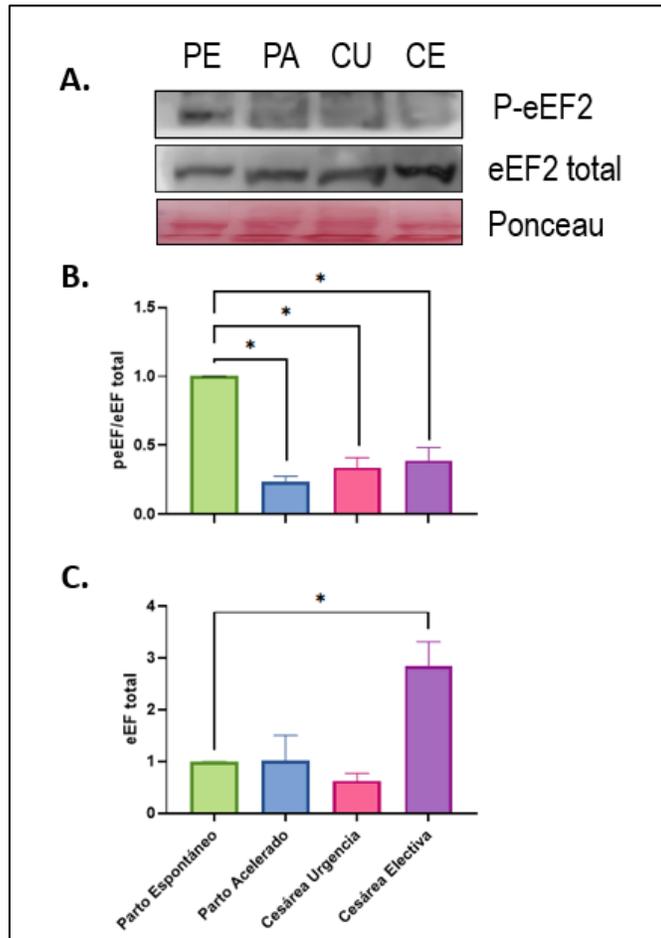


Figura 15: Efecto del tipo de parto sobre la fosforilación de eEF2 en explantes placentarios humanos provenientes de distintos tipos de parto. En **A.** Western blot para los diferentes tipos de parto. PE: Parto Espontáneo; PA: Parto Acelerado; CU: Cesárea Urgencia; CE: Cesárea Electiva. En **B.** expresión relativa de fosfo-eEF2 para los distintos tipos de parto. En **C.** Expresión total de eEF2 por tipo de parto. Valores corresponden a media \pm SEM., T-Test con corrección de Welch, * $P < 0.05$, $n = 4$ por grupo.

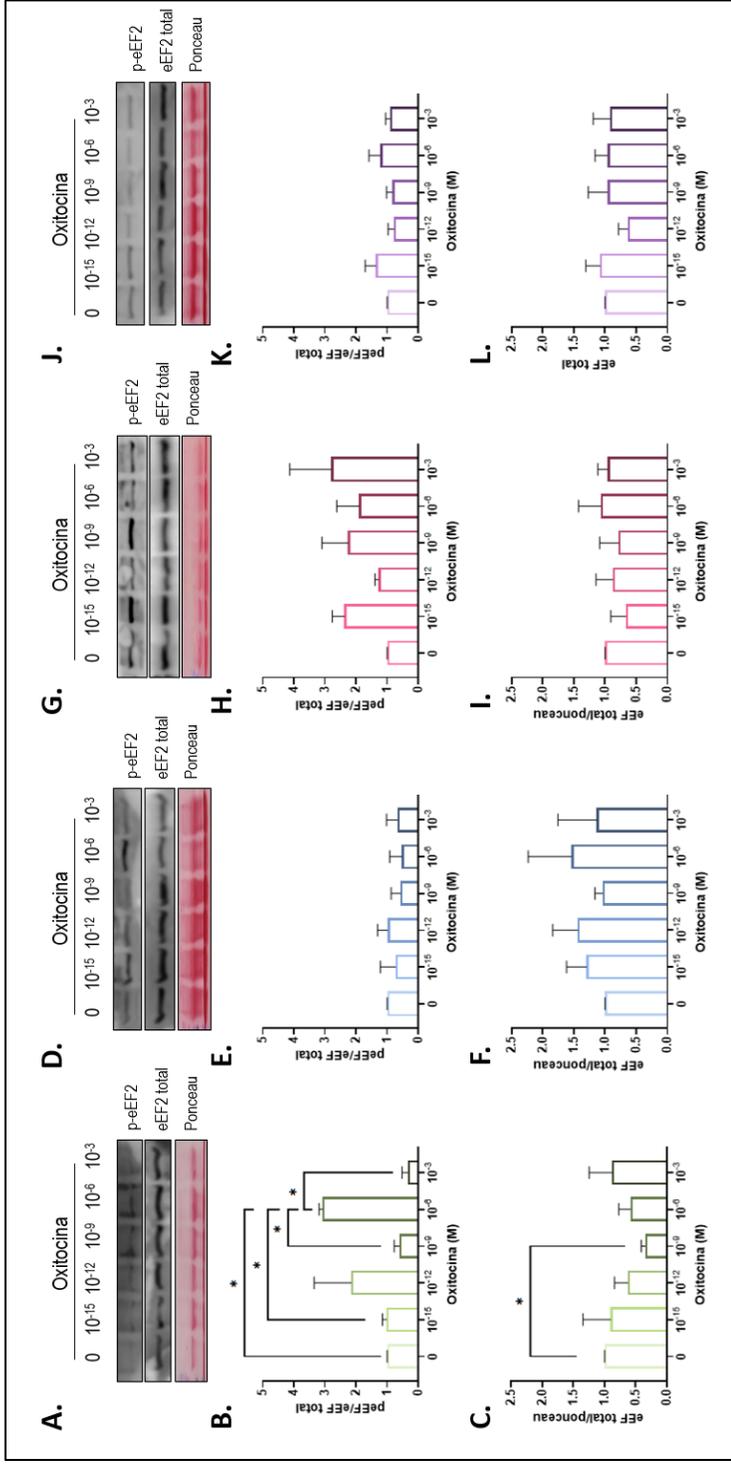


Figura 16: Efecto de Oxitocina sobre la fosforilación del factor eEF2 y expresión de eEF2 total en explantes placentarios humanos provenientes de diferentes tipos de parto. A-C. Parto Espontáneo. D-F. Parto Acelerado. G-I. Cesárea Urgencia. J-L. Cesárea Electiva. Valores corresponden a media \pm SEM., T-Test con corrección de Welch, * $p < 0.05$, $n = 3-5$ por grupo.

8.5. Efecto de L-Tiroxina sobre la expresión de genes

Una vez estandarizada la PCR para cada par de partidores (**Figura complementaria 10 y 11**), se analizó el set de muestras de explantes placentarios humanos incubados de manera basal y con dosis crecientes L-Tiroxina.

Al evaluar el efecto de L-Tiroxina sobre la expresión relativa de Endotelina-1 en explantes placentarios humanos según tipo de parto, se observa diferencias estadísticamente significativas entre el grupo basal de Parto Acelerado con respecto al grupo basal de Parto Espontáneo, en el cual se evidencia que aquellos explantes provenientes de Parto Acelerado poseen una expresión 140 veces mayor de END-1 por sobre el grupo control. Mientras que también se observa que aquellos explantes expuestos a 2pM de L-Tiroxina aumentan 17 veces la expresión de END-1 con respecto a los explantes que no estuvieron expuestos a la hormona (**Figura 17-A**).

Con respecto al efecto de L-Tiroxina sobre la expresión de Endotelina-1 para cada respectivo tipo de parto. Se observa que la hormona produce un aumento estadísticamente significativo en la expresión relativa de END-1 para el parto espontáneo, cuyo aumento es de 20 veces por sobre la expresión basal de

END-1 (**Figura 18-A**). Los explantes de pacientes que cursaron con cesárea de urgencia no expresan END-1 de manera basal, mientras que, al exponer el explante a L-Tiroxina el tejido es capaz de expresar este mensajero (**Figura 18-C**). Por otro lado, para Parto Acelerado, como para Cesárea Electiva no existe un efecto de L-Tiroxina sobre la expresión relativa de Endotelina-1 (**Figura 18-B y 18-D**).

Con respecto a la expresión relativa de HIF-1 α , no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio cuando se evalúa la expresión de HIF-1 α con respecto a las muestras provenientes de Parto Espontáneo (**Figura 17-B**). Tampoco se observa un efecto de L-Tiroxina sobre el tejido placentario para ninguno de los grupos por tipo de parto (**Figura 19**).

Adicionalmente, se analizó el efecto de L-Tiroxina sobre la expresión de END-1 y HIF-1 α en explantes placentarios según parto espontáneo en comparación con cesárea electiva, los dos grupos más contrastantes de los tipos de parto estudiados. En donde se observó que en cesárea electiva no existen cambios en la expresión mRNA al exponer a L-tiroxina al tejido, y tampoco existen cambios en la expresión de mRNA en comparación con parto espontáneo. Pero si, existen diferencias estadísticamente significativas al exponer el tejido de explante placentario con L-tiroxina aumentando la expresión de END-1, 20 veces

más que en su condición basal. **(Figura complementaria 12)**. Y, también se analizó el efecto de L-Tiroxina sobre la expresión de END-1 y HIF-1 α en vía de parto: Vía Vaginal vs Cesárea Electiva, en donde no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio **(Figura complementaria 13)**.

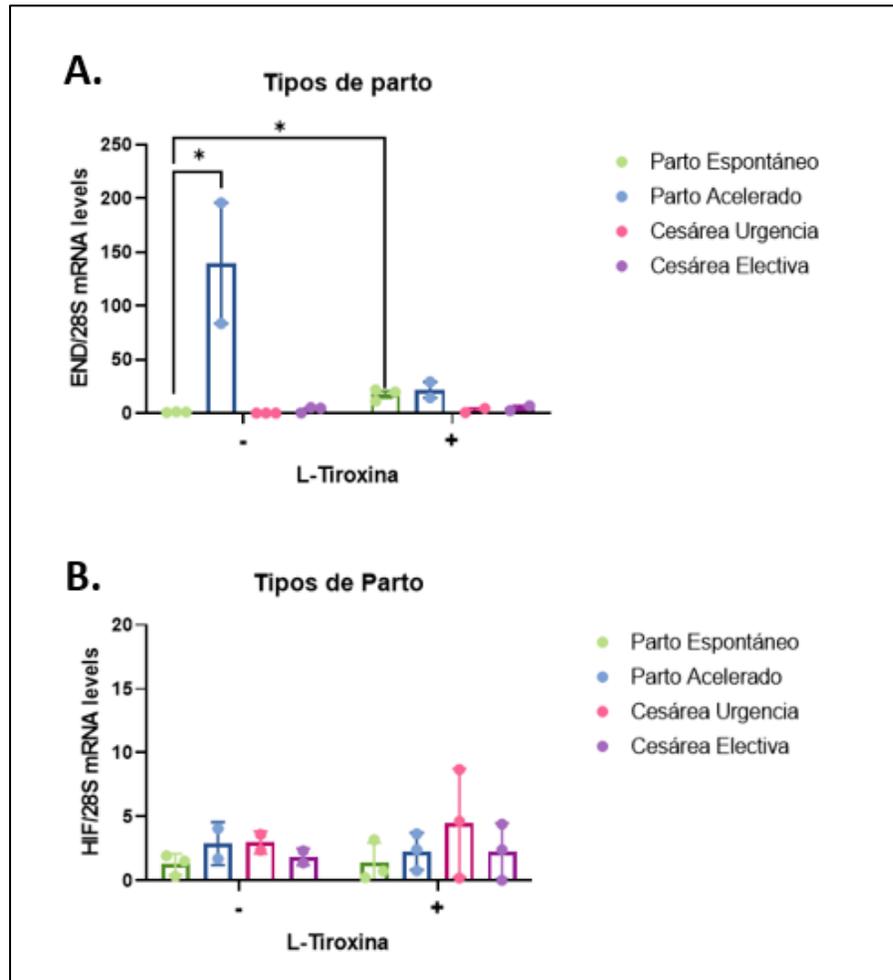


Figura 17: Efecto de L-Tiroxina sobre la expresión relativa de Endotelina en explantes placentarios humanos según tipo de parto. En **A.** Expresión relativa de Endotelina con respecto a la expresión basal del grupo de Parto Espontáneo. En **B.** Expresión relativa de HIF-1 α con respecto a la expresión basal del grupo de Parto Espontáneo. (+) = 2pM de L-Tiroxina. Valores corresponden a media \pm SEM., ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples, *P<0.05, n = 3 por grupo.

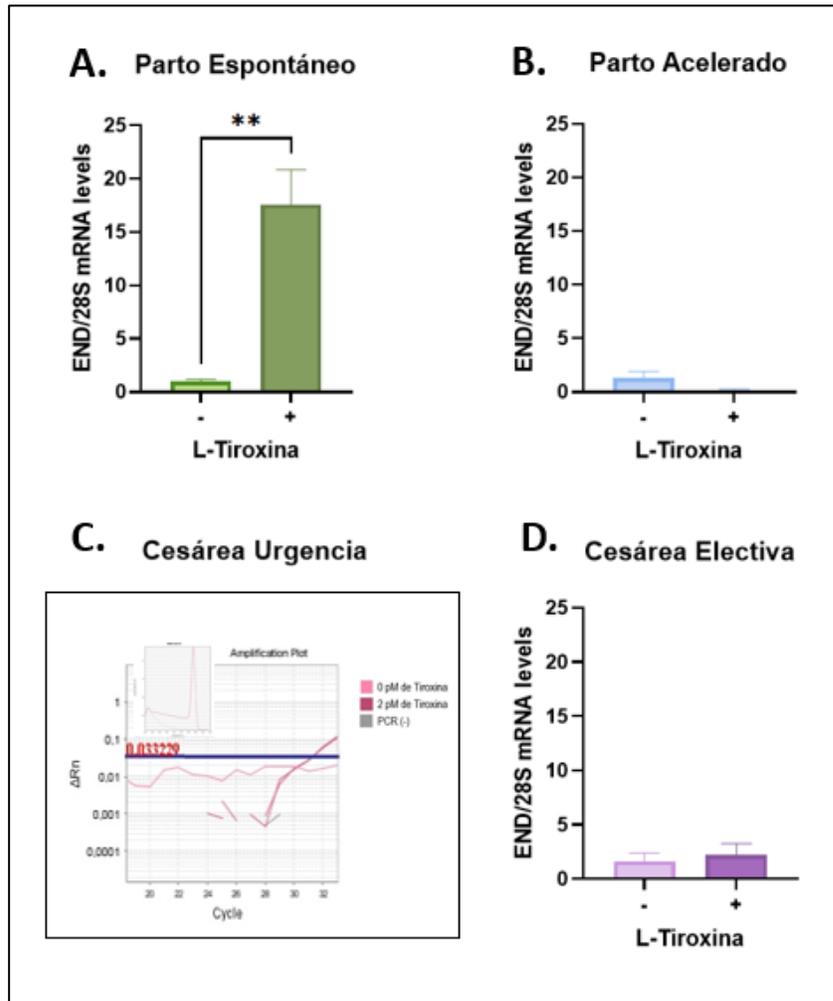


Figura 18: Efecto de L-Tiroxina sobre la expresión relativa de Endotelina - 1 en explantes placentarios humanos. En **A.** Expresión relativa de END-1 para Parto Espontáneo a 0pM y 2pM de L-Tiroxina. En **B.** Expresión relativa de END-1 para Parto Acelerado a 0pM y 2pM de L-Tiroxina. En **C.** Curva de Amplificación y Curva de Melt para END-1 de muestras representativas del grupo de Cesárea Urgencia a 0pM y 2pM de L-Tiroxina. En **D.** Expresión relativa de END-1 para Cesárea Electiva a 0pM y 2pM de L-Tiroxina. Valores corresponden a media \pm SEM., T-Test, *P<0.05, n = 3 por grupo.

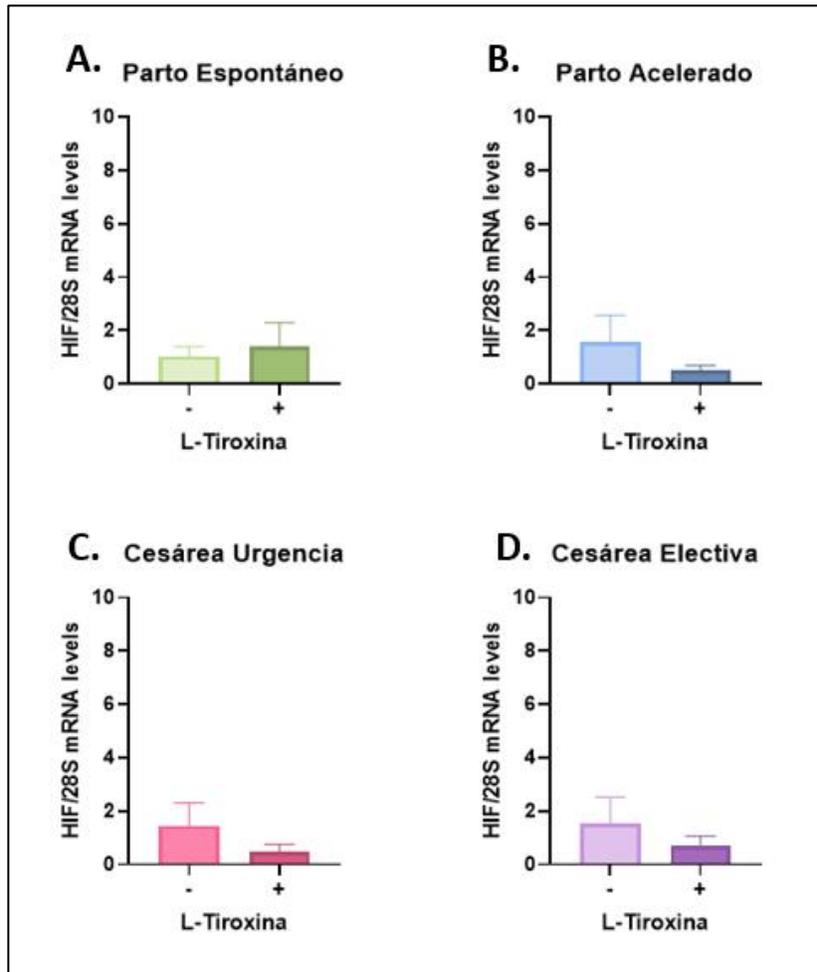


Figura 19: Efecto de L-Tiroxina sobre la expresión relativa de HIF-1 α en explantes placentarios humanos. Se presenta la expresión relativa de HIF-1 α de manera basal y al exponer el tejido a 2pM de L-Tiroxina, para **A.** Parto espontáneo, **B.** Parto Acelerado. **C.** Cesárea Urgencia. **D.** Cesárea Electiva. Valores corresponden a media \pm SEM., T-Test, *P<0.05, n = 3 por grupo.

9. DISCUSIÓN

Los sistemas oxitocinérgico y tiroideo, están modificados en placentas dependiendo del tipo de parto. Fue posible observar que los niveles hormonales de oxitocina son capaces de modular la expresión de receptor de oxitocina y su efector eEF2 en explantes placentarios humanos provenientes de parto espontáneos. Mientras que, por otro lado, la exposición frente a L-tiroxina también modula la expresión del mensajero de END-1 en este tipo de tejido.

9.1. Sistema oxitocinérgico:

Para caracterizar el sistema oxitocinérgico en explantes placentarios humanos según el tipo de parto, se evaluó: la expresión del receptor de oxitocina (OXTR) y, como efector al factor de elongación eucariota 2 (eEF2) [45-48].

Al evaluar la expresión del receptor de oxitocina por medio de inmunohistoquímica, se observó que su expresión se encuentra tanto en membrana plasmática como en el citoplasma de las células de sincitiotrofoblasto, coincidente con los resultados presentes en literatura [49]. En bibliografía se ha señalado que una continua exposición de oxitocina produce la desensibilización e internalización del receptor de oxitocina a dosis de entre 10 a 100 nM incubadas

entre 10 minutos a 12 horas en cultivos de línea celular de miometrio humano [78-81], como también en tejido uterino o de glándula mamaria de ratón [79, 82, 83]. Mientras que frente a largas exposiciones del OXTR a oxitocina, en concentraciones de 1000 nM durante 24 a 48 horas, no cambia la expresión proteica del receptor, pero si disminuye la capacidad de unión ligando-receptor y la expresión del mRNA de OXTR en cultivo primario de miometrio humano [84, 85]. Los resultados de esta investigación serían coincidentes con literatura, ya que, los explantes provenientes de partos espontáneos, que cursaron con oxitocina endógena secretada de manera pulsátil en rangos de concentraciones fisiológicas (1 - 10 nM) [25], serían sensibles a oxitocina disminuyendo su expresión conforme aumenta la concentración de oxitocina, pero esto se detendría al superar notoriamente la EC_{50} de OXTR (~2 nM) [86], rango para el cual la expresión de OXTR se mantiene elevada en el explante placentario humano.

Los explantes provenientes de parto acelerado serían capaces de presentar un efecto sobre OXTR ante la exposición de oxitocina, sin embargo, esto ocurriría a dosis más bajas de la hormona que en los explantes provenientes de parto espontáneo. Probablemente, esto ocurra debido a que los tejidos provenientes de parto acelerado estuvieron expuestos a altas concentraciones de oxitocina durante el trabajo de parto, ya que cursaron con la secreción de oxitocina

endógena materna y, además de ello, se le administró oxitocina exógena. Por lo que estuvieron expuestos a una larga exposición oxitocina, a concentraciones suprafisiológicas [87], lo cual se relacionaría con el proceso de desensibilización del receptor OXTR mencionado en bibliografía [84, 85].

Mientras tanto, en cuanto a los explantes placentarios provenientes de cesáreas, se observa una tendencia a la disminución de la intensidad de marcación de OXTR, lo cual sugiere que el tejido sería sensible a los cambios de concentración de oxitocina, y que de este modo cursarían con un proceso de internalización del receptor de oxitocina. Ahora bien, se debe distinguir que los tejidos provenientes de cesárea urgencia cursaron con oxitocina endógena y, además, con oxitocina exógena, pero aun así no se logró un trabajo de parto eficiente. Probablemente esto estaría relacionado con la baja capacidad del tejido uterino de realizar contracción muscular debido a modulación de la respuesta de OXTR en miometrio humano.

Se describe en literatura que existen diversos factores que determinan la respuesta de OXTR. Entre ellos se describe 1.- el número de OXTR presente en la membrana, 2.- la capacidad de unión ligando-receptor y 3.- el estado de conformación de OXTR [88]. El primer punto estaría relacionado con la internalización del receptor, proceso que ocurriría por sobre 100 nM de oxitocina

en línea celular de miometrio humano [81] y que estaría modulado por proteínas como la GRK (principalmente GRK5 y GRK6), kinasa que fosforila al receptor OXTR en la región del carboxilo terminal y en sus loops intracelulares. Lo cual produce el reclutamiento de β -arrestina-2, una proteína que impide estéricamente el acoplamiento del GPCR para inhibir su señalización. Posterior a ello, se produce la internalización de OXTR mediada por clatrina a través de la maquinaria endocítica. Para finalmente, llevar a degradación por vía lisosomal, o volver a ser presentado en membrana vía reciclamiento (*recycling*) de OXTR [84, 85, 88-92].

El segundo punto, menciona la capacidad de unión ligando-receptor, el cual puede ser modificado por presencia de cationes o por colesterol [88].

Mientras que el tercer aspecto menciona la conformación de OXTR, la cual puede ser modificada por la formación de dímeros, los cuales hasta el día de hoy se desconocen cuales pudieran ser su función biológica, pero que se han propuesto como medidas terapéuticas para tratamiento de esquizofrenia o trastorno del espectro autista, ya que estos permitirían generar respuestas altamente eficaces modulando la capacidad de interacción social de este grupo de personas [88, 93]. Mientras que los cambios de conformación de OXTR modulado por colesterol, serían realizados mediante: la unión de colesterol a

OXTR, o por la formación de microdominios de membrana, como es el caso de las balsas lipídicas [85, 88, 92, 94-97].

Esta investigación estuvo enfocada en el primer aspecto, relacionado a la expresión del receptor de oxitocina. Sin embargo, cualquiera de los tres mecanismos sería capaz de modular la respuesta de OXTR, por lo que podrían estar implicados en las diferentes resultados obtenidas en esta investigación, y sería un importante enfoque que se puede abarcar en futuras investigaciones.

En cuanto a la evaluación del efector de oxitocina, utilizando la desfosforilación de eEF2 como representante de la activación de la vía. Se observa que en explantes provenientes de parto espontáneo la vía de señalización se encuentra inactivada, por lo que no ocurriría la síntesis de proteínas, a diferencia de las muestras provenientes de otros tipos de parto. Los cuales mantienen una mayor desfosforilación y, por ende, una vía de señalización activada para la síntesis de proteínas. Se conoce que, en miometrio humano, la activación de la vía de señalización depende de OXTR y esta permitiría el incremento de calcio intracelular, de manera directamente proporcional al incremento de oxitocina hasta el rango de concentración de 1 nM [78]. Ya que, una vez superada esta concentración, se activaría eEF2K, kinasa dependiente de calcio/calmodulina, que cataliza la transferencia de γ -fosfato desde GTP a

Thr56 de eEF2. Lo cual produciría la fosforilación e inactivación de eEF2, debido a la disminución de la afinidad de eEF2 en el ribosoma [45, 98]. Se ha descrito que, a su vez, la eEF2K estaría modulada por factores como: estrés, disminución de nutrientes, condiciones de hipoxia, bajos niveles energéticos y acidosis. Los cuales producirían la activación de eEF2K para la inactivación de eEF2, y con ello disminuir la síntesis de proteínas, evitando el gasto innecesario de recursos energéticos [45, 98, 99].

Los resultados sobre la expresión de eEF2 se podrían interpretar de la siguiente manera: durante parto espontáneo el tejido placentario presentaría la inactivación del efector del sistema oxitocinérgico, ya sea por activación de la eEF2K para reservar energía, como resultado de un extenuante trabajo de parto provisto exclusivamente por la capacidad innata de la madre [23], o por ausencia de la activación de OXTR, ya que la desfosforilación de eEF2 es dependiente de OXT-OXTR [45]. Mientras que, en parto acelerado y cesárea urgencia, si bien se inició un trabajo de parto, este trabajo de parto fue facilitado de manera externa y por ello, aun se presentan reservorios energéticos que permiten mantener la vía de señalización activada para la síntesis proteica. Y, de forma similar ocurriría en cesárea electiva, en la cual nunca se cursó con trabajo de parto y, por ende, no existiría ningún impedimento en la activación de la vía de señalización. Incluso, en cesárea electiva se observa que existe una mayor expresión de eEF2

total, la cual se encontraría completamente desfosforilada. Además, esta activación de eEF2 estaría relacionada a la activación de OXTR mencionada anteriormente.

Los mecanismos propuestos anteriormente se presentan en la **figura 20**, la cual resume de manera general las vías de señalización oxitocinérgicas propuestas para tejido placentario humano.

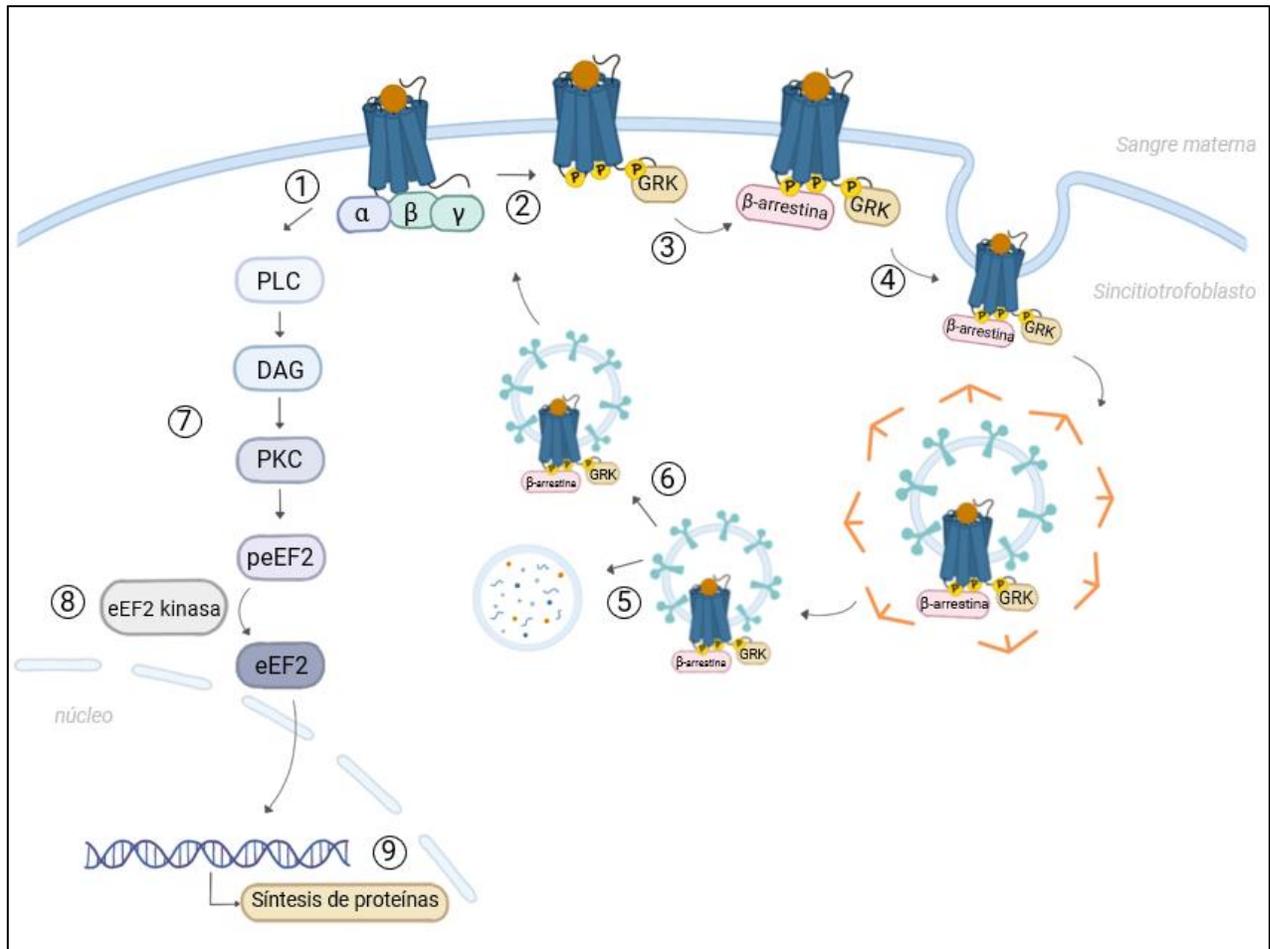


Figura 20: Vías de señalización propuestas para sistema oxitocinérgico vía OXTR en placenta humana. (1) Activación del receptor OXTR por unión a ligando vía proteína G. (2) Reclutamiento de GRK y fosforilación del receptor OXTR. (3) Reclutamiento de β-arrestina. (4) Internalización de OXTR mediada por clatrina mediante maquinaria endocítica. (5) Degradación de OXTR vía lisosomal. (6) Recycling del receptor. (7) Señalización de OXTR vía PLC/DAG/PKC. (8) Activación de eEF2 kinasa para desfosforilación de eEF2. (9) Síntesis de proteínas. Elaboración propia.

9.2. Sistema tiroideo:

Al respecto de la evaluación de la expresión del receptor de hormonas tiroideas $\alpha\text{v}/\beta\text{3}$ por medio de inmunohistoquímica y western blot, no se obtuvo resultado alguno. Para esta determinación, primero se realizó el proceso de estandarización, utilizando muestras de tejido $\alpha\text{v}/\beta\text{3}$ positivos según literatura, tales como: placenta, endometrio, cáncer urotelial y osteosarcoma [63, 67, 100]. Se realizaron diversas incubaciones con diferentes títulos de anticuerpo y diferentes periodos de tiempo, y también, diferentes protocolos de recuperación antigénica para IHC. Sin embargo, no se logró la marcación en ninguno de los tejidos utilizados, por lo que no se logró obtener un control positivo para la determinación. De este modo, para caracterizar el sistema tiroideo en explantes placentarios humanos según el tipo de parto, evaluamos el efecto de L-tiroxina en la expresión de mRNA para Endotelina-1 y HIF-1 α , según tipo de parto.

Al evaluar la expresión de mRNA de Endotelina-1 y HIF-1 α , se evalúa de forma indirecta la señalización de hormonas tiroideas mediante su efecto genómico (TR α /TR β) y no genómico ($\alpha\text{v}/\beta\text{3}$), respectivamente [63-65].

Al respecto de la expresión de Endotelina-1 en parto espontáneo, se obtuvo un aumento de 20 veces de la expresión de mRNA al exponer el tejido frente a

2pM de L-tiroxina. Mientras que en cesárea de urgencia se obtuvo que en ausencia de T4 el tejido no expresa mRNA de END-1, sin embargo, al exponer el tejido a 2pM este si lo expresa. Estos resultados son consistentes con la información presente en literatura. Por ejemplo, la revisión de Guzmán-Gutiérrez y colaboradores, señala que en condiciones elevadas de T3 existe un aumento de la expresión de Endotelina-1, favoreciendo así la vasoconstricción en tejido excitable (Células endoteliales de vena de cordón umbilical humano o HUVEC). Evidenciando que las hormonas tiroideas son capaces de modular la respuesta vascular mediante la inducción de síntesis de vasoconstrictores y vasodilatadores [58]. Al ser esta la primera investigación que evalúa la señalización del sistema tiroideo en placenta humana, los resultados obtenidos sobre la expresión de END-1 en tejido placentario podría ser utilizados como indicador del posible efecto que las hormonas tiroideas tienen sobre la vasculatura placentaria.

Por otro lado, en la publicación de Contreras-García y colaboradores en 2023, señala que en muestras de sangre de tejido umbilical proveniente de mujeres embarazadas a las cuales se sometieron a cesáreas electivas, cursaron con niveles de T3 y T4 más bajos que las pacientes que cursaron con los demás tipos de partos, siendo el Parto Espontáneo aquel grupo que presenta los niveles más elevados de hormonas tiroideas [87]. Del mismo modo la revisión de Ramezani y colaboradores, señalan que aquellas mujeres que cursaron con

partos de tipo vaginal presentan niveles más elevados de TSH en cordón umbilical en comparación a cesárea electiva [101]. Esto estaría relacionado con los resultados obtenidos en esta investigación, donde se obtuvo que los explantes provenientes de partos de tipo vaginal expresan mayor mRNA de END-1 que las cesáreas de manera basal. Esta relación se basaría en que aquellos tejidos provenientes de partos en los cuales se cursa con mayores niveles de hormonas tiroideas presentan mayor activación del sistema tiroideo y, por lo tanto, una mayor expresión de mensajero.

Además, se debe destacar la importante diferencia en la expresión de mRNA de END-1 en explantes provenientes de parto acelerado, el cual expresa 120 veces más el mRNA de END-1 que en el parto espontáneo. La endotelina-1 al ser un importante vasoconstrictor, es capaz de regular la contracción muscular en tejidos como, el miometrio. Endotelina-1, al igual que oxitocina, es capaz de incrementar el calcio intracelular por vía GPCR-Gq-PLC-IP3 según lo descrito en tejido excitable [102]. La relación entre endotelina-1 y oxitocina, es desconocida hasta la fecha y los científicos no han logrado dilucidar si estos facilitadores de la contracción muscular actúan de manera conjunta; o si bien, ambos actúan de forma completamente independiente inactivando una u otra vía de señalización [103, 104]. Por lo que este novedoso hallazgo pudiera ser una nueva evidencia que aporte en dilucidar esta incógnita. Del mismo modo, se deberá seguir

indagando sobre las posibles razones por las cuales el tejido placentario proveniente de parto acelerado presenta una mayor expresión de mRNA de END-1 y cuáles serían las implicancias de esta sobreexpresión.

En cuanto al efecto no genómico de hormonas tiroideas, no se obtuvo diferencia alguna de la expresión de mRNA de HIF-1 α entre los diferentes tipos de parto de manera basal, ni tampoco diferencias al exponer los tejidos frente a L-tiroxina. Resultados contrastantes con bibliografía, los cuales señalan que las hormonas tiroideas activan la vía de señalización, aumentando la expresión del mensajero. La publicación de Lin y colaboradores señala que incubaciones entre 10^{-9} y 10^{-7} M de T3 durante 24 horas induce la expresión de HIF-1 α , mediante la vía no genómica de hormonas tiroideas. [91] Mientras que la incubación con 10^{-7} M de T4 durante 24 horas también induce la expresión de genes por la vía no genómica, tanto de HIF-1 α , como de TR β 1. [63]

La preferencia entre la activación de la vía genómica frente a la vía no genómica permanecerá incierta, y habrá que realizar nuevas determinaciones para evaluar los intermediarios presentes en la ruta de señalización, para determinar de manera concreta si existe una preferencia entre las vías de señalización dependiendo del tipo de parto, de acuerdo a las referencias antes mencionadas.

Los mecanismos propuestos anteriormente se presentan en la **figura 21**, la cual resume de manera general las vías de señalización tiroideas propuestas para tejido placentario humano.

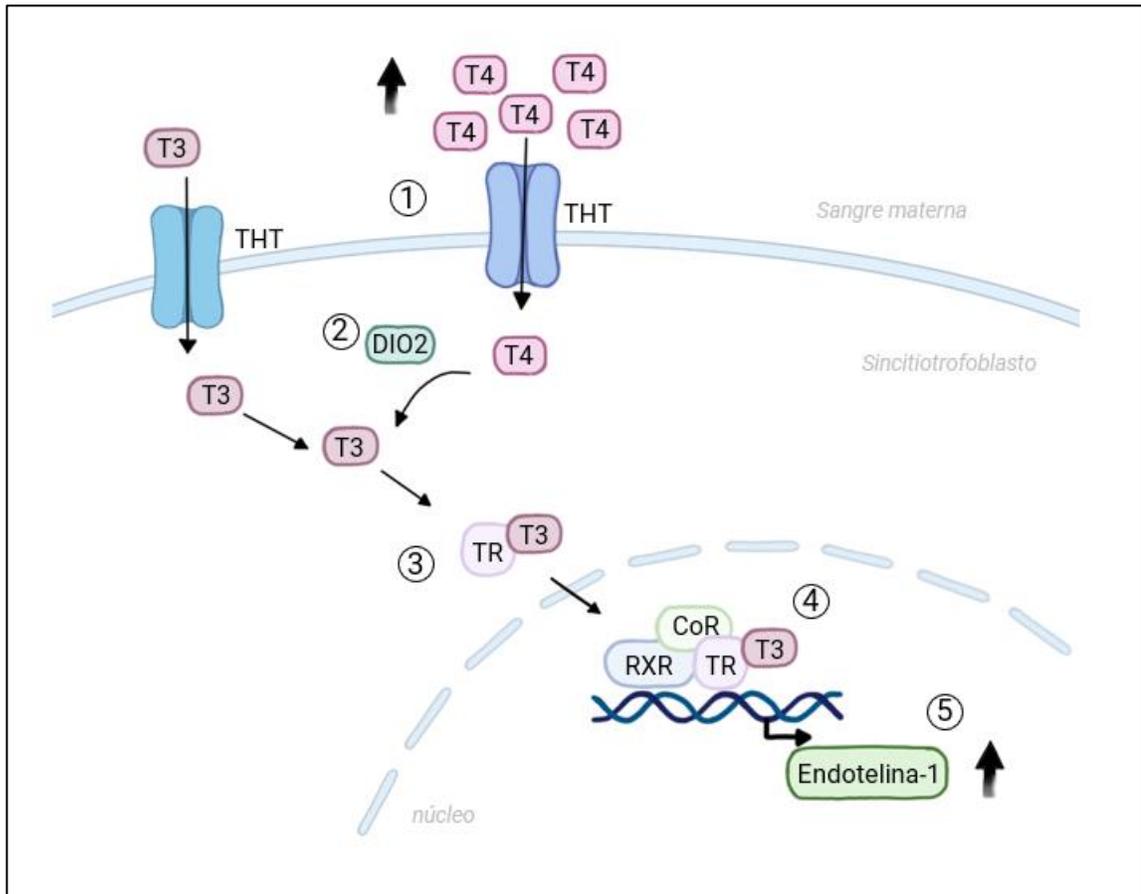


Figura 21: Vías de señalización propuestas para sistema tiroideo en placenta humana. (1) Transporte de hormonas tiroideas a citosol. (2) conversión de T4 en T3 por parte de Deiodinasa 2. (3) Unión de T3 a su receptor. (4) activación de maquinaria transcripcional. (5) Transcripción de Endotelina-1. Elaboración propia.

9.3. Fortalezas y debilidades:

Esta investigación, es la primera que evalúa el sistema oxitocinérgico y tiroideo en placentas humanas, diferenciando entre tipos de parto y el efecto frente a la exposición de oxitocina y tiroxina, respectivamente. Siendo estos resultados un nuevo aporte en el entendimiento de los mecanismos de señalización presentes en placenta humana. Comprobando que efectivamente existe una capacidad de respuesta diferenciada del tejido, según tipo de parto. Por lo que esta investigación reforzaría la importancia de mantener un parto fisiológico.

Esta tesis no estuvo exenta a dificultades como, por ejemplo, la imposibilidad de evaluar el receptor α/β_3 . La cual al no ser evaluada deja en la incertidumbre sobre si existen o no, cambios en la expresión del receptor de hormonas tiroideas en los diferentes tipos de parto y, como estos responden frente a dosis crecientes de L-tiroxina.

Además, la falta de evaluación de intermediarios en la señalización como: PLC, PKC, PI3K y ERK1/2; la falta de evaluación de receptores nucleares de hormonas tiroideas, como: TR β 1 y TR α ; o incluso la falta de evaluación de otros factores que determinan la respuesta de OXTR, como la capacidad de unión

ligando-receptor y el estado de conformación de OXTR. Son algunas de las debilidades que presenta esta tesis y, al mismo tiempo, son los principales puntos para considerar en las futuras proyecciones de esta investigación.

10. CONCLUSIÓN

Esta investigación nos permite concluir que los tipos de parto presentan diferencias en la expresión del receptor y señalización del sistema oxitocinérgico y tiroideo en placentas humanas. Esta diferencia se observa de manera basal y también, en respuesta a la exposición de oxitocina y L-tiroxina.

Además, se demostró que el tejido proveniente de parto espontáneo sería capaz de responder biológicamente a oxitocina. Mientras que, en cesárea electiva, en donde, no existe inicio de trabajo de parto, el tejido perdería esta capacidad. Del mismo modo, el tejido proveniente de partos vaginales sería capaz de activar la vía de señalización de hormonas tiroideas, en contraste con tejidos provenientes de cesáreas.

Esto evidencia una vez más que el trabajo de parto no es únicamente un evento mecánico, sino que un evento neuroendocrino. De este modo, el interrumpir los procesos fisiológicos humanos en casos en donde la intervención quirúrgica no es estrictamente necesaria se estaría provocando alteraciones a nivel placentarios que podrían llegar a afectar al recién nacido.

Por esta razón, es fundamental continuar indagando cómo afecta la realización de intervenciones del embarazo al desarrollo fisiológico del parto. Y, además, concientizar a la población y al personal de salud en la importancia de respetar los procesos biológicos.

Queda como proyección evaluar los diferentes intermediarios de las respectivas vías de señalización del sistema oxitocinérgico y tiroideo en placentas humanas.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Baczyk, D., J.C. Kingdom, and P. Uhlén, *Calcium signaling in placenta*. Cell Calcium, 2011. **49**(5): p. 350-6.
2. Regnault, T.R., B. de Vrijer, and F.C. Battaglia, *Transport and metabolism of amino acids in placenta*. Endocrine, 2002. **19**(1): p. 23-41.
3. Costa, M.A., *The endocrine function of human placenta: an overview*. Reprod Biomed Online, 2016. **32**(1): p. 14-43.
4. Burton, G.J. and E. Jauniaux, *What is the placenta?* Am J Obstet Gynecol, 2015. **213**(4 Suppl): p. S6.e1, S6-8.
5. Palmeira, P., et al., *IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 985646.
6. Tong, M. and V.M. Abrahams, *Immunology of the Placenta*. Obstet Gynecol Clin North Am, 2020. **47**(1): p. 49-63.
7. Ander, S.E., M.S. Diamond, and C.B. Coyne, *Immune responses at the maternal-fetal interface*. Sci Immunol, 2019. **4**(31).
8. Moffett, A. and C. Loke, *Immunology of placentation in eutherian mammals*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(8): p. 584-94.
9. Jennewein, M.F., et al., *Fc Glycan-Mediated Regulation of Placental Antibody Transfer*. Cell, 2019. **178**(1): p. 202-215.e14.
10. Stulc, J., *Placental transfer of inorganic ions and water*. Physiol Rev, 1997. **77**(3): p. 805-36.
11. Sibley, C.P., et al., *Regulation of placental transfer: the Na(+)/H(+) exchanger--a review*. Placenta, 2002. **23 Suppl A**: p. S39-46.
12. Gao, X., et al., *The hematopoietic stem cell niche: from embryo to adult*. Development, 2018. **145**(2).
13. Turco, M.Y. and A. Moffett, *Development of the human placenta*. Development, 2019. **146**(22).
14. Schlafke, S. and A.C. Enders, *Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation*. Biol Reprod, 1975. **12**(1): p. 41-65.
15. Maltepe, E. and S.J. Fisher, *Placenta: the forgotten organ*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2015. **31**: p. 523-52.
16. Winterhager, E. and A. Gellhaus, *Transplacental Nutrient Transport Mechanisms of Intrauterine Growth Restriction in Rodent Models and Humans*. Front Physiol, 2017. **8**: p. 951.
17. Duttaroy, A.K., *Transport of fatty acids across the human placenta: a review*. Prog Lipid Res, 2009. **48**(1): p. 52-61.
18. Mei, C., et al., *The Unique Microbiome and Innate Immunity During Pregnancy*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 2886.
19. Gude, N.M., et al., *Growth and function of the normal human placenta*. Thromb Res, 2004. **114**(5-6): p. 397-407.

20. Aye. I, A.C., Charnock-Jones. S, Smith. G,, *Placental energy metabolism in health and disease-significance of development and implications for preeclamsia*. AMERICAN journal of obstetrics and gynecology, 2022. **226**(2): p. S928 - S944.
21. Bowman, C.E., Z. Arany, and M.J. Wolfgang, *Regulation of maternal-fetal metabolic communication*. Cell Mol Life Sci, 2021. **78**(4): p. 1455-1486.
22. in REAL ACADEMIA ESPAÑOLA: *Diccionario de la lengua española* 2022.
23. *Supporting Healthy and Normal Physiologic Childbirth: A Consensus Statement by ACNM, MANA, and NACPM*. J Perinat Educ, 2013. **22**(1): p. 14-8.
24. Minsal, M.d.S.G.d.C., *Guía Perinatal*. 2015.
25. Uvnäs-Moberg, K., et al., *Maternal plasma levels of oxytocin during physiological childbirth - a systematic review with implications for uterine contractions and central actions of oxytocin*. BMC Pregnancy Childbirth, 2019. **19**(1): p. 285.
26. Sung S, M.H. *Cesarean Section*. [Updated 2022 Apr 21].
27. Uvnäs-Moberg. K, E.-B., Berg. M, Buckley. S; Pajalic. S; Hadjigeorgiou. E; Kotłowska. A; Lengler. L, Bogumila; Kielbratowska, Leon-Larios. F; Meier Magistretti. C, Downe. S; Lindström. B; Dencker. A, *Maternal plasma levels of oxytocin during physiological childbirth – a systematic review with implications for uterine contractions and central actions*. BMC Pregnancy and Childbirth, 2019. **19:285**.
28. Uvnäs-Moberg. K, G.M., Agius. A, Downe. S, Calleja-Agius. J, *Are There Epigenetic Oxytocin-Mediated Effects on the Mother and Infant during Physiological Childbirth?* Int J Mol Sci, 2020. **21**(24).
29. Bethlehem. R, V.H.J., Auyeung. B, Baron-Cohen. S., *Oxytocin, brain physiology, and functional connectivity: A review of intranasal oxytocin fMRI studies*. Psychoneuroendocrinology 2013. **38**: p. 962-974.
30. Uvnäs-Moberg, K., et al., *Are There Epigenetic Oxytocin-Mediated Effects on the Mother and Infant during Physiological Childbirth?* Int J Mol Sci, 2020. **21**(24).
31. Sladek. C, S.Z., *Diverse Roles of G-Protein Coupled Receptors in the Regulation of Neurohypophyseal Hormone Secretion*. Journal of Neuroendocrinology 2012. **24**: p. 554–565.
32. Gutkowska. J, J.M., *Oxytocin Revisited: Its Role in Cardiovascular Regulation*. journal of Neuroendocrinology, 2012.
33. Kajuluri. L, L.Y., Morgan. K, *The uterine myocyte, contractile machinery and proteins of the myometrium and their relationship to the dynamic nature of myometrial function*. Current Opinion in Physiology, 2020. **13: 14–19**.
34. Yu-Feng. W, G.H., *Mechanisms Underlying Oxytocin-Induced Excitation of Supraoptic Neurons: Prostaglandin Mediation of Actin Polymerization*. J Neurophysiol 2006. **95: 3933–3947**.

35. Yu-Feng. W, G.H., *Dominant Role of by Subunits of G-Proteins in Oxytocin-Evoked Burst Firing*. The Journal of Neuroscience, 2007. **27(8)1902-1912**.
36. Morishima. M, T.S., Wang. Y, Ono. K, *Oxytocin Downregulates the CaV1.2 L-Type Ca²⁺ Channel via Gi/cAMP/PKA/CREB Signaling Pathway in Cardiomyocytes*. Membranes, 2021. **11, 234**.
37. McKay, E.C. and S.E. Counts, *Oxytocin Receptor Signaling in Vascular Function and Stroke*. Front Neurosci, 2020. **14**: p. 574499.
38. Arrowsmith. S, W.S., *Oxytocin: its mechanism of action and receptor signalling in the myometrium* J Neuroendocrinol., 2014. **26 (6):356-69**.
39. Chibbar. R, W.S., Miller. F, Mitchell. B *Estrogen stimulates oxytocin gene expression in human chorio-decidua* Clinical Endocrinology & Metabolism, 1995. **80(2,1)**: p. 567-572.
40. Jurek. B, N.I., *THE OXYTOCIN RECEPTOR: FROM INTRACELLULAR SIGNALING TO BEHAVIOR*. Physiol Rev 2018. **98: 1805–1908**.
41. Miller. R, G.O., Turner, M, Aplin. J, Caniggia. I, Huppertz. B, *Human placental explants in culture: approaches and assessments*. Placenta, 2005. **26(6)**: p. 439-48.
42. Terzidou. V, B.A., Kim. S, Thornton. S, Bennett. P, *Labor and Inflammation Increase the Expression of Oxytocin Receptor in Human Amnion*. BIOLOGY OF REPRODUCTION, 2011. **84, 546–552**.
43. Kimura. T, T.T., Nomura. S, Nobunaga. T, Kubota. Y, Inoue. T, Hashimoto. T, Kumazawa. I, Ito. Y, Ohashi. I, Koyama. M, Azuma. C, Kitamura. Y, Saji. F *Expression of Oxytocin Receptor in Human Pregnant Myometrium*. Endocrinology, 1996. **137: 780-785**.
44. Miller. F, C.R., Mitchell. B, *Synthesis of oxytocin in amnion, chorion and decidua: a potential paracrine role for oxytocin in the onset of human parturition*. Regulatory Peptides, 1993. **45** p. 247-251.
45. Devost. D, C.M., Zingg. H, *Oxytocin-Induced Activation of Eukaryotic Elongation Factor 2 in Myometrial Cells Is Mediated by Protein Kinase C*. Endocrinology and metabolism, 2008. **149(1):131–138**.
46. Devost, D., et al., *Oxytocin induces dephosphorylation of eukaryotic elongation factor 2 in human myometrial cells*. Endocrinology, 2005. **146(5)**: p. 2265-70.
47. Devost, D., P. Wrzal, and H.H. Zingg, *Oxytocin receptor signalling*. Prog Brain Res, 2008. **170**: p. 167-76.
48. Jurek, B. and I.D. Neumann, *The Oxytocin Receptor: From Intracellular Signaling to Behavior*. Physiol Rev, 2018. **98(3)**: p. 1805-1908.
49. Kim. S, L.J., Kang. S, Yang. H, Kim. S, An. B., *The regulation of oxytocin and oxytocin receptor in human placenta according to gestational age* Journal of Molecular Endocrinology, 2017. **59**: p. 235–243.
50. Marchini. G, L.H., Winberg. J, Uvnas-Moberg. K, *Fetal and maternal plasma levels of gastrin, somatostatin and oxytocin after vaginal*

- delivery and elective cesarean section* Early Human Development, 1988. **18**: p. 73-79.
51. Kuwabara. Y, T.S., Mizuno. M, Sakamoto. S *Oxytocin Levels in Maternal and Fetal Plasma, Amniotic Fluid, and Neonatal Plasma and Urine.* Gynecology and Obstetrics, 1987. **241**: **13-23**.
 52. Pérez-López, F.R., *Iodine and thyroid hormones during pregnancy and postpartum.* Gynecol Endocrinol, 2007. **23**(7): p. 414-28.
 53. Patel. J, L.K., Li. H, Mortimer. R, Richard. K, *Delivery of maternal thyroid hormones to the fetus.* Endocrinology and metabolism, 2011. **27**.
 54. Loubiere, L.S., et al., *Expression of thyroid hormone transporters in the human placenta and changes associated with intrauterine growth restriction.* Placenta, 2010. **31**(4): p. 295-304.
 55. Rodríguez-Cortéz. Y, M.-Z.H., *La placenta como órgano endocrino compartido y su acción en el embarazo normoevolutivo.* Revista de medicina e investigación, 2014. **2**(1): p. 28-34.
 56. Adu-Gyamfi. E, Y.-X.W., Yu-Bin. D, *The interplay between thyroid hormones and the comprehensive review.* Biology of reproduction, 2020. **102**(1): p. 8-17.
 57. Gutiérrez-Vega S, A.A., Mennickent. D, Loyola M, Covarrubias A, Ortega-Contreras B, et al. , *High levels of maternal total tri-iodothyronine, and low levels of fetal free L-thyroxine and total tri-iodothyronine, are associated with altered deiodinase expression and activity in placenta with gestational diabetes mellitus.* Plos One, 2020. **15**(11).
 58. Guzmán-Gutierrez. E, V.C., Leiva. A, Escudero. C, Sobrevia. L, *Is a low level of free thyroxine in the maternal circulation associated with altered endothelial function in gestational diabetes?* frontiers in pharmacology, 2014. **5**.
 59. Brent, G.A., *Mechanisms of thyroid hormone action.* J Clin Invest, 2012. **122**(9): p. 3035-43.
 60. Pagnin. M, K.-D.D., Chincarini.G, Cumberland. A, Richardson. S, Tolcos. M, *Role of thyroid hormones in normal and abnormal central nervous system myelination in humans and rodents.* Frontiers in neuroendocrinology, 2021. **61**.
 61. Cheng. S, L.J., Davis. P, *Molecular aspects of thyroid hormone actions.* Endocrine reviews, 2010. **April 2010**; **31**(2): p. 139-170.
 62. Davis. P, G.F., Leonard. J, *Nongenomic actions of thyroid hormone.* Nature reviews; endocrinology, 2015. **12**.
 63. Lin, H.Y., et al., *Nuclear monomeric integrin α 5 in cancer cells is a coactivator regulated by thyroid hormone.* FASEB J, 2013. **27**(8): p. 3209-16.
 64. Lin, H.Y., et al., *L-Thyroxine vs. 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and cell proliferation: activation of mitogen-activated protein kinase and*

- phosphatidylinositol 3-kinase*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009. **296**(5): p. C980-91.
65. Davis, P.J., et al., *Membrane receptor for thyroid hormone: physiologic and pharmacologic implications*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2011. **51**: p. 99-115.
 66. Fukushima, K., et al., *Effect of transient TCDD exposure on immortalized human trophoblast-derived cell lines*. *Hum Exp Toxicol*, 2012. **31**(6): p. 550-6.
 67. Szewczyk, G., et al., *Influence of histamine on the process of human trophoblast differentiation*. *Inflamm Res*, 2005. **54 Suppl 1**: p. S78-9.
 68. Forhead, A.J., et al., *Developmental control of iodothyronine deiodinases by cortisol in the ovine fetus and placenta near term*. *Endocrinology*, 2006. **147**(12): p. 5988-94.
 69. Eng, L. and L. Lam, *Thyroid Function During the Fetal and Neonatal Periods*. *Neoreviews*, 2020. **21**(1): p. e30-e36.
 70. Haddow, J.E., et al., *Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child*. *N Engl J Med*, 1999. **341**(8): p. 549-55.
 71. Pop, V.J., et al., *Low maternal free thyroxine concentrations during early pregnancy are associated with impaired psychomotor development in infancy*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1999. **50**(2): p. 149-55.
 72. Forhead, A.J. and A.L. Fowden, *Thyroid hormones in fetal growth and prepartum maturation*. *J Endocrinol*, 2014. **221**(3): p. R87-r103.
 73. Hacioglu, C., I.E. Sahin, and C. Uyuk, *Correlation of perilipin 2 and lipid metabolism in elective cesarean section and vaginal delivery: a prospective study with oxidative and apoptotic pathways*. *Mol Biol Rep*, 2021. **48**(5): p. 3991-3998.
 74. Mutlu, B., et al., *The effects of the mode of delivery on oxidative-antioxidative balance*. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2011. **24**(11): p. 1367-70.
 75. Galvao, J., et al., *Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO*. *FASEB J*, 2014. **28**(3): p. 1317-30.
 76. Gulden, M., et al., *Cytotoxic potency of H₂O₂ in cell cultures: impact of cell concentration and exposure time*. *Free Radic Biol Med*, 2010. **49**(8): p. 1298-305.
 77. Bustin, S. A., et al., *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. *Clin Chem*, 2009. **55**(4): p. 611-22.
 78. Hasbi, A., et al., *Real-time detection of interactions between the human oxytocin receptor and G protein-coupled receptor kinase-2*. *Mol Endocrinol*, 2004. **18**(5): p. 1277-86.
 79. Kim, S.H., P.R. Bennett, and V. Terzidou, *Advances in the role of oxytocin receptors in human parturition*. *Mol Cell Endocrinol*, 2017. **449**: p. 56-63.

80. Robinson, C., et al., *Oxytocin-induced desensitization of the oxytocin receptor*. *Am J Obstet Gynecol*, 2003. **188**(2): p. 497-502.
81. Smith, M.P., et al., *Internalization and desensitization of the oxytocin receptor is inhibited by Dynamin and clathrin mutants in human embryonic kidney 293 cells*. *Mol Endocrinol*, 2006. **20**(2): p. 379-88.
82. Albizu, L., et al., *Time-resolved FRET between GPCR ligands reveals oligomers in native tissues*. *Nat Chem Biol*, 2010. **6**(8): p. 587-94.
83. Grotegut, C.A., et al., *β -Arrestin mediates oxytocin receptor signaling, which regulates uterine contractility and cellular migration*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011. **300**(3): p. E468-77.
84. Phaneuf, S., et al., *The desensitization of oxytocin receptors in human myometrial cells is accompanied by down-regulation of oxytocin receptor messenger RNA*. *J Endocrinol*, 1997. **154**(1): p. 7-18.
85. Phaneuf, S., et al., *Desensitization of oxytocin receptors in human myometrium*. *Hum Reprod Update*, 1998. **4**(5): p. 625-33.
86. Tahara, A., et al., *Pharmacologic characterization of the oxytocin receptor in human uterine smooth muscle cells*. *Br J Pharmacol*, 2000. **129**(1): p. 131-9.
87. Contreras-García. Y, O.-A.K., Guzmán-Gutierrez. E, Manriquez-Vidal. C, Araya-Quintana. J, González-Ortiz. M, *Types of deliveries and levels of oxytocin, cortisol and thyroid hormones in umbilical cord plasma*. *Rev Chil Obste Ginecol*, 2023. **88**(1): p. 25-34.
88. Busnelli, M. and B. Chini, *Molecular Basis of Oxytocin Receptor Signalling in the Brain: What We Know and What We Need to Know*. *Curr Top Behav Neurosci*, 2018. **35**: p. 3-29.
89. Busnelli, M., et al., *Functional selective oxytocin-derived agonists discriminate between individual G protein family subtypes*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(6): p. 3617-29.
90. Shukla, A.K., K. Xiao, and R.J. Lefkowitz, *Emerging paradigms of β -arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling*. *Trends Biochem Sci*, 2011. **36**(9): p. 457-69.
91. Liu, H., et al., *The oxytocin receptor signalling system and breast cancer: a critical review*. *Oncogene*, 2020. **39**(37): p. 5917-5932.
92. Villar, V.A., et al., *Localization and signaling of GPCRs in lipid rafts*. *Methods Cell Biol*, 2016. **132**: p. 3-23.
93. Busnelli, M., et al., *Design and Characterization of Superpotent Bivalent Ligands Targeting Oxytocin Receptor Dimers via a Channel-Like Structure*. *J Med Chem*, 2016. **59**(15): p. 7152-66.
94. Gimpl, G., *Interaction of G protein coupled receptors and cholesterol*. *Chem Phys Lipids*, 2016. **199**: p. 61-73.
95. Klein, U., G. Gimpl, and F. Fahrenholz, *Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with beta-cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor*. *Biochemistry*, 1995. **34**(42): p. 13784-93.

96. Rimoldi, V., et al., *Oxytocin receptor elicits different EGFR/MAPK activation patterns depending on its localization in caveolin-1 enriched domains*. *Oncogene*, 2003. **22**(38): p. 6054-60.
97. Wiegand, V. and G. Gimpl, *Specification of the cholesterol interaction with the oxytocin receptor using a chimeric receptor approach*. *Eur J Pharmacol*, 2012. **676**(1-3): p. 12-9.
98. Browne, G.J. and C.G. Proud, *Regulation of peptide-chain elongation in mammalian cells*. *Eur J Biochem*, 2002. **269**(22): p. 5360-8.
99. Xu, B., L. Liu, and G. Song, *Functions and Regulation of Translation Elongation Factors*. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2022. **8**.
100. *Integrin α V/ β 3 (23C6): sc-7312*, I. SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Editor. 2022.
101. Ramezani, F, N.S., *Delivery factors and neonatal thyroid hormone levels: a systematic review*. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 2021. **34**: p. 821-833.
102. Tanfin, Z., et al., *Endothelin-1: physiological and pathological roles in myometrium*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011. **43**(3): p. 299-302.
103. Stojilkovic, S.S. and K.J. Catt, *Expression and signal transduction pathways of endothelin receptors in neuroendocrine cells*. *Front Neuroendocrinol*, 1996. **17**(3): p. 327-69.
104. Kotani, T., et al., *Altered expression of enzymes regulating the activity of endothelin-1 in the lower segment of the human amnion during labor*. *Biol Reprod*, 2013. **89**(3): p. 52.

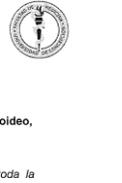
12. ABREVIACIONES

ANOVA	Análisis de varianza
ATP	Adenosín trifosfato
CE	Cesárea Electiva
CU	Cesárea Urgencia
D1	Deiodinasa 1
D2	Deiodinasa 2
D3	Deiodinasa 3
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC50	Mitad de la concentración efectiva máxima
eEF2	Factor de elongación eucariota 2
eEF2K	Kinsasa de eEF2
END-1	Endotelina-1
ERK1/2	kinasa reguladora de señalización extracelular 1/2
GDP	Guanosín difosfato
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GRK	Kinasa de GPCR
GTP	Guanosín trifosfato
hCG	Gonadotropina coriónica humana (siglas en inglés)
HIF-1α	Factor inducible de hipoxia-1 α
HUVEC	células endoteliales de vena de cordón umbilical humano
IHC	Inmunohistoquímica (siglas en inglés)
IgG	Inmunoglobulina clase G
IP3	inositol trifosfato
LDH	Lactato deshidrogenasa
MAPK	Proteína kinasa activada por mitógeno
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
NK	Natural Killer Cells
OXT	Oxitocina
OXTR	Receptor de oxitocina
PA	Parto Acelerado
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (siglas en inglés)
PE	Parto Espontáneo
PKC	Proteína kinasa C
PLC	fosfolipasa C
SEM	Error estándar de la medición (siglas en inglés)

STB	Sincitiotrofoblasto
T3	L-3,5,3'triyodotironina
T3r	T3 reversa
T4	tetrayodotironina
Thr	Treonina
v/v	Volumen/volumen

13. ANEXOS

Anexo 1: Consentimiento informado que será entregado a las pacientes.

<div style="text-align: center;">  <p>Universidad de Concepción Facultad de Medicina Departamento de Obstetricia y Puericultura</p>  </div> <p>Introducción: Estimada Usuaría,</p> <p>Mediante el presente documento se le invita a participar a usted en la investigación titulada "Caracterización de los sistemas oxitocinérgico y tiroideo, en la unidad feto placentaria según tipo de parto." Esta información le permitirá evaluar, juzgar y decidir si desea re-consentir su participación para este estudio. Lea esta hoja informativa con atención y puede que existan algunas palabras que no entienda. Por favor, téngase en confianza de solicitar que le sean explicados de mejor manera los conceptos. Si tiene preguntas más tarde, puede preguntarle a la investigadora responsable cuando desee.</p> <p>Fundamento: La unidad feto placentaria (bebé y placenta) modifica el funcionamiento placentario por una parte y en el niño/a van ocurriendo cambios únicos durante el parto, para la adaptación del niño/a al medio ambiente. En este sentido evaluar hormonas u otras sustancias bioquímicas presentes en el plasma del cordón umbilical, según tipo de parto, podría ser una información muy útil para comprender mejor el proceso del parto desde el punto de vista neurohormonal y la necesidad de mejorar las prácticas clínicas que se aplican durante este período.</p> <p>Razón por la que se invita a la persona a re-consentir su participación: Debido a que usted participó del estudio "Efectos de la Oxitocina sintética utilizada durante el parto, en el neurodesarrollo y comportamiento del niño(a) durante el primer año de vida" durante los años 2014 al 2016, en donde se le tomó una muestra de la sangre del cordón umbilical al momento del parto, rescatando el plasma que fue congelado para su análisis y determinación de niveles de Oxitocina. Existe una cantidad de plasma (1 ml) que aún se mantiene congelado y permitirá medir otras hormonas, en este caso en particular hormona tiroidea, además de otros similares que pudiesen identificarse y medirse.</p> <p>Participación y retiro voluntario: el re-consentir su participación en este nuevo estudio considera la donación de su plasma congelado que permite realizar las mediciones. Esta donación es estrictamente voluntaria, por lo cual, podrá retirarse de esta investigación en cualquier momento sin que esto le perjudique de alguna forma. De negarse a participar no recibirá sanción alguna, seguirá teniendo los mismos derechos y recibiendo todas las prestaciones de igual modo en cualquiera de los centros asistenciales públicos a los que usted acceda. Usted no recibirá una remuneración monetaria, ya que el estudio se realizará en muestras congeladas de plasma. La información que nos brindará para esta investigación corresponde a la que está contenida en la base de datos de la primera investigación en la cual usted participó. Su información será confidencial, su identidad se encuentra completamente anónima en dicha base de datos puesto que se le identifica por un número correlativo y es utilizada únicamente con fines investigativos, la donación de su plasma congelado es fundamental para el desarrollo de estudio ya que su colaboración es importante para el estudio.</p> <p>Diseño de estudio: Es un estudio del tipo transversal, que medirá los niveles plasmáticos de hormona tiroidea y otros metabolitos activos presentes en el momento del parto y los asociará con su tipo de parto y las prácticas clínicas que tuvo en ese momento, particularmente el uso de medicamentos. No será sometida a ningún procedimiento, ni se le solicitará otro tipo de muestra.</p> <p>Descripción del estudio: Una vez obtenido su re-consentimiento, y evaluado que las características de esta muestra cumplan con los requisitos para su uso (cantidad mínima 0,5 ml y sin precipitación) se incorporará su</p> <p>Versión 02 07 de octubre de 2020 2</p>	<div style="text-align: center;">  <p>Universidad de Concepción Facultad de Medicina Departamento de Obstetricia y Puericultura</p>  </div> <p style="text-align: center;">HOJA DE FIRMAS DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO</p> <p>TÍTULO DEL ESTUDIO: "Caracterización de los sistemas oxitocinérgico y tiroideo, en la unidad feto placentaria según tipo de parto."</p> <p style="text-align: center;">CONFIRMÓ QUE ANTES DE FIRMAR:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mis preguntas han sido respondidas satisfactoriamente y creo comprender toda la información proporcionada acerca del estudio. - Acepto donar mi plasma congelado y que mi información médica ya recopilada pueda ser utilizada en esta investigación y los resultados obtenidos sean divulgados conforme a lo descrito en esta información. - He decidido voluntariamente re-consentir mi participación en el estudio de investigación y entiendo que puedo retirarme en cualquier momento sin sanción alguna. - Sé que recibiré una copia firmada y fechada de este documento. - Sé que al firmar este documento, no renuncio a ninguno de mis derechos legales. <table border="0" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 60%; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;"></td> <td style="width: 20%; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; text-align: center;">/ /</td> <td style="width: 20%; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; text-align: center;">/ /</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Nombre de la participante</td> <td style="text-align: center;">Firma de la participante</td> <td style="text-align: center;">Fecha</td> </tr> </table> <p>Yo, quien suscribe, investigadora/co-investigador/a, confirmo que he entregado verbalmente la información necesaria acerca del estudio, que he contestado toda duda adicional y que no ejerzi presión alguna para que la participante ingrese al estudio. Declaro que procedí en completo acuerdo con los principios éticos descritos en las Directrices de GCP (Buenas Prácticas Clínicas) y otras leyes nacionales e internacionales vigentes. Se le proporcionará a la usuaria una copia de esta información escrita en conjunto con el formulario de consentimiento informado.</p> <table border="0" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 60%; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;"></td> <td style="width: 20%; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; text-align: center;">/ /</td> <td style="width: 20%; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; text-align: center;">/ /</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Nombre Investigadora Responsable</td> <td style="text-align: center;">Firma</td> <td style="text-align: center;">Fecha</td> </tr> </table> <table border="0" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 60%; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;"></td> <td style="width: 20%; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; text-align: center;">/ /</td> <td style="width: 20%; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; text-align: center;">/ /</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Nombre Director centro o delegado</td> <td style="text-align: center;">Firma</td> <td style="text-align: center;">Fecha</td> </tr> </table> <div style="text-align: right; margin-top: 20px;">  </div> <p>Versión 02 07 de octubre de 2020 4</p>		/ /	/ /	Nombre de la participante	Firma de la participante	Fecha		/ /	/ /	Nombre Investigadora Responsable	Firma	Fecha		/ /	/ /	Nombre Director centro o delegado	Firma	Fecha
	/ /	/ /																	
Nombre de la participante	Firma de la participante	Fecha																	
	/ /	/ /																	
Nombre Investigadora Responsable	Firma	Fecha																	
	/ /	/ /																	
Nombre Director centro o delegado	Firma	Fecha																	

Anexo 2: Instructivo sobre manejo de residuos biológicos establecidos por la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción.

		CLASIFICACIÓN DE RESIDUOS BIOLÓGICOS			
Tipo de Residuo	Definición	Almacenamiento y Retiro	Contenedor o bolsa		
Residuos biológicos (tipo 1)	Corresponden SOLO a tejidos humanos, restos de tejidos humanos, materiales contaminados con fluidos humanos (sangre, orina) y restos de animales contaminados con bacterias o virus.	Deben ser almacenados a temperaturas inferiores a 4°C, de acuerdo al decreto N°6 REAS, hasta ser retirados por MATPEL o empresa externa*.	Bolsa de autoclave amarilla		
Residuos cortopunzantes biológicos (tipo 2)	Corresponden a materiales cortopunzantes (agujas, lancetas, hojas de bisturí, escalpelos) que se han utilizado con fluidos y tejidos humanos o en disecciones de animales contaminados con bacterias o virus.	Deben ser almacenados a temperaturas inferiores a 4°C, de acuerdo al decreto N°6 REAS, hasta ser retirados por MATPEL o empresa externa*.	Caja cortopunzante amarilla		
Residuos bio-inertes (tipo 3)	Corresponden a animales o restos de animales de experimentación que <u>NO</u> están contaminados con bacterias, virus u otras sustancias peligrosas.	Deben ser almacenados en bolsas para residuos inertes color negro, resistente al volumen y peso del residuo, a temperaturas inferiores a 4°C hasta ser retirados por MATPEL para su disposición final.	Bolsa para residuos inertes color negro		
Residuos cortopunzantes inertes (tipo 4)	Corresponden a materiales cortopunzantes (agujas, lancetas, hojas de bisturí, escalpelos) que <u>NO</u> han estado en contacto con tejidos humanos, restos de tejidos humanos, fluidos humanos (sangre, orina), ni restos de animales contaminados con bacterias o virus.	Serán almacenados en contenedores plásticos de 4 L, etiquetados como "Cortopunzante inerte", hasta ser retirados por MATPEL para su disposición final.	Contenedor plástico 4 L		
Residuos microbiológicos (tipo 5)	Corresponden a materiales de cultivo que han estado en contacto con bacterias no patógenas y que han sido inactivados por esterilización con autoclave o por baño en solución de hipoclorito de sodio.	Deben ser entregados a MATPEL, <u>SOLO</u> cuando sean inertizados mediante autoclave o baño con solución de hipoclorito de sodio.	Bolsa de autoclave transparente o blanca		

(*) El retiro desde la Facultad de Medicina, Facultad de Odontología, DISE y Centro RAI, será una vez a la semana a través de empresa externa Stericycle y MATPEL. El resto de las facultades que generen este tipo de residuos deberá gestionar retiro mensual a través de MATPEL.

Instructivo elaborado en colaboración con la Facultad de Ciencias Biológicas.

14. FIGURAS COMPLEMENTARIAS:

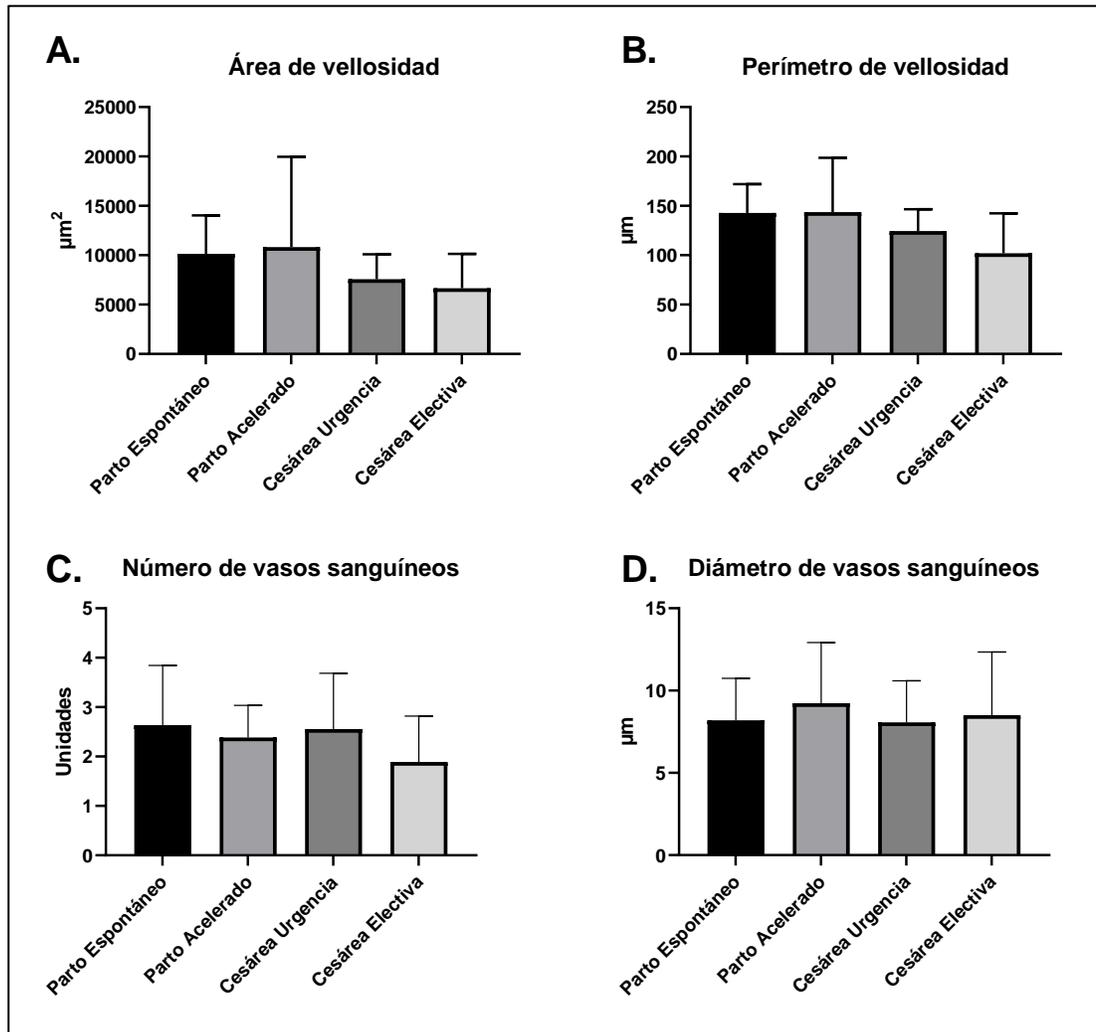


Figura complementaria 1: Evaluación morfométrica de las vellosidades placentarias según tipo de parto. En **A.** Área de la vellosidad placentaria. En **B.** Perímetro de la vellosidad placentaria. En **C.** Número de vasos sanguíneos presentes en cada vellosidad placentaria. En **D.** Diámetro de los vasos sanguíneos. $n=12$. Test ANOVA de una vía con comparaciones múltiples. Se consideró como estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

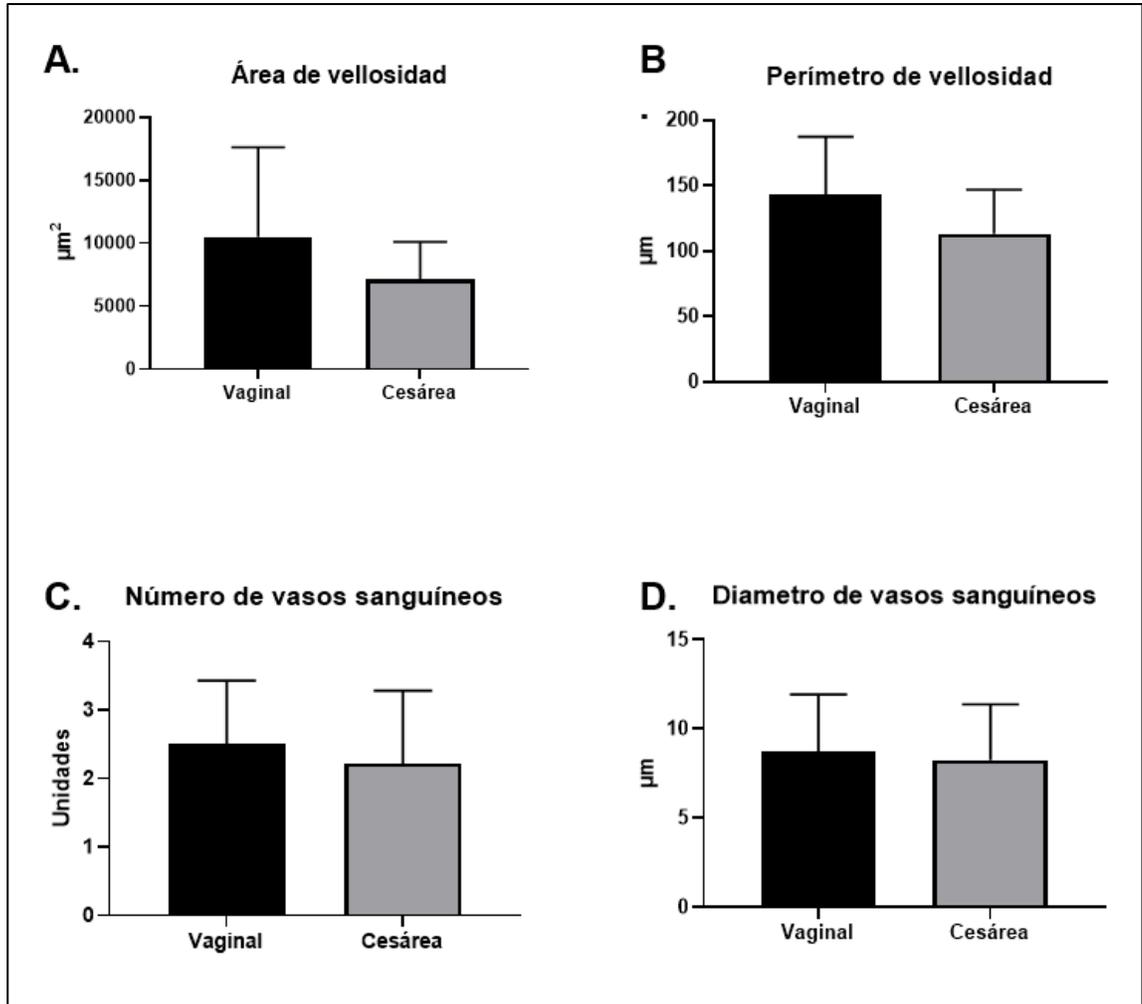


Figura complementaria 2: Evaluación morfométrica de las vellosidades placentarias según vía de parto. En **A.** Área de la vellosidad placentaria. En **B.** Perímetro de la vellosidad placentaria. En **C.** Número de vasos sanguíneos presentes en cada vellosidad placentaria. En **D.** Diámetro de los vasos sanguíneos. n=12. Test Mann-Whitney. Se consideró como estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

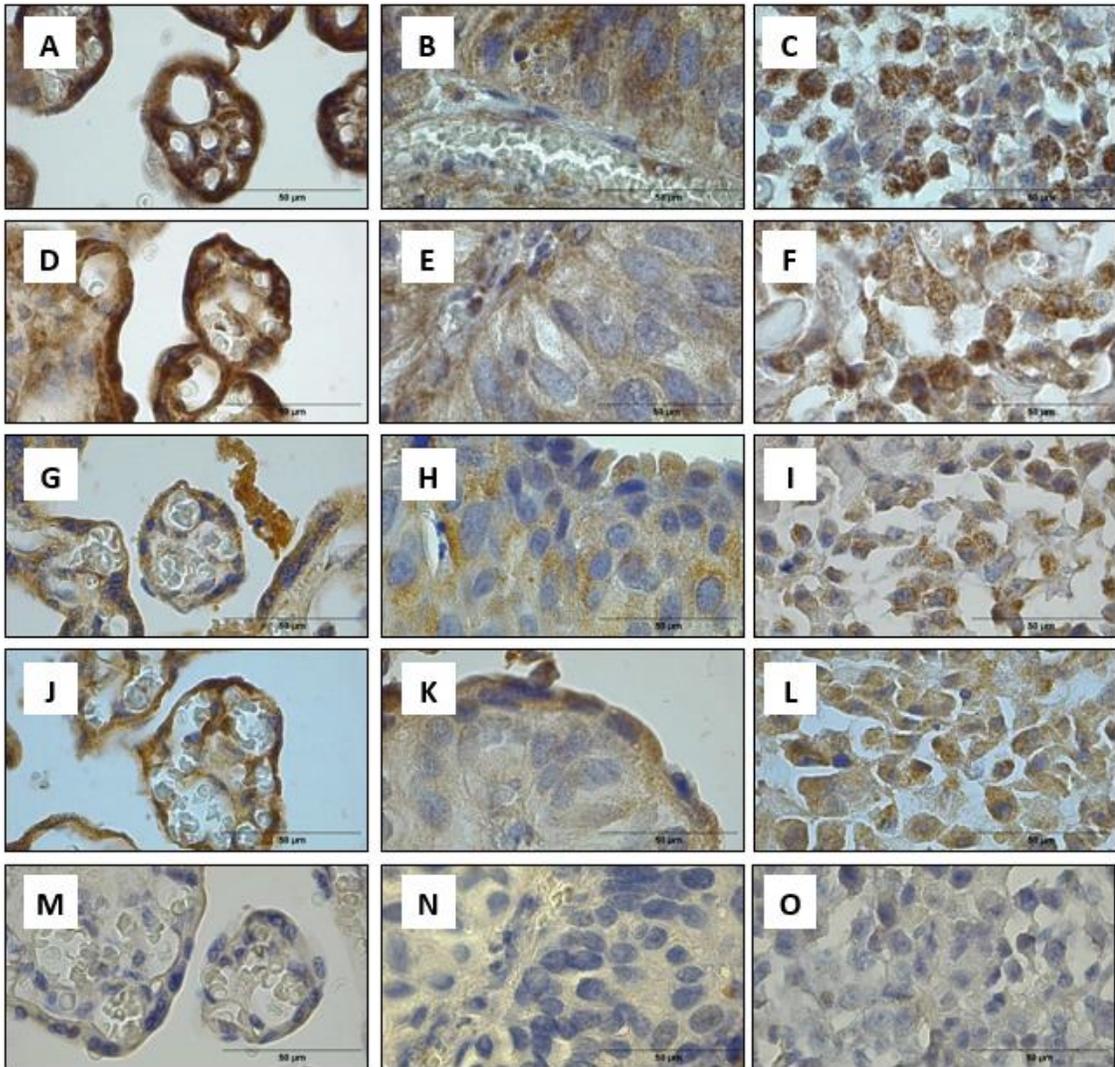


Figura complementaria 3: Estandarización de anticuerpo anti-OXTR sobre muestra de tejido de placenta, cáncer urotelial y osteosarcoma. Primera columna corresponde al tejido de placenta, columna central corresponde a tejido de cáncer urotelial y tercera columna corresponde a tejido de osteosarcoma. **A-C.** Incubación anticuerpo anti-OXTR 1:350 a pH6. **D-F.** Incubación anticuerpo anti-OXTR 1:350 a pH9. **G-I.** Incubación anticuerpo anti-OXTR 1:900 a pH6. **J-L.** Incubación anticuerpo anti-OXTR 1:900 a pH9. **M-O.** Controles negativos. Magnificación original 100X. Scale Bar de 50µm.

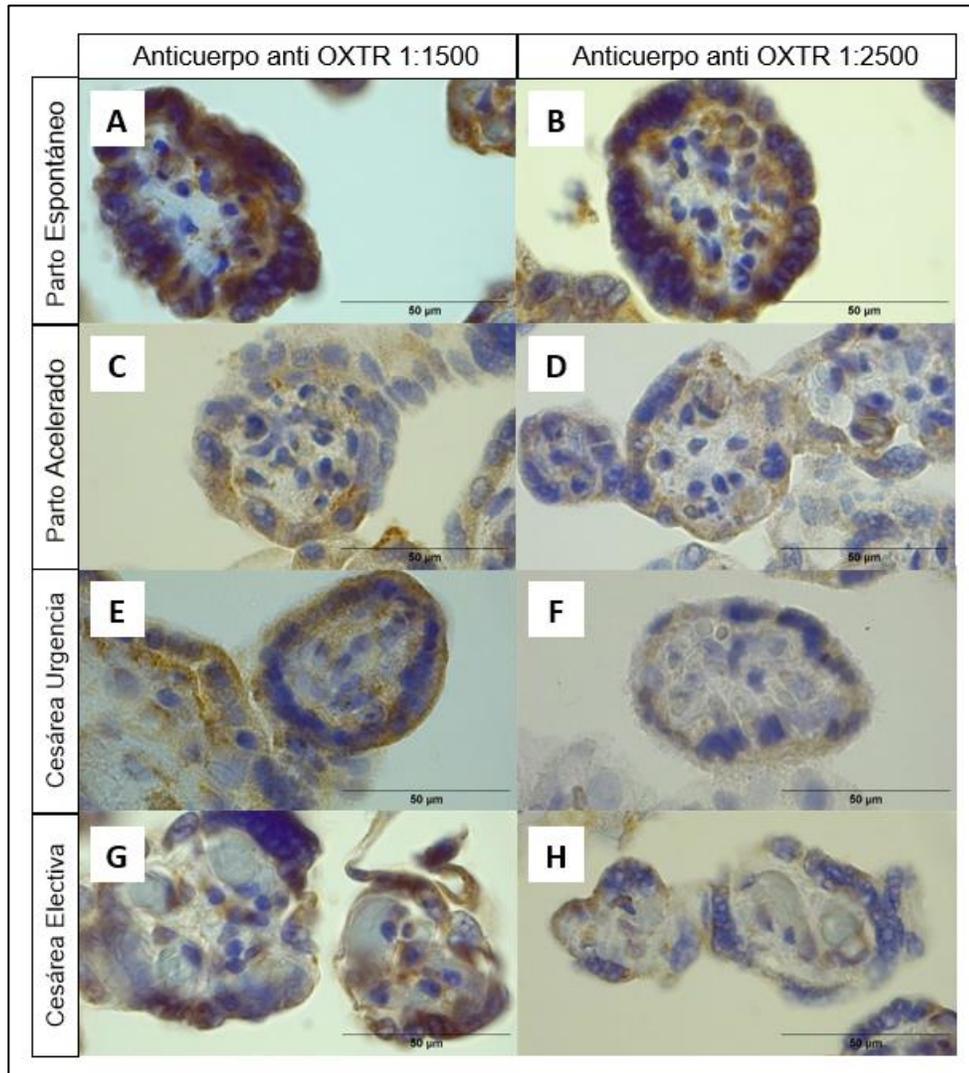


Figura complementaria 4: Estandarización de título de anticuerpo. Comparación de IHC entre dos diferentes títulos de anticuerpo primario anti OXTR. **A.-C.-E.-G.** corresponde a IHC utilizando título de 1:1500. Mientras que **B.-D.-F.-H.** corresponden al resultado de IHC utilizando título de anticuerpo 1:2500. Scale Bar de 50µm. Magnificación original 100X.

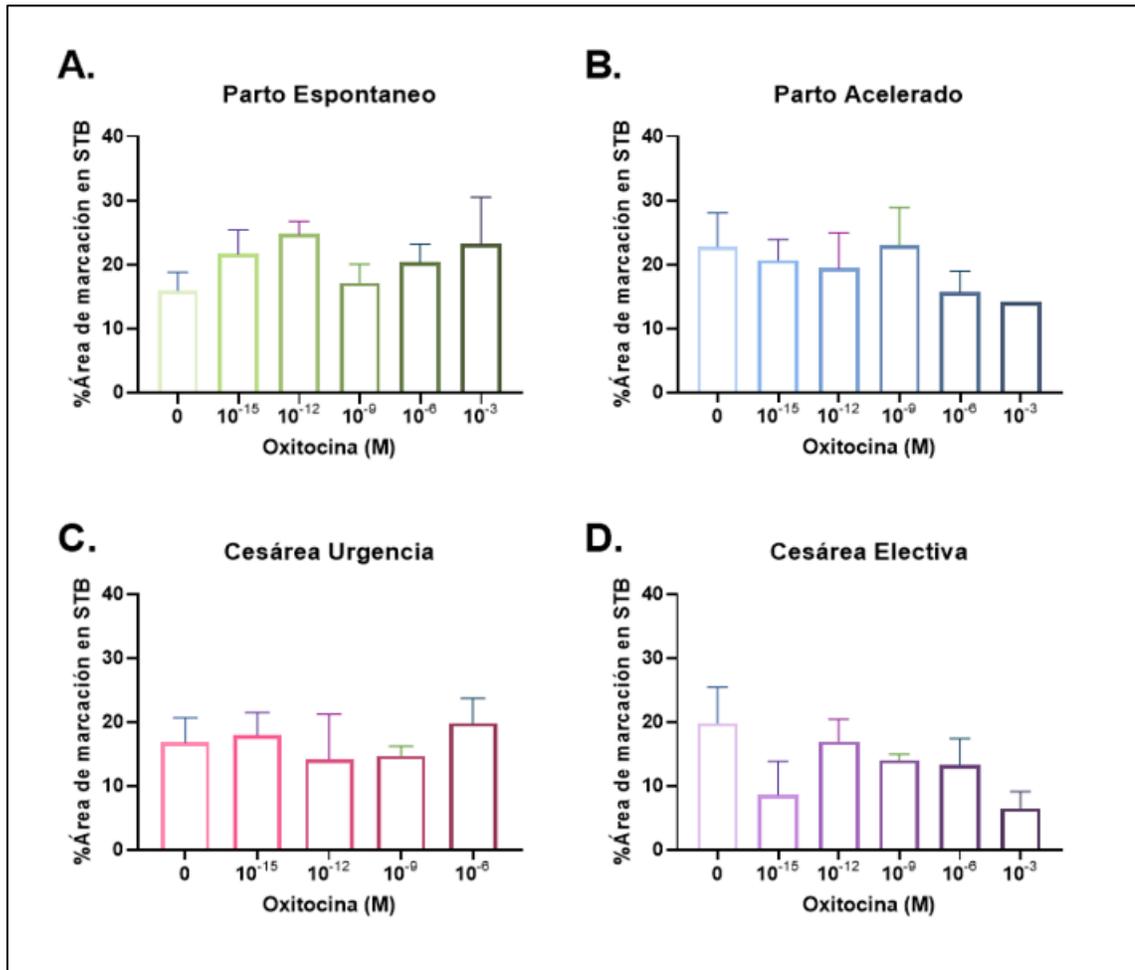


Figura complementaria 5: Efecto de oxitocina frente al área de marcación en el sincitiotrofoblasto. En **A** Parto Espontáneo, **B.** Parto Acelerado., **C,** Cesárea Urgencia. **D.** Cesárea Electiva. Valores corresponden a media \pm SEM., ANOVA de una vía con comparaciones múltiples, * $p < 0.05$, $n = 3-5$ por grupo

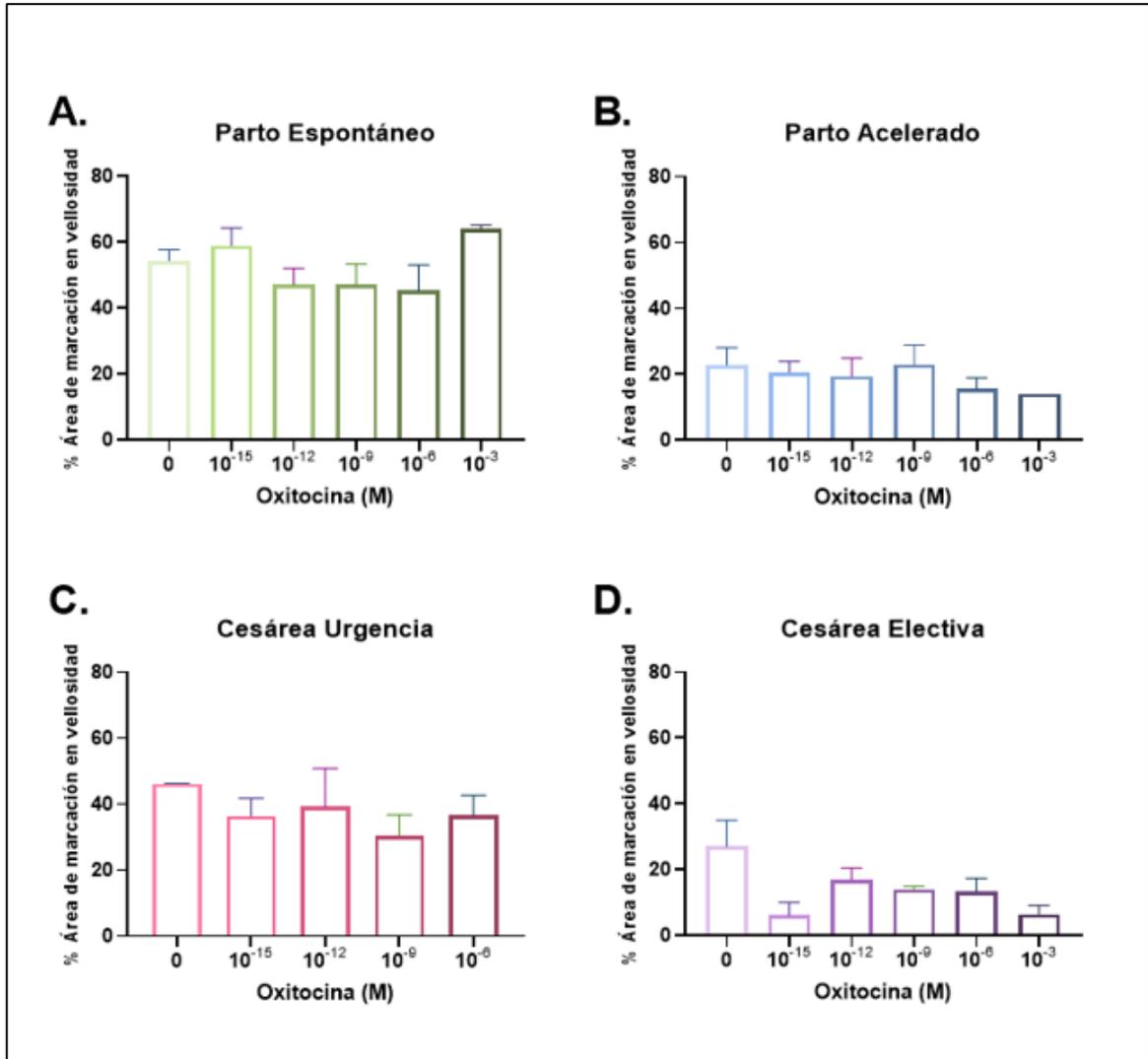


Figura complementaria 6: Efecto de oxitocina frente al área de marcación en la vellosidad placentaria. En **A** Parto Espontáneo, **B.** Parto Acelerado., **C,** Cesárea Urgencia. **D.** Cesárea Electiva. Valores corresponden a media \pm SEM., ANOVA de una vía con comparaciones múltiples, * $p < 0.05$, $n = 3-5$ por grupo

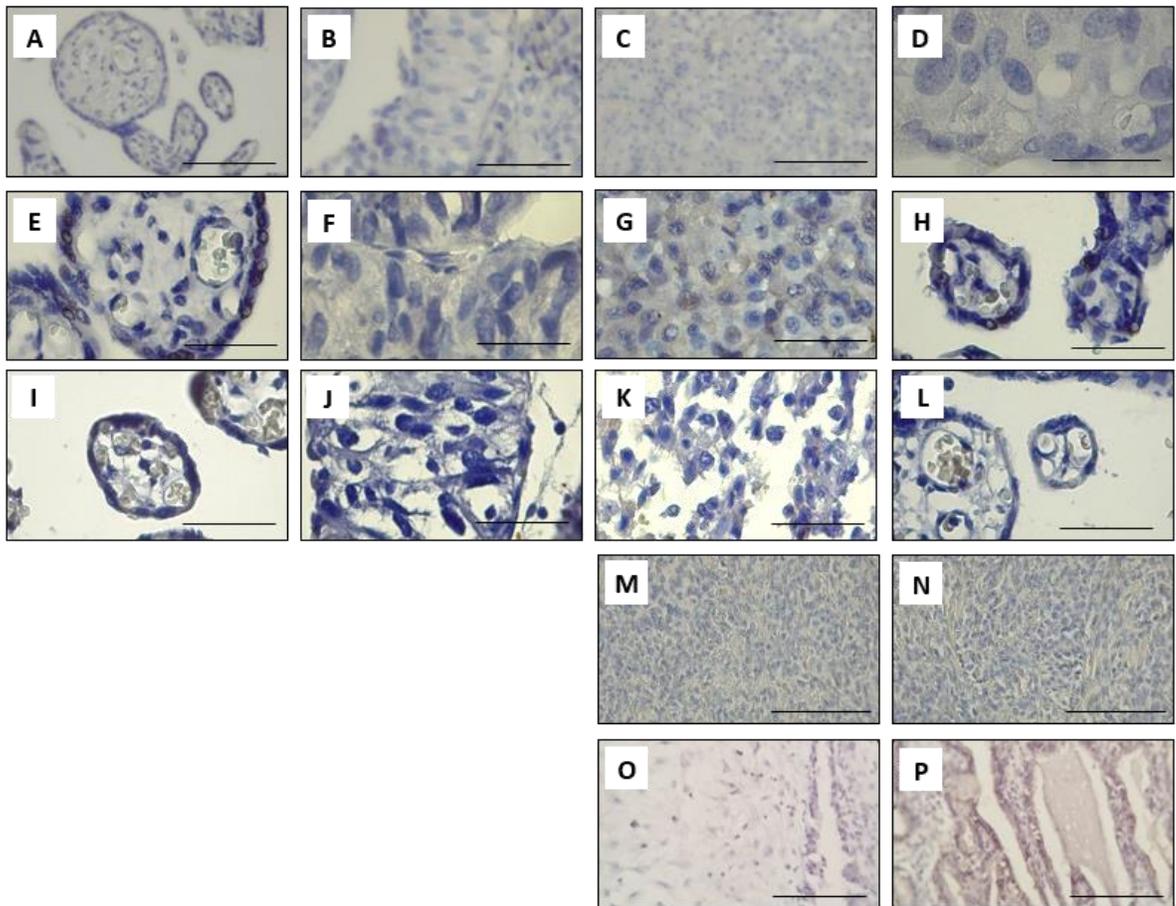


Figura complementaria 7: Estandarización de anticuerpo anti- α v/ β 3 sobre muestra. Primera columna corresponde al tejido de placenta, segunda columna corresponde a tejido de cáncer urotelial, tercera columna C-G-K. corresponde a tejido de osteosarcoma, mientras que M. corresponde a tejido de la granulosa y O. corresponde a tejido de endometrio humano. Finalmente, la cuarta columna corresponde a los controles negativos de cada fila. **A-C.** Incubación overnight a 4°C de anticuerpo anti- α v/ β 3 1:250 a pH6. **D.** Control negativo, incubando sin anticuerpo primario en placenta humana. **E-G.** Incubación anticuerpo anti- α v/ β 3 1:50 durante 45 min a T° ambiente, recuperación antigénica a pH9. **H.** Control negativo, incubando sin anticuerpo primario en placenta humana. **I-K.** Incubación anticuerpo anti- α v/ β 3 1:50 durante 30 min a T° ambiente, recuperación antigénica a pH6. **L.** Control negativo, incubando sin anticuerpo primario en placenta humana. **M.** Incubación en tejido de la Granulosa con anticuerpo anti- α v/ β 3 1:250 durante overnight a 4°C. **N.** Control negativo, incubando sin anticuerpo

primario. **O.** Incubación en tejido de Endometrio humano con anticuerpo anti- $\alpha v/\beta 3$ 1:750 durante overnight a 4°C. **P.** Control negativo, incubando sin anticuerpo primario. Magnificación original 100X. Scale Bar de 50 μ m.

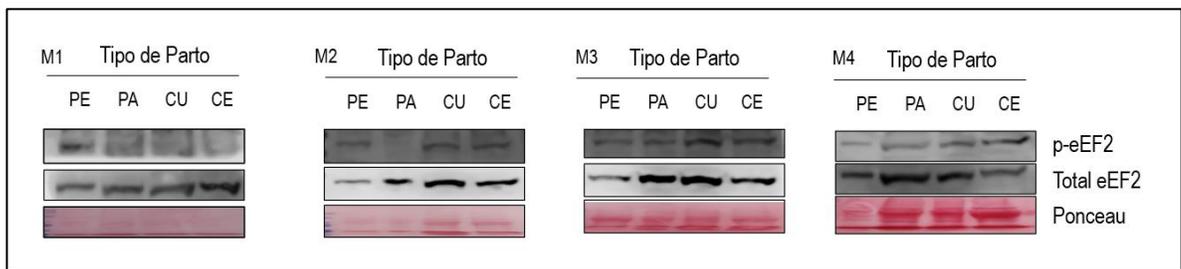


Figura complementaria 8: Fosforilación del factor eEF2 y expresión de eEF2 total en explantes placentarios humanos según tipo de parto. PE: Parto Espontáneo; PA: Parto Acelerado; CU: Cesárea Urgencia; CE: Cesárea Electiva. (n = 4).

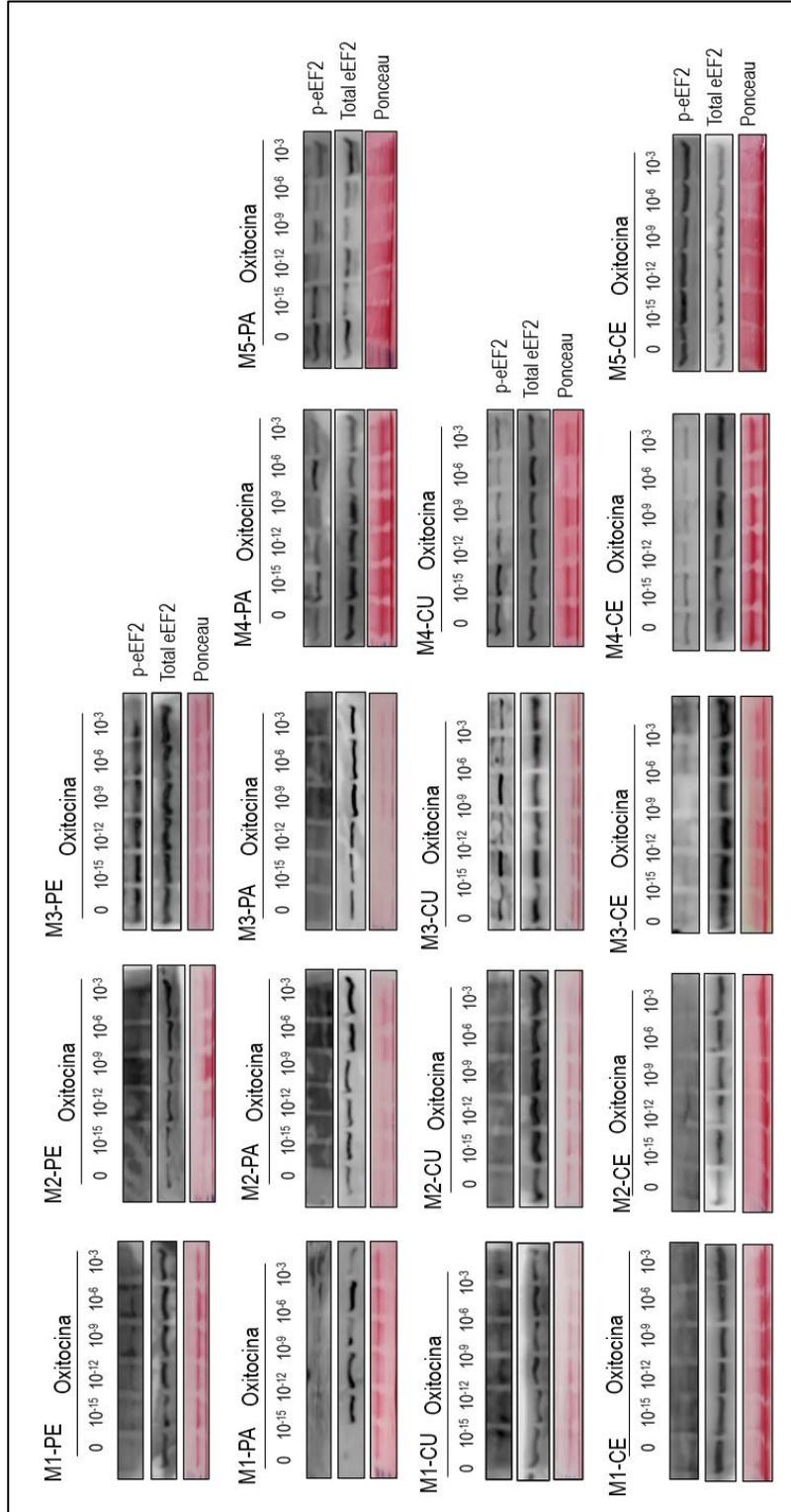


Figura Complementaria 9: Efecto de Oxitocina sobre la fosforilación del factor eEF2 y expresión de eEF2 total en explantes placentarios humanos provenientes de diferentes tipos de parto. PE: Parto Espontáneo (n = 3). PA: Parto Acelerado (n = 5); CU: Cesárea Urgencia (n = 4); CE: Cesárea Electiva (n = 5).

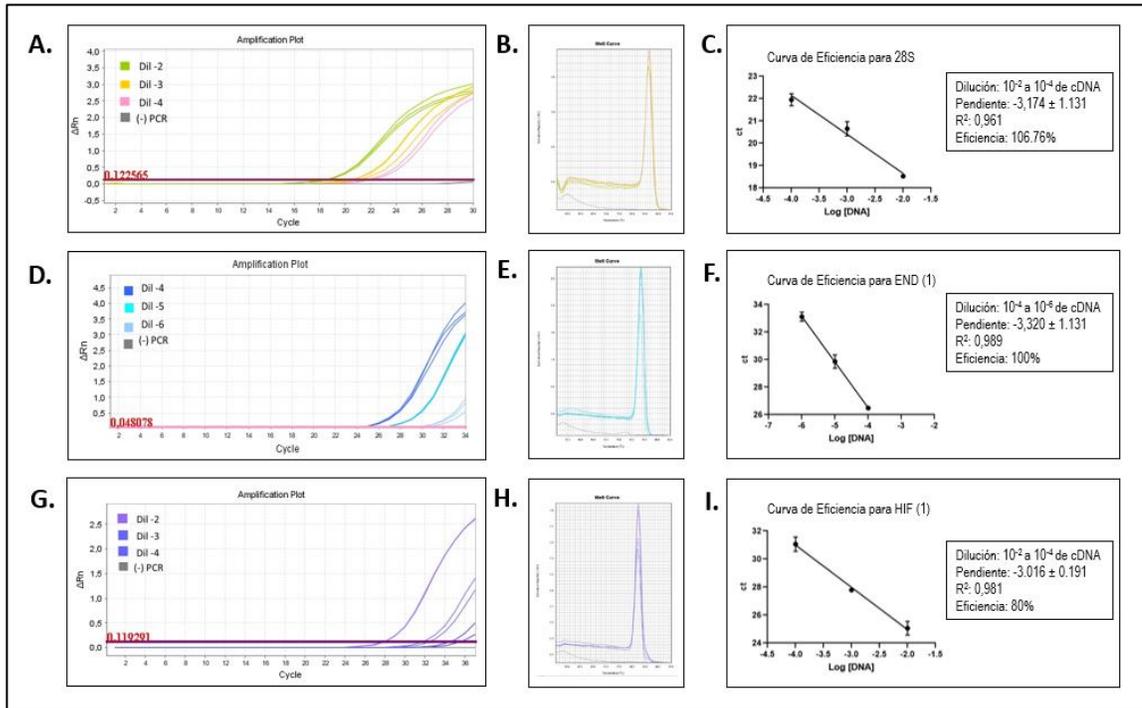


Figura complementaria 10: Estandarización de qPCR para 28S, Endotelina (1) y HIF-1 α . Estandarización de qPCR mediante amplificación de una dilución seriada de concentración conocida. **A-C.** Corresponden a Curva de Amplificación, Curva de Melt y Curva de Eficiencia para amplificación de 28S. En **D-F.** Corresponden a Curva de Amplificación, Curva de Melt y Curva de Eficiencia para amplificación de END-1. **G-I.** Corresponden a Curva de Amplificación, Curva de Melt y Curva de eficiencia para amplificación de HIF-1 α . Cada punto fue realizado por triplicado.

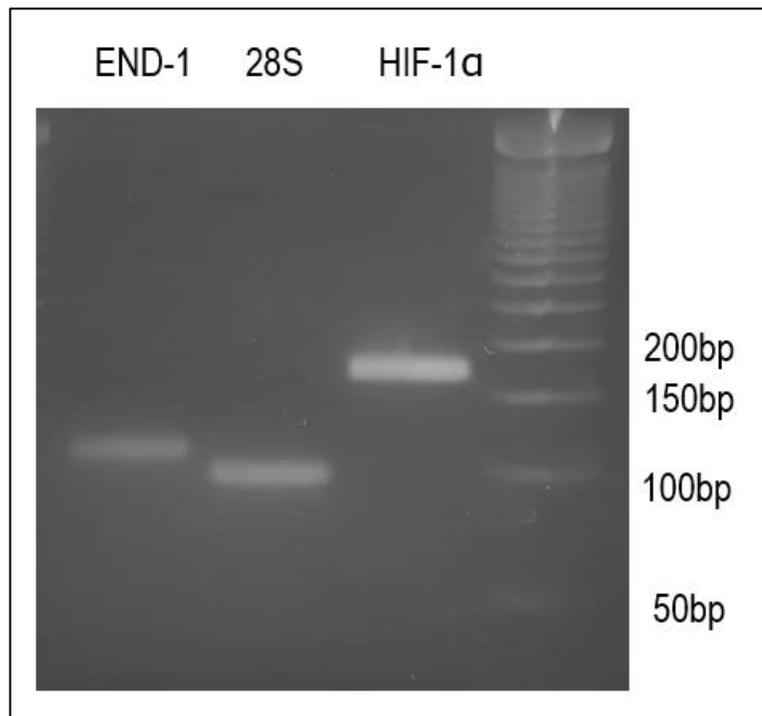


Figura complementaria 11: Electroforesis gel de Agarosa. Comprobación de Amplificación del Amplicón de interés mediante Electroforesis en gel de Agarosa al 5%. En primer carril muestra de END-1 cuyo amplicón es de 113bp, en el segundo carril amplicón de 28S de 100bp, en el tercer carril amplicón de HIF-1α de 167bp y en el cuarto carril Ladder Promega (REF: G452).

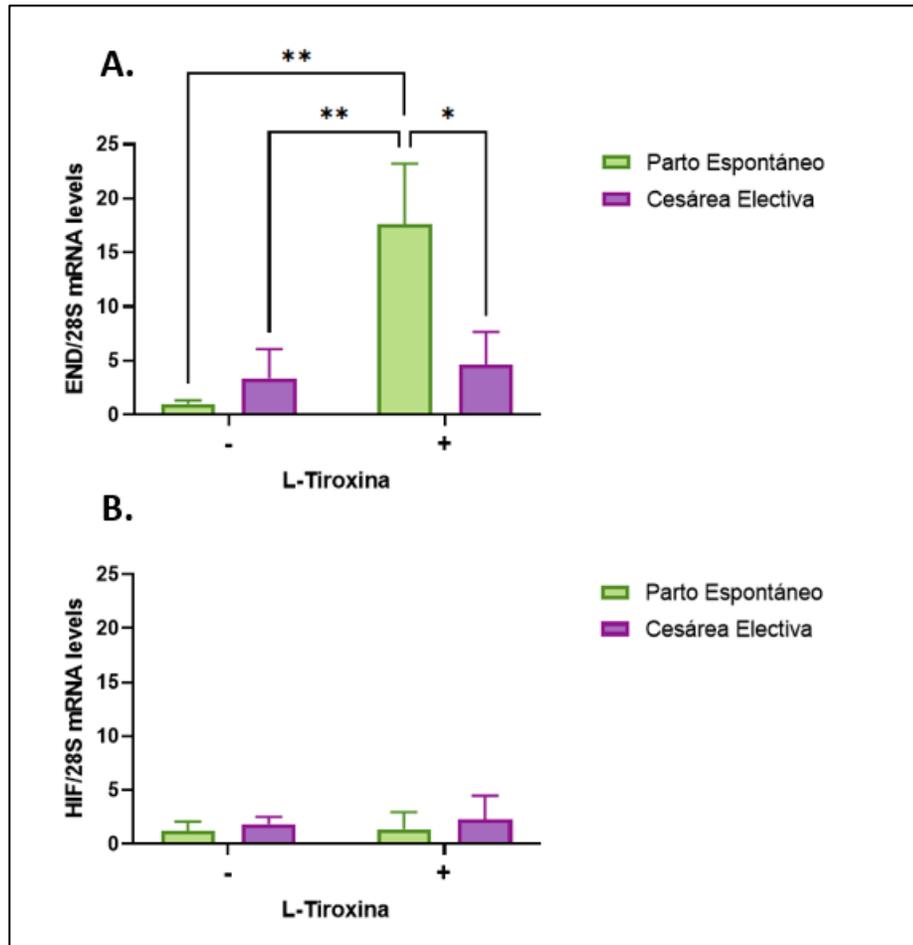


Figura complementaria 12: Efecto de L-Tiroxina sobre la expresión de END-1 y HIF-1 α en explantes placentarios según parto espontáneo y cesárea electiva. En **A.** Expresión relativa de END-1 con respecto a grupo de parto espontáneo. En **B.** Expresión relativa de HIF-1 α con respecto a grupo de parto espontáneo. (+) = 2pM de L-Tiroxina. Valores corresponden a media \pm SEM., ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples, * $p < 0.05$, $n = 3$ por grupo.

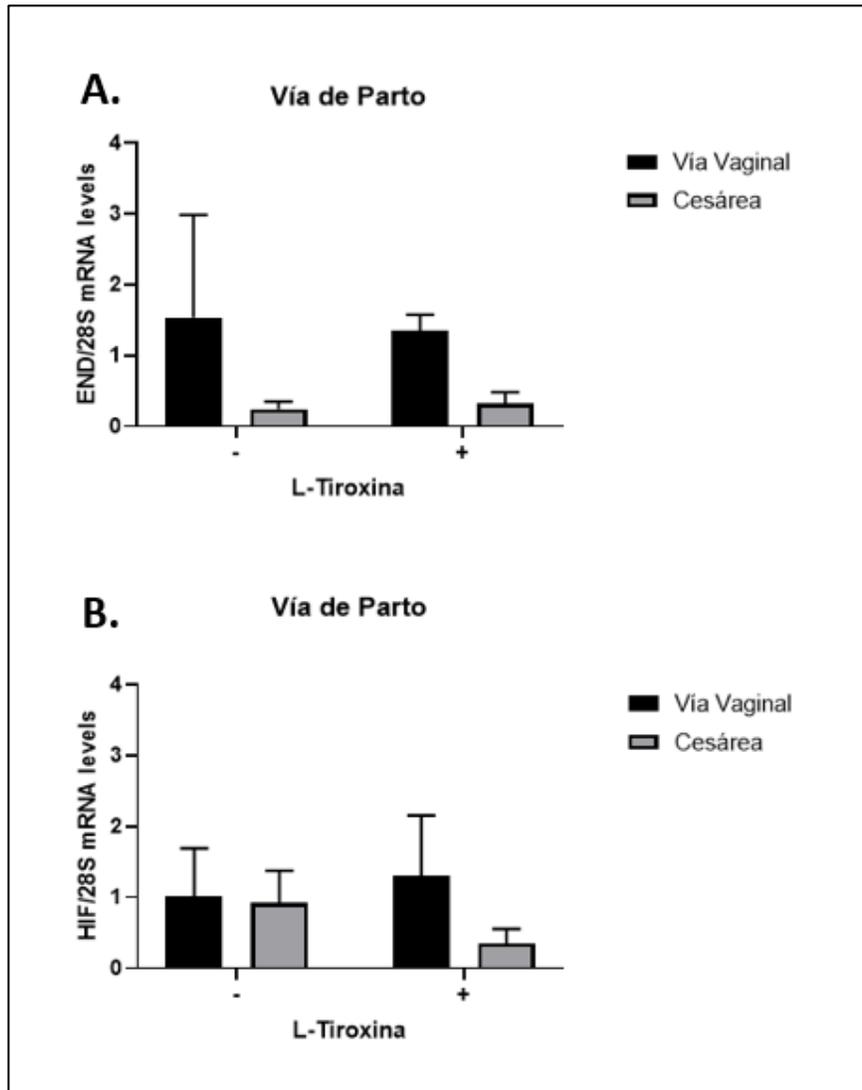


Figura complementaria 13: Efecto de L-Tiroxina sobre la expresión de END-1 y HIF-1 α en explantes placentarios según vía de parto. En **A.** Expresión relativa de END-1 con respecto a grupo de Vía Vaginal. En **B.** Expresión relativa de HIF-1 α con respecto a grupo de Vía Vaginal. (+) = 2pM de L-Tiroxina. Valores corresponden a media \pm SEM., ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples, * $p < 0.05$, $n = 6$ por grupo

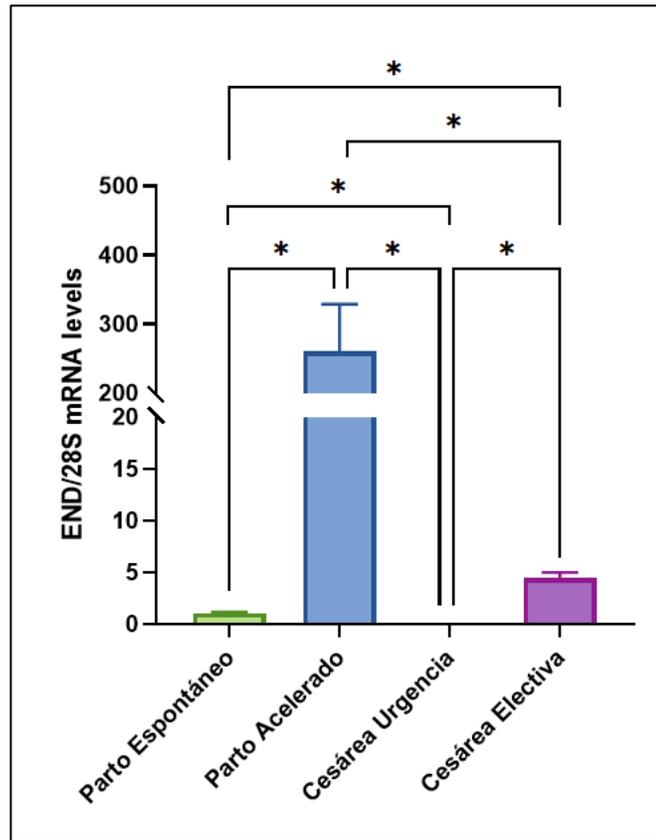


Figura complementaria 14: Expresión basal de END-1 en explantes placentarios según tipo de parto. Valores corresponden a media \pm SEM. Test T con corrección de Welch, $*p < 0.05$, $n = 4$ por grupo.

