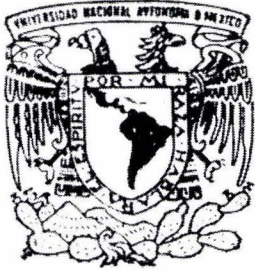


11217



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POST-GRADO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DIRECCION 2 NORESTE DEL DISTRITO FEDERAL
HOSPITAL DE GINECOOBTETRICIA
C.M.N. LA RAZA

UNIONES CELULARES DEL TROFOBLASTO Y EL ENDOTELIO PLACENTARIO HUMANO



SUBDIVISION DE ESPECIALIZACION
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
U.N.A.M.

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:

ESPECIALISTA EN: GINECOOBTETRICIA

P R E S E N T A

DRA. MONICA VANESSA GARCIA DIAZ



IMSS

CENYND MEDICO LA RAZA
Hosp. de Gineco-Obstetricia
Unidad de Enseñanza e Investigación

ASESOR DE TESIS: DR. SAMUEL ALEJANDRO LIEVANO TORRES

MEXICO, D. F.

JULIO 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
HOSPITAL GINECOOBSTETRICIA No. 3
CENTRO MEDICO NACIONAL
"LA RAZA"

**“UNIONES CELULARES DEL TROFOBLASTO Y EL
ENDOTELIO PLACENTARIO HUMANO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**ESPECIALIDAD DE
GINECOOBSTETRICIA**

PRESENTA

DRA. MONICA VANESA GARCIA DIAZ

TUTOR: DR. SAMUEL ALEJANDRO LIEVANO TORRES

Septiembre 2004

México D.F.

Número definitivo del proyecto: 016/ 02

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

**UNIONES CELULARES DEL TROFOBLASTO Y EL ENDOTELIO
PLACENTARIO HUMANO.**

AUTORES:

Dra. Mónica Vanessa García Díaz

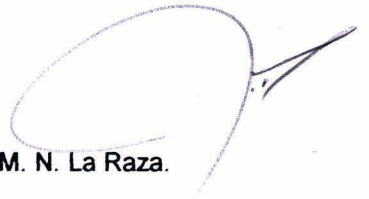
Residente de 4to Año Gineco-Obstetricia

Centro Medico Nacional La Raza

ASESORES:

Dr. Samuel Alejandro Liévano Torres

Gineco-Obstetra, Hospital de Gineco-Obstetricia C. M. N. La Raza.



Q.F.B. Maria de Lourdes Alarcón Montero

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV.

JULIO

2004

DEDICATORIA

A DIOS QUIEN SIEMPRE ESTA A MI LADO

A MIS PADRES QUE POR ELLOS HE ALCANZADO MIS METAS

A MI HERMANA, A MIS SOBRINOS RENE, VANESSA, QUIENES SON MI
FAMILIA Y APOYO INCONDICIONAL EN TODO

AL DR ALEJANDRO LIEVANO, QUIEN HIZO POSIBLE ESTA INVESTIGACION.

A MIS AMIGOS: ROCIO, NELSON, JESUS, ROBERTO, NOHEMI, AMANDA.

Y LOS QUE SABEN QUE DEBERIAN ESTAR AQUÍ, PERO NO ESTAN.

INDICE

RESUMEN

1.-INTRODUCCION.....	4
2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
3.-OBJETIVO GENERAL.....	19
4.-OBJETIVO ESPECIFICO.....	19
5.-HIPOTESIS.....	20
6.-VARIABLES.....	20
7.-PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	21
8.-RESULTADOS.....	25
9.-CONCLUSIONES.....	32
10.-ASPECTOS ETICOS.....	33
11.-BIBLIOGRAFIA.....	34

RESUMEN

UNIONES CELULARES DEL TROFOBLASTO Y ENDOTELIO PLACENTARIO HUMANO.

GARCIA DIAZ MONICA V.. DR. LIEVANO TORRES SAMUEL ALEJANDRO.
Q.F.B. MARIA DE LOURDES ALARCON MONTERA

OBJETIVO caracterizar a la placenta humana a término la expresión de occludina en las uniones estrechas del trofoblasto y el árbol vascular veloso.

MATERIAL Y METODOS Procedimiento experimental se realizó con 3 placentas humanas con embarazo de término provenientes de gestación única resueltos por operación cesárea resultado negativo para VIH y hepatitis B, se fijó el tejido con dos metilbutano y nitrógeno líquido en cortes congelados con protocolo de (González - Mariscal) se utilizó inmunofluorescencia para conocer el grado de localización

RESULTADOS se realizaron observaciones con inmunofluorescencia en microscopio con focal Bio- Rad Mrc -600 con láser criptón argón se analizó la distribución de la proteína en la unión estrecha occludina con los anticuerpos convencionales con verde marcador fluoresceína y los vasos sanguíneos con PECAM con anticuerpo Rodaminado.

CONCLUSIONES el endotelio placentario humano expresa intensamente la proteína de la unión estrecha occludina, se expresa en empalizada, la occludina no se expresa en la unión del sincitiotrofoblasto. La occludina se encuentra solo en vasos de gran calibre y a nivel de la unión celular del endotelio de los vasos de distribución y no en los de intercambio en la placenta humana.

INTRODUCCION

Implantación

La fecundación del óvulo ocurre en los oviductos. El huevo avanza por la trompa y necesita cuatro días para llegar al útero como mórula. En ella se diferencia el blastocisto (blástula), el cual permanece libre por dos o tres días para después implantarse. El blastocisto está constituido por la masa celular interna, que dará origen al embrión, y por el trofoblasto que constituirá la placenta. El trofoblasto se adhiere a la superficie del epitelio endometrial (llamado decidua), y en el sitio de contacto, las células del trofoblasto proliferan formando un tejido constituido por varias capas celulares.

La capacidad invasora del trofoblasto sobre la decidua es crucial ya que determina la fijación del blastocisto al útero, la nutrición del embrión y la calidad de la función endocrina del trofoblasto. Todas estas características son determinantes para el mantenimiento del embarazo.

Once días después de la fecundación, las células del trofoblasto han formado dos capas: 1) el citotrofoblasto (interna), constituido por células individuales o células de Langhans que se caracterizan por tener un núcleo grande y el citoplasma claro y rico en vacuolas, además de glucógeno; y

2) el sincitiotrofoblasto (externa) cuyas células forman un sincitio con múltiples núcleos pequeños y oscuros de forma irregular, dispersos en un citoplasma basófilo con abundante retículo endoplásmico rugoso y numerosas gotas y gránulos lipídicos.

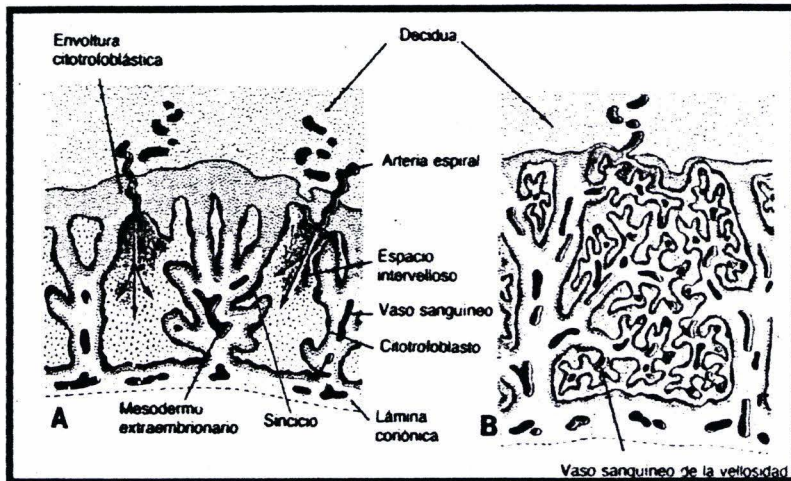


Fig 1 DIVERSAS ETAPAS EN LA MADURACION DE LAS VELLOSIDADES EN "A" VELLOSIDADES DE LA PRIMERA MITAD DEL EMBARAZO, OBSERVESE LAS CAPAS FORMADORAS DE BARRERA. EN "B" VELLOSIDADES DE TERMINO DEL EMBARAZO, OBSERVESE EL ADELGAZAMIENTO DE CAPAS QUE INTEGRAN LA BARRERA HEMOPLACENTARIA

Formación de las vellosidades de la placenta.

A medida que el huevo crece se destruye mas tejido materno y se erosionan las paredes de los capilares deciduales. Esto genera que se formen lagunas de sangre materna que quedan atravesadas por bandas trofoblásticas denominadas vellosidades primitivas de la placenta. Cada vellosidad consiste en un centro de

citotrofoblasto cubierto por una capa irregular de sincitio. Cuando las lagunas de sangre materna forman un complejo laberinto con divisiones de columnas trofoblásticas sólidas, esta región se denomina espacio intervelloso.

Alrededor del día 12 de la fecundación, se observan vellosidades secundarias, en las cuales el trofoblasto sólido está invadido en su porción central por tejido mesinquitomatoso, posiblemente derivado del citotrofoblasto.

Los senos venosos maternos se perforan precozmente pero hasta el día 14 o 15 de la fecundación, no entra sangre materna arterial en el espacio intervelloso.

Alrededor del día 17 los vasos fetales presentes en las vellosidades adquieren capacidad funcional, y la circulación fetal se completa al día 22 cuando los vasos sanguíneos del embrión se conectan con los vasos formados *in situ* por el citotrofoblasto. A partir de este momento las vellosidades se llaman definitivas o terciarias y contienen en su porción central tejido conectivo laxo y células voluminosas (células de Hofbauer) posiblemente fagocitarias, así como un capilar fetal revestido de endotelio.

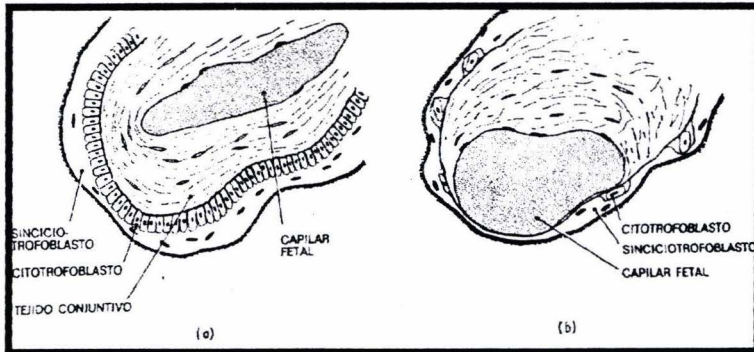


Fig. 2 DETALLE DE LOS DIFERENTES TIPOS CELULARES, EN "a" UNA VELLOSIDAD DE LA 1 RA MITAD DEL EMBARAZO; EN " b" VELLOSIDAD DE LA 2DA MITAD DEL EMBARAZO EN DONDE LA CAPA DEL CITOTROFOBLASTO CASI HA DESAPARECIDO Y EL CAPILAR SE ENCUENTRA EN EL EXTREMO DE LA VELLOSIDAD SOLO CUBIERTO POR SINCICITROFOBLASTO.

Al endometrio que recibe el huevo fecundado se denomina decidua. La porción de decidua directamente debajo del sitio de implantación forma la decidua basal. Por encima del huevo en desarrollo y separándolo del resto de la cavidad uterina se halla la decidua capsular. El resto del útero estará revestido por la decidua parietal.

La decidua basal comprende tres capas: una superficial o zona compacta; una porción media o zona esponjosa, con glándulas y numerosos vasos sanguíneos pequeños; y una zona profunda o zona basal. La compacta y la esponjosa juntas forman la zona funcional.

El corión

Las vellosidades en contacto con la decidua basal proliferan para formar el corión frondoso, mientras que las que están en contacto con la decidua capsular dejan de crecer y degeneran (corión liso):

Algunas vellosidades del corión frondoso se extienden desde la placa coriónica hasta la decidua basal como vellosidad de anclaje. Sin embargo, la mayoría de las vellosidades forman arborescencias y terminan libres en el espacio intervelloso sin alcanzar la decidua. A medida que la placenta madura, las vellosidades se ramifican y forman vellosidades cada vez más finas y numerosas.

Cada una de estas vellosidades troncales principales y sus ramificaciones constituyen un cotiledón fetal.

Las vellosidades troncales muestran hasta 15 ramificaciones. Su ramificación más delgada o distal representa una gran superficie para el intercambio de sustancias nutritivas o metabólicas que con la amplificación adicional de las micro vellosidades en el polo apical del sincitiotrofoblasto hace que la superficie de intercambio se aproxime a los 90 metros cuadrados.

El sincitiotrofoblasto.

El genuino carácter sincitial del sincitiotrofoblasto humano ha sido confirmado por microscopía electrónica (Wislocki y Dempsey 1955). Las microvellosidades prominentes, la superficie sincitial, sus vacuolas y vesículas pinocitóticas están relacionadas con la función de absorción y secreción placentarias.

A la mitad del tercer mes de la gestación, se inicia la desaparición progresiva del citotrofoblasto, esta desaparición es más notoria en las vellosidades menores que en las mayores, hasta que al término del embarazo sólo quedan acúmulos aislados de células.

A medida que progresa el embarazo, el sincitiotrofoblasto muestra grandes variaciones en su grosor. Así, se observan áreas finas anucleadas alternando con otras gruesas que contienen numerosos grupos de núcleos, estas zonas se denominan nudos sincitiales, los cuales pueden desprenderse para quedar libres en la circulación materna.

Los capilares centrales de las vellosidades se apoyan y comprimen a las zonas anucleadas del sincitiotrofoblasto, de forma que la barrera entre la sangre materna y la fetal es un poco mayor de dos μm (similares al pulmón).

Hacia el comienzo del cuarto mes, las únicas capas que separan las circulaciones materna y fetal, son el sincitio y el endotelio de los vasos sanguíneos fetales con sus membranas basales correspondientes, constituyendo esta conjunto a la denominada barrera placentaria. La reducción del número de capas puede traducirse en un paso transplacentario más rápido de sustancias.

Las uniones estrechas.

La característica fundamental de las células epiteliales polarizadas es regular el paso de iones y moléculas entre dos compartimentos biológicos diferentes. Esta función depende de que las células se unan entre sí y que su membrana esté polarizada en dos dominios, estructural, fisiológica y bioquímicamente diferentes (Cereijido *et al* 1989): el apical o luminal, orientado hacia el medio externo, y el basolateral dirigido hacia el compartimento intersticial.

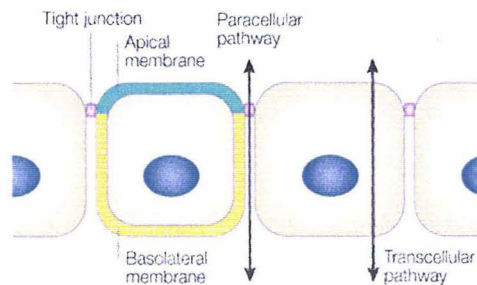


Fig. 3 ESQUEMA QUE EJEMPLIFICA A UN EPITELIO, SE OBSERVA EL DOMINIO APICAL Y BASOLATERAL EN EL LIMITE ENTRE ELLOS, SE ENCUENTRA LA UNION ESTRECHA SIRVIENDO DE COMPUERTA A LA VIA PARACELULAR.

La unión estrecha (UE) se localiza justo en el límite entre las caras apical y basolateral. Actúa como una barrera de difusión que regula el paso de iones y moléculas en el espacio lateral entre célula y célula (ruta paracelular). También participa en el mantenimiento de la polaridad celular al impedir el libre movimiento de lípidos y proteínas en el plano de la membrana desde una cara a la otra (Diamond 1977).

Mediante microscopía electrónica en un corte transversal, la UE se ve como una serie de contactos puntuales de la membrana plasmática, donde las caras externas de la membrana adyacente convergen y se funden, obliterando el espacio intercelular. Por criofractura, la UE aparece como una serie de filamentos en la cara protoplasmática y de surcos en la cara exoplasmática que se entrecruzan formando una red (González-Mariscal *et al*, 2001)

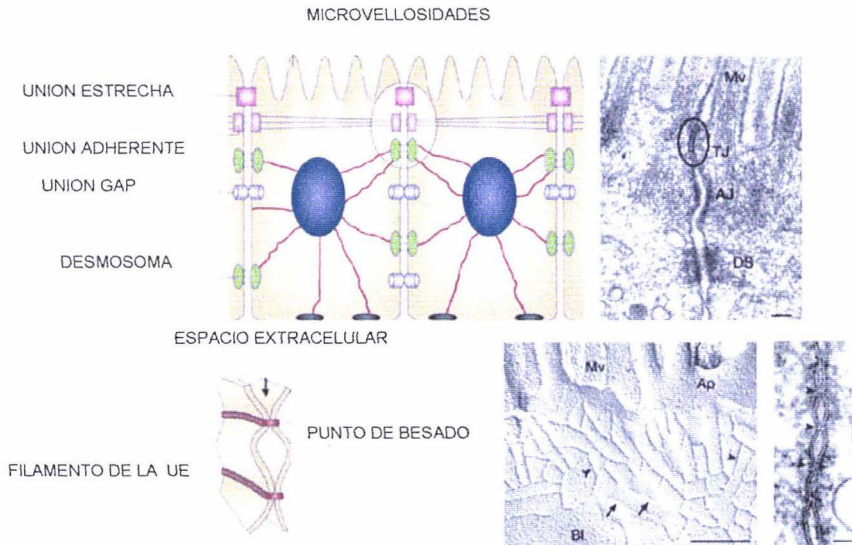


Fig. 4 ESQUEMA DE LAS DIFERENTES UNIONES CELULARES DE UN EPITELIO SOBRE SU LADO DERECHO OBSERSE EN LA PARTE SUPERIOR UNA MICROGRAFÍA ELECTRONICA Y EN LA PARTE INFERIOR UNA MICROSCOPIA ELECTRONICA Y UNA CRIOFRACTURA Mv=MICROVELLOSIDAD AP=APICAL, TJ=UNION ESTRECHA, AJ=UNION ADHERENTE, D=DESMOSOMA, FLECHAS = UNION ESTRECHA

A nivel molecular, la UE posee un dominio extracelular adhesivo (proteínas transmembranales) y un dominio submembranal.

A) Proteínas transmembranales

1.-Occludina. Esta proteína con peso de 65 kDa, es un constituyente de los filamentos de la UE. Tiene cuatro dominios transmembranales y dos dominios extracelulares. La expresión de claudina parece estar relacionada con el nivel de resistencia transepitelial que desarrolla un tejido. Así, en las células endoteliales de cerebro que tienen una elevada resistencia transepitelial, se expresan altos niveles de occludina, en cambio, en las células endoteliales de aorta, que forman UEs con muy baja resistencia, la occludina es casi indetectable (Hirase *et al*, 1996). Así

mismo, en la nefrona del mamífero la expresión de occludina aumenta conforme se incrementa la resistencia eléctrica transepitelial (RET) y la complejidad de la UE de los diferentes segmentos tubulares (González –Mariscal *et al*, 2000). En el caso del árbol vascular placentario se ha observado que la expresión de occludina es intensa en los vasos gruesos y esta ausente en los capilares terminales (Leach *et al* 2000).

2.-Claudinas. Constituyen una familia de mas de 20 diferentes proteínas de 23 kDa. Son parte integral fundamental de los filamentos de la UE. Poseen 4 dominios transmembranales y dos asas extracelulares (Morita K, *et al* 1999). La resistencia al flujo paracelular de un epitelio o endotelio se relaciona tanto con la cantidad de claudina que se expresa, como con el tipo particular de claudinas presentes.

Así se han encontrado claudinas que preferencialmente se expresan en epitelios de alta permeabilidad, como otras que solo aparecen en tejidos de alta resistencia.

3.-JAM (Junctional Adhesion Molecule). Esta molécula atraviesa la membrana una sola vez y expone al dominio extracelular dos repetidos semejantes a las regiones variables de las inmunoglobulinas. La JAM no forma filamentos cuando se transfecta en fibroblastos, por lo que se sospecha que no es parte integral de los filamentos de la UE. Participa en el paso de los leucocitos por la ruta paracelular.

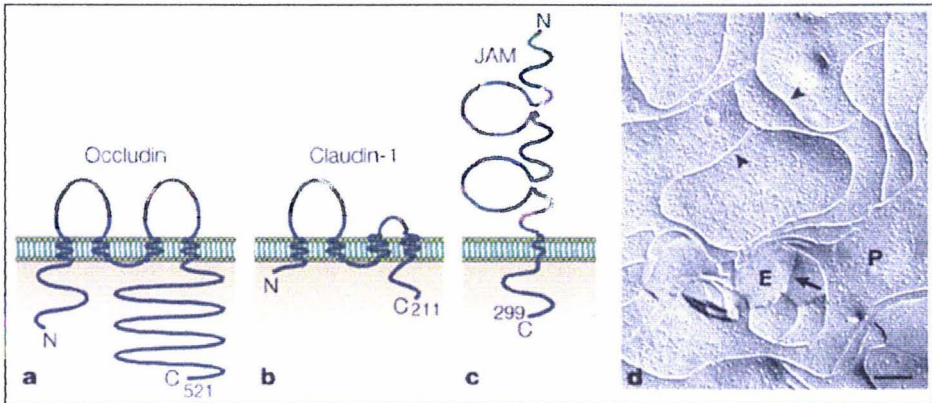


Fig 5 ESQUEMA QUE REPRESENTA LAS DIFERENTES PROTEINAS TRANSMEMBRANALES EN a OCLUDINA b CLAUDINA , c JAM , d SE OBSERVA LA CRIOFRACTURA EN DONDE LA CABEZA DE LA FLECHA REPRESENTA LOS FILAMENTOS DE LA CARA PROTOPLASMATICA Y LA FLECHA LOS SURCOS EN LA CARA EXOPLASMATICA.

B) Proteínas submembranales.

1) - Proteínas ZO (ZO-1,ZO-2 y ZO-3). La proteína ZO-1 fue la primer molécula de la UE en ser identificada. Pertenece junto con las proteínas ZO-2 y ZO-3 a la familia MAGUK. Estas son proteínas con múltiples dominios que funcionan como puentes entre las proteínas integrales de la UE y el citoesqueleto de actina, y como “scaffolds” o andamios a los que se asocian múltiples proteínas tales como cinasas, factores de transcripción, moléculas involucradas en el tránsito vesicular etc. Las proteínas ZO también son cruciales para señalar al núcleo el estado de adhesión que mantiene un epitelio. Esta característica se relaciona con su capacidad para funcionar como supresores tumorales.

2) Otras proteínas que también se localizan en la región cortical de la UE y que por brevedad no se describirán en el presente documento son: Simplekina, Cingulina, Barmotina/7H6, Rab13 y Rab 3B, Afadina / canoe.

La unión estrecha en la placenta humana.

Los microvasos de las vellosidades terminales de la placenta humana poseen numerosas uniones estrechas, las cuales son diferentes a las epiteliales y las de la barrera hematocerebral. Su diferencia radica en que no muestran posición preferente luminal y en cambio se localizan entremezcladas con las uniones adherentes a largo de la ruta paracelular (Leach y Firth, 1992).

La frecuencia y complejidad de la UE en los vasos placentarios depende de su posición anatómica en el árbol vascular (Simionescu y Simionescu 1991). Así, las vénulas postcapilares carecen de UEs, mientras que los grandes vasos contienen conspicuas UE.

Recientemente al estudiar a la occludina, se encontró que esta se encuentra localizada en grandes vasos placentarios. Su presencia se reduce al disminuir el calibre de la vasculatura, hasta que desaparece en la zona de intercambio postcapilar. ZO-1 en cambio, está presente a lo largo de todo el árbol vascular independientemente del calibre del vaso en cuestión.

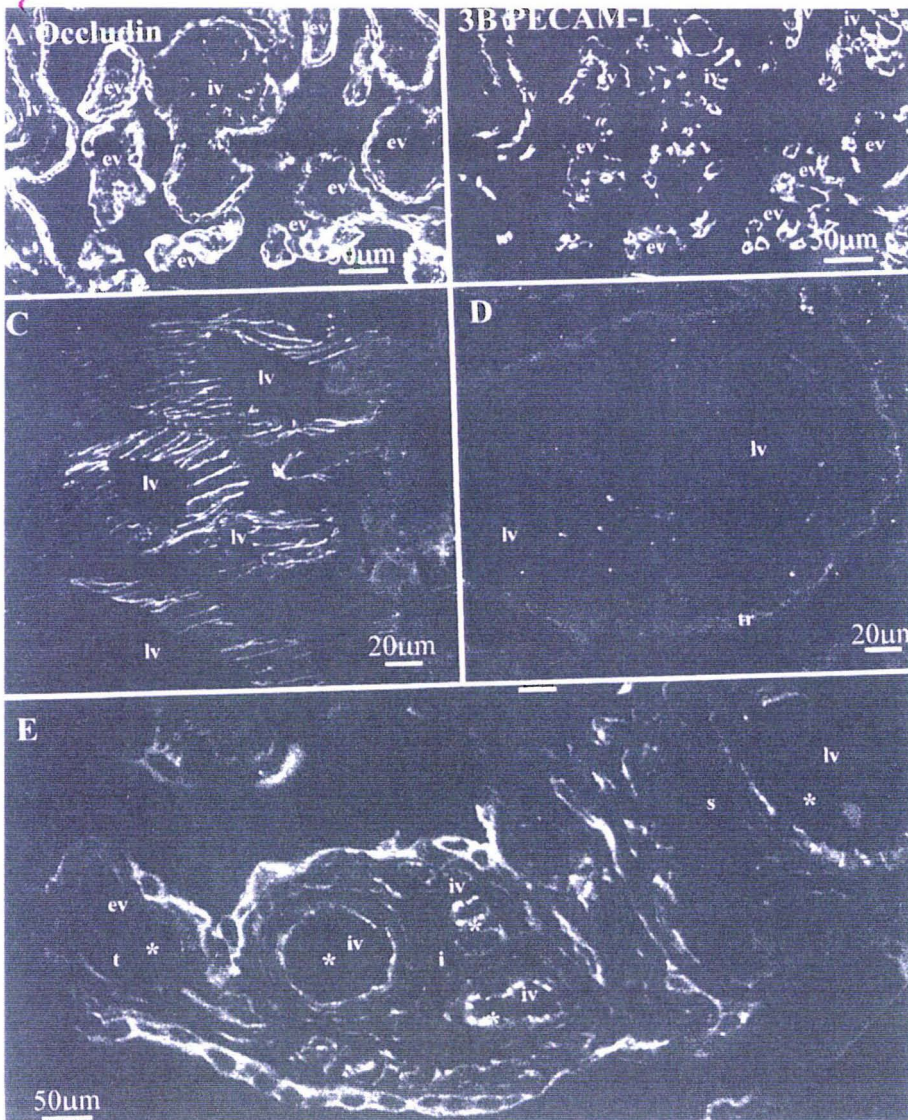


Fig 6 CORTES DE FLUORESCENCIA DE PLACENTAS A TERMINO EN DONDE SE OBSERVA EN "A"= MARCA DE OCLUDINA "iv"=VASOS INTERMEDIOS "ev"= VASOS DE INTERCAMBIO. "B" TINCION CON P-CAM PERMITE IDENTIFICAR TODOS LOS VASOS OBSERVESE EN "ev" , NO SE MARCA LA OCLUDINA, "C" SE OBSERVA MARCA DE EMPALZADA DE VASOS INTERMEDIOS. FIGURA "D" OBSERVESE LA MARCA EN LA EXTREMIDAD DE LA VELLOSIDAD . EN "iv" SIN MARCA DE OCLUDINA . "E" ESPACIO INTERVELLOSO (- Leach L, Lammiman MO, Babawale SA, Hobson B, Bromilou S, Lovat and Simmonds MJR (2000). Placenta, 2, 547-557.)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante el embarazo las vellosidades coriales del trofoblasto desarrollan vasculatura encargada del intercambio de nutrientes, gases y electrolitos entre los lechos sanguíneos maternos presentes en la decidua y el feto. Dicho endotelio posee uniones estrechas (UEs), sin embargo la frecuencia y complejidad de las mismas varían dependiendo de la posición anatómica en el árbol vascular, de tal manera que mientras que las vénulas pos-capilares carecen de UE, los vasos grandes contienen uniones extensas y maduras (Leach *et al* 2000).

Recientemente distintos componentes moleculares de las UEs han sido identificados. Nosotros ahora queremos estudiar si existen estos componentes a lo largo del árbol vascular placentario humano.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar en placenta humana a término la expresión de occludina en las uniones estrechas del trofoblasto y del árbol vascular vellosito.

OBJETIVO ESPECIFICO

Estudiar la presencia de occludina en el árbol vascular veloso de la placenta humana a término.

HIPOTESIS

La porción de intercambio expresa occludina en menor grado (alta permeabilidad), que en la región intermedia (mayor resistencia).

VARIABLES

FLUORESCENCIA. Capacidad de un tejido de emitir luminiscencia.

INDICADOR Presente o Ausente

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Obtención del tejido.

Se realizo con 3 placentas humanas de pacientes sanas con embarazo a término (36 a 40 semanas de edad gestacional), provenientes de gestación única, resueltos por operación cesárea, con resultado negativo para VIH y hepatitis B.

Fijación del tejido

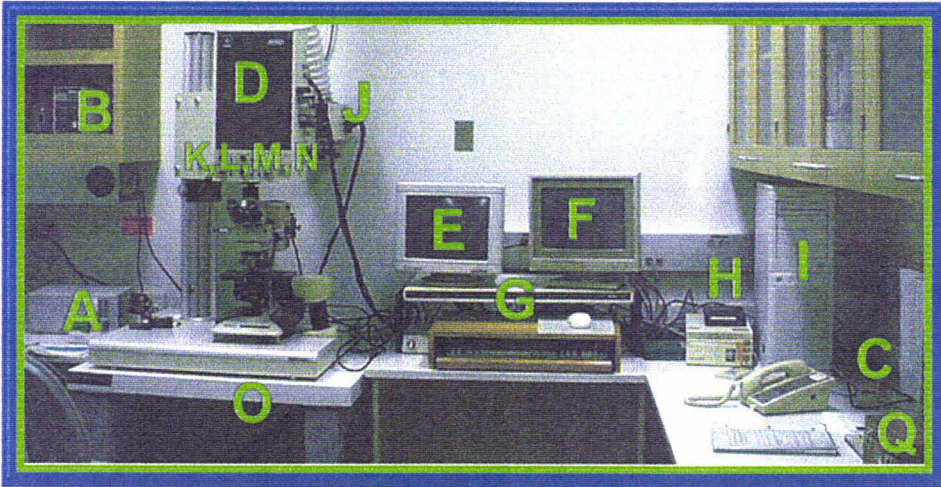
Las biopsias de placenta se tomaron inmediatamente después del nacimiento y pinzamiento del cordón umbilical, a 3 cm de la inserción del cordón umbilical y con dimensiones de 3 x 3 cm, así como otra de 2 x 2 cm en la periferia del disco placentario. Se fijaron por inmersión en 2-metil-butano, por 3 minutos, posteriormente se dejaron en inmersión en nitrógeno líquido por 5 minutos.

Finalmente se procesaron para cortes congelados siguiendo protocolos previamente descritos (González –Mariscal *et al*, 2000).

Inmunofluorescencia

Los cortes congelados de 5 μm de grosor se procesaron para Inmunofluorescencia siguiendo protocolos previamente reportados (González – Mariscal *et al*, 2000). Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: policlonales contra occludina (Zymed 71-1500), PECAM-1 (R&D System, Clone 9G11),

Como segundos anticuerpos se emplearán un policlonal de cabra anti conejo acoplado a fluoresceína (Zymed 65-6111) y un anti ratón acoplado a rodamina (Sigma T-5393). Las observaciones de Inmunofluorescencia se hicieron en un microscopio confocal Bio-Rad MRC-600 con un láser de criptón-argón.



DETALLE DE LAS PARTES CONSTITUTIVAS DE UN MICROSCOPIO CON FOCAL

- A. Fuente de poder del láser
- B. Fuente de poder de la lámpara de mercurio
- C. Toma corriente
- D. Unidad de barrido (cabeza de barrido)
- E. Monitor de imagen de captura
- F. Monitor de imagen del programa
- G. Unidad de control
- H. Unidad de disco Jazz
- I. CPU
- J. Unidad de láser
- K,L,M,N. Controles de contraste
- O. Mesa anti-vibratoria
- Q. Caja de cubos filtros

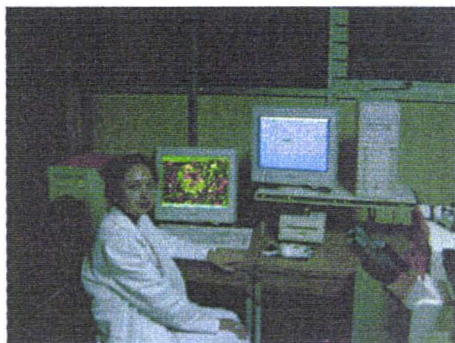
Las observaciones se compararon con análisis de inmunofluorescencia para conocer el grado de localización a través de gráficas de intensidad de fluorescencia, que en este caso contaremos con dos marcadores rojo correspondiente a rhodamina y verde a fluoresceína y color amarillo la coexistencia de los dos.



La microscopia con focal nos permite observar tinciones de inmunofluorescencia a diferentes espesores en un tejido dado.



Una de las ventajas de la utilización de la microscopia con focal es la de proyectarnos los diferentes cortes a diferentes alturas en una sola imagen



Las observaciones de Inmunofluorescencia se hicieron en un microscopio con focal Bio-Rad MRC-600 con un láser de criptón-argón.

RESULTADOS

Posterior al alumbramiento, se procedió a localizar la cara materna de la placenta a 3 cm. de la inserción del cordón umbilical se obtuvo una muestra del tejido placentario de 3cm de longitud por 1 cm. de espesor el tejido se secciono en 2 fragmentos de 1.5 cm. cuadrados. Una porción de tejido se fijo a un fragmento de corcho utilizando una gota de medio congelante para tejido JUNC. Inmediatamente el tejido se sumergió por tres minutos en un recipiente con 2 metilbutano depositado dentro de un recipiente con nitrógeno liquido a -196°C .

Posteriormente se cortaron fragmentos de este tejido en un criotomo con espesor de $5\ \mu\text{m}$ a una temperatura de menos 15°C depositándose los cortes en un portaobjetos previamente gelatinizado. Dichos cortes se procesaron siguiendo protocolos para inmunofluorescencia previamente reportados. (González Mariscal et al kitney int.2000).

Se utilizo anticuerpo monoclonal antioccludina (Zymed 33-1500), PCAM-1 (R D System, clone 9G11) y Pan-Cadherina (Zymed 71-7100). Como segundos anticuerpos se emplearan policlonal de la cabra anti conejo acoplado a fluoresceína (Zymed 656111) y anti ratón acoplado a rodamina (Sigma T-5393).

Las concentraciones utilizadas se detallan en la tabla 1.

TABLA 1. CONCENTRACION DE PRIMER Y SEGUNDO ANTICUERPO ESTANDARIZADO.

Proteína	Concentración Primario	Anticuerpo secundario	Concentración secundario
Occludina	1: 125	Fluoresceína	1 : 100
PECAM	1: 500	Fluoresceína Rhodamina	1 : 100

Las observaciones de inmunofluorescencia se hicieron en un microscopio con focal Bio-Rad MRC -600 con un láser de criptón -argón.

Se estudiaron 3 placentas de embarazos normales observándose en cortes de 5mcs de grosor, procedimos analizar la distribución de la proteína de la unión estrecha occludina con los anticuerpos comerciales mencionados a anteriormente la localización de occludina en la unión estrecha (verde), se aprecia con un marcador de fluoreseina, la luz de los vasos sanguíneos se localizaron con PECAM marcado con un anticuerpo secundario Rodaminado (rojo).

La observación de muestras al microscopio Confocal se ilustra en las diferentes figuras que a continuación se marcan:

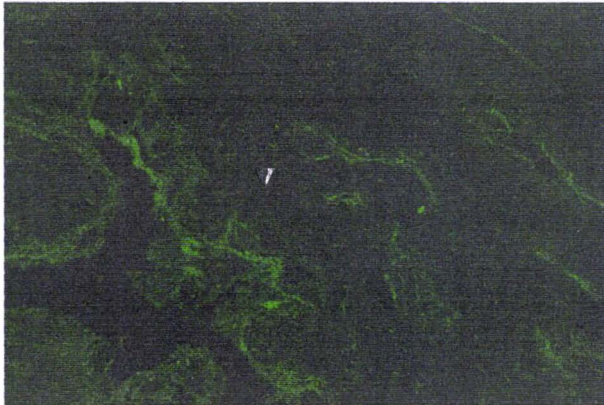


FIGURA A: Occludina con marca de Fluoresceína

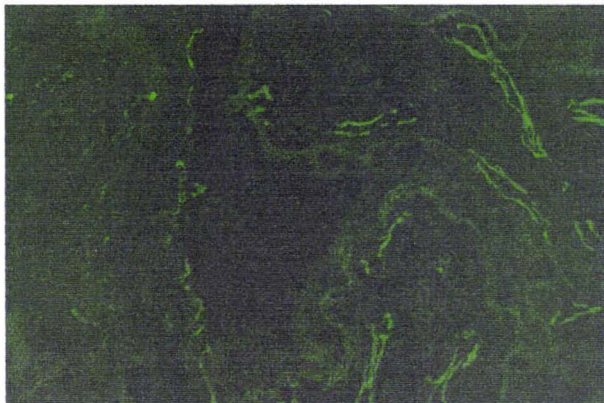


Figura B: PECAM con marca de fluoresceína.

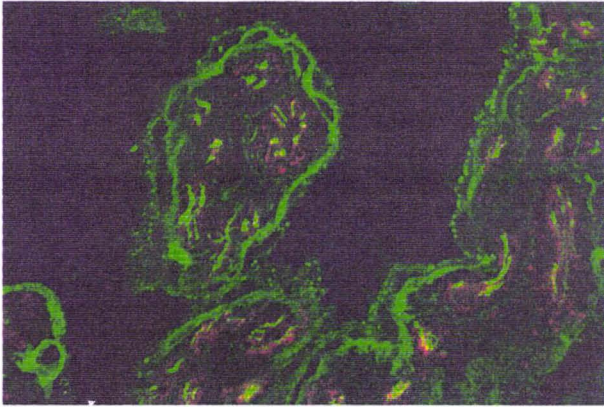


Figura C: Occludina y PECAM.

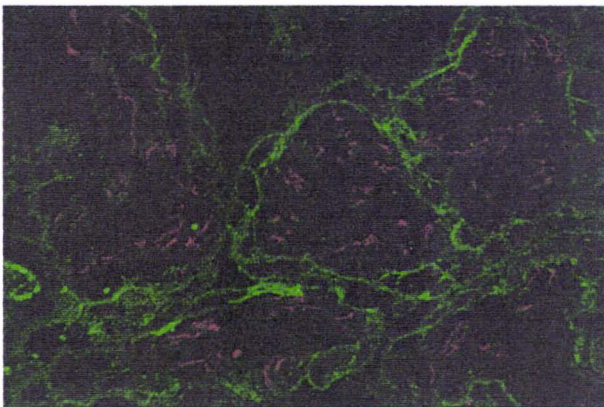


Figura D: Occludina y Pan-Cadherina

El papel de la occludina en la hermeticidad de las uniones estrechas resulta controversial. Saitou en 2000 demostró al analizar ratones *Kncot out* a occludina que la presencia de esta proteína no es necesaria para la formación de uniones estrechas funcionales.

Por otro lado en el epitelio estratificado en la piel de ratón se demostró por FURUSE en el año 2002 que el paso de sustancias de la ruta paracelular se regula justamente donde se localiza la occludina con la claudina 1, lo que nos lleva a pensar que es necesario las 2 proteínas para que las uniones estrechas sean funcionales.

La tinción de occludina en las células endoteliales de la placenta en un embarazo normal da un típico patrón de empalizada como ha sido descrito por LEACH 2000, lo que corroboramos en el presente estudio (Fig.7)

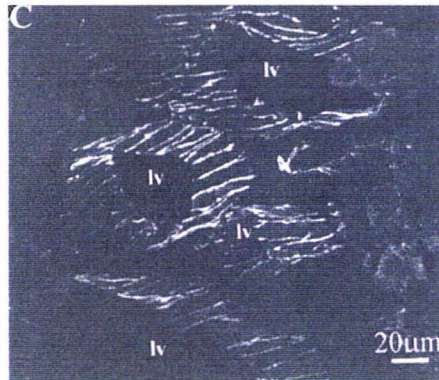


Fig 7. La occludina da un típico patrón de empalizada en los vasos de la placenta normal.

CONCLUSIONES

- 1.- El endotelio placentario humano expresa intensamente a la proteína de la unión estrecha llamada occludina
- 2.- El patrón de expresión de la occludina en los vasos placentarios normales es el de empalizada.
- 3.- La occludina no se expresa en la unión celulares del sincitiotrofoblasto,
- 4.- La occludina se encuentra solo en vasos de gran calibre en las vellosidades de la placenta humana.
- 5.- La occludina solo se encuentra en la unión celular del endotelio de vasos de distribución y no en los de intercambio en la placenta humana.

ASPECTOS ÉTICOS

Se obtuvo consentimiento informado por escrito de las pacientes de las que se tomaron las biopsias de placenta.

Se realizaron análisis de VIH y Hepatitis B previa a la obtención de las muestras a las pacientes candidatas.

En todo momento se guardó confidencialidad de la identidad de las pacientes donadoras de tejido placentario y de los resultados de los análisis practicados.

El trabajo se condujo de acuerdo al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud y con la Declaración de Helsinki de 1975 y sus modificaciones en Tokio y Venecia en 1989

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Leach L, Lammiman MO, Babawale SA, Hobson B, Bromilou S, Lovat and Simmonds MJR (2000). Placenta, 2, 547-557.
- 2.- Wislocki GB, Dempsey EW .(1955). Electron microscopy of the human placenta .Anat Rec 123:133
- 3.- Roberts J M (1989) Preeclampsia:an endothelial cell disorder .Am J Obstet Gynecol 161,1200-1204.
- 4.-Scott J S (1958). Pregnancy Toxaemia associated with hidrops faetaly,hidatiform mole and hydramnios.J Obstet Gynaecol Br Empire 65,689-701.
- 5.- MacLennan A H, Sharp R, Shaw-Dunn J. (1972) The ultrastructure of human trophoblast in spontaneous and induced hypoxia using a system of organ culture. J Obstet Gynaecol Br Common 79, 113-121.
- 6.- Attwood H D, Park W W (1961) Embolism to the lungs by trophoblast. J Obstet Gynaecol Br Common 68, 611-617.
- 7.- Chua S. (1991) Trophoblast deportation in pre-eclampsie pregnancy. Br J Obstet Gynecol 98, 973-979.
- 8.- Cereijido M, Contreras RG, González-Mariscal L. (1989 a). Development and alteration of polarity. An Rev Physiol. 51:785-795
- 9.- Diamond J.1977 The epithelial tight junction: bridge, gate and fence. Phisycologist 20:10-18
- 10.-González–Mariscal L, Avila A and Betanzos A. (2001). The relationship between structure and function of tight junctions. In "Tight junctions" Ed.Anderson J M, and Cereijido M. CRC press. Boca Raton, Florida.

- 11.-Hirase T, Staddon J M, Saitou M, Furuse M, Tsukita SH and Rubin L L. (1996). Occludin in endothelial cells. *Mol Biol Cell Suppl.*7:605^a.
- 12.- González-Mariscal L, Namorado MC, Martín D, Luna J, Alarcon L, Islas S, Valencia L, Muriel P, Ponce L and Reyes JL (2000). Tight junctions proteins ZO-1, ZO-2 and occludin along isolated renal tubules. *Kidney Int.* 57:2386-2402.
- 13.- Morita K, Furuse M, Fujimoto K and Tsukita S (1999). Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 511-516.
- 14.- Leach L and Firth JA (1992) Fine structure of paracellular junctions of terminal villous capillaries in the perfused human placenta. *Cell Tissue Res.* 268, 447-452.
- 15.- Simionescu M y Simionescu (1991) Endothelial transport of macromolecules:transcytosis y endocytosis. *Cell Biol Rev* 25 1 –80.

HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

UNIONES CELULARES DEL TROFOBlasto Y EL ENDOTELIO
PLACENTARIO HUMANO.

Clave del caso	Nombre del paciente	VIH+HEPATITIS	OCCLUDINA*		PECAM		PanCatherina	
			(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)

*Anotar grosor de corte y tiempos de incubación de anticuerpos.

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**UNIONES CELULARES DEL TROFOBLASTO Y EL ENDOTELIO
PLACENTARIO HUMANO.**

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

YO..... he sido informada,
de mi
participación en el proyecto de investigación UNIONES CELULARES DEL
TROFOBLASTO Y EL ENDOTELIO PLACENTARIO HUMANO, estoy conciente
de que donare la placenta de mi embarazo para su estudio y se me realizara un
estudio de sangre para detectar (VIH) virus de inmunodeficiencia humana así
como hepatitis B, se me ha asegurado que los datos obtenidos de mis estudios en
sangre serán guardados confidencialmente y solo serán revelados a mi persona.

Se me ha asegurado que en cualquier momento puedo retirarme del estudio sin
que sufra alguna reprimenda, represalia o que se me niegue el servicio.

Los autores del proyecto, se comprometen a guardar en todo momento el
anonimato de los participantes donantes del estudio.

.....
Firma del participante de aceptación

.....
Nombre y firma del testigo

.....
Nombre y firma del testigo

Centro Medico La Raza a.....de.....del 2004.