



Ministerio
de Educación
y Cultura

iibce
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOLÓGICAS CLEMENTE ESTABLE



**Tesina para optar por el grado de
Licenciada en Ciencias Biológicas**

Opción Fisiología y Nutrición

Facultad de Ciencias, Universidad de la República

**CORDÓN UMBILICAL HUMANO Y SU INERVACIÓN.
REPERCUSIONES DE LA EXPOSICIÓN PRENATAL
A COCAÍNA.**

Estudiante: Sofía Stanley

Departamento de Neurofarmacología Experimental
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE)

Orientadora: Dra. Analía Richeri

Co-Orientadora: Dra. Cecilia Scorza

Mayo, 2021
Montevideo, Uruguay

TABLA DE CONTENIDO

1. Resumen

2. Introducción

2.1. Cordón umbilical humano

2.2. Circulación feto-placentaria e intercambio de oxígeno y nutrientes entre la madre y el feto

2.3. Mecanismos de regulación de la contracción de los vasos umbilicales

2.4. Inervación de los vasos del CU

2.5. Cocaína, consumo durante el embarazo y sus repercusiones sobre el feto

3. Hipótesis de trabajo

4. Objetivos

4.1 Evaluar si el CU de neonatos de madres que hayan cursado embarazos saludables está inervado. Analizar el patrón de inervación.

4.2 Evaluar el patrón y la densidad de inervación del CU de neonatos de madres gestantes consumidoras de cocaína, comparándolo con la inervación del CU de embarazos saludables.

4.3 Analizar determinadas variables maternas (edad, peso, talla, IMC) de las donantes de CU.

4.4 Analizar si el perfil de inervación del CU se asocia con presentaciones clínicas del RN (RCIU, BPN, PEG y PT).

5. Materiales y Métodos

5.1. Poblaciones de estudio y procedimiento de anonimización

5.2. Procedimiento de obtención de las muestras de los CUs

5.3. Procesamiento y obtención de cortes histológicos de las muestras de CU

5.4. Técnicas de inmunofluorescencia y de tinción con hematoxilina y eosina de criocortes de CU

5.5. Microscopía y análisis de imágenes

5.6. Caracterización y cuantificación de la presencia de fibras nerviosas

5.7. Análisis de medidas antropométricas del RN y de la madre

5.8. Análisis estadístico

6. Resultados

6.1. Inervación del CU de neonatos de embarazos saludables

6.2. Inervación del CU de neonatos de madres consumidoras de cocaína

6.3. Datos maternos de las donantes de CU

6.4. Análisis de las presentaciones clínicas del RN y su asociación con el perfil de inervación del CU:

6.4.1. Edad gestacional e inervación del CU

6.4.2. Datos antropométricos del RN e inervación del CU

7. Discusión

7.1. Inervación del CU humano: la importancia del patrón de inervación

7.2. Inervación del CU de neonatos de madres consumidoras de cocaína

7.3. Densidad de inervación del CU de RNs de madres saludables vs CU de RNs de madres gestantes consumidoras de cocaína

7.4. Datos maternos de las donantes de CU

7.5. Presentaciones clínicas de los RNs de madres consumidoras de cocaína y su asociación con el perfil de inervación del CU

8. Limitaciones, principales conclusiones y perspectivas

9. Bibliografía

1. Resumen

El cordón umbilical (CU) contiene los vasos sanguíneos responsables del intercambio de nutrientes y oxígeno entre la placenta y el feto, posibilitando un desarrollo normal del embarazo. Se reporta que el consumo de drogas de abuso, como la cocaína, incide en variables como la restricción del crecimiento intrauterino, bajo peso al nacer, niños pequeños para su edad gestacional y partos pre-término. El efecto vasoconstrictor provocado por la acción simpaticomimética de la cocaína reduciría el flujo sanguíneo hacia el feto, explicando, en parte, dichas manifestaciones clínicas. Hasta el momento, algunos estudios reportan el perfil de inervación del CU en embarazos saludables, demostrando únicamente fibras en el sector proximal al feto. Mientras que este dato es controversial, no existen estudios que demuestren la inervación del CU en mujeres gestantes consumidoras de cocaína.

En este trabajo, evaluamos la influencia del consumo de cocaína sobre la inervación del CU y su asociación con las repercusiones clínicas mencionadas.

Estudiamos la inervación del CU de neonatos cuyas madres fueron asistidas en la Maternidad del Hospital de Clínicas. Los grupos de análisis fueron: (A) Madres sanas: no consumidoras, sin patologías pregestacionales ni gestacionales, y (B) Madres consumidoras de cocaína: determinado por entrevista y/o estudio de drogas en orina, según consentimiento informado firmado. Cada CU fue extraído al momento del parto o cesárea, muestreado en 3 sectores: proximal (CU-P), medio (CU-M) y distal (CU-D) al recién nacido y procesados para ser cortados a congelación. Las fibras nerviosas fueron valoradas mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos contra PGP 9.5 (marcador pan-neuronal de fibras nerviosas autónomas y sensoriales) y TH (tirosina hidroxilasa, marcador específico de fibras simpáticas, noradrenérgicas).

La evaluación de las muestras procesadas demostró la presencia de fibras nerviosas inmunorreactivas para PGP 9.5 (PGP-IR) en el sector del CU-P al recién nacido, en todos los cordones umbilicales estudiados; mientras que no se detectaron fibras PGP-IR en los sectores mediales y distales de los CUs analizados. Estas fibras se observaron principalmente alrededor de los vasos sanguíneos. Una subpoblación de dichas fibras mostró inmunoreactividad para TH (TH-IR), lo cual sugiere el marcado de fibras simpáticas.

En las muestras de CU analizadas durante esta pasantía, pudimos observar que una subpoblación de recién nacidos del grupo Cocaína tenía un área nerviosa PGP-IR exacerbada alrededor de las arterias, con respecto al grupo Control. En línea con nuestra hipótesis, mostramos que en esta subpoblación el área nerviosa TH-IR en los vasos sanguíneos del cordón umbilical también era elevada. En la gelatina de

Wharton, tejido conjuntivo mucoso que rodea los vasos sanguíneos del CU, la densidad de inervación observada tendió a ser mayor en el grupo Cocaína que en el grupo Control.

En conjunto, estos hallazgos sugieren que podrían existir cambios en la densidad de inervación del CU tras el consumo crónico de cocaína durante el embarazo.

Encontramos una disminución en el peso de los RNs de madres consumidoras de cocaína, así como un impacto en la prematurez, resultando en su mayoría neonatos prematuros o en el límite de la prematurez.

Si bien estos hallazgos deben interpretarse con cautela debido a que el abuso de cocaína puede estar acompañado de muchos otros factores de riesgo, los resultados del presente estudio aportan conocimiento respecto a potenciales mecanismos responsables que podrían estar provocando cambios en la resistencia vascular del CU, como consecuencia del consumo de cocaína, y sugiriendo entonces que podría existir un control neural de la vasoconstricción. Los resultados del trabajo en conjunto con investigaciones actualmente en curso apoyan la idea de que la inervación alrededor de los vasos umbilicales podría estar involucrada en la regulación del flujo fetoplacentario y contribuir a las manifestaciones clínicas con mayor incidencia en los RNs de madres consumidoras de cocaína.

2. Introducción

2.1. Cordón umbilical humano

El cordón umbilical (CU) humano tiene como principal función viabilizar el intercambio respiratorio y nutricional entre la placenta y el feto. El intercambio de oxígeno y nutrientes se realiza a través de vasos sanguíneos (dos arterias y una vena) (Fig. 1) inmersos en la gelatina de Wharton (1, 2). El CU se desarrolla a partir del mesodermo en un período temprano del desarrollo embrionario y es encapsulado por la membrana amniótica (1). Mide aproximadamente cincuenta centímetros de largo y se puede dividir en tres sectores: proximal al feto, medio y distal al feto (placentario) (3).



Figura 1. El recuadro indica la región placentaria del cordón umbilical humano. A la izquierda se esquematiza a mayor aumento. En azul y rojo se muestran las dos arterias y la vena. Las flechas negras muestran el espacio intervelloso de la placenta. Tomado de Wang y Zhao, 2010.

2.2. Circulación feto-placentaria e intercambio de oxígeno y nutrientes entre la madre y el feto

La sangre oxigenada llega al feto desde la placenta a través de la vena umbilical. La sangre fetal desoxigenada y empobrecida en nutrientes viaja a través de las arterias umbilicales desde el feto hasta la placenta (Fig. 1). La placenta es un órgano vascular único que recibe aporte sanguíneo tanto del sistema fetal como del materno y, por lo tanto, tiene dos sistemas circulatorios separados. Presenta una circulación sanguínea materno-placentaria (útero-placentaria) y una circulación feto-placentaria (4).

El intercambio de oxígeno y nutrientes se da cuando la sangre materna fluye alrededor de las vellosidades terminales que contienen los vasos sanguíneos del feto. Esto ocurre en lo que se denomina el espacio intervelloso de la placenta (flechas negras; Fig. 1), el cual es una gran laguna sanguínea. Las vellosidades están separadas de los

espacios intervellosos por la membrana placentaria de tal manera que solo ciertos componentes de la sangre materna y fetal se entremezclan. La sangre arterial materna que fluye hacia el espacio intervelloso, empuja la sangre desoxigenada hacia el endometrio y luego a las venas uterinas de regreso a la circulación materna (4).

La circulación feto-placentaria permite que luego del intercambio de oxígeno y nutrientes, la vena umbilical transporte sangre oxigenada y rica en nutrientes de regreso a la circulación sistémica fetal (4) (Fig. 1). La circulación de la sangre a través del cordón umbilical es fundamental para preservar el bienestar fetal y cualquier incidente que comprometa el flujo sanguíneo a través del cordón podría ser nocivo para el feto.

Es de relevancia entonces conocer los mecanismos de regulación de la contractilidad de los vasos umbilicales, ya que estos son los que regulan el pasaje sanguíneo para la nutrición fetal, su oxigenación y eliminación de desechos.

2.3. Mecanismos de regulación de la contracción de los vasos umbilicales

Los vasos umbilicales son sensibles a varias sustancias vasoactivas, que son liberadas localmente o están presentes en la circulación, y que regulan la contracción de las células de músculo liso de las arterias y venas umbilicales (4). Entre ellas se encuentran la serotonina, la histamina, la endotelina 1, la prostaglandina F_{2α}, e iones como el calcio y el potasio (5, 6, 7, 8). El agente vasoconstrictor más potente de la arteria umbilical es la serotonina, siendo responsable del cierre fisiológico de la arteria umbilical después del parto. Los vasos umbilicales también producen vasodilatadores. Por ejemplo, estudios in vitro indican que el endotelio de la vena umbilical (HUVEC, del inglés *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) produce más prostaglandinas que el endotelio de las arterias del CU (HUAECs) (4). Se reporta además, que la síntesis y producción de prostaciclina (PGI₂) y de prostaglandina E₂ (PGE₂) por parte de las HUVECs es significativamente menor en madres gestantes fumadoras y diabéticas en comparación a madres gestantes sanas. Ambas, la PGI₂ y la PGE₂ son potentes vasodilatadores e inhiben la agregación plaquetaria. Asimismo, las células del músculo liso de las arterias umbilicales también expresan receptores para serotonina e histamina que llevan a la relajación vascular (5).

Otra vía de regulación del tono vascular en el cordón umbilical podría darse a través de la inervación de los vasos umbilicales. En este sentido, existen escasos estudios que caractericen la inervación del CU.

2.4. Inervación de los vasos del CU

En términos generales, los vasos sanguíneos se encuentran revestidos en su interior (lumen) por células endoteliales que se encuentran rodeadas por células de músculo liso, que a su vez las cubre una capa adventicia, la cual suele contener una red de nervios perivasculares. Estas fibras nerviosas consisten típicamente en axones eferentes del sistema nervioso simpático que pueden co-existir con axones sensoriales, y en algunos casos con axones del sistema parasimpático (9, 10). Cada fuente de inervación puede modular la función vasomotora a través de múltiples vías de señalización, liberando sus respectivos neurotransmisores y co-neurotransmisores, adrenérgicos, colinérgicos, peptidérgicos, nitrérgicos y purinérgicos, que conducen en última instancia a la contracción o relajación de las células del músculo liso (10). Las señales vasoactivas que se originan en los nervios sensoriales y simpáticos perivasculares se integran con señales derivadas del endotelio para producir vasodilatación o vasoconstricción. Por lo general, la activación de los nervios perivasculares simpáticos causa vasoconstricción, mientras que la activación de los nervios perivasculares sensoriales o parasimpáticos causa vasodilatación (10).

La inervación de los vasos sanguíneos varía entre las especies y son escasos los estudios en humanos. Para el caso particular de los vasos del CU, algunas investigaciones de hace dos décadas, indican que el CU humano está inervado en el sector proximal fetal, careciendo de fibras en los otros sectores (3, 11). Se reporta la presencia de fibras nerviosas simpáticas, que utilizan como neurotransmisor principal a la noradrenalina, así como de péptidos vasoactivos, alrededor de los vasos sanguíneos del CU, específicamente en la porción proximal al feto (3). En particular, los autores de dichas investigaciones, describieron que en el lado fetal del CU las fibras positivas para el Péptido Relacionado con el Gen de la Calcitonina (CGRP) y para Tirosina Hidroxilasa (TH) se distribuyen principalmente en la superficie externa de la capa de músculo liso de la arteria umbilical. Asimismo, se detectaron fibras CGRP- y TH-IR en el margen de la gelatina de Wharton. Sin embargo, no se observaron fibras nerviosas alrededor de la vena umbilical ni en la parte media o en el lado placentario del CU (3).

A pesar de las evidencias mencionadas, existen revisiones de literatura actuales que contradicen la existencia de inervación perivascular en el CU (5, 6, 7, 8). Al día de hoy, entonces, persiste la interrogante de si existe inervación en el CU humano, por lo que surgió la necesidad de investigar, en primer lugar, dicha variable, dado que esta podría estar contribuyendo a la regulación del flujo sanguíneo feto-placentario.

2.5. Cocaína, consumo durante el embarazo y sus repercusiones sobre el feto

El uso y abuso de drogas ilícitas durante el embarazo ha recibido una creciente atención en los últimos años, especialmente en la salud pública de nuestro país, debido a que es un fenómeno que aumenta significativamente los riesgos en la salud tanto del feto como de la madre (12, 13). En particular, el consumo de cocaína durante el embarazo representa una problemática no sólo a nivel nacional sino también a nivel mundial (12, 13, 14).

La cocaína (en forma de clorhidrato, pasta base o crack) es un psicoestimulante, con alto poder adictivo, cuya acción principal se conoce sobre el sistema nervioso central (SNC). Su mecanismo de acción involucra la alteración en la neurotransmisión de los neurotransmisores monoaminérgicos, tales como, dopamina, noradrenalina y serotonina tanto a nivel del SNC como del sistema nervioso periférico (SNP). Esta droga bloquea la proteína transportadora encargada de la re-captación pre-sináptica de estos neurotransmisores (DAT para dopamina, NAT para noradrenalina y SERT para serotonina), generando un aumento en la transmisión neuroquímica de las monoaminas (15). Se define además como una droga simpaticomimética, es decir, en el caso de las fibras nerviosas simpáticas, la cocaína actúa bloqueando NAT, aumentando la transmisión noradrenérgica (16).

No hay consenso sobre los efectos de la exposición prenatal a la cocaína y malformaciones congénitas (14). Algunos estudios reportan que, durante el período fetal, después de que se completa el desarrollo estructural mayor, la cocaína, así como también otras drogas de abuso, pueden provocar alteraciones en el crecimiento y/o maduración, cambios en los neurotransmisores y sus receptores, y en la organización del cerebro fetal (13). Sin embargo, existen estudios que no han encontrado correlación directa entre el consumo de cocaína base fumable (también conocida como pasta base de cocaína) y una mayor incidencia de malformaciones congénitas (17). Asimismo, se reporta que el desarrollo de áreas del cerebro que regulan la atención y el funcionamiento ejecutivo es particularmente vulnerable a la cocaína. Por lo tanto, funciones como la excitación, la atención y la memoria en la primera infancia, pueden verse afectadas negativamente por la exposición prenatal a esta droga (13, 18, 19). Estos efectos dependen de la dosis, etapa embrio-fetal y consumo de otras drogas asociadas, pudiendo ser reversibles o no, en función de estos factores mencionados (18).

La cocaína además de tener efectos directos, puede impactar en el desarrollo del feto indirectamente a través de trastornos vasculares maternos. De particular interés para el presente proyecto, es el hecho de que la cocaína provoca hipertensión materna, vasoconstricción fetal, y disminución de la circulación uterina, comprometiendo el intercambio de nutrientes y oxígeno con el feto (14, 18). Durante el embarazo se incrementa de forma considerable la circulación uterina, favoreciendo el adecuado crecimiento fetal. Algunas patologías o el consumo de drogas de abuso en forma crónica, implican mecanismos de vasoconstricción (20, 21). La cocaína, una vez consumida, es transportada a la placenta elevando los niveles circulantes de monoaminas (dopamina, noradrenalina y adrenalina), las cuales producen vasoconstricción y aumentan la contractilidad uterina (12). Este predominio en el tono vasoconstrictor inducido por el consumo de cocaína reduce el flujo sanguíneo hacia el feto. La inervación simpática de los vasos sanguíneos posee un rol clave en regular la presión arterial y el flujo sanguíneo en respuesta al ambiente (22, 23, 24).

Específicamente, el abuso materno de cocaína se ha asociado con una serie de resultados adversos en el embarazo, incluido el parto prematuro, la ruptura prematura de membranas y otros síndromes relacionados con la placenta, tales como el desprendimiento de la placenta, infarto de placenta, además de la pre-eclampsia (13, 18, 25, 26).

Existen evidencias respecto de los hijos recién nacidos (RN) de las usuarias de esta droga, que muestran un menor peso, talla y circunferencia craneal al nacer. Sin embargo, estas manifestaciones clínicas también se asocian a factores de riesgo sociales como la pobreza, el estrés, la depresión y malnutrición, entre otros (18). También se ha reportado una asociación entre el consumo de cocaína y la restricción del crecimiento intrauterino (RCIU), que conduce a un bajo peso al nacer (BPN) y niños pequeños para la edad gestacional (PEG) (19). El niño PEG es un recién nacido que presenta una longitud y/o peso al nacimiento menor a 2 DE o de percentil 3 (P3) para su edad gestacional (percentiles normales 3-97). La RCIU implica una disminución en la velocidad de crecimiento del feto, no alcanzando su total potencial desarrollo genético. En esta situación, el peso al nacer se considera independiente de los límites de la normalidad para sus estándares poblacionales. Sin embargo, el PEG es un concepto estático que utiliza el peso y/o talla en el momento del nacimiento. Se hace más notoria la diferencia con el niño pretérmino (PT) y con el recién nacido de bajo peso (peso al nacimiento menor a 2.500 g) (26, 27). El RN prematuro nace antes de completar la semana 37 de gestación. Se clasifican según la OMS, en: prematuros

tardíos (34-36 semanas + 6 días); prematuros moderados (32-33 semanas + 6 días); muy prematuros (28-31 semanas + 6 días) y prematuros extremos (\leq 27 semanas + 6 días) (19, 27, 28).

Cabe destacar que estas presentaciones clínicas mencionadas, han estado generalmente asociadas con múltiples causas. Sin embargo, hasta nuestro conocimiento, no se ha tenido en cuenta que el perfil de inervación del CU podría estar alterado en madres consumidoras de cocaína, factor que podría estar vinculado a los cambios en la circulación del flujo sanguíneo en los vasos del CU, alterando el flujo feto-placentario y así contribuir a explicar las presentaciones clínicas observadas. En este sentido, se sabe además que el uso de cocaína puede provocar un cambio en la resistencia vascular del CU, aunque no se conocen los mecanismos responsables.

Nos propusimos entonces estudiar el estado de inervación de los vasos sanguíneos en CUs de neonatos de madres consumidoras de cocaína, y compararlo con CUs de neonatos de madres que hayan cursado gestaciones sanas, con el fin de evaluar si el aumento del tono vascular (vasoconstricción) que compromete el aporte de oxígeno y nutrientes al feto, así como la eliminación de sus desechos, podría estar sujeto a un control neural.

3. Hipótesis de trabajo

El consumo de cocaína induce cambios en la inervación de los vasos sanguíneos del CU de neonatos de madres consumidoras, efecto que podría asociarse a las complicaciones clínicas del recién nacido.

4. Objetivos

El **objetivo general del proyecto** es evaluar el perfil de inervación de CUs provenientes de madres consumidoras de cocaína con el fin de aportar una variable biológica que podría colaborar en explicar las complicaciones clínicas del RN.

Objetivos específicos:

4.1) Evaluar si el CU de neonatos de madres sanas que hayan cursado embarazos saludables está inervado. Analizar el patrón de inervación.

4.2) Evaluar el patrón y la densidad de inervación del CU de neonatos de madres gestantes consumidoras de cocaína, comparándolo con la inervación del CU de embarazos saludables.

4.3) Analizar determinadas variables maternas (edad, peso, talla, IMC) de las donantes de CU.

4.4) Analizar si el perfil de inervación del CU se asocia con presentaciones clínicas del RN (RCIU, BPN, PEG y PT).

5. Materiales y métodos

Se estudió la invasión de los CU provenientes de madres de entre 16 y 42 años, ingresadas en el Hospital de Clínicas “Dr. Manuel Quintela” (HC); Departamento de Neonatología. La captación de la paciente, la información brindada a la misma, la autorización firmada por madre, padre/tutor y la obtención de las muestras fueron coordinadas y ejecutadas por la Dra. Viettro (Posgrado del Depto. de Neonatología - Piso 16-HC).

El consentimiento informado firmado por las donantes fue aprobado por el Instituto Nacional de Donación y Trasplante de órganos, células y tejidos (INDT), en el marco del proyecto de investigación FVF del Laboratorio en donde se realizó la pasantía.

Número de muestras: N=13 cordones umbilicales (3 sectores por cada cordón); cada sector de cada cordón fue a su vez muestreado en 4 trozos. Total= 156 muestras.

5.1. Poblaciones de estudio y procedimiento de anonimización

(A) Madres Sanas (N=6, grupo Control): no consumidoras, sin patologías pre-gestacionales ni gestacionales, con embarazos bien controlados y paraclínica infectológica (HIV-VDRLHepB - Toxoplasmosis) negativa.

(B) Madres Consumidoras de Cocaína (N=7, grupo Cocaína): determinado por entrevista estructurada, dado que es el único método en que la información puede obtenerse con respecto al tiempo (13).

Los datos de la madre y el RN que se asociaron con la invasión del CU fueron extraídos del Sistema Informático Perinatal (SIP), SIP-CLAP. Esta información fue recabada con el consentimiento de las madres que accedieron a participar del proyecto, de modo de corroborar las diferentes variables de la madre durante la gestación, información fundamental para la clasificación de las muestras y la realización de los análisis morfométricos.

Todos los datos fueron sometidos a un procedimiento de anonimización: Se le asignó un número de identificación al consentimiento informado firmado y al SIP, identificando el año en que fue tomada la muestra y el número de muestra en orden secuencial según fueron recibidas en el Instituto (año/n° CU) (ej. 19/01, 19/02.....19/19).

5.2. Procedimiento de obtención de las muestras de los CUs

Previo a la toma de la muestra, se le proporcionó a la madre la información clara; una vez agotadas todas las dudas, se le solicitó que firmara una autorización para la toma de las muestras.

Los CU fueron obtenidos luego del parto vaginal o cesárea en block de partos o block quirúrgico, según fuese la vía de nacimiento decidida por el equipo de ginecología del piso 16 del HC.

En todo momento, las muestras fueron manejadas con total respeto, en condiciones adecuadas de bioseguridad y los datos recabados de las mismas fueron utilizados de forma anónima.

El muestreo se realizó siguiendo el criterio de Sato N (1998) Kurume Medical Journal 45:327-331. En este sentido, se tomaron 3 muestras de cada CU de la siguiente forma:

Proximal al RN, primera muestra; **Región medial**, segunda muestra; **Distal** al RN (placentario), tercera muestra (Fig. 2).

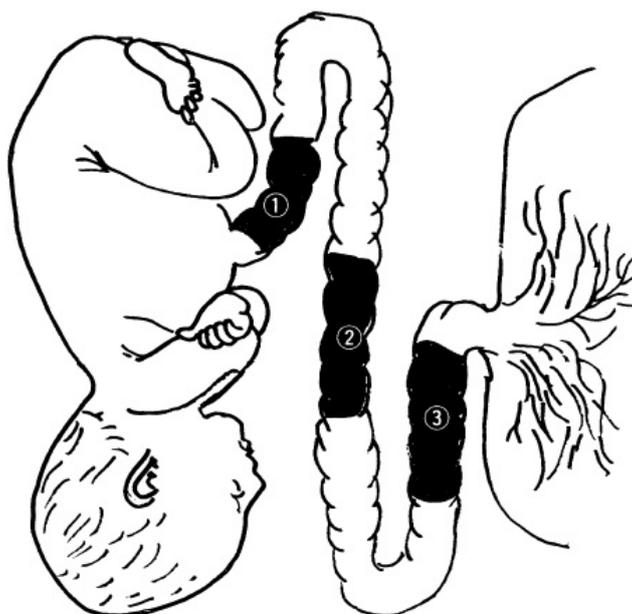


Figura 2. Esquema que ilustra el criterio utilizado para el muestreo de los cordones umbilicales. En negro se indican las distintas muestras tomadas de cada CU: sector proximal (1), sector medial (2) y sector distal (3) al recién nacido. Tomado de Sato N., 1998.

Una vez el RN estuvo en la mesa de recepción, con el cordón clamped, estable y fueron tomadas todas las muestras pertinentes a la pesquisa neonatal inicial (VDRL,

TSH, grupo y RH), se cortó el cordón a 1 cm de la pinza. Luego del alumbramiento, con previa coordinación con el ginecólogo encargado del equipo, se cortó a 1 cm proximal a la placenta.

Se tomó el CU en su totalidad y se procedió a generar las muestras de los tres sectores (6 cm aprox. de cada uno), las cuales se colocaron en tubos con 30 mL de paraformaldehído (fijador; Sigma-Aldrich) 4% en PBS para su traslado al IIBCE en vehículo personal del encargado de la muestra (duración del viaje 5 minutos). Las mismas fueron transportadas en conservadoras en condiciones de frío (2 a 8 °C) en óptimas condiciones de seguridad. Se mantuvieron en fijador durante 14-16 hs a 4 °C en heladeras del Laboratorio de Biología Celular. Posteriormente, se procedió al corte de las diferentes secciones del CU en crióstato y luego a la realización de técnicas histológicas para el reconocimiento de los vasos umbilicales, y de inmunofluorescencia para la detección de las fibras nerviosas.

5.3. Procesamiento y obtención de cortes histológicos de las muestras de CU

Las muestras de CU ya fijadas fueron lavadas con PBS y se procedió a cortarlas transversalmente en trozos de aprox. 1,5 cm de longitud.

En promedio se obtuvieron 4 trozos por sector (sector proximal; medio; distal) de cada CU (N=13 CU; total = 156 muestras). Las muestras fueron crioprotegidas en sacarosa 12% en PBS a 4°C durante 36 hs y posteriormente incluidas en medio de inclusión de tejidos a congelación (Cryoplast, BIOQUIM DIAGNOSTICS S.A.). Los bloques de tejido fueron almacenados en freezer a -80°C (IIBCE-DNFE), hasta ser cortados. Los cortes de 12 micrómetros de espesor fueron obtenidos en crióstato (Leica, Alemania) a -22°C y montados sobre portaobjetos gelatinizados.

A modo de facilitar el reconocimiento de los vasos umbilicales y otros tejidos como la gelatina de Wharton los criocortes fueron recogidos de la siguiente manera: el primer corte en un portaobjetos que se destinó a inmunomarcación; el corte consecutivo, en otro portaobjetos, se destinó para tinción histológica; se descartaron 10 cortes, para luego volver a tomar un segundo corte para inmunomarcación en el mismo portaobjetos, y de la misma forma, el consecutivo se destinó a histología.

Con el fin de hacer un muestreo seriado de cada CU y de cada sector del mismo, continuando con la misma muestra, se descartaron 20 cortes, y se volvió a repetir el procedimiento anteriormente mencionado. Esto fue realizado para cada muestra.

5.4. Técnicas de inmunofluorescencia y de tinción con hematoxilina y eosina de criocortes de CU

Inmunodetección de fibras nerviosas en los CUs: Se evaluó la inervación en tres sectores del cordón umbilical (proximal, medial y distal) empleando métodos indirectos de inmunodetección. Los criocortes de CU fueron co-marcados con un anticuerpo dirigido contra el marcador general de fibras nerviosas, anti-PGP 9.5 (*Abcam – ab10404*) generado en conejo y otro anticuerpo generado en ratón específico de fibras simpáticas, anti-tirosina hidroxilasa (TH, enzima de síntesis de noradrenalina; *Millipore*).

Los preparados con cortes de tejido fueron incubados durante toda la noche, en cámara húmeda a temperatura ambiente, con los siguientes anticuerpos primarios: un anticuerpo policlonal generado en conejo anti-PGP 9.5 (dilución final 1:2000); y un anticuerpo monoclonal generado en ratón anti-TH (dilución final 1:1000). Para evitar uniones inespecíficas, el diluyente de los anticuerpos primarios contenía suero normal de cabra (5 %) y DL-lisina (0.05 %; Sigma) como bloqueantes, y Tritón X-100 (0.2 %; Sigma) como surfactante, incluidos en una solución salina amortiguadora (PBS: KCl, NaCl, KHPO₄; KH₂PO₄). La especificidad de la inmunomarcación se valoró omitiendo la incubación con los anticuerpos primarios. Al final del período de incubación los cortes fueron lavados con PBS (3 x 15 min) y las preparaciones incubadas con los anticuerpos secundarios, anti-IgG de conejo o anti-IgG de ratón, ambos producidos en cabra y conjugados a los fluorocromos: FITC (del inglés, *Fluorescein iso-thiocyanate*; Sigma-Aldrich) o Alexa-Fluor 555 (Life Technologies-Molecular Probes, USA), respectivamente, durante 1.5 horas a temperatura ambiente. Ambos anticuerpos se referirán de ahora en adelante según sus siglas en inglés como GAR, del inglés *Goat anti-rabbit* y GAM, *Goat anti-mouse*, respectivamente. Al cabo de ese tiempo los cortes fueron lavados en PBS (3 x 15 min) y montados en buffer/glicerol (Citifluor, AF1, Reino Unido).

Los anticuerpos anti-PGP 9.5 y anti-TH utilizados en este trabajo ya han sido empleados en estudios previos del Laboratorio y en particular, el anti-PGP 9.5 fue validado en muestras humanas por la Téc. AP María Paula Latorre. Los anticuerpos

secundarios GAR-FITC (1:400) y GAM Alexa Flúor 555 (1:1000) fueron incubados en simultáneo y preparados en el mismo diluyente de los anticuerpos primarios pero sin el agregado de suero de cabra.

Para confirmar la presencia de fibras nerviosas positivas, en cada ensayo de inmunofluorescencia se realizaron controles positivos (cortes de útero de rata prepúber, los cuales presentan una rica inervación simpática asociada tanto a las células de músculo liso del miometrio como alrededor de los vasos del plexo intramiometrial) (22).

Tinción con hematoxilina y eosina: Los preparados destinados para tinciones histológicas fueron incubados en solución de hematoxilina de Mayer durante 10 minutos, lavados con agua corriente durante 10 minutos y posteriormente incubados en eosina durante un minuto. Luego fueron deshidratados con dos pasajes por alcohol etílico 95% y un pasaje por etanol 100 % puro para análisis. Finalmente, los preparados fueron incubados en xileno durante 1 minuto y los cubreobjetos fueron colocados empleando Entellán (Merk Millipore) como medio de montaje.

5.5. Microscopía y análisis de imágenes

Los preparados fueron visualizados por microscopía de epifluorescencia utilizando un microscopio Nikon Eclipse 800 (filtro B-2E; EX 450–490; BA 520–560; y G-2B.Nikon; Lab. Biología Celular, DNFE-IIBCE) o con el microscopio confocal LSM Zeiss 800 de la plataforma de microscopía confocal del IIBCE. Los cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina para el reconocimiento de los vasos umbilicales y otras estructuras del CU, fueron examinados en el mismo microscopio con luz transmitida. Utilizando un objetivo 20X, se adquirieron imágenes digitales de las preparaciones, empleando cámaras CCD acopladas a los microscopios y equipados con sus correspondientes programas de adquisición de imágenes, *CoolSNAP-Pro Monochrome Digital Kit* e *Image Pro Plus, MediaCybernetics* en el microscopio Nikon; *Dino capture* para histología e *Image J FIJI* para las imágenes del microscopio confocal Zeiss.

5.6. Caracterización y cuantificación de la presencia de fibras nerviosas

Se determinó el área ocupada por fibras nerviosas, en cada imagen digital obtenida, midiendo el área inmunorreactiva (-IR) para cada marcador (área PGP-IR, como indicador general de fibras nerviosas y área TH-IR como marcador específico de las fibras simpáticas) utilizando el programa *Image Pro Plus, Media Cybernetics*. De todas las muestras de CU co-inmunomarcadas y visualizadas por microscopía de

fluorescencia, se adquirieron imágenes digitales con propósitos cuantitativos. Se adquirieron 10 imágenes rodeando a cada uno de los vasos sanguíneos del CU, en sentido horario teniendo la precaución de que las imágenes no se superpusieran entre sí. En cada campo se adquirieron las imágenes para ambos fluoróforos. Dado que el CU tiene dos arterias y una vena, se obtuvieron en promedio 60 imágenes por corte. Además, luego del muestreo perivascular, exploramos la gelatina de Wharton en su totalidad en busca de fibras nerviosas.

Todas las imágenes correspondientes a la señal de cada fluoróforo habían sido adquiridas en las mismas condiciones y se determinaron automáticamente los valores óptimos de SNR (del inglés, *Signal-to-Noise-Ratio*) en ambos casos. Las imágenes fueron procesadas de manera de trabajar en escala de grises de 8 bits y escaladas según las calibraciones de los microscopios correspondientes.

5.7. Análisis de medidas antropométricas del RN y de la madre

Los datos analizados, tanto de la madre como del RN, fueron extraídos del Sistema Informático Perinatal (Anexo 1), como se detalla en el punto 5.1. El consentimiento informado firmado por la madre fue aprobado por el Instituto Nacional de Donación y Trasplante de órganos, células y tejidos (INDT), en el marco del proyecto de investigación FVF “Cordón Umbilical y su inervación: posibles mecanismos que expliquen el retardo de crecimiento intrauterino, bajo peso al nacer y prematuridad de neonatos de madres consumidoras crónicas de cocaína”, del Laboratorio de Biología Celular, del Departamento de Neurofarmacología Experimental, del IIBCE.

5.8. Análisis estadístico

El análisis de los resultados se realizó con el software *GraphPad Prism 7.00*. Los datos fueron analizados mediante tests estadísticos paramétricos y no paramétricos, dependiendo el modo de distribución de los mismos. Para definir si los datos presentaban una distribución normal, se empleó el test Shapiro-Wilk. Los que presentaron distribución normal fueron comparados mediante tests paramétricos, utilizando el test *t de Student* para datos no pareados. Los datos que no presentaron una distribución normal fueron comparados mediante el test de *Mann-Whitney*. Los valores de $p \leq 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

6. Resultados

6.1. Inervación del CU de neonatos de embarazos saludables

Se detectaron fibras nerviosas PGP-IR en todos los CU de gestaciones saludables. Estas fueron observadas principalmente alrededor de los vasos sanguíneos, en la túnica adventicia de las arterias, y entre ambas arterias (Fig. 3).

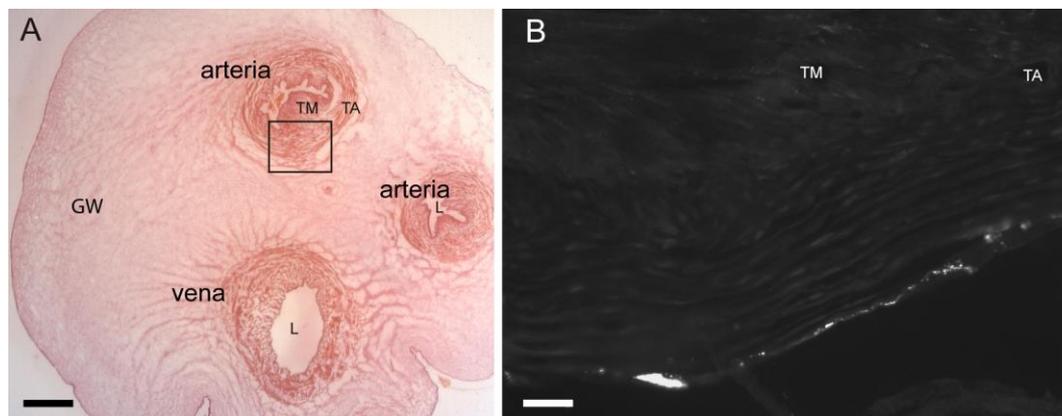


Figura 3. Cordón umbilical (CU) humano de un recién nacido (RN). A, corte representativo del sector próximo al RN teñido con hematoxilina y eosina que permite el reconocimiento de las arterias y la vena umbilicales rodeadas de un tejido conjuntivo laxo que constituye la gelatina de Wharton (GW). El recuadro representa la porción de la arteria que se muestra en aumento en B. B, inmunofluorescencia con anti-PGP 9.5 que permite el reconocimiento de las fibras nerviosas en la túnica adventicia (TA). L, lumen; TM, túnica media. Barras de calibración: (A) 500 μm ; (B) 100 μm .

Patrón de inervación

Las fibras inmunorreactivas para PGP perivasculares no se distribuyeron uniformemente a lo largo de los vasos sanguíneos del CU. Evidenciamos la existencia de un patrón bien definido, en el cual únicamente el sector del CU más próximo al recién nacido estaba inervado (Fig. 4A; Fig. 5). En este sector, se detectaron fibras PGP-IR co-marcadas con anti-TH, el marcador específico de axones simpáticos (Fig. 4B, C).

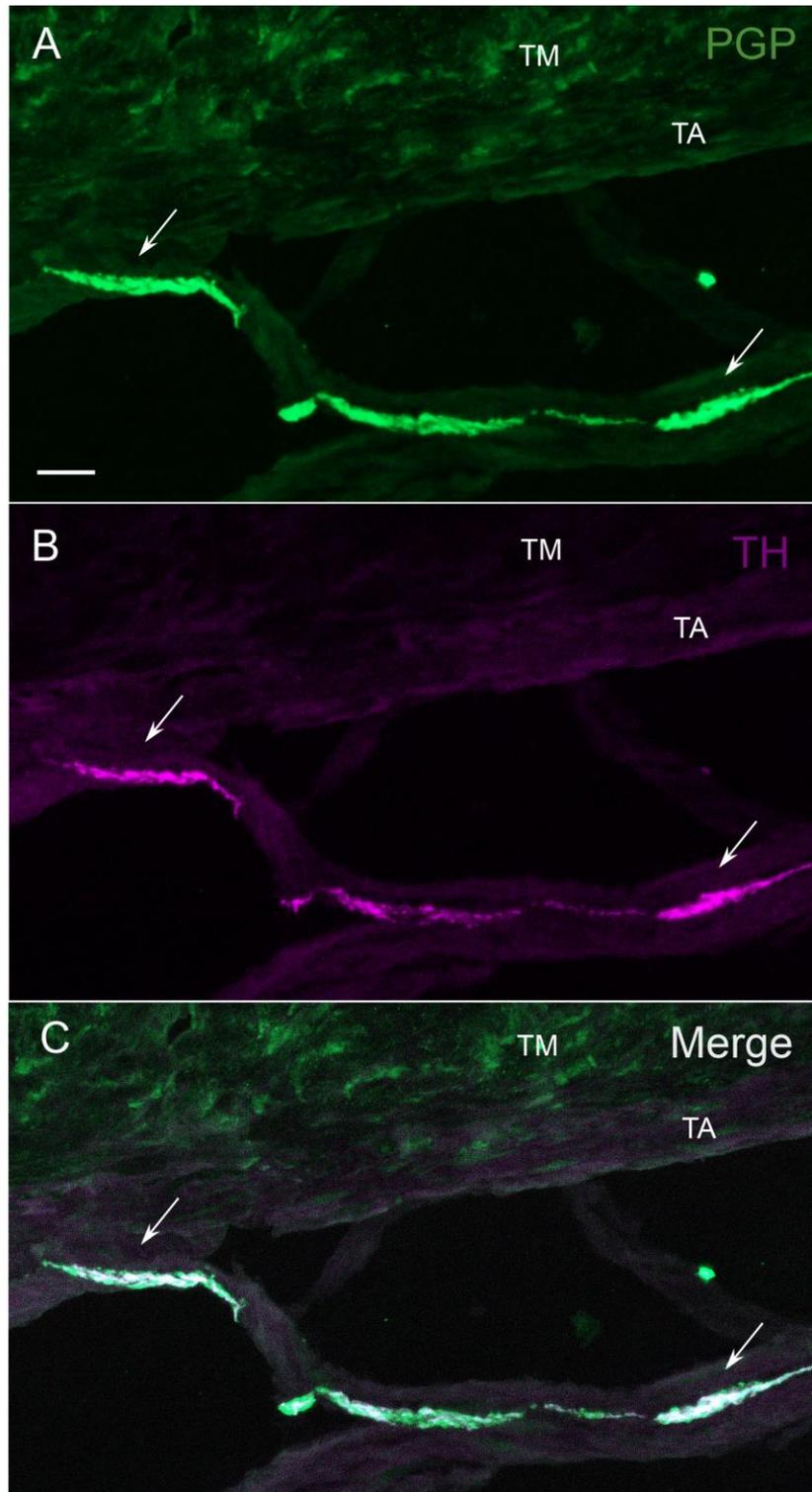


Figura 4. Fibras nerviosas simpáticas alrededor de una arteria umbilical del CU. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia (Z-stack) de un corte transversal del CU próximo al RN co-marcado con anti-PGP (A; verde; marcador general de fibras nerviosas) y anti-TH (B; magenta; marcador específico de fibras simpáticas) donde se ve inervada (flechas) la túnica adventicia (TA) de una de las arterias umbilicales. Panel C, superposición (merge). TM, túnica media. Barra de calibración: 50 μm .

Contrariamente a lo que observamos en el sector proximal (Fig. 5A-C), no se detectaron fibras nerviosas en los sectores del medio del CU (Fig. 5D-F), así como tampoco en la región más distal al neonato (placentario) (Fig. 5G-I). Todos los CUs de los RNs de gestaciones sanas analizados estaban inervados con este mismo patrón (Tabla 1).

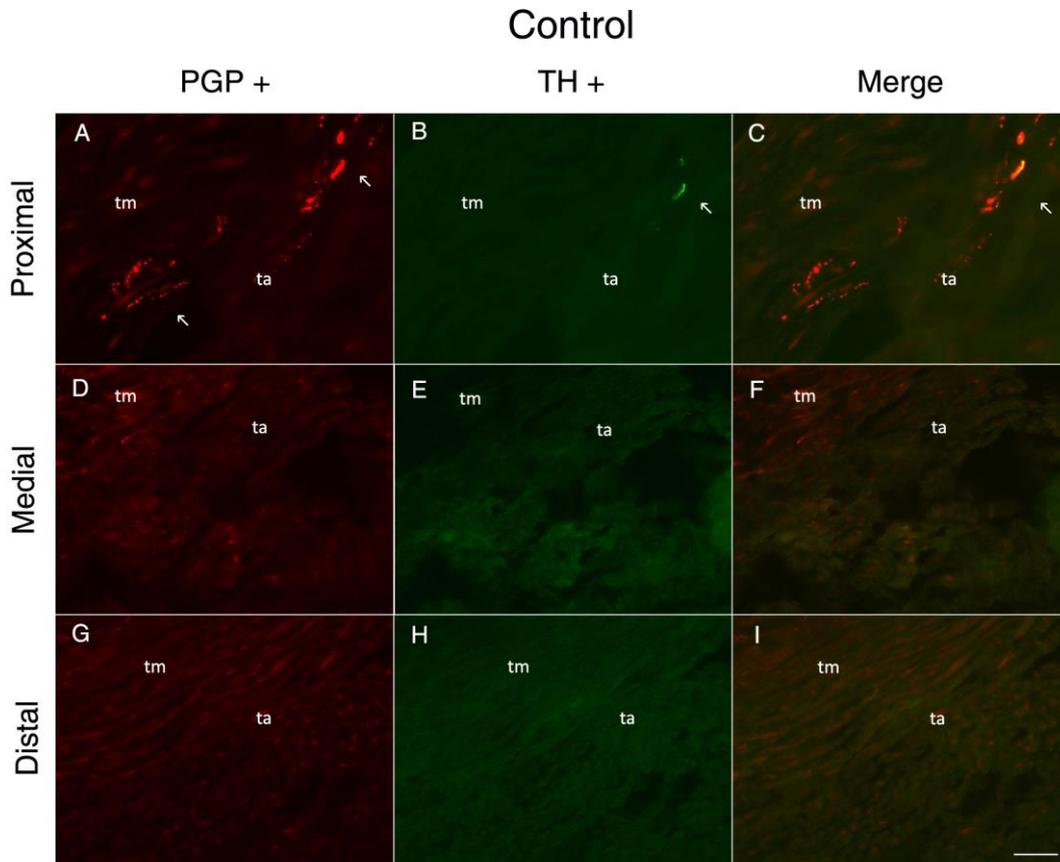


Figura 5. Inervación de arterias umbilicales de RN de madres que cursaron embarazos saludables (grupo Control). Cortes transversales de los 3 sectores del CU: proximal, medial y distal al RN co-marcados con anti-PGP (rojo, marcador general de fibras nerviosas) y anti-TH (verde, marcador de fibras simpáticas). A la derecha se muestra la superposición de ambos fluoróforos (merge). Flechas, fibras nerviosas; tm, túnica media; ta, túnica adventicia. Barra de calibración: 30 μ m.

6.2. Inervación del CU de neonatos de madres consumidoras de cocaína

Patrón de inervación

En los CUs de los RN de madres consumidoras de cocaína (Grupo Cocaína, CC) se observó el mismo patrón general de inervación que en los CUs del grupo Control (Fig. 6).

Si bien presentaron la inervación acotada a la porción próxima al RN, se visualizó un mayor número de fibras intensamente inmunorreactivas para PGP alrededor de las arterias umbilicales en comparación con los CU control (Fig. 6A vs Fig. 5A; Tabla 1). De interés, para la hipótesis de este trabajo, varias de estas fibras se co-marcaron con anti-TH (Fig. 6B flechas; 6C).

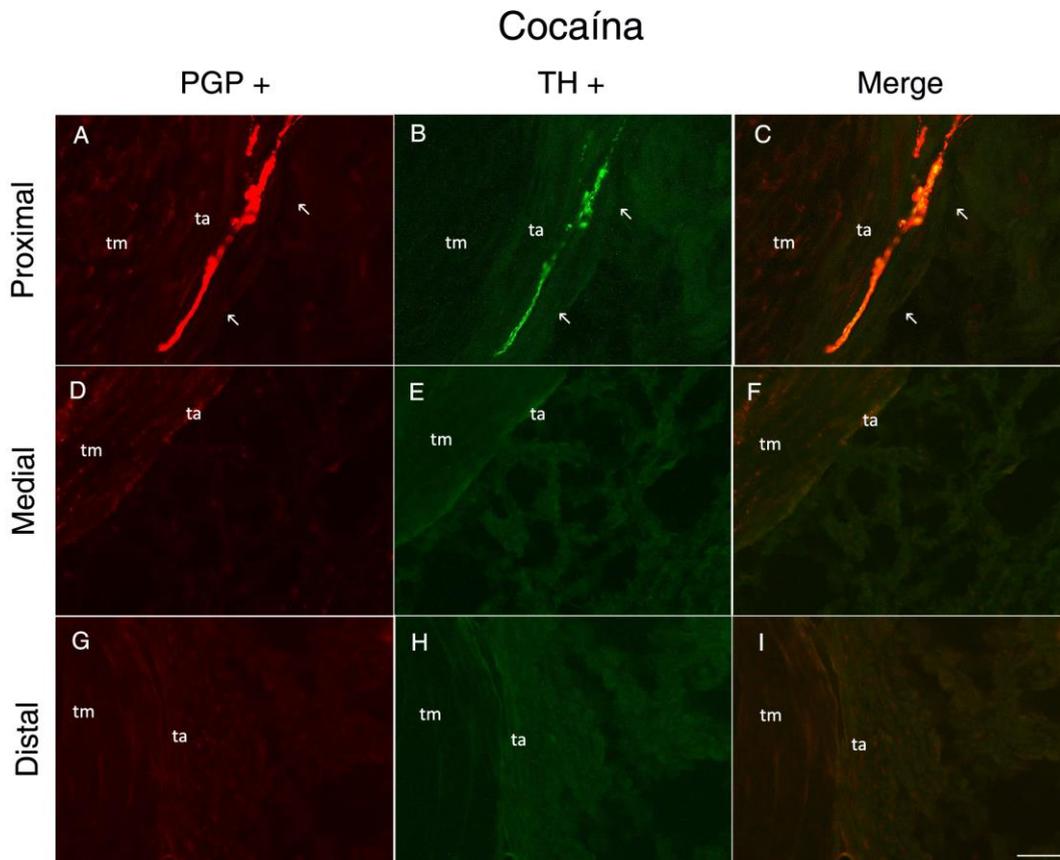


Figura 6. Inervación de arterias umbilicales de RNs de madres consumidoras de cocaína (Grupo Cocaína). Cortes transversales de los 3 sectores del CU: proximal, medial y distal al RN, co-marcados con anti-PGP (rojo, marcador general de fibras nerviosas) y anti-TH (verde, marcador de fibras simpáticas). A la derecha se muestra la superposición de ambos fluoróforos (merge). Flechas, fibras nerviosas; tm, túnica media; ta, túnica adventicia. Barra de calibración: 30 μ m.

Densidad de inervación

Se cuantificó el área nerviosa (AN), definida como el área ocupada por fibras inmunorreactivas para PGP (AN PGP-IR), y para TH (AN TH-IR) en los CU de los RNs de ambos grupos.

Tabla 1. Cuantificación del área nerviosa total (AN) ocupada por fibras inmunorreactivas para PGP 9.5 (PGP +) y tirosina hidroxilasa (TH +) en cada sector del CU (Proximal, Medial, Distal) de neonatos de madres sanas y madres consumidoras de cocaína.

Grupo	Proximal AN PGP+	Proximal AN TH+	Medial AN PGP+	Medial AN TH+	Distal AN PGP+	Distal AN TH+
Control	3630 ± 2269	345 ± 201	12 ± 6	0,00	0,00	0,00
Cocaína	7040 ± 5531	544 ± 385	6 ± 3	0,00	0,00	0,00

Datos expresados como la Media ± EEM; Test-t de Student.

En el sector inervado (CU-Proximal), la media del AN PGP-IR (fibras perivasculares + fibras detectadas en GW) del grupo Cocaína tendió a ser mayor con respecto al grupo control, aunque esta diferencia no alcanzó a ser estadísticamente significativa (Tabla 1). En este sector del CU, el área ocupada por fibras TH positivas también tendió a ser mayor en el grupo Cocaína (Tabla 1).

Al analizar la inervación perivascular específicamente, encontramos que una subpoblación de recién nacidos del grupo Cocaína tenía un AN PGP-IR exacerbada alrededor de las arterias umbilicales, con respecto al grupo Control (Fig. 7).

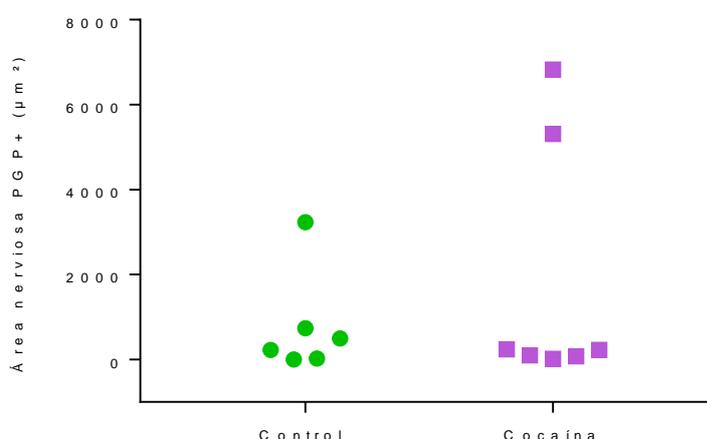


Figura 7. Cuantificación del área ocupada por fibras nerviosas inmunorreactivas para **PGP alrededor de las arterias**, en el sector proximal del CU de neonatos de madres sanas (Control) y madres consumidoras de cocaína (Cocaína). Test Mann Whitney.

Dado que esto fue observado solo en 2 de los 7 CU-P de neonatos de madres CC, estas diferencias no fueron significativas en el análisis estadístico de toda la población (Figs. 7).

Más interesante aún, el AN TH-IR alrededor de las arterias de los CUs de estos RN de madres consumidoras de cocaína también tendió a aumentar con respecto al grupo Control (Fig. 8).

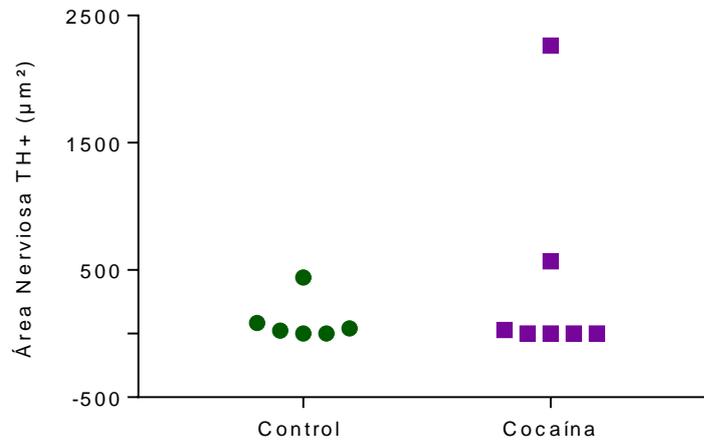


Figura 8. Cuantificación del área ocupada por fibras nerviosas inmunorreactivas para **TH alrededor de las arterias**, en el sector proximal del CU de neonatos de madres sanas (Control) y madres consumidoras de cocaína (Cocaína). Test Mann Whitney.

Respecto a la inervación alrededor de las venas umbilicales, las fibras PGP-IR fueron prácticamente indetectables alrededor de las mismas en todas las muestras analizadas del grupo Cocaína en comparación con la población Control (Fig. 9).

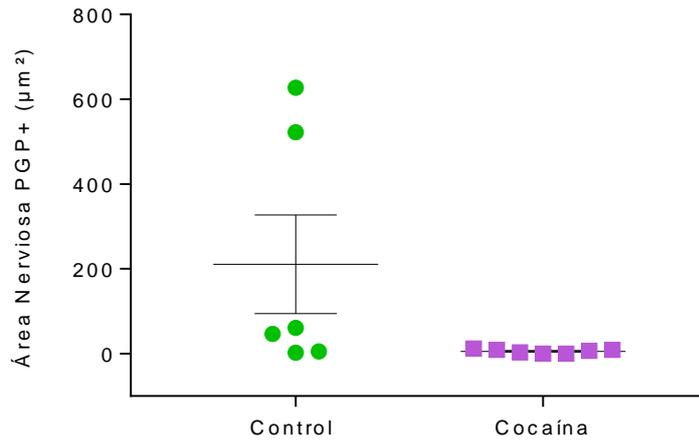


Figura 9. Cuantificación del área ocupada por fibras nerviosas inmunorreactivas para **PGP alrededor de la vena**, en el sector proximal del CU de neonatos de madres sanas (Control) y madres consumidoras de cocaína (Cocaína). Datos expresados como la Media \pm EEM; Test-t de Student.

En concordancia, no se detectaron fibras simpáticas alrededor de las venas umbilicales en las muestras de CU-P del grupo Cocaína (Fig. 10).

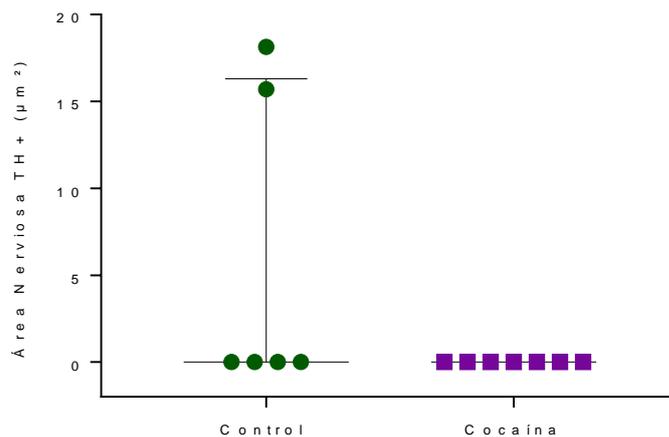


Figura 10. Cuantificación del área ocupada por fibras nerviosas inmunorreactivas para **TH alrededor de la vena**, en el sector proximal del CU de neonatos de madres sanas (Control) y madres consumidoras de cocaína (Cocaína). Datos expresados como la Mediana \pm rangos intercuartiles; Test Mann Whitney.

En la gelatina de Wharton, también se detectaron fibras nerviosas. Estas fibras fueron PGP positivas y una subpoblación también mostró inmunorreactividad para TH (Fig. 11 y Fig. 12, respectivamente).

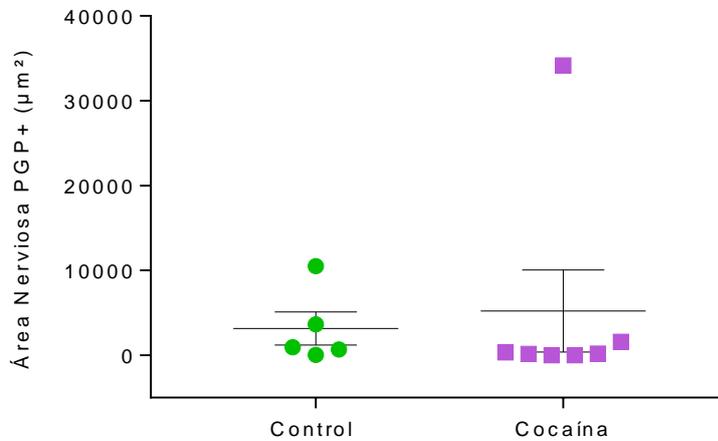


Figura 11. Cuantificación del área ocupada por fibras nerviosas inmunorreactivas para **PGP en la Gelatina de Wharton (GW)**, en el sector proximal del CU de neonatos de madres sanas (Control) y madres consumidoras de cocaína (Cocaína). Datos expresados como la Media \pm EEM; Test-t de Student.

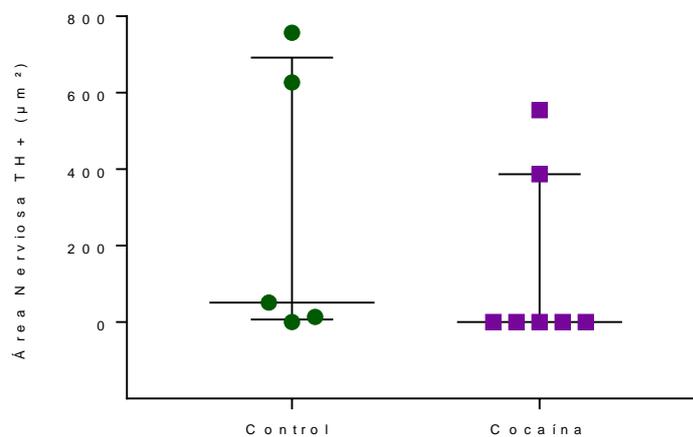


Figura 12. Cuantificación del área ocupada por fibras nerviosas inmunorreactivas para **TH en la Gelatina de Wharton (GW)** en el sector proximal del CU de neonatos de madres sanas (Control) y madres consumidoras de cocaína (Cocaína). Datos expresados como la Mediana \pm rangos intercuartiles; Test Mann Whitney.

6.3. Datos maternos de las donantes de CU

En vista de que las consumidoras de cocaína también suelen presentar déficits nutricionales y teniendo en cuenta que la desnutrición materna es considerada un factor de riesgo para el desarrollo físico y mental del feto (29, 30), nos propusimos comparar los datos antropométricos maternos de ambas poblaciones donantes de CU antes de proceder a analizar la clínica de sus RNs.

No se observaron diferencias significativas entre las variables de peso de la madre, talla, ni índice de masa corporal (IMC), así como tampoco en los promedios de edad entre las madres sanas y las consumidoras de cocaína (Tabla 2).

Tabla 2. Características de las madres que donaron los Cordones Umbilicales utilizados en este trabajo.

	Madres sanas Control	Madres consumidoras de cocaína
Nº de CU	6	7
Edad (años)	23 ± 4	27 ± 3
Peso (kg)	61 ± 8	58 ± 5
Talla (m)	1,61 ± 0,03	1,57 ± 0,05
IMC (Kg/m ²)	23,9 ± 2	23,5 ± 3

Los datos se presentan como Media ± Error Estándar de la Media.

6.4. Análisis de las presentaciones clínicas del RN y su asociación con el perfil de inervación del CU

6.4.1 Edad gestacional e inervación del CU

En el grupo control, de madres sanas, no hubo recién nacidos prematuros. Contrariamente, más del 70% de los recién nacidos de madres consumidoras de cocaína fueron pre-términos (nacidos antes de la semana 37 de gestación) o en el límite de la prematurez (Fig. 13).

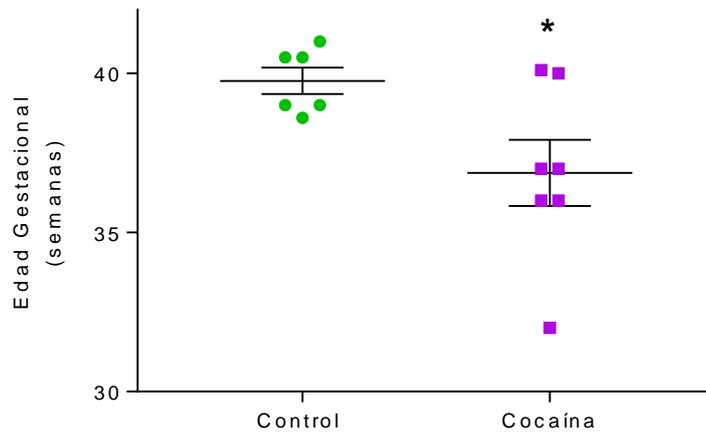


Figura 13. Edad Gestacional de los recién nacidos de madres sanas (Control) y de madres consumidoras de cocaína (Cocaína) donantes de los CUs cuya inervación fue analizada en este trabajo de tesis. (*) diferencia significativa respecto a los RNs de madres sanas. Datos expresados como la Media \pm EEM. Test t-Student.

6.4.2 Datos antropométricos del RN e inervación del CU

El peso de los RNs de madres del grupo Cocaína fue significativamente menor en comparación a los RNs de gestaciones saludables ($p=0.01$, Fig. 14).

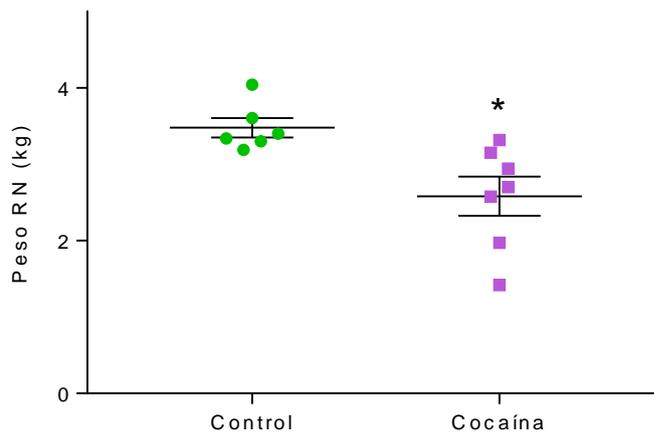


Figura 14. Peso del RN (en kg), para el grupo Control vs grupo Cocaína. (*) indica diferencias significativas respecto al grupo control. Datos expresados como la Media \pm EEM. Test t-Student.

A destacar, los dos RN que presentaron una mayor densidad de inervación en sus CUs, provenían de embarazos de madres consumidoras de cocaína y fueron de los bebés de menor peso al nacer (Tabla 3).

Tabla 3. Edad gestacional, peso del RN y cuantificación de la inervación perivascular observada (AN PGP+ y TH+) para cada muestra de CU.

	Edad Gest (sem)	Peso RN (kg)	AN PGP+	AN TH+
Control	39,0	3,188	3860	441
	40,5	3,300	270	38
	38,6	3,338	23	0
	40,5	3,402	61	0
	39,0	3,606	1258	60
	41,0	4,044	498	85
Cocaína	32,0	1,418	74	0
	37,0	1,973	6832	2263
	37,0	2,578	5323	570
	36,0	2,702	104	0
	36,0	2,942	245	30
	40,1	3,150	28	0
	40,0	3,318	223	0

La talla de los RNs del grupo Cocaína fue levemente menor que en el grupo Control pero esta diferencia no alcanzó la significancia estadística.

De manera similar, se observó una tendencia a un menor perímetro cefálico en el grupo Cocaína respecto al grupo Control ($p=0.0634$) (Tabla 4).

Tabla 4. Talla y perímetro cefálico de los RNs que donaron los CU utilizados en este trabajo.

	RNs de madres sanas	RNs de madres consumidoras de cocaína
Nº de CU	6	7
Talla del RN (cm)	49,33 ± 0,44	47,92 ± 0,95
Perímetro cefálico RN (cm)	35,00 ± 0,43	32,64 ± 0,98

Datos expresados como la Media ± EEM; Test-t de Student.

7. Discusión

7.1. Inervación del CU humano: la importancia del patrón de inervación

Los resultados obtenidos confirman que, contrario a algunos estudios, el CU humano se encuentra inervado. Específicamente, el análisis cuali- y cuantitativo demostró un patrón de inervación característico definido por la presencia de fibras nerviosas únicamente en el sector del CU próximo al RN. Dentro del cordón, la inervación se detectó principalmente alrededor de los vasos umbilicales (Figs. 3-5) y en menor medida en la gelatina de Wharton. Estos resultados podrían explicar la inconsistencia de varios reportes existentes en la literatura, dado que las investigaciones referidas en las revisiones actuales (5, 6, 7, 8) incluyen estudios que analizaron el sector medial del CU, excluyendo por motivos de muestreo, al sector proximal al RN. Por ejemplo en Quan, A., et al., 2003 los autores afirman que el CU no está inervado, sin embargo al describir su forma de muestreo, tomaron únicamente la región media del CU. Así mismo, Fox y Khong (1989) describen que no existe inervación, mientras que su muestreo fue a 2 cm desde la placenta, y hasta la mitad del largo del CU, lo que equivale al sector distal y medial muestreado en nuestro estudio (Tabla 1; Figs. 2 y 5).

En la región media del CU de los RN del grupo Control, el área nerviosa PGP-IR detectada representó el 0.3 % de la media detectada en el sector proximal al RN (Tabla 1). Estos resultados pueden explicarse por un muestreo no del todo acertado, en donde puede haber sucedido que el sector medial se haya tomado muy cercano al sector proximal al RN. Estas fibras entonces no corresponderían al sector medial, sino al proximal, por lo que no fueron consideradas en la interpretación de los resultados del presente trabajo. No se observaron fibras nerviosas en el sector distal de ningún CU analizado (Tabla 1; Fig. 5), apoyando la hipótesis de que existe una denervación en el lado placentario del CU (11).

En su conjunto, nuestros resultados confirman el patrón descrito previamente por Sato (1998), indicando que el proximal es el único sector inervado, y ponen en evidencia que la sectorización de la inervación en el CU no fue considerada en las revisiones más actuales.

7.2. Inervación del CU de neonatos de madres consumidoras de cocaína

Nuestros estudios inmunohistoquímicos indicaron que el patrón de inervación del CU de los RNs de madres consumidoras de cocaína parece no alterarse con respecto al grupo control (Tabla 1; Fig. 6).

Si bien los CUs de los neonatos de madres consumidoras presentaron la inervación acotada a la porción próxima al RN de forma similar a los embarazos saludables, se visualizaron cambios notables en la densidad de fibras nerviosas en comparación con la de los CUs de neonatos de madres sanas.

7.3. Densidad de inervación del CU de RNs de madres saludables vs CU de RNs de madres gestantes consumidoras de cocaína

En los sectores próximos de los CUs de RNs de madres saludables, se visualizaron fibras nerviosas inmunorreactivas para PGP alrededor de las arterias umbilicales (Fig. 7), y en menor densidad alrededor de la vena (Fig. 9). También se localizaron en la gelatina de Wharton (Fig. 11), principalmente en el espacio entre ambas arterias y menos frecuentemente fueron observadas en la periferia del corte. Estos hallazgos se condicen con los observados por Sato, N., 1998, quien encontró que en el sector fetal del cordón umbilical se observaron fibras nerviosas alrededor de las arterias umbilicales y en los márgenes de la gelatina de Wharton. En cuanto al área ocupada por fibras TH-IR, en el grupo Control fue muy reducida, apoyando lo observado por los escasos reportes previos (3).

En el grupo Cocaína, el área nerviosa ocupada por fibras PGP-IR observada alrededor de las arterias, tendió a ser mayor con respecto al grupo Control en una sub-población de CUs (Fig. 7). Aunque se trate de una tendencia, ya que no alcanzó la significancia estadística debido a la gran variabilidad, este hallazgo apoya la hipótesis de trabajo respecto a que el consumo crónico de cocaína durante el embarazo podría estar induciendo cambios en la inervación de los vasos sanguíneos del CU. Más interesante aún, la inervación perivascular inmunorreactiva para TH tendió del mismo modo a ser mayor en esta sub-población de CUs, con respecto al grupo Control (Fig. 8). Esto sugiere la existencia de una inervación simpática exacerbada en los vasos del CU de estos bebés del grupo Cocaína. Una mayor densidad de axones simpáticos podría influir en la regulación de la contractibilidad de los vasos umbilicales, efecto que podría asociarse a las complicaciones clínicas del RN.

No encontramos fibras TH positivas que no fueran inmunorreactivas para PGP (Figs. 4, 5 y 6), lo cual es consistente con lo detectado por el anticuerpo empleado como marcador general de fibras nerviosas, que ya había sido validado en estudios previos de nuestro grupo. Por otro lado, el hecho de que únicamente un subgrupo de nervios PGP-IR fueran co-marcados con anti-TH indica que, además de fibras simpáticas, existen axones sensoriales o colinérgicos pertenecientes al sistema parasimpático. En futuros experimentos se deberán utilizar anticuerpos específicos para confirmar la naturaleza de estos axones.

El análisis de densidad de inervación en la gelatina de Wharton, tejido conjuntivo laxo en el que se encuentran inmersos los vasos sanguíneos del CU, sugiere una tendencia al aumento de las fibras nerviosas PGP-IR en los CUs del grupo Cocaína con respecto a las gestaciones Control. Futuras investigaciones serán necesarias para profundizar en el significado biológico de estas observaciones.

En conjunto, estos hallazgos sugieren que existen cambios en la inervación del CU humano tras el consumo crónico de cocaína durante el embarazo. Los cambios encontrados apoyan la hipótesis de trabajo. Una exacerbada inervación simpática podría estar contribuyendo a la vasoconstricción de los vasos umbilicales y alterar el flujo sanguíneo feto-placentario, lo que podría estar comprometiendo el intercambio de nutrientes y oxígeno con el feto (14), y por consiguiente, afectando el correcto desarrollo del feto resultando en neonatos con RCIU, PT, PEG y BPN.

7.4. Datos maternos de las donantes de CU

En vista de que las mujeres consumidoras de cocaína también suelen presentar déficits nutricionales y, teniendo en cuenta que la desnutrición materna es considerada un factor de riesgo para el desarrollo físico y mental del feto (29, 30, 31), nos propusimos comparar los datos antropométricos maternos de ambas poblaciones donantes de CU antes de proceder a analizar la clínica de sus RN.

Analizamos los pesos y tallas de todas las madres al inicio de la gestación, verificando que ninguna de ellas presentara desnutrición. En cuanto a los datos maternos como la edad, el peso, la talla y el IMC, no se observaron diferencias significativas entre los grupos de estudio (Tabla 2). Esto es de relevancia, ya que factores como la desnutrición materna podría estar afectando el correcto desarrollo del feto (18) y por consiguiente, resultando en presentaciones clínicas que no serían únicamente efecto del consumo de cocaína, alterando la interpretación de los resultados observados.

7.5. Presentaciones clínicas de los RN de madres consumidoras de cocaína y su asociación con el perfil de inervación del CU

En el grupo Cocaína encontramos un impacto en la prematurez (Fig. 13), así como una disminución en el peso de los RNs de madres consumidoras de cocaína (Fig. 14). Estos datos son consistentes con lo reportado por otros estudios respecto a una mayor incidencia de partos pre-término (menor a las 37 semanas de gestación) asociados al consumo crónico de cocaína durante el embarazo (18, 19, 27) y validan en cierta manera el diseño y desarrollo del procedimiento experimental en este trabajo. Por otra parte, reafirman también la homogeneidad de la población de madres sanas incluidas en nuestro análisis dado que todos los RNs de embarazos saludables nacieron a término.

Dado que los bebés del grupo cocaína nacieron en su mayoría pretérminos o en el límite de la prematurez, nos cuestionamos si el peso que presentaron los RNs del grupo Cocaína era acorde a su edad gestacional o podría estar reflejando un efecto debido al aumento de la inervación de los vasos del CU asociado al consumo de cocaína durante el embarazo.

Se realizó un análisis del peso de cada RN del grupo Cocaína, y se comparó con el esperado para su edad gestacional, en base a la curva de Fenton y Kim (32). El cruce de estos datos sugiere que, excepto por uno de ellos, que fue PEG, dado que presentó un peso por debajo del apropiado para su edad gestacional (31, 32), el resto tendría un peso acorde a su prematurez. Por lo tanto, la diferencia significativa observada en el peso para ambos grupos de estudio se debe principalmente a la diferencia observada en las edades gestacionales. En este sentido, surge la interrogante respecto a si la inervación del CU varía con la edad gestacional. Sin embargo, dadas las poblaciones abordadas en este estudio, se dificulta la valoración de la inervación a lo largo de la gestación, sobretodo en el grupo Control. Dado que al ser embarazos saludables, los bebés nacen a término, mientras que las gestaciones del grupo consumidor son principalmente partos pre-término. Los resultados obtenidos en esta pasantía sugieren que no existe dicha dependencia, dado que observamos CUs de RN del grupo cocaína que fueron pre-términos y poseían poca densidad de inervación simpática alrededor de los vasos sanguíneos umbilicales.

Si bien no se observaron diferencias significativas en el perímetro cefálico entre los grupos de estudio, se observó una tendencia a que los RNs del grupo Cocaína, presentaran un menor perímetro cefálico que los RNs de embarazos saludables. Esto es consistente con datos reportados, en donde se ha observado un menor peso, talla y circunferencia craneal al nacer en RNs de usuarias de cocaína (19). El perímetro cefálico observado para los RNs del grupo Control fue adecuado para su edad gestacional; mientras que para el grupo Cocaína, dos de los RNs pertenecieron al percentil 10, siendo su perímetro cefálico menor al esperado para su edad gestacional (32). Por lo que esta tendencia observada puede estar debiendo en parte a las diferencias en las edades gestacionales y parte por los efectos del consumo de cocaína durante el embarazo.

Nuestro siguiente objetivo fue evaluar los datos de cada RN donante de CU en relación con la variable biológica determinada en este trabajo, la inervación del CU.

En este sentido, el incremento en fibras nerviosas PGP-IR y TH-IR perivasculares en el grupo Cocaína fue encontrado en una sub-población de neonatos de madres consumidoras de cocaína. En particular, el único diagnosticado con RCIU y PEG que perteneció al grupo de madres consumidoras, fue el que, de interés para este trabajo de tesis, presentó mayor densidad de inervación simpática perivascular en su CU. Dado que la inervación simpática controla la vasoconstricción, es posible que este bebé haya tenido comprometido el pasaje sanguíneo para la nutrición fetal, su oxigenación y eliminación de desechos. Otra asociación interesante que está en línea con la hipótesis de trabajo, es que, aparte del prematuro moderado de 32 semanas de gestación, que a priori no pertenece a esta subpoblación, los RNs de madres consumidoras cuyos CUs estaban más inervados fueron los de menor peso al nacer (Tabla 2). Luego de un análisis exhaustivo de las historias clínicas y SIPs de las madres, se encontró que, éstas no habrían consumido alcohol pero sí otras drogas.

A destacar, encontramos también que en el grupo Control, la muestra que presentó mayor inervación PGP-IR perteneció a una madre que estaba cursando infección urinaria, y el RN fue el que tuvo menor peso al nacer.

En suma, y a pesar de que son puntuales los casos que apoyan la hipótesis planteada, nuestros datos estarían confirmando que el consumo de cocaína durante el embarazo induciría cambios en la inervación simpática de los vasos sanguíneos del CU de

madres consumidoras y esto parece estar asociado con bebés de bajo peso y prematuros, hecho que podría condicionar seriamente el desarrollo del recién nacido.

8. Limitaciones, principales conclusiones y perspectivas

Este estudio posee limitaciones y fortalezas. Como principal limitación, consideramos que la muestra analizada es pequeña y debe ser aumentada. Sin embargo, el análisis de estas primeras muestras de CU recolectadas durante la pasantía, permite extraer algunas conclusiones principales. En primer lugar, demostramos la presencia de fibras nerviosas en el CU humano, en particular en el sector próximo al recién nacido, aportando información robusta para disminuir la evidencia controversial en la literatura.

Previo a estos estudios, no existían reportes sobre la inervación del CU en mujeres gestantes consumidoras de cocaína. Este trabajo, que se centró en evaluar la influencia del consumo de cocaína sobre la inervación del CU y su asociación con las complicaciones clínicas más frecuentes de los neonatos de madres consumidoras de cocaína, aportó las primeras evidencias que indican que:

- Los cordones umbilicales de una sub-población de bebés de madres consumidoras de cocaína, poseían una alta densidad de fibras nerviosas simpáticas alrededor de sus vasos.
- En el grupo Cocaína, los RN que presentaron algunas de las manifestaciones clínicas antes mencionadas (RCIU, PEG, BPN) fueron los que presentaron mayor densidad de inervación TH positiva alrededor de las arterias umbilicales.

La inervación simpática en el sector proximal del cordón umbilical sugiere una regulación neural de la circulación sanguínea a través de los vasos umbilicales. Las alteraciones en esta densidad de inervación podrían estar involucradas en la regulación del flujo fetoplacentario y ser las responsables de las manifestaciones clínicas con mayor incidencia en los RN de madres consumidoras.

Con respecto a la inmunomarcación de las fibras nerviosas, queda pendiente distinguir la naturaleza de las fibras PGP-IR que no fueron TH-IR. Una posibilidad, dado que aún disponemos de bloques de tejido, sería marcar las fibras sensoriales con CGRP por medio de inmunofluorescencia, co-localizando con PGP y medir el área nerviosa en el CU de RNs saludables y de RNs de madres consumidoras de cocaína en estas mismas muestras.

Por otra parte, se observó gran variabilidad en la densidad de inervación tanto entre grupos, como dentro de cada grupo para las muestras de distintas edades

gestacionales. Al tratarse de poblaciones humanas, existen muchos factores que pueden estar influyendo en los resultados observados. Si bien se contempló el hecho de que las complicaciones clínicas de los RNs son multicausales, descartándose una variedad de factores influyentes como patologías maternas y del feto en nuestro criterio de inclusión, aún existen factores de riesgo sociales como pobreza, estrés, depresión, malnutrición, entre otros (18). Según nuestros análisis de las historias clínicas y los SIPs, la malnutrición materna podría ser descartada. Con respecto al peso que podrían tener los otros factores mencionados, en el laboratorio donde se desarrolló la presente pasantía, actualmente existe un proyecto de investigación centrado en el análisis cuanti y cualitativo de datos provenientes de la Encuesta de Nutrición, Desarrollo Infantil y Salud (ENDIS) cohorte 2018 Primera ronda, realizado por el Instituto Nacional de Estadística y el MIDES, del Programa Uruguay Crece Contigo. En el ENDIS se entrevistaron a madres, padres o tutores a cargo de 2.500 niños de entre 0 a 4 años. Nuestro grupo intenta identificar a las madres que consumieron cocaína durante el embarazo y buscar asociaciones entre el consumo, los datos antropométricos de las madres y datos sobre los niños al momento del nacimiento, así como información sobre su desarrollo psico-social en la primer infancia, por lo que podría encontrarse alguna asociación en este sentido.

Si bien estos resultados deben interpretarse con cautela ya que el abuso de cocaína puede estar acompañado del policonsumo, así como de muchos otros factores de riesgo maternos y sociodemográficos, por lo que se torna difícil determinar el efecto de la cocaína de forma aislada, este trabajo es un primer aporte que colaboraría en la generación de políticas públicas basadas en evidencia científica. En este sentido, si fuese posible por ejemplo cuantificar la inervación del CU al momento del nacimiento, podría identificarse a esta sub-población de RNs vulnerables, para de esta forma desarrollar programas que apunten a dar seguimiento profesional y apoyo a la primera infancia.

9. Bibliografía

1. Sola, A. (2011). *Cuidados Neonatales*. 3a Edición. Ed. EdiMed.
2. Bloom, W., Fawcett, D., W. (1995). *Tratado de Histología*. Editorial Interamericana McGraw-Hill. 12^o Edición.
3. Sato, N. (1998). *Calcitonin Gene related peptide, Neuropeptide Y, and Tyrosine Hydroxylase immunoreactive nerve fibers in the human umbilical cord*. Kurume Medical Journal, 45:327-331.
4. Wang, Y., Zhao, S. (2010). Vascular Biology of the Placenta. Chapter 2. *Placental blood circulation*. Ed. Morgan & Claypool Life Sciences. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53254/>
5. Lorigo M., Mariana, M., Feiteiro, J., Cairrao, E. (2018). *How is the human umbilical artery regulated?* The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research, 44:1193-1201.
6. Quan A., Phil M., Leung S., Lao T., Man R., Y. (2003). *5-Hydroxytryptamine and Thromboxane A2 as Physiologic Mediators of Human Umbilical Artery Closure*. Society for Gynecologic Investigation, 10:490-495.
7. Fox S. B., Khong T. Y. (1990). *Lack of Innervation of Human Umbilical Cord. An Immunohistological and Histochemical Study*. Placenta, 11:59-62.
8. Macara, L., Kingdom, J., Kaufmann, P. (1993). *Control of the fetoplacental circulation*. Fetal and Maternal Medicine Review, 5:167-179.
9. Long, J., Jay, S., Segal, S., Madri, J. (2009). *VEGF-A and Semaphorin3A: Modulators of vascular sympathetic innervation*. Developmental Biology, 334: 119–132.
10. Westcott, E., Segal, S. (2013). *Perivascular Innervation: A Multiplicity of Roles in Vasomotor Control and Myoendothelial Signaling*. Microcirculation, 20:217-238.
11. Marzioni, D., Tamagnone, L., Capparuccia, L., Marchini, C., Amici, A., Todros, T., Bischof, P., Neidhart, S., Grenningloh, G., Castellucci, M. (2004). *Restricted innervation of uterus and placenta during pregnancy: evidence for a role of the repelling signal Semaphorin 3A*. Developmental Dynamics, 231:839-848.
12. Moraes, M., González, G., Castelli, L., Umpiérrez, E., Sosa, C. (2015). *Consumo de pasta base de cocaína y cocaína en mujeres durante el embarazo*. Espacio Interdisciplinario, Universidad de la República, Montevideo.
13. Behnke, M., Smith, V., C. (2013). *Prenatal Substance Abuse: Short- and Long-term Effects on the Exposed Fetus*. Committee on substance abuse, Committee of fetus and newborn. From the American Academy of Pediatrics, 131:1009-1024.
14. Wouldes, T., Lester, M. (2019). *Stimulants: how big is the problem and what are the effects of prenatal exposure?* Seminars in Fetal and Neonatal Medicine. SFNM 996, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.siny.2019.01.011>.

15. Purves, D., Augustine, G., J., Fitzpatrick, D., Gall, W., C., LaMantia, A., McNamara, J., O., Williams, S., M. (2004). *Neuroscience*. Third Edition. Sinauer Associates, Inc.
16. Macmillan, W., H. (1959). *A hypothesis concerning the effect of cocaine on the action of sympathomimetic amines*. Brit. J. Pharmacol, 14:385.
17. Moraes, M.; González, G.; Sosa, C., Umpiérrez, E. (2013). *Consumo de alcohol, cocaína y cafeína en el embarazo: efectos sobre el embarazo y el niño*. Espacio Interdisciplinario, Universidad de la República, Montevideo.
18. Moraes, M., Scorza, C., Abin-Carriquiry, J. A., Pascale, A., González, G., Umpiérrez, E. (2010). *Consumo de pasta base de cocaína en Uruguay en el embarazo, su incidencia, características y repercusiones*. Archivos de Pediatría del Uruguay; 81:100-104.
19. Cressman, A. M., Natekar, A., Kim, E., Koren, G., Bozzo, P. (2014). *Cocaine Abuse During Pregnancy*. Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada, 36:628-631.
20. Ellis, J., E., Byrd, L., D., Sexson, W., R., Patterson-Barnett C., A. (1993). *In utero exposure to cocaine: a review*. Southern Medical Journal, 86:725-731.
21. Ortigosa, S., Friguls, B., Joya, X., Martínez, S., Mariñoso, M., L., Alameda, F., Vall, O., Garcia-Algar, O. (2012). *Feto placental morphological effects of prenatal exposure to drugs of abuse*. Reproductive Toxicology, 34:73-79.
22. Richeri, A., Vierci, G., Martínez, G., F., Latorre, M., P., Chalar, C., Brauer, M. (2020). *Neuropilin-1 receptor in the rapid and selective estrogen-induced neurovascular remodeling of rat uterus*. Cell and Tissue Research, 381:299-308.
23. Burnstock, G., Ralevic, V. (1994). *New insights into the local regulation of blood flow by perivascular nerves and endothelium*. British Journal of Plastic Surgery, 47:527-543.
24. Burnstock, G., Loesch, A. (2016). *Sympathetic innervation of the kidney in health and disease: Emphasis on the role of purinergic cotransmission*. Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical, 204:4-16.
25. De Giovanni, N., Marchetti, D. (2012). *Cocaine and its metabolites in the placenta: A systematic review of the literature*. Reproductive Toxicology, 33:1-14.
26. Su, E., J. (2015). *Role of the fetoplacental endothelium in fetal growth restriction with abnormal umbilical artery Doppler velocimetry*. American Journal of Obstetrics and Gynecology. 213:S123-S130.
27. Furray, A., Foster, D. (2015). *Substance Use in the Perinatal Period*. Current Psychiatry Reports, 17:91.
28. Organización Panamericana de la Salud. Manual de recomendaciones en el embarazo y parto prematuro. (2019). Ministerio de Salud, Uruguay.
29. Atalah, E., Castillo, C., Castro, R., Aldea, A. (1997). *Proposal of a new standard for the nutritional assessment of pregnant women*. Revista Medica de Chile, 125:1429-36.

30. Griffiths, E., A., Mardones, A., O., Zambrano, J., R., Sánchez, J., S., Quintana, J., C., Muñoz, L., C. (1995). *Relation between nutritional status of adolescent mothers and neonatal development*. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana, 118:488-98.
31. Battaglia, F., Lubchenco, L. (1967). *A practical classification of newborn infants by weight and gestational age*. The Journal of Pediatrics, 71:159-163.
32. Fenton, T., Kim, J. (2013). *A systematic review and meta-analysis to revise the Fenton growth chart for preterm infants*. BMC Pediatrics, 13:59.

ANEXO

HISTORIA CLINICA PERINATAL - CLAP/SMR - OPS/OMS

FECHA DE NACIMIENTO: día mes año

ETNIA: blanca, indígena, mestiza, negra, otra

ALFA BETA: si, no

ESTUDIOS: ninguno, primario, secundario, universitario, años en el mayor nivel

ESTADO CIVIL: casado, unión estable, soltera, otro

Lugar del control prenatal: Lugar del parto, otro

DOMICILIO: LOCALIDAD, TELEF.

EDAD (años): < de 15, > de 35

Nº hijos vivos: no, si

Nº hijos muertos: no, si

FIN EMBARAZO ANTERIOR: día mes año, meses de 1 año

EMBARAZO PLANEADO: no, si

FRACASO METODO ANTICONCEPCION: no, si

USABA: barrera, DIU, hormona, otro, natural, genica

ANTECEDENTES

FAMILIARES: TBC, diabetes, hipertensión, pre-eclampsia, eclampsia, otra cond. médica grave

PERSONALES: cirugía, genito-urinario, infertilidad, cardiopat., nefropatía, violencia

OBSTETRICOS: gestas previas, abortos, vaginales, nacidos vivos, nacidos muertos, después 1º sem, después 2º sem

ULTIMO PREVIO: n.c., <2500g, normal, >4000g

Antecedente de gemelares: no, si

GESTACION ACTUAL

PESO ANTERIOR: Kg

TALLA (cm): cm

EG CONFiable por FUM: Eco <20 s, 1º trim, 2º trim, 3º trim

FUMACT: no, si

FUMAPS: no, si

DROGAS: no, si

ALCOHOL: no, si

VIOLENCIA: no, si

ANTIRRUBEOLA: no, si

ANTITETANICA: vigente no, si, dosis 1º, 2º mes gestación

EX. NORMAL: ODONT., MAMAS

CERVIX: normal, anormal

GRUPO: Rh, Rh incompatible, yglobulina anti D

TOXOPLASMOISIS: <20sem IgG, >20sem IgG, 1º consulta IgM

VH: <20 sem, no, si, solicitado, realizado

Hb <20 sem: no, si, <11.0 g/dl

Ferrolatos: no, si, <11.0 g/dl

SIFILIS: no, si, diagnóstico y tratamiento, prueba, treponémica, no treponémica, no, si, n.c.

GLUCEMIA EN AYUNAS: <20 sem, >20 sem, >105 mg/dl, solicitado, realizado

ESTREPTOCOCCO B: >35-37 semanas, no, si, solicitado, realizado

PREPARACION PARA EL PARTO: no, si

CONSEJERIA LACTANCIA MATERNA: no, si

CHAGAS: no, si, huzo, no se hizo

PALUDISMO/MALARIA: no, si, huzo, no se hizo

BACTERIURIA: sem, normal, anormal, no huzo, >20

CONSULTAS ANTEMIALES

di, mes, año, edad gest., peso, P.A., altura uterina, presentación, FCF (bpm), movim. fetales, proteín. hurnia, signos de alarma, exámenes, tratamientos, Iniciales Técnico, próxima cita

PARTO ABORTO

FECHA DE INGRESO: día mes año

CONSULTAS PRE-NATALES: total, días

HOSPITALIZ. en EMBARAZO: completo, incompl., ninguna, inicio, cesar. elect.

CORTICOIDES ANTEMIALES: completo, incompl., ninguna, semana inicio, n.c.

INICIO: espontáneo, inducido, cesar. elect.

ROTURA DE MEMBRANAS ANTEPARTO: no, si, hora, min, temp. >38°C

EDAD GEST. al parto: <37 sem, >37 sem, semanas, días

PRESENTACION SITUACION: cefalica, pelviana, transversa

TAMANO FETAL ACORDE: no, si

ACOMPANANTE: TDP, P, familiar, otro, ninguno

CARNÉ: no, si

TRABAJO DE PARTO: hora, min, posición de la madre, PA, pulso, contr./10, dilatación, altura present., variedad posic., meconio, FCF/hips

ENFERMEDADES: HTA previa, HTA inducida embarazo, preeclampsia, eclampsia, cardiopatía, nefropatía, diabetes, infec. ovular, infec. urinaria, amenaza parto preter., R.C.L.U., rotura prem. de membranas, anemia, otra cond. grave

HEMORRAGIA: 1º trim., 2º trim., 3º trim., postparto, infección puerperal, notas

NACIMIENTO VIVO

hora, min, día, mes, año

MUERTO: anteparto, parto, ignora momento

MULTIPLE: no, si, orden

TERMINACION: espont., cesarea, otra, fórceps, vacío

INDICACION PRINCIPAL DE INDUCCION O PARTO OPERATORIO: INDUC., OPER.

POSICION PARTO: sentada, acostada, EPODITOMA, DESGARROS: Grado (1 a 4), OCTOCICOS: preslabre, poslabre, no, si, PLACENTA: completa, retenida, LIGADURA CORDON: completa, no, si, MEDICACION: octocicos en TDP, antibiot., analgesia, anest. local, anest. region., anest. gen., transfusión, otros, específico

REANIMACION: estimular., aspiración, máscara, oxígeno, masaje, tubo

FALLECE en LUGAR de PARTO: no, si

REFERIDO: no, si, alq. cont., neonat. hosp., otro

ATENDIO: médico, obst., enf., auxil., estad., empir., otro

NEONATO: no, si

PUERPERIO: día, hora, T°C, P.A., pulso, invol. uter., loquios

DEFECTOS CONGENITOS: no, si, mayor, menor, otro

ENFERMEDADES: no, si, mayor, menor, otro

TAMIZAJE NEONATAL: VDRL, TSH, Htpatía, Bilirub, IgM, Meconio 1º día

ALIMENTO AL ALTA: lact. excl., parcial, artificial

Boca amibia: no, si

BCG: no, si

PESO AL EGRESO: g

EGRESO MATERNO: traslado, lugar, día, mes, año, vive, fallece, fallece durante o al lugar de traslado

ANTICONCEPCION: no, si

CONSEJERIA: no, si

MI TODO ELIGIDO: DIU post. evento, DIU natural, DIU hormonal, líquido tubaria, barrera, otro, ninguno

EGRESO RN: vivo, fallece, traslado, fallece durante o al lugar de traslado, día, mes, año, hora, min, lugar

Nombre Recién Nacido: Responsable

Nombre Recién Nacido: Responsable

Anexo 1. Sistema Informático Perinatal (SIP) - Historia Clínica Perinatal Regional. 2010.
 Organización Panamericana de la Salud y Centro Latinoamericano de Perinatología - Salud de la Mujer y Reproductiva (CLAP/SMR).