



Ministerio
**de Educación
y Cultura**



Programa de
Desarrollo de las
Ciencias Básicas

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas subárea
Neurociencias – PEDECIBA

**Consumo de cocaína en el embarazo: cambios en
la inervación vascular en el cordón umbilical del
recién nacido, repercusiones clínicas y un
mecanismo molecular asociado**

Lic. Jimena Fagetti Methol

**Departamento de Neurofarmacología Experimental
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable**

Orientadora: Dra. Analía Richeri

Co-orientadora: Dra. Cecilia Scorza

2024

AGRADECIMIENTOS

A Analía por permitirme realizar mis estudios de maestría bajo su orientación, presente y cercana. Gracias por tu calidez y tus enseñanzas en las distintas metodologías y en el análisis de los resultados.

A Cecilia, por la buena disposición y por sus aportes en el análisis e interpretación de los resultados. Gracias por tus devoluciones y por tu paciencia.

Al resto del grupo del DNFE que hacen que el clima de trabajo sea más disfrutable, gracias por los almuerzos y festejos compartidos y por estar siempre a disposición ante cualquier inquietud en el día a día.

A mi familia y amigos que acompañaron este proceso desde un lado más personal, motivándome y apoyándome en todas las decisiones, y que son tan importantes en mi vida.

A Fede por su compañía y apoyo, que fue fundamental durante este último tiempo.

Al tribunal de la tesis (Rebeca, Gisselle y Mariano) por tomarse el tiempo de corregirla, y aportar sus devoluciones que enriquecen el trabajo.

A PEDECIBA y ANII por el apoyo económico para realizar esta tesis.

TABLA DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS.....	5
1. RESUMEN.....	6
2. INTRODUCCIÓN	8
2.1. Antecedentes generales	8
2.1.1. Cordón umbilical humano	8
2.1.1.1. Circulación feto-placentaria	9
2.1.1.2. Vasos sanguíneos del CU	12
2.1.1.3. Mecanismos de regulación del flujo sanguíneo.....	12
2.1.1.4. Inervación del CU.....	14
2.1.2. Consumo de drogas de abuso en el embarazo: cocaína	15
2.1.3. Semaforinas: moléculas de guiado axonal	19
2.2. Antecedentes específicos	22
3. HIPOTESIS DE TRABAJO:	24
4. OBJETIVOS	24
4.1. Objetivo general	24
4.2. Objetivos específicos.....	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS	26
5.1. Obtención de cordones umbilicales y poblaciones de estudio	26
5.2. Procesamiento de las muestras de CU	27
5.2.1. Inmunofluorescencia (IF) para detección de fibras nerviosas en el CU.....	28
5.2.2. Tinción con hematoxilina y eosina de cortes de CU: anatomía, diámetro, y análisis morfométrico de los vasos umbilicales.	31
5.3. Análisis de datos clínicos maternos y del RN.....	32
5.4. IF para evaluar expresión de Sema3A en cortes de CU y co-marcación con anti-TH	33
5.5. Análisis estadísticos.....	34
6. RESULTADOS	36

6.1.1.	Efecto de la exposición prenatal a cocaína en el patrón de innervación a lo largo del CU	36
6.1.2.	Efecto de la exposición prenatal a cocaína en la densidad de innervación en la región proximal del CU	38
6.1.3.	Diámetro de los vasos sanguíneos umbilicales.....	42
6.2.1.	Análisis de las historias clínicas maternas	43
6.2.2.	Análisis de la información clínica perinatal de los donantes de CU, impacto de la exposición prenatal a cocaína.....	43
6.2.3.	Análisis comparativo entre la innervación de los vasos sanguíneos del CU y las variables antropométricas del RN	45
6.3.	Efecto de la exposición prenatal a cocaína en la expresión de Sema3A en los vasos sanguíneos del CU y asociación con los cambios de innervación simpática vascular	47
7.	DISCUSIÓN	49
7.1.	Patrón y densidad de innervación de los vasos sanguíneos del CU	49
7.2.	Diámetro de los vasos sanguíneos del CU	51
7.3.	Información clínica de las madres y de los RN donantes de CU y relación con la innervación vascular del CU	53
7.4.	Semaforina-3A como mecanismo molecular subyacente a los cambios de innervación de los vasos sanguíneos del CU	56
8.	CONCLUSIONES.....	59
8.1.	Patrón y densidad de la innervación vascular	59
8.2.	Diámetro vascular	59
8.3.	Relación entre la innervación vascular y las variables antropométricas	59
8.4.	Mecanismo molecular: Sema3A	59
9.	APORTES	60
10.	LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS	61
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	64

ABREVIATURAS

5-HT – Serotonina

ACh – Acetilcolina

ANOVA – Análisis de Varianza

BPN – Bajo peso al nacer

CGRP - Péptido relacionado con el gen de la calcitonina

CU – Cordón umbilical

GW – Gelatina de Wharton

ID – Densidad integrada

IF – Inmunofluorescencia

IR – Inmunorreactividad

MCC – Madres con consumo de cocaína

MGV – *Mean gray value* (promedio de escala de grises)

NA - Noradrenalina

NPY – Neuropeptido Y

NRP – Neuropilina

ON – Óxido nítrico

PEG – Pequeño para la edad gestacional

PGP 9.5 – *Protein gene product 9.5* (Ubiquitina-carboxi hidrolasa)

PT – Pretérmino

RCIU – Restricción del crecimiento intrauterino

RN – Recién nacido

Sema3A – Semaforina 3A

SIP – Sistema informático perinatal

SNA – Sistema nervioso autónomo

SNC – Sistema nervioso central

SNP – Sistema nervioso periférico

TH – Tirosina Hidroxilasa

TM – Túnica media

UNODC – Oficina de Naciones Unidas contra Drogas y Delitos

VEGF – Factor de crecimiento endotelial vascular

1. RESUMEN

El consumo de drogas de abuso durante el embarazo es un factor de riesgo que aumenta la vulnerabilidad en la aparición de afecciones en la salud materno-fetal. Su cronicidad puede impactar en el desarrollo del niño/a incluso en etapas tempranas.

El cordón umbilical (CU) es una estructura de origen fetal que colabora en mantener el bienestar fetal durante la gestación a través de sus vasos sanguíneos (dos arterias y una vena umbilical) que facilitan el transporte de nutrientes y oxígeno, y la eliminación de desechos por la sangre. Cualquier alteración en el flujo sanguíneo conlleva consecuencias leves o graves para el feto. Este trabajo de tesis es una investigación básico-clínica cuyo objetivo fue analizar la inervación de los vasos sanguíneos del CU de recién nacidos (RN) de madres que consumieron drogas durante el embarazo, especialmente cocaína (MCC). La cocaína es una droga de abuso, con alto poder adictivo. Su principal mecanismo de acción es bloquear el transportador de monoaminas, en particular de noradrenalina, aumentando la actividad de las fibras simpáticas (droga simpaticomimética). Esta acción a nivel del sistema nervioso simpático genera un efecto vasoconstrictor en los vasos sanguíneos. Hipotetizamos que un aumento en la inervación simpática de los vasos sanguíneos del CU, inducido por el consumo de cocaína, puede disminuir el diámetro vascular, afectando el flujo sanguíneo y asociarse directamente con las manifestaciones clínicas que se observan en los RN de MCC, tales como bajo peso al nacer, prematuridad, entre otros. Dado que la densidad de inervación vascular puede ser modulada por moléculas de guiado axonal, proponemos a la semaforina-3A (Sema3A), una glicoproteína neuro-repulsiva, como mecanismo molecular subyacente a un aumento en la inervación simpática por cocaína.

La inervación vascular del CU se analizó a través de técnicas de inmunofluorescencia en cortes de tejido utilizando dos anticuerpos: anti-PGP (marcador general de fibras nerviosas) y anti-Tirosina Hidroxilasa (TH, para marcar fibras simpáticas). Se midió el área inmunorreactiva para PGP (IR-PGP) y para TH (IR-TH), en tres regiones: proximal, medial y distal. Además, se midió el diámetro de los vasos umbilicales, en cortes histológicos adyacentes a los destinados para evaluar inervación. Los datos clínicos sobre las gestantes y sus RN fueron tomados del Sistema Informático Perinatal (SIP). Se analizaron las medidas antropométricas del RN tales como el peso, la talla y el perímetro cefálico. La edad gestacional y las variables maternas también fueron evaluadas. La expresión de Sema3A en los vasos umbilicales, se evaluó mediante inmunofluorescencia.

Los resultados mostraron la presencia de inervación, incluyendo inervación simpática en la región proximal del CU en las arterias, y escasa inervación en la vena umbilical. Se observó una tendencia al aumento de la inervación simpática de las arterias umbilicales de

RN de MCC, que no alcanzó a ser estadísticamente significativa respecto al grupo control. No se evidenció una disminución significativa en el diámetro de arterias y vena umbilical, aunque el valor tendió a ser menor en la vena de los RN de MCC respecto a los RN no expuestos a cocaína. En el grupo de RN de MCC encontramos una disminución estadísticamente significativa en la edad gestacional y en los percentiles de peso y perímetro cefálico. Las comparaciones de los datos clínicos con la innervación de las arterias umbilicales de cada donante, sugieren que podría haber una relación inversa entre estas variables. No encontramos diferencias entre la edad, el peso y la talla de las MCC con respecto a las madres del grupo control. Observamos también, que tanto las arterias como la vena umbilical expresan Sema3A, aunque no se encontraron diferencias en su expresión tras la exposición prenatal a cocaína que pudieran explicar un aumento en la innervación simpática (IR-TH) de las arterias de algunos RN de MCC.

Los hallazgos de esta tesis podrían colaborar en la identificación de una variable biológica que explique, al menos en parte, las manifestaciones clínicas de los RN de MCC en etapas tempranas. Sin embargo, más investigación es necesaria para confirmar estos resultados y evaluar si esta variable podría implicar también riesgos en el neurodesarrollo en etapas avanzadas.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Antecedentes generales

2.1.1. Cordón umbilical humano

El cordón umbilical (CU) humano es un órgano vital en el mantenimiento del bienestar fetal durante la gestación. Es una estructura única que permite la comunicación del feto con la placenta e indirectamente con la madre. Su principal función es el transporte de nutrientes y de oxígeno, sustancias esenciales para el desarrollo y crecimiento del feto, y la eliminación de los desechos (Donlon y cols., 2002; Ferguson y Dodson, 2009; Wang y Zhao, 2010). Junto con la placenta, son los órganos encargados de mantener la vida intrauterina durante las 40 semanas que dura el embarazo humano. El cordón umbilical y la placenta son órganos compartidos con todos los mamíferos placentarios, son estructuras “transitorias” ya que se forman y existen únicamente en la gestación, luego de que se implanta un embrión en el útero. Al finalizar la gestación ya no son necesarios y se descartan, pudiéndose formar nuevos en futuras gestaciones.

El CU humano se desarrolla a partir del embrión entre la cuarta (4ta) y la octava (8va) semana de gestación, desde el amnios en expansión, como una estructura rudimentaria, completando su desarrollo en la doceava (12va) semana de gestación. Lo precede la formación de la placenta, que comienza al final de la tercera semana, al final de la 4ta semana se desarrolla una compleja red vascular en la placenta que permite el intercambio de gases, nutrientes y productos metabólicos de desecho entre la madre y el feto. El flujo sanguíneo feto-placentario se establece al final de la quinta (5ta) semana de gestación (Spurway y cols., 2012). El CU normalmente contiene dos arterias umbilicales y una vena umbilical, embebidas en un tejido conjuntivo mucoso llamado “gelatina de Wharton” (GW) y rodeado por una capa de amnios (Fawcett y Bloom, 1995; Ferguson y Dodson, 2009). Las dos arterias umbilicales forman una hélice alrededor de la vena umbilical (Figura 1). El alantoides surge como un divertículo del saco vitelino, extendiéndose de la vejiga temprana fetal y contribuye al desarrollo de los vasos umbilicales. La regresión del alantoides ocurre entre la sexta (6ta) y la 8va semana de gestación y el remanente se ubica entre las dos arterias, del lado fetal del CU (Spurway y cols., 2012). Rodeando los vasos umbilicales está la GW, un tejido conjuntivo mucoso, con ácido hialurónico y proteoglicanos, moléculas hidrofílicas que resisten la compresión (Davies y cols., 2017; Ferguson y Dodson, 2009). Un cordón completamente desarrollado (12va semana), se proyecta como una extensión extracorpórea del sistema vascular fetal, sin mayor protección que la GW (Wang y Zhao, 2010).

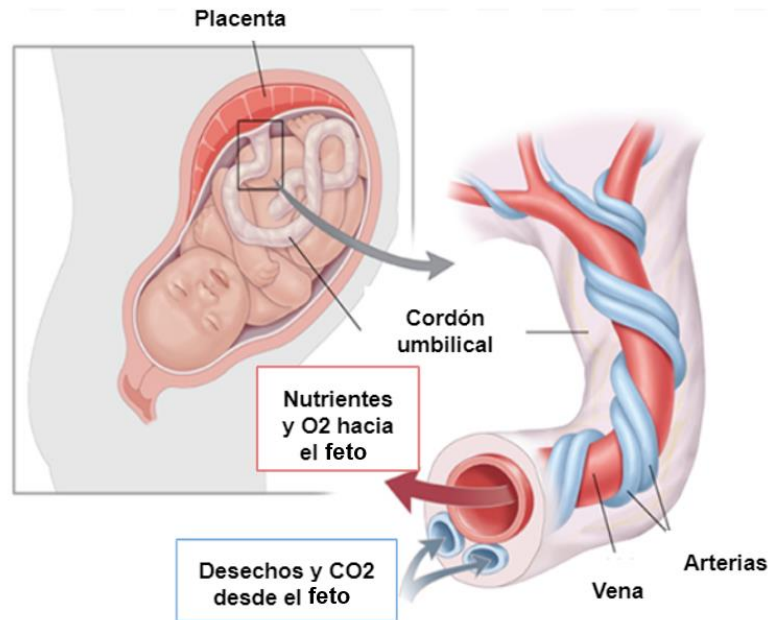


Figura 1: Esquema que ilustra la anatomía e inserción del cordón umbilical en la vida intrauterina. Ampliado a la derecha se representan los vasos sanguíneos que lo conforman y su disposición característica: 2 arterias (color azul) rodeando una vena (color rojo) rodeadas por la gelatina de Wharton (color rosado). Modificado de Jonathan Dimes para *BabyCenter* (2021) www.babycenter.com.

En un feto humano a término (40 semanas), el CU tiene un promedio de 50-70 cm de largo y aproximadamente 2 cm de diámetro. Se extiende desde el ombligo del feto hasta la superficie fetal de la placenta o la placa coriónica (Figura 1). El CU no está directamente conectado con el sistema circulatorio materno, sino que se une a la placenta materna sin permitir la mezcla directa de sangre (Wang y Zhao, 2010).

2.1.1.1. Circulación feto-placentaria

La placenta y el CU constituyen el sistema de transporte de sustancias que transitan entre la madre y el feto. Los nutrientes y el oxígeno necesarios para el desarrollo pasan a través de la placenta desde la sangre materna a la fetal, mientras que las sustancias de desecho y el dióxido de carbono lo hacen desde la sangre fetal a través de la placenta hasta la sangre materna para poder ser eliminados por la circulación materna.

La placenta es un órgano vascular único que recibe sangre tanto del sistema circulatorio de la madre como del feto, se puede distinguir la circulación materno-placentaria (uteroplacentaria) y la feto-placentaria. Se caracteriza hemo-dinámicamente por poseer una doble irrigación. La circulación materna le proporciona el flujo uteroplacentario mientras que el feto, a través de la circulación umbilical, es responsable del flujo feto-placentario. Este

órgano forma diminutas proyecciones pilosas (vellosidades), que se extienden hacia el interior de la pared uterina (Figura 2). Una membrana fina en las vellosidades separa la sangre del embrión de la sangre de la madre, que fluye por el espacio que rodea dichas vellosidades (espacio intervelloso). Esta membrana, la barrera feto-placentaria, también evita que el sistema inmunitario materno reaccione frente al embrión, ya que los anticuerpos producidos en la madre, por su tamaño no atraviesan dicha membrana (Wang y Zhao, 2010).

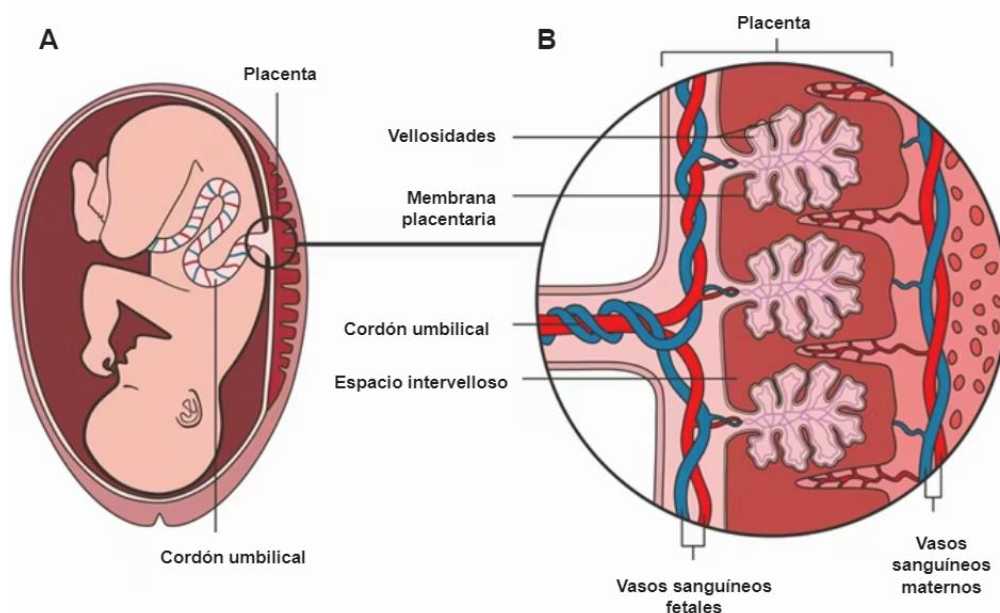


Figura 2: Esquema que ilustra la anatomía de la placenta (A), y a mayor aumento (B) se indica la región donde ocurre el intercambio entre la sangre materna y la fetal. Modificado de *Nucleus Medical Media* www.nucleusmedicalmedia.com.

La circulación uteroplacentaria comienza con el flujo sanguíneo materno que llega al espacio “intervelloso”, donde se da el intercambio de oxígeno y nutrientes mientras la sangre materna fluye alrededor de las vellosidades. El flujo sanguíneo materno arterial lleva la sangre desoxigenada al endometrio y luego por las venas uterinas, de vuelta hacia la circulación materna. En la circulación feto-placentaria, las arterias umbilicales llevan sangre desoxigenada y sin nutrientes desde el feto hacia las vellosidades de la placenta para cargarse de oxígeno y nutrientes provenientes de la sangre materna. Luego del intercambio, la vena umbilical lleva la sangre oxigenada y rica en nutrientes de vuelta hacia la circulación sistémica del feto (Wang y Zhao, 2010).

En suma, la vena umbilical se encarga de transportar sangre oxigenada, cargada de nutrientes, desde la placenta hacia el feto y las arterias umbilicales se encargan de transportar la sangre poco oxigenada que vuelve cargada de dióxido de carbono y otros productos de desechos desde el feto hacia la placenta, o sea, en sentido contrario. La dirección de la

distribución sanguínea y la función de la vena y las arterias en el CU se contraponen con lo que sucede en la mayoría de los vasos sanguíneos del organismo adulto, ya que las arterias usualmente transportan sangre oxigenada, y las venas sangre poco oxigenada.

Dado que de estos vasos sanguíneos depende la nutrición, oxigenación y eliminación de desechos del feto, podemos deducir que cualquier impedimento en el flujo sanguíneo dentro del CU puede tener consecuencias con diferentes grados de severidad para el feto. Efectivamente, las alteraciones del CU se consideran la causa de alrededor del 35% de los abortos espontáneos y los accidentes en el mismo causan el 28,8% de los casos de anoxia intrauterina (Olaya-Contreras y cols., 2015). Al tratarse de una estructura tan relevante para el desarrollo normal del feto existen mecanismos “de seguridad” fisiológicos involucrados en la protección del CU.

La GW, es uno de los mecanismos de seguridad, ya que, como se mencionó es el tejido conjuntivo rico en ácido hialurónico y proteoglicanos que rodea los vasos umbilicales y los protege de fuerzas externas. Su estructura primaria es una matriz sólida-elástica formada por fibras de colágeno que forma poros interconectados a través de los cuales los fluidos se pueden mover cuando el tejido es comprimido, esta estructura primaria constituye sólo una pequeña porción de su volumen (Fawcett y Bloom, 1995). Existen poros más grandes en la GW que rodean los vasos sanguíneos, estos pueden servir como un espacio extra-vascular que facilita el movimiento de las paredes de los vasos durante el flujo sanguíneo pulsátil (Ferguson y Dodson, 2009). Otro de los mecanismos de protección es el líquido amniótico, este líquido amortigua al feto y al CU y previene la compresión directa, provocada por las contracciones uterinas y los movimientos fetales. La torsión anatómica característica de los vasos umbilicales se cree que está relacionada con el hecho de que esta forma lo hace más resistente al estiramiento y la compresión sin impedir el movimiento fetal libre (Degani y cols., 1995).

El final de la circulación feto-placentaria y del intercambio gaseoso a nivel del CU se da cuando se realiza la maniobra de pinzamiento del cordón umbilical, en la sala de parto o cesárea. Esta es una maniobra que se realiza en la tercera etapa del trabajo de parto, entre el nacimiento y el alumbramiento, dando paso a un proceso fisiológico de adaptación cardiopulmonar del recién nacido (RN). El momento en el que se realiza este pinzamiento es clave, ya que condiciona directamente la redistribución del flujo sanguíneo placentario desde la placenta al RN, con las implicancias que esto puede tener (Hutton y Hassan, 2007; Sinavszki y cols., 2011). Si bien la determinación del momento oportuno del pinzamiento del CU ha suscitado controversias, cada vez hay más evidencia de los beneficios a corto y largo plazo de esperar la redistribución del flujo sanguíneo en los minutos finales de la función placentaria (Sinavszki y cols., 2011).

2.1.1.2. Vasos sanguíneos del CU

Los vasos sanguíneos del CU presentan algunas diferencias destacables en su anatomía y función respecto al resto de los vasos sanguíneos del cuerpo. En general, la mayoría de los vasos sanguíneos consisten en 3 regiones histológicamente diferentes. Cada región se denomina “túnica”, anatómicamente desde el lumen del vaso hacia afuera, se llaman túnica íntima (endotelio), túnica media (músculo liso), y túnica adventicia (Figura 3). La túnica íntima, es usualmente la más fina, consiste en una única capa de células endoteliales sobre una membrana basal. La túnica media contiene predominantemente células de músculo liso y fibras de elastina. Estas capas celulares tienden a estar más organizadas en arterias de mayor calibre. La última capa, más exterior, es la túnica adventicia que está compuesta por tejido conectivo fibro-elástico (Pugsley y Tabrizchi, 2000). En aquellos vasos sanguíneos que se encuentran inervados, los plexos nerviosos se observan en esta capa (Figura 3).

En el caso de los vasos sanguíneos umbilicales las arterias no tienen capa adventicia (Davies y cols., 2017; Ferguson y Dodson, 2009). En cambio, la gelatina de Wharton es la encargada de cumplir con las funciones de esta capa, incluyendo el soporte vascular y la facilitación de la contracción/relajación vascular. Por lo tanto, en el caso de estar inervados, se espera encontrar fibras nerviosas en la región de la GW que rodea a los vasos umbilicales. Se han descrito en esta región de la GW células como “miofibroblastos” que actúan como capa adventicia, rodeando los vasos umbilicales (Takechi y cols., 1993). La estructura general de los vasos también varía entre las arterias y las venas. Las arterias del cuerpo humano usualmente constan de una capa elástica interna y externa, y la vena únicamente de una capa elástica externa (Fawcett y Bloom, 1995). Las arterias umbilicales generalmente tienen varias capas de músculo liso por eso sus paredes son más gruesas que la vena y no tienen capa elástica interna y externa, por el contrario, la vena umbilical tiene una sola capa de músculo liso y una capa elástica interna (Ernst, 2011).

2.1.1.3. Mecanismos de regulación del flujo sanguíneo

La contracción y dilatación de los vasos sanguíneos del organismo puede estar sujeta a un control dual neural-endotelial repercutiendo en el flujo sanguíneo. Las efectoras de dicho control son las células del músculo liso vascular, que circunvalan a las células endoteliales, y van a responder tanto a las señales vasoactivas liberadas de las células endoteliales como a los neurotransmisores liberados por las fibras nerviosas perivasculares. Estas fibras perivasculares son axones simpáticos, en ocasiones complementados con axones sensoriales (y ocasionalmente parasimpáticos) (Figura 3) (Westcott y Segal, 2013).

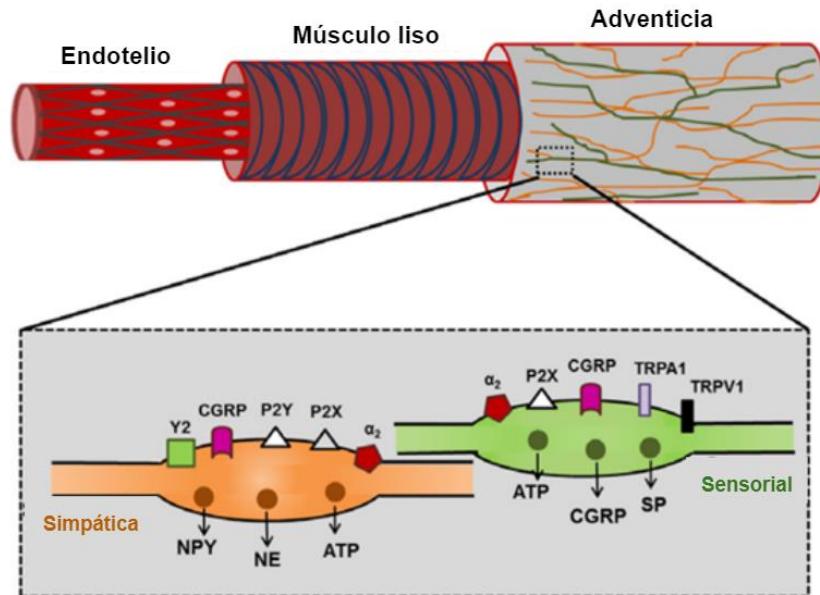


Figura 3: Representación anatómica de las capas que forman a los vasos sanguíneos del cuerpo desde la más interna (Endotelio) a la más externa (Adventicia) y la ubicación anatómica de los nervios perivasculares simpáticos y sensoriales. Además de los neurotransmisores clásicos tales como noradrenalina (NA/NE) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), la liberación concomitante de co-transmisores como neuropéptido-Y (NPY) y ATP, y péptidos neuromoduladores puede influenciar la función vascular. Y2= receptor de NPY; P2Y y P2X= receptores purinérgicos; α_2 = receptor adrenérgico; TRPA1 y TRPV1= receptores de potencial transitorio. Modificado de Westcott y Segal 2013.

Las fibras simpáticas, pertenecen al Sistema Nervioso Autónomo (SNA) y colaboran en mantener el balance en las funciones de los órganos efectores (homeostasis). Los neurotransmisores liberados de las varicosidades de los axones simpáticos que inervan los vasos sanguíneos, pueden regular el tono vascular. Típicamente, la activación de las fibras perivasculares simpáticas causa vasoconstricción mientras, que la activación de las fibras sensoriales o parasimpáticas causa vasodilatación (Westcott y Segal, 2013). Por lo tanto, la noradrenalina (NA), el adenosín trifosfato (ATP) y el neuropéptido Y (NPY) funcionan generalmente como vasoconstrictores, mientras que, la acetilcolina (ACh), liberada por fibras parasimpáticas y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) liberado por axones sensoriales pueden mediar la vasodilatación (Sheng y Zhu, 2018). Además de los neurotransmisores clásicos tales como NA y CGRP, la liberación concomitante de co-transmisores y sustancias neuromoduladoras puede influenciar la función vascular (Figura 3) (Burnstock y Ralevic, 1994). La actividad nerviosa simpática perivascular regula la presión sanguínea, alterando la resistencia vascular periférica, regulando la homeostasis cardiovascular. Generalmente, las arterias de mayor calibre y las arteriolas precapilares están inervadas, mientras que los capilares, las vénulas y las venas, están escasamente inervadas.

Además del control neural de la vasodilatación y la vasoconstricción, existen otras sustancias vasoactivas derivadas de las células del endotelio, como el óxido nítrico (ON), un clásico vasodilatador y la endotelina, que es vasoconstrictora, que pueden cumplir un rol importante en el control vasomotor en condiciones fisiológicas (Sheng y Zhu, 2018; Westcott y Segal, 2013).

2.1.1.4. Inervación del CU

En la actualidad persiste la interrogante de si los vasos sanguíneos del CU humano están inervados o no, dado que existen evidencias controversiales al respecto. La evidencia más reciente es escasa y no se ha llegado a un consenso ya que, algunos estudios reportan inervación de los vasos umbilicales (Marzioni y cols., 2004; Sato, 1998) y otros demuestran y/o asumen que no están inervados y que la modulación del tono vascular en el cordón umbilical no está sujeta a un control neural (Lorigo y cols., 2018).

A fines de los años 60s se reportó la existencia de fibras nerviosas perivasculares en el cordón umbilical (Fox y Jacobson, 1969; Jacobson y Chapler, 1967). Específicamente mediante estudios histoquímicos se identificaron fibras nerviosas noradrenérgicas y colinérgicas (Ellison, 1971). Sin embargo, existen reportes de la época que no confirmaron estos hallazgos (Reilly y Russell, 1977; Walker y McLean, 1971). En los años 90 S. B. Fox y Khong (1990) negaron la presencia de inervación en el CU en la región cercana a la inserción en la placenta y en la región medial del cordón (Fox y Khong, 1990). En oposición a esto, en 1998 N. Sato reporta presencia de fibras nerviosas inmunorreactivas para CGRP y NPY en la región cercana al feto (proximal) del cordón umbilical. En esta región también describió fibras inmunorreactivas para tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante de la síntesis de noradrenalina que sirve como marcador de fibras simpáticas. En particular, este autor describe la presencia de dichas fibras nerviosas, en aposición a la túnica media de las arterias umbilicales, y en los márgenes de la gelatina de Wharton, sugiriendo una regulación neural del flujo sanguíneo en la arteria umbilical (Sato, 1998). Reportes más recientes confirman la presencia de fibras nerviosas en el lado fetal del CU (proximal) y la ausencia en la región más cercana a la placenta (distal) y en la placenta (Marzioni y cols., 2004).

Existen numerosos reportes en la actualidad, que niegan la existencia de un control neural de la contractilidad de los vasos sanguíneos umbilicales, en los que se proponen mecanismos alternativos de regulación del flujo sanguíneo (Chakraborty y cols., 2021; Lorigo y cols., 2018). Estos mecanismos estarían enfocados en el control endotelial del tono del músculo liso en las paredes de los vasos umbilicales. Proponen que el tono vascular estaría regulado por sustancias vasoactivas producidas por las células endoteliales y asimismo

podría estar influenciado por sustancias producidas por las células endoteliales vecinas, de forma paracrina (Benirschke y cols., 2012). Han sido examinadas como moléculas vasoactivas que podrían estar involucradas en la regulación del tono vascular la Orfanina, Serotonina, Angiotensina II, Oxitocina, Péptido Natriurético Auricular y ON (Mauro y cols., 2011). Además se han reportado a las siguientes sustancias vasoactivas, como moduladoras de la contracción de la arteria umbilical: Histamina, tromboxano, bradisinina, endotelina-1, prostaglandina-F2 α y KCl (Lorigo y cols., 2018).

Además de la necesidad de esclarecer los mecanismos de modulación del tono vascular en los vasos umbilicales en gestaciones saludables, es importante conocer de qué forma estos mecanismos se pueden alterar. Algunas patologías gestacionales o la exposición a drogas de abuso podrían influenciar en la circulación a través del CU. Por ejemplo, existen sustancias que pueden alterar la circulación sanguínea y que logran atravesar la placenta (Ellis y cols., 1993; Ganapathy, 2011). En este contexto, el efecto de la exposición prenatal a drogas de abuso en la circulación a través del CU durante el embarazo aún no había sido estudiado.

2.1.2. Consumo de drogas de abuso en el embarazo: cocaína

El consumo de drogas de abuso se encuentra en permanente aumento y supone un problema de salud pública a nivel mundial (UNODC – *World Drug Report* 2023). Los estudios de prevalencia de consumo en la región muestran un aumento especialmente entre adolescentes y mujeres en edad reproductiva, lo que conlleva un riesgo adicional por los posibles efectos que puedan tener el consumo en la descendencia (Risso y cols., 2023).

El uso de estimulantes durante el embarazo como cocaína, metanfetaminas, éxtasis o estimulantes prescritos es cada vez más frecuente y aumenta los riesgos de efectos adversos perinatales, neonatales, y en la primera infancia (Smid y cols., 2019). El impacto en el desarrollo de niños expuestos a drogas de abuso durante su gestación representa una preocupación a nivel mundial (Behnke y Smith, 2013; Larson y cols., 2019; Singer y cols., 2018; Wouldes y Lester, 2019). La exposición prenatal a drogas ha sido asociada a complicaciones severas perinatales, desde aborto espontáneo, muerte fetal, ruptura prematura de membranas, asfixia, accidente cerebrovascular y síndrome de muerte súbita del lactante (Behnke y Smith, 2013). También se ha asociado con el síndrome de abstinencia neonatal, el 30% de los RN expuestos a cocaína en su vida intrauterina presentan síndrome de abstinencia (Moraes y cols., 2010). Por estos motivos, los RN expuestos a drogas de abuso durante el embarazo tienen un mayor riesgo de ingreso a unidades de cuidados neonatales intermedios e intensivos, con los costos que eso conlleva (Roca y cols., 2021).

Se han realizado varios estudios tanto nacionales como internacionales enfocados en estudiar los efectos del consumo de drogas de abuso en el embarazo en torno al impacto neonatal (Behnke y Smith, 2013; Moraes y cols. 2010; Ortigosa y cols., 2012; Wouldes y Lester, 2019). Sin embargo, existe consenso en la literatura sobre la escasez de conocimiento acerca de los mecanismos implicados en el impacto que tiene el consumo de drogas de abuso en el embarazo sobre los niños expuestos a dichas sustancias, en particular sobre el sistema nervioso, y a nivel celular y molecular. Además, preocupan los riesgos que el consumo pueda tener a largo plazo, en la primera infancia de niños expuestos a drogas in útero. Actualmente, se han comenzado a identificar factores de riesgo vinculados al consumo materno de drogas de abuso en el embarazo que se manifiestan posteriormente al período neonatal, en la primera infancia. Estos pueden significar consecuencias neurocognitivas adversas, alteraciones en el desarrollo del niño y vulnerabilidad a desarrollar desórdenes en el uso de sustancias tempranamente en la adolescencia. (Singer y cols., 2018).

Según el “*World Drug Report 2023*” (UNODC, 2023), la cocaína es la droga psicoestimulante más utilizada en un alto porcentaje de países globalmente, especialmente en América, Europa y África (Figura 4).

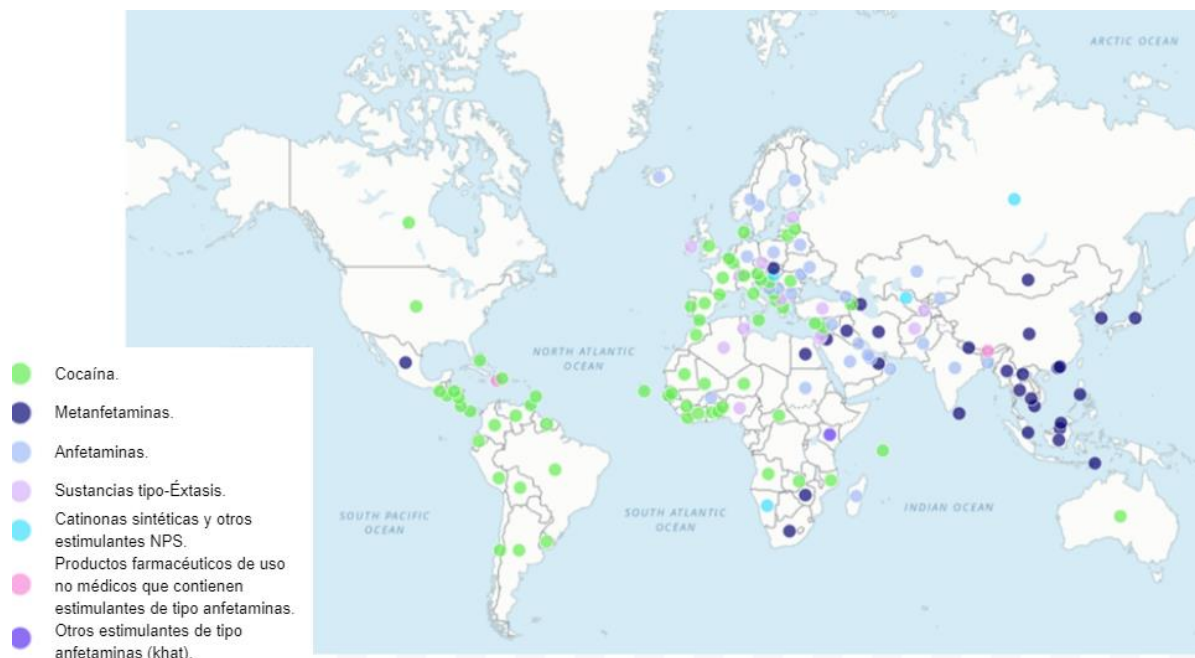


Figura 4: Representación de las drogas estimulantes más utilizadas en cada país según reporte de UNODC 2021. La cocaína es la droga estimulante más usada en las Américas, en términos de número de usuarios. Modificado de UNODC (*United Nations Office on Drugs and Crime*), respuestas al cuestionario del reporte anual *World Drug Report 2023*.

Si observamos la prevalencia anual de consumo en Sudamérica, Uruguay es de los países con valores de prevalencia más altos, antecedido únicamente por Brasil según datos recientes (Figura 5). Además, la cocaína y sus derivados son la principal droga utilizada por

aquellas personas que solicitaron atención por el uso problemático de drogas de abuso en nuestro país (UNODC, 2023); este hecho constituye un indicador relacionado con el daño asociado a este tipo de droga.



Figura 5: Prevalencia del uso de cocaína y sus derivados en Sudamérica, por país, del último año que hay datos. Modificado de UNODC (*United Nations Office on Drugs and Crime*), respuestas al cuestionario del reporte anual *World Drug Report 2023*.

El uso de cocaína supone un riesgo para toda la población, aunque el consumo es mayor en hombres que en mujeres, ha sido ampliamente documentado que las mujeres en edad reproductiva son especialmente vulnerables a desarrollar uso problemático de esta droga (Cook y cols., 2017). El consumo de cocaína en mujeres presenta ciertas características distintivas con relación al consumo en varones. Las mujeres generalmente muestran una transición más rápida desde el consumo ocasional al consumo problemático y se reportan tasas más altas de reincidencia en el consumo, comparada con los varones (Bobzean y cols., 2014). Adicionalmente, el uso en esta población aumenta el riesgo de continuar su consumo durante el embarazo (Orndorff y cols., 2023) lo que expone a la mujer y al feto en desarrollo a un riesgo mayor en la predisposición a resultados perinatales adversos.

La cocaína en sus diferentes formas (clorhidrato, pasta base o crack) se conoce en relación a su alto poder reforzador y adictivo (Hatsukami y Fitchman, 1996). Su sitio de acción principal es el sistema nervioso central (SNC) y su mecanismo de acción involucra el bloqueo de la proteína transportadora encargada de la recaptación presináptica de los neurotransmisores monoaminérgicos, tales como, dopamina, NA y serotonina tanto a nivel del SNC como del sistema nervioso periférico (SNP), generando un aumento en la transmisión neuroquímica de las monoaminas (MacMillan, 1959; Pierce y Kumaresan, 2006). A nivel del SNP actúa mediante su acción simpaticomimética indirecta, aumentando los

niveles de NA de aferentes simpáticos, produciendo un efecto psicomotor estimulante, dado por un aumento en la alerta y en la actividad locomotora (Koob y Volkow, 2016).

Durante el embarazo se incrementa de forma considerable la circulación uterina favoreciendo el adecuado crecimiento fetal. Algunas patologías (ej. preeclampsia) o el consumo de drogas de abuso como la cocaína en forma crónica, implican mecanismos de vasoconstricción (Ortigosa y cols., 2012). La vasoconstricción inducida por cocaína en mujeres embarazadas puede provocar hipertensión materna, lo que se ha asociado entre otros factores, con el desprendimiento prematuro de la placenta y placenta previa (Ellis y cols., 1993; Fan y cols., 2024). **Por su acción simpaticomimética, una vez consumida, la cocaína aumenta los niveles circulantes de NA y a su vez de la transmisión NAérgica, que produce vasoconstricción** generalizada por afectar directa o indirectamente los vasos sanguíneos maternos y fetales (Smid y cols., 2019). La cocaína por su bajo peso molecular, ionización a pH fisiológico, y su alta solubilidad, atraviesa la barrera hemato-encefálica materna y la placenta mediante difusión simple (Schenker y cols., 1993). Los efectos sobre el desarrollo fetal se podrían dar de forma indirecta, a través de trastornos vasculares maternos como la vasoconstricción de arterias uterinas o de forma directa sobre el desarrollo del cerebro fetal por la difusión a través de la placenta (Ellis y cols., 1993). Actualmente, se desconoce si la cocaína puede provocar vasoconstricción de los vasos sanguíneos del CU potenciando la actividad de la inervación simpática vascular. **Un predominio en el tono vasoconstrictor de los vasos umbilicales podría reducir el diámetro de los vasos, y en consecuencia el flujo sanguíneo feto-placentario, afectando así el correcto desarrollo fetal.**

Estudios en recién nacidos de madres consumidoras de cocaína permitieron la **identificación de indicadores claves en el RN que podrían tener una fuerte asociación con el consumo**, por ejemplo: la restricción del crecimiento intrauterino (RCIU), una menor talla y perímetro cefálico, el bajo peso al nacer (BPN < 2500 g) (Gouin y cols., 2011; Smid y cols., 2019), los niños pequeños para la edad gestacional (PEG) y los partos pretérminos (PT) (Moraes y cols., 2010, 2015, 2020; Smid y cols., 2019). El peso y la edad gestacional al momento del parto son importantes determinantes de la salud perinatal, neonatal, infantil y adulta (Sola, 2011).

A pesar de que se ha avanzado en el conocimiento de algunos de los riesgos y perjuicios en el recién nacido de la exposición in útero a cocaína, todavía restan esclarecer los mecanismos mediante los cuales se producen estos efectos. **En este contexto, proponemos que un aumento de la inervación simpática de los vasos sanguíneos del CU podría ser uno de esos mecanismos.**

Además, de existir cambios en la innervación del CU, provocados por cocaína, también deberían existir mecanismos que regulen este proceso, es decir el crecimiento o la repulsión de estos axones hacia los vasos umbilicales (efector). **Diversos mecanismos moleculares modulan la innervación de los efectores. Entre ellos, la expresión de moléculas de guiado axonal como las semaforinas podrían ser estudiadas en este contexto.**

2.1.3. Semaforinas: moléculas de guiado axonal

Durante el desarrollo embrionario y postnatal, los axones deben crecer para innervar sus tejidos efectores, para lograr su correcta trayectoria son instruidos por señales fisicoquímicas del entorno. Este proceso es mediado en parte, por gradientes de señales moleculares que actúan por contacto o a distancia, y que pueden resultar atractivas o repulsivas, promoviendo o inhibiendo el crecimiento, respectivamente (Tessier-Lavigne y Goodman, 1996) (Figura 6). Las señales de guiado axonal incluyen: factores de crecimiento, moléculas de la matriz extracelular, y señales “clásicas” que son las netrinas, slits, semaforinas y efrinas (Young y cols., 2004).

Las semaforinas son una de las principales familias de proteínas inhibitorias o repulsivas de los axones, altamente conservadas a lo largo de la evolución (Kolodkin y cols., 1993; Luo y cols., 1993; Pasterkamp, 2012). En general, repelen a los axones de territorios inapropiados y así, contribuyen al guiado y la correcta innervación de los efectores (Figura 6).

Son reguladores claves del desarrollo del sistema nervioso. Participan en la formación de estructuras importantes del SNC tales como la corteza cerebral, el hipocampo, el bulbo olfatorio, el sistema visual, cerebelo y médula espinal; así como en el correcto cableado de los nervios periféricos. Además del guiado axonal, participan en otras funciones relacionadas con la formación de conexiones neuronales precisas, por ejemplo, la especificación de las dendritas, y la especificidad de la sinapsis (Roth y cols., 2009).

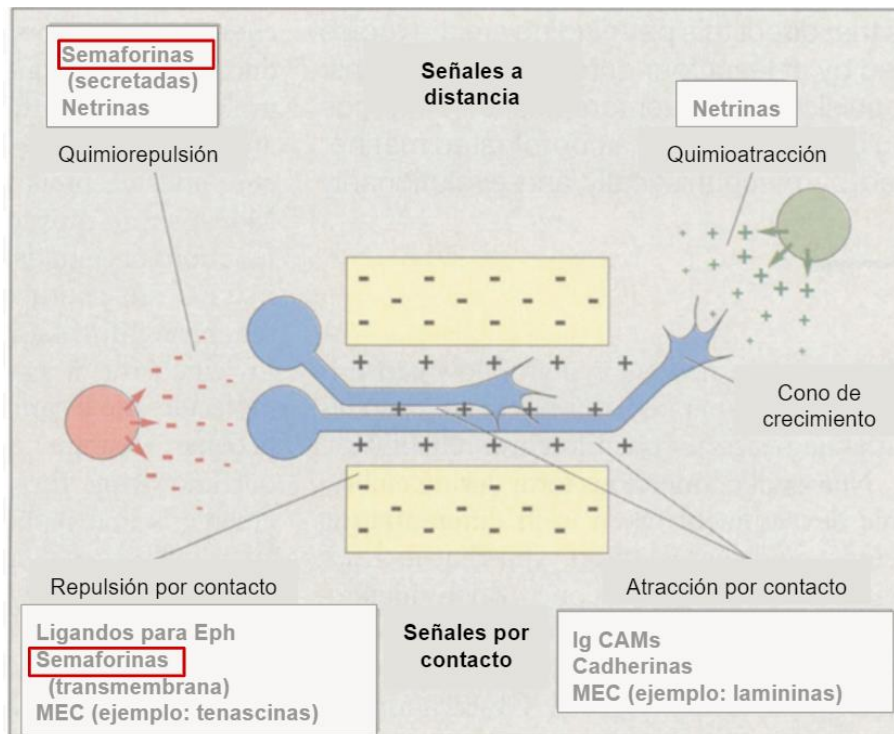


Figura 6: Representación de mecanismos de guiado axonal. Existen moléculas que ejercen sus señales por contacto y otras que actúan a distancia. Además, pueden ser tanto positivas (+) como negativas (-). Se destaca las semaforinas como señal neuro-repulsiva que actúa tanto por contacto como a distancia. Modificado de Tessier-Lavigne 1996.

Las semaforinas son una gran familia de glicoproteínas que pueden existir de forma transmembrana o secretada, y que actúan por contacto/localmente o a distancia, respectivamente. Se han identificado 27 semaforinas que pueden categorizarse en 8 clases según la similitud en su estructura y secuencia de aminoácidos (Figura 7). Las semaforinas secretadas son las de las clases 2, 3 y las virales (Sema2s, Sema3s y SemaV respectivamente), las transmembranas pertenecen a las clases 1, 4, 5 y 6 (Sema1s, Sema4s, Sema5s y Sema6s), además las de la clase 7 (Sema7A) se localizan ancladas a membranas (Figura 7). Como se mencionó previamente, estas proteínas son conservadas y se pueden hallar tanto en invertebrados como en vertebrados, así como en algunos virus. Las Sema-1a, Sema-2a, y Sema-5c, se encuentran en invertebrados, mientras que SemaV se encuentra en algunos virus ADN (Figura 7). El resto de las semaforinas se encuentran en vertebrados, incluyendo a los humanos (Pasterkamp, 2012).

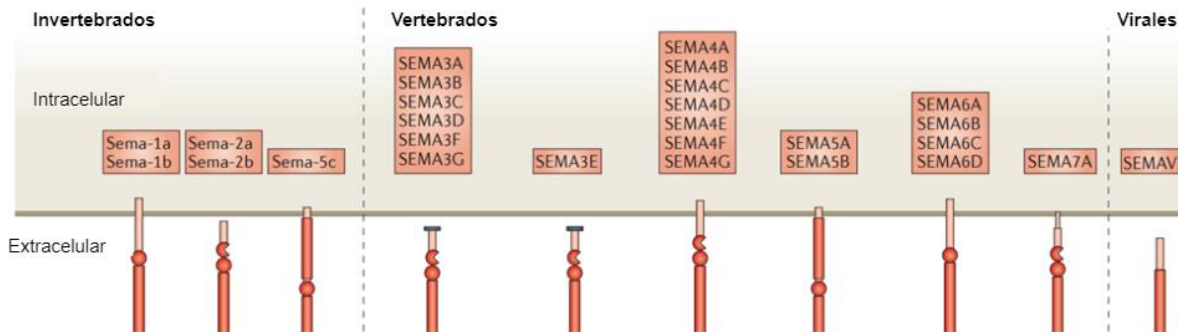


Figura 7: Clasificación de las 27 semaforinas descritas. Categorizadas en 8 clases (SEMA1-SEMA7 y SEMAV), en sus formas secretadas, transmembrana o ancladas. Algunas clases pertenecen a los invertebrados, otras a los vertebrados e incluso se han identificado en los genomas de virus ADN. Modificado de Pasterkamp 2012

Además del guiado y crecimiento axonal, las semaforinas cumplen otros roles importantes. En particular, las células vasculares (endoteliales/musculares) expresan semaforinas que afectan la vasculogénesis y angiogénesis (formación y remodelación vascular) (Kolodkin y Tessier-Lavigne, 2011). Asimismo, las Sema3s producidas por los vasos sanguíneos inhiben el crecimiento de axones simpáticos (Damon, 2006).

Las semaforinas ejercen su efecto neuro-repulsivo en axones que expresan receptores específicos denominados plexinas y neuropilinas. En las neuronas, la mayoría de las semaforinas señalizan a través de plexinas. En los vertebrados, las Sema3s además requieren de neuropilinas de tipo 1 o 2 (NRP1 o NRP2) (Pasterkamp, 2012). Las Neuropilinas son un tipo de proteína transmembrana de tipo I que están altamente conservadas en los vertebrados y se expresan en diversos tipos neuronales. Fueron identificadas originalmente como moléculas de adhesión en el sistema nervioso (Fujisawa, 2004). NRP1 luego fue redescubierta, como receptor de unión de Sema3A en neuronas (Kolodkin y cols., 1997) y luego en los vasos sanguíneos como co-receptor del factor del endotelio vascular (VEGF) (Erskine y cols., 2017). Ambos ligandos de NRP1, Sema3A y VEGF se continúan expresando en la adultez (Brauer y Richeri, 2013; Mann y cols., 2007; Vo y cols., 2013) y se les ha asociado un rol importante en la plasticidad neuronal.

Sema3A y Sema3F particularmente, han sido reportadas como repelentes de axones periféricos, que contribuyen al correcto cableado del SNP (Brauer y Richeri, 2013; Roth y cols., 2009). De nuestro interés, la expresión de Sema3A también ha sido demostrada en el miometrio humano al término de la gestación, así como en la placenta y en el CU del recién nacido (Marzioni y cols., 2004). Además, estos autores demostraron que las fibras nerviosas que inervan estos tejidos expresan Neuropilinas, particularmente la isoforma del tipo 1, Neuropilina-1 y Plexina-A1 que son las proteínas de superficie que forman un complejo

receptor para Sema3A. Esto fue estudiado en cordones de recién nacidos sanos sin ninguna patología gestacional o pregestacional materna (Marzioni y cols., 2004).

Hasta el momento, no se había asociado la expresión de semaforinas u otras moléculas de guiado axonal con, la innervación de los vasos del CU en el contexto de consumo de drogas de abuso durante el embarazo.

2.2. Antecedentes específicos

Resultados previos del laboratorio sugieren la existencia de una innervación aumentada en los vasos sanguíneos del CU de RN de madres que consumieron cocaína durante la gestación, en relación a la población de RN control (Viettro y Richeri, 2019). Estos estudios además, evidenciaron la existencia de nervios simpáticos asociados al CU. Si bien estos resultados fueron el punto de partida de la presente tesis, era necesario completar el muestreo y profundizar en el análisis de las muestras. **Además, aún quedaba por investigar si existía una relación directa entre las variables clínicas antropométricas del recién nacido y los cambios en la innervación de los vasos umbilicales.**

Los cambios en la innervación de los vasos sanguíneos implican procesos de plasticidad neural. Entre los mecanismos subyacentes, las semaforinas toman relevancia dado que, por definición, son moléculas de guiado axonal que median dichos procesos (Brauer y Richeri, 2013). En trabajos recientes del grupo, se ha estudiado en un modelo *in vivo* en rata el papel de las semaforinas específicamente en los procesos de plasticidad de la innervación simpática uterina, donde se determinó la importancia del papel de las semaforinas en los cambios de densidad de innervación de los axones simpáticos intrauterinos. En estos trabajos, se identificaron en el útero dos miembros de semaforinas secretadas del grupo 3, la Sema3A y Sema3F; y se determinó que su expresión era inducida por el estradiol (E2) (Richeri y cols., 2011, 2020). Además, se demostró en los nervios simpáticos intrauterinos, que la expresión de los receptores de unión de estas semaforinas, del tipo Neuropilinas, también era inducida por E2 (Richeri y cols., 2011, 2020) indicando que los cambios en la innervación simpática uterina en respuesta a los niveles de estradiol estaban modulados por este tipo de semaforinas.

La exposición repetida a drogas de abuso induce cambios duraderos en el cableado de los circuitos neurales, los que podrían estar mediados por la expresión de moléculas de guiado axonal. Existen evidencias que muestran que la cocaína, efectivamente regula la expresión de un conjunto de moléculas de guiado axonal en varias regiones del cerebro (Bahi y Dreyer, 2005). De interés para la presente tesis, algunas de ellas son las semaforinas y

neuropilinas. Particularmente, estos cambios se observaron en la región del núcleo accumbens, un núcleo clave del sistema de recompensa y en el efecto reforzador de las drogas de abuso, así como en el caudado-putamen. En el núcleo accumbens se encontró una disminución en la expresión de Sema3A, Sema3E, Sema3F, Sema4G, Sema5B, y Sema7A en respuesta a cocaína; en cambio los receptores para semaforinas solubles, Neuropilina-1 y 2, fueron inducidos (Bahi y Dreyer, 2005).

La expresión de Sema3A también fue demostrada en cordón umbilical humano de gestaciones saludables y se propone como mecanismo regulador de la restricción en la inervación (Marzioni y cols., 2004). En este contexto, y dado que Sema3A se asocia con mecanismos de neuro-repulsión, se espera encontrar una menor expresión de esta molécula en los vasos umbilicales expuestos a cocaína, asociado a una mayor inervación vascular por exposición a esta droga de abuso.

De acuerdo con los antecedentes generales y específicos mencionados, hasta nuestro conocimiento ningún trabajo había examinado hasta ahora el perfil de inervación de los vasos sanguíneos del CU de los RN de madres consumidoras de cocaína durante la gestación, ni los mecanismos celulares y moleculares subyacentes a los cambios de inervación.

3. HIPOTESIS DE TRABAJO:

El consumo de cocaína durante el embarazo induce un aumento en la innervación simpática de los vasos sanguíneos del CU, asociado a las manifestaciones clínicas que se observan en los RN de madres consumidoras de cocaína. Proponemos que la acción vasoconstrictora de cocaína en los vasos del CU reduce el diámetro de los vasos umbilicales, compromete el flujo sanguíneo materno-fetal y explica, en parte, las repercusiones clínicas reportadas. Planteamos además, que la regulación de la expresión de Sema3A, una glicoproteína neuro-repulsiva subyace a los cambios de innervación en respuesta a la exposición prenatal a cocaína.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Esta tesis es un trabajo básico-clínico cuyo objetivo general es estudiar la innervación de los vasos sanguíneos del CU de RN de madres consumidoras de cocaína como variable biológica para explicar las manifestaciones clínicas de los RN, así como identificar un mecanismo molecular subyacente a cambios en la innervación.

4.2. Objetivos específicos

4.2.1. Determinar el patrón, la densidad de innervación y el diámetro de los vasos sanguíneos del CU de RN de MCC y del grupo control.

1. Evaluación del patrón de innervación a lo largo del CU: detección de fibras nerviosas en cortes de las distintas regiones del CU (proximal, medial y distal) mediante inmunofluorescencia (IF), utilizando anticuerpos dirigidos contra un marcador general de fibras nerviosas (anti-PGP) y un marcador de fibras simpáticas (anti-TH).
2. Evaluación de la densidad de innervación vascular: cuantificación del área nerviosa inmunorreactiva para PGP y TH en arterias y vena umbilical.
3. Medición del diámetro de arterias y vena umbilical, en cortes histológicos de CU.

4.2.2. Analizar los datos clínicos maternos y del RN. Determinar si el perfil de innervación de los vasos sanguíneos del CU se relaciona con las variables antropométricas del RN.

1. Análisis de las historias clínicas maternas.
2. Análisis de la Información clínica perinatal del RN donante de CU, obtenida del SIP.
3. Análisis comparativo entre la innervación de los vasos del CU y las variables antropométricas del RN.

4.2.3. Evaluar la expresión vascular de Sema3A mediante IF, como mecanismo molecular subyacente a cambios en la innervación de los vasos sanguíneos del CU, asociados a cocaína.

1. Análisis de la co-marcación de Sema3A y TH en los vasos sanguíneos del CU.
2. Cuantificación de los niveles de fluorescencia de Sema3A en las paredes de los vasos sanguíneos en cortes de CU, inmunomarcados con un anticuerpo anti-Sema3A.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño de investigación:

5.1. Obtención de cordones umbilicales y poblaciones de estudio

Para los experimentos, se utilizaron muestras de cordones umbilicales humanos, colectados de recién nacidos de madres ingresadas en el Hospital de Clínicas “Dr. Manuel Quintela” (HC). Las madres donantes, dieron su consentimiento informado para donar el CU de sus RN y para permitir el acceso a su historia clínica y a la de su RN. Para este propósito se trabajó en conjunto y en colaboración con los Departamentos de Neonatología y con la Clínica Ginecotológica “B” del Hospital (<https://www.ginecotologicab.hc.edu.uy/>). Los procedimientos para la obtención y procesamiento de muestras, así como el consentimiento informado (versión N°6/30-10-18) contaron con la aprobación del Instituto Nacional de Donación y Trasplante de Células, Tejidos y Órganos (INDT; Ministerio de Salud Pública, piso 4 Hospital de Clínicas) y con el aval de la comisión de Bioética Humana del IIBCE, en el marco del proyecto de investigación FVF2017/203. El procedimiento de obtención de las muestras de cordones umbilicales fue realizado teniendo en cuenta las recomendaciones éticas y de bioseguridad recomendadas. Los resultados obtenidos se difundirán de forma anónima.

Las poblaciones de estudio y las muestras de CU se clasificaron en:

1) Grupo CONTROL (N=6); CU provenientes de RN de madres que no consumieron drogas de abuso durante el embarazo, sin patologías pregestacionales ni gestacionales, con embarazos bien controlados y paraclínica infectológica negativa (HIV-VDRL-HepB-Toxoplasmosis).

2) Grupo COCAÍNA (N=9); CU provenientes de RN con exposición *in-utero* a cocaína determinado por autodeclaración de consumo en la entrevista con la paciente. En 3 casos además se realizó la medición de cocaína en orina según el método de la alcohol-deshidrogenasa, con resultados positivos.

Los criterios de exclusión definidos en este estudio fueron: madres con preeclampsia o con diabetes gestacional.

Los CU se obtuvieron luego del parto por vía vaginal o cesárea, en el block de partos o en el block quirúrgico respectivamente. Los encargados de tomar las muestras fueron los neonatólogos asociados al proyecto, la Dra. Lorena Viettro y el Dr. Cristian González. Una vez que el recién nacido estaba estable, luego del pinzamiento del CU, y de tomar todas las

muestras pertinentes a la pesquisa neonatal inicial se cortó el cordón umbilical (del lado más cercano al bebé a 1 cm de la pinza, y luego del alumbramiento se cortó a aproximadamente 1 cm de la placenta). Para poder tener muestras representativas de todo el largo del cordón, el muestreo se realizó siguiendo el criterio de N. Sato (Sato, 1998). Para ello se tomó el CU en su totalidad y se generaron muestras de tres regiones de 6 cm aproximadamente cada una: una proximal al recién nacido, cercana a la pinza (P); otra en la región media (M); y la última distal al RN, cercana a la placenta (D) (Figura 8). Es decir que de cada CU colectado se obtuvieron 3 muestras correspondientes a las 3 regiones.

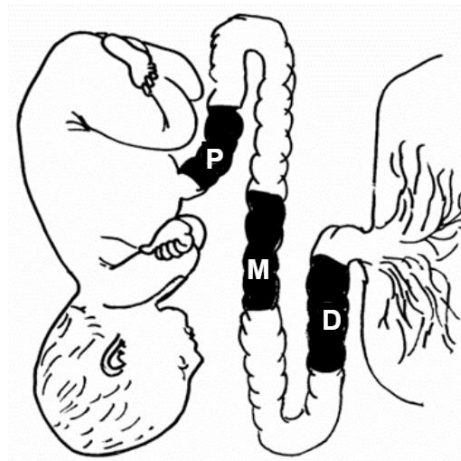


Figura 8: Criterio de muestreo del cordón umbilical. Para cada cordón se obtuvieron muestras de 3 regiones, un fragmento de la región proximal al recién nacido (P, proximal) otro fragmento de la región medial (M, medial) y un tercer fragmento de la región más distal al recién nacido o cercano a la placenta (D, distal). Esquema modificado de (Sato, 1998).

5.2. Procesamiento de las muestras de CU

Las muestras de cada cordón umbilical colectado fueron inmediatamente fijadas por inmersión en paraformaldehído fresco (P6148; Sigma-Aldrich, EE. UU.) al 4% (PFA 4%) en solución salina de tampón de fosfato, (PBS: NaCl; KCl; KH_2PO_4 ; Na_2HPO_4) a pH fisiológico (7,2-7,4). Las muestras fueron fijadas en el HC y luego se transportaron al instituto (IIBCE) en conservadoras de frío (2-8°C). Una vez en el instituto, y al cabo de 14-16 hs de fijación en PFA 4%, a 4°C, cada muestra se lavó con PBS y se seccionó en fragmentos de 1,5 - 2 cm de largo, considerando el orden en su posición original (Figura 9).

Los fragmentos fueron crío-protegidos para evitar que se formen cristales de hielo durante la congelación que pudieran dañar las células del tejido de interés. Esto se realizó sumergiendo el tejido fijado en una solución de sacarosa 12% en PBS durante toda la noche a 4°C. Finalmente, los fragmentos crío-protegidos fueron incluidos en *Cryoplast* (Glicerina 60-80% + polietilenglicol 20-40%; 120405 Biopack, Argentina), para formar los bloques (3-6

bloques por región: P, M y D). Los bloques de tejido se congelaron a -20°C y posteriormente se almacenaron a -80°C hasta el momento de su utilización (Figura 9).

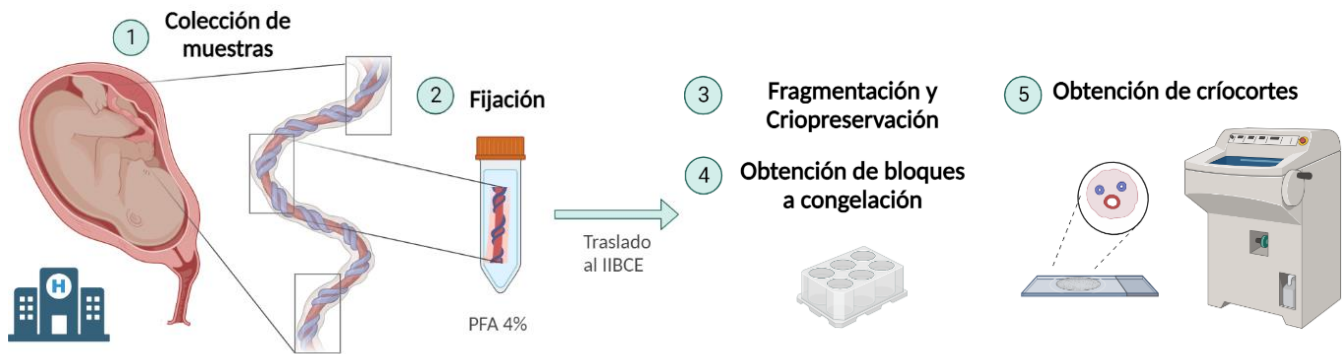


Figura 9: Representación ilustrativa del procesamiento de las muestras de CU. Comienza en el Hospital de Clínicas Dr. Manuel Quintela (HC) y culmina en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). La figura fue realizada utilizando ilustraciones facilitadas por el programa BioRender (<https://www.biorender.com/>).

Para los distintos experimentos los bloques de CU fueron cortados en criostato (Leica, Alemania) a -22°C , para obtener cortes transversales de $12\ \mu\text{m}$ de espesor (Figura 9). Por región (proximal, medial, distal), se obtuvieron 8 cortes, 2 por portaobjeto espaciados $120\ \mu\text{m}$ entre sí y entre los pares de portaobjetos, se descartan 20 cortes ($240\ \mu\text{m}$) de tejido para lograr un análisis más representativo de la muestra. Los cortes se recogieron de forma pareada en portaobjetos gelatinizados, el uso de la gelatina es fundamental para mejorar la adhesión al vidrio, ya que neutraliza la carga negativa del vidrio que de otras formas repele el tejido que también tiene carga negativa. Dos de los cuatro portaobjetos fueron destinados para la técnica de inmunofluorescencia para evaluar la presencia de fibras nerviosas y sus pares, que contenían cortes adyacentes, fueron destinados a histologías para la evaluación morfológica de los vasos sanguíneos umbilicales.

5.2.1. Inmunofluorescencia (IF) para detección de fibras nerviosas en el CU

Se evaluó la inervación en las tres regiones del cordón umbilical proximal-medial-distal (Figura 8), mediante técnicas de inmunodetección in situ en cortes de CU. Se emplearon métodos de IF indirecta, utilizando anticuerpos primarios comerciales dirigidos contra un marcador general de fibras nerviosas que marca una proteína citoplasmática en neuronas. Se trata de un anticuerpo policlonal generado en conejo dirigido contra el *Protein Gene Product* humano (PGP 9.5; ab10404 Abcam). Ya que el eje de nuestros estudios estuvo centrado en la población de fibras nerviosas simpáticas, además se utilizó un anticuerpo

monoclonal producido en ratón y dirigido contra la Tirosina Hidroxilasa (TH; MAB318 Merck) como marcador de fibras simpáticas. La TH es la enzima limitante de la síntesis de NA, el principal neurotransmisor liberado por este tipo neuronal. Se utilizaron protocolos de co-marcación en los que los preparados fueron incubados con ambos anticuerpos primarios en simultáneo.

La co-marcación nos permite identificar a las fibras simpáticas y además detectar si existe otro tipo de fibras nerviosas no simpáticas. La incubación con los anticuerpos anti-PGP 9.5 (dilución final 1:2000) y anti-TH (dilución 1:1000) se realizó durante la noche a temperatura ambiente y en cámara húmeda, para evitar la deshidratación de los cortes. El diluyente de los anticuerpos primarios contiene suero normal de cabra (5%, Gibco) y DL-lisina (0,05%, Sigma-Aldrich) como bloqueantes para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos secundarios, y Tritón X-100 (0,2%, Sigma-Aldrich) como surfactante para favorecer la permeabilidad de las membranas. Luego de la incubación los cortes se lavaron con PBS (3 x 15min) y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes, conjugados a fluoróforos. Para unirse al anticuerpo anti-PGP 9.5 se utilizó un anticuerpo secundario producido en cabra y dirigido contra IgG de conejo (*Goat anti Rabbit - GAR*) conjugado a Alexa-Fluor 488 (GAR-488; A11008 Invitrogen) dilución final 1:400. Para el anticuerpo anti-TH se utilizó otro anticuerpo secundario dirigido contra IgG de ratón también producido en cabra, (*Goat anti Mouse - GAM*) conjugado a Alexa-Fluor 555, (GAM-555; A32727 Invitrogen) dilución final 1:1000. Para la dilución de los Ac. secundarios se utiliza el mismo diluyente que para los anticuerpos primarios, sin el agregado del suero normal de cabra. Los preparados se incubaron con los 2 anticuerpos secundarios en simultáneo durante 90 min, a temperatura ambiente en cámara húmeda y en condiciones de oscuridad. Al finalizar, los cortes se lavaron en PBS (3 x 15 min), se secaron a temperatura ambiente y se cubrieron con un cubreobjeto, utilizando medio de montaje (*Citifluor AF1; Electron Microscopy Science, UK*). Los preparados finalizados se almacenaron a -20°C hasta el momento de la adquisición de imágenes mediante microscopía de fluorescencia.

Microscopía y análisis de imágenes – Inervación.

El patrón y la densidad de inervación de los CU se analizó por microscopía de fluorescencia empleando un microscopio de epifluorescencia *Nikon Eclipse 800* equipado con los espejos dicroicos apropiados (filtro B-2E; EX 450-490; BA 520- 560 y G-2B. Nikon, Japón), la cámara digital *CoolSNAP-Pro Monochrome* y el programa de adquisición de imágenes *Image Pro Plus*, (*MediaCybernetics, EEUU*).

Se siguieron los criterios de muestreo y adquisición de imágenes establecidos previamente (tesina Lic. Sofía Stanley, 2021). Se obtuvieron imágenes de la región perivascular del CU como se muestra en la figura 10, rodeando las paredes de las arterias (A) y de la vena (B). En cada caso se obtuvo la primera imagen y las consiguientes en sentido horario cuidando el no solapamiento entre las mismas.

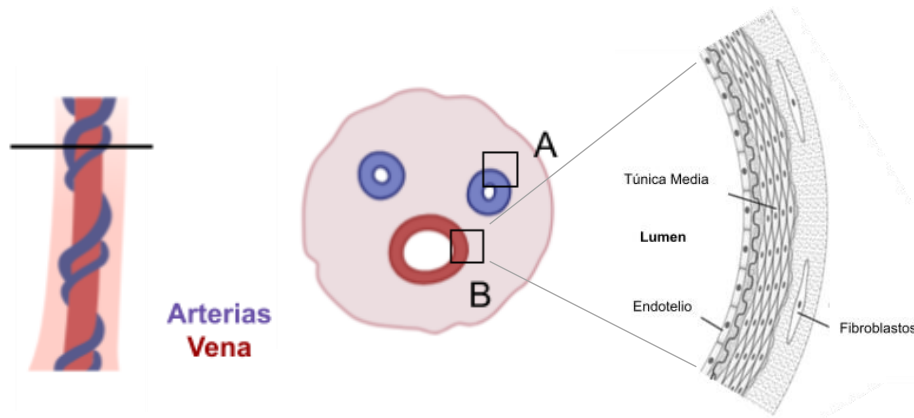


Figura 10: Representación de la región peri-vascular en donde se adquirieron las imágenes del CU. Se muestra un corte transversal del CU y se esquematiza la región de adquisición de imágenes peri-arteriales (A) y alrededor de la vena (B). A la derecha, aumentado se observa la estructura de la pared vascular de los vasos umbilicales. La figura fue realizada utilizando ilustraciones facilitadas por el programa BioRender (<https://www.biorender.com/>)

Para estudiar la inmunorreactividad (IR) de las fibras nerviosas, en los cortes de las 3 regiones del CU, los cortes inmunomarcados se estimularon con los dicróicos adecuados para la excitación correspondiente a los 2 fluoróforos utilizados y la señal detectada es la que se registra en las imágenes adquiridas a 20x.

En las imágenes obtenidas de todos los cortes muestreados de CU, se determinó el área ocupada por fibras nerviosas inmunorreactivas para ambos marcadores (IR-PGP y -TH) en la región perivascular, utilizando el programa de análisis de imágenes Image Pro Plus (*MediaCybernetics*, EEUU). Para ello se estableció un umbral óptimo de detección, distinto para cada marcador, por encima del cual la señal se considera positiva y se cuantifica como medida de área nerviosa (AN). La gelatina de Wharton, rodeando la pared muscular de los vasos sanguíneos umbilicales, fue la región donde se examinó la presencia de marca positiva para fibras nerviosas.

5.2.2. Tinción con hematoxilina y eosina de cortes de CU: anatomía, diámetro, y análisis morfométrico de los vasos umbilicales.

Para reconocer los vasos sanguíneos de cada CU y medir su diámetro, los preparados con cortes de CU destinados a este propósito se sumergieron en una solución de hematoxilina de Mayer (10 min), luego se lavaron con agua corriente y posteriormente se incubaron en eosina (1 min). Los cortes fueron lavados con alcohol etílico 95%. Finalmente, los cortes se deshidrataron con: alcohol etílico 95% (2 x 1min), 100% (1min) y xileno (1 min) y se cubrieron inmediatamente con un cubreobjetos utilizando el medio de montaje Entellán (Merk).

Los preparados histológicos de CU fueron examinados mediante microscopía de luz transmitida (Microscopio Nikon E800; DNFE) utilizando objetivos 4x y 10x, con el fin de reconocer las arterias y la vena umbilical. Además, se utilizó una lupa binocular con una ampliación de 0.67x acoplada a una cámara (*Dino-Eye* AM-423X) para adquirir imágenes de los cortes teñidos con Hematoxilina y Eosina utilizando el programa de captura *Dino Capture* (*Dino-lite*, *Eu*). Luego del reconocimiento del tipo de vaso umbilical (arterias o vena), se obtuvieron las medidas del diámetro externo de los vasos sanguíneos del CU, mediante el software *ImageProPlus*. Este programa calcula la media del diámetro de un área delimitada. En las imágenes adquiridas, se delimitó manualmente el contorno de cada vaso sanguíneo umbilical. El programa utilizado toma medidas de diámetro, pasando por el centroide de la luz del vaso, a cada intervalo de 2 grados. Luego promedia estas medidas y nos arroja un resultado final de la media del diámetro para cada vaso umbilical. Teniendo en cuenta que las arterias umbilicales forman una hélice alrededor de la vena umbilical (Figura 1), se utilizó como criterio de inclusión para la medición del diámetro de las arterias y la vena, aquellas imágenes que mostraban una anatomía circular y transversal al eje longitudinal del vaso, siguiendo el criterio de circularidad o “Roundness” (Richeri y cols., 2010). Se midió el diámetro de cada vaso sanguíneo en 4 cortes de cada bloque de la región proximal del CU (entre 4-8 repeticiones de venas y arterias, respectivamente).

5.3. Análisis de datos clínicos maternos y del RN.

Los datos clínicos analizados fueron extraídos del SIP de cada paciente. El SIP es una herramienta diseñada por el Centro Latinoamericano de Perinatología (CLAP) de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) en el cual se ingresan datos clínicos tanto de la madre como de su RN y del parto/cesárea. La información fue recabada para evaluar y corroborar las variables clínicas de la paciente durante el embarazo, incluyendo datos pregestacionales y gestacionales, información relevante del parto o cesárea, datos clínicos del recién nacido y del alta médica. Esta información fue fundamental para lograr en una primera instancia, la correcta clasificación de las muestras en nuestras poblaciones de estudio y para descartar posibles variables confundentes. Posteriormente, se utilizó esta información para poder correlacionar los datos obtenidos de las muestras de cordones umbilicales con los datos clínicos y antropométricos de sus donantes.

Los SIP de cada paciente pasaron por un proceso de anonimización antes de ser analizados. Para esto primero se clasificaron según su pertenencia a las poblaciones de estudio y luego se les adjudicó un código alfanumérico para ser identificados. En el proceso de anonimización se preservaron datos personales tanto de la mamá gestante como del RN, tales como nombres, apellidos y número de documento de identidad; así como los datos de contacto tales como dirección personal, número de teléfono, celular o email.

Se analizaron datos maternos como la edad, el peso, la talla y el índice de masa corporal (IMC), para el cual se tuvo en cuenta el estándar de evaluación nutricional en embarazadas (Atalah y cols., 1997) y nos dio una idea del estado nutricional de las pacientes participantes. También obtuvimos del SIP los datos sobre consumo de drogas de abuso durante el embarazo, el mismo reporta consumo de alcohol, tabaco y otras drogas (incluida cocaína), distribuidos en los 3 trimestres del embarazo.

Los principales datos clínicos del RN a estudiar fueron la edad gestacional, el peso, la talla y el perímetro cefálico. La edad gestacional se mide en semanas y se cuenta desde el primer día del último ciclo menstrual de la mujer embarazada. Los parámetros antropométricos como el peso, la talla y el perímetro cefálico, dependen en gran medida de la edad gestacional. Por este motivo, para realizar comparaciones, se calcularon los percentiles a los que correspondía cada valor según la edad gestacional. Para ello se utilizaron tablas de estándares internacionales del *International Fetal and Newborn Growth Consortium for the 21st Century* (INTERGROWTH-21st/ www.intergrowth21.tghn.org), que es una red global multidisciplinaria coordinados por la Universidad de Oxford.

5.4. IF para evaluar expresión de Sema3A en cortes de CU y co-marcación con anti-TH

Para identificar un posible mecanismo molecular subyacente a un cambio en la innervación del CU, y basándonos en lo reportado en la literatura (Bahi y Dreyer, 2005; Marzioni y cols., 2004), decidimos evaluar la expresión de la glicoproteína Sema3A en las muestras de CU. Para ello, también se utilizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta en crio-cortes, utilizando un anticuerpo específico para Sema3A humana. Se trata de un anticuerpo policlonal generado en conejo (anti-Sema3A; PA5-65715; *Thermo-Fisher Scientific*) que permitió la co-marcación con el marcador de fibras simpáticas (anti-TH) generado en ratón. Este anticuerpo fue adquirido teniendo en cuenta que fuera dirigido contra tejido humano, y que se pudiera utilizar para experimentos de inmunofluorescencia en cortes fijados.

Para estos estudios se utilizó la misma metodología para la inmunofluorescencia utilizada en los experimentos de evaluación de la innervación (ver sección 5.2.1), incluyendo los mismos diluyentes, los tiempos de incubación y los lavados.

Se determinaron las condiciones óptimas de inmunodetección del anticuerpo anti-Sema3A mediante curvas de concentración, las diluciones del anticuerpo primario probadas fueron: 1:200, 1:400 y 1:1000 (dilución final elegida: 1:200). La especificidad de la inmunomarcación se valoró omitiendo la incubación con el anticuerpo primario. También se optimizó la concentración del anticuerpo secundario. Para poder correlacionar los niveles de expresión de Sema3A con la innervación simpática, se realizaron ensayos de co-marcación con los anticuerpos anti-Sema3A (dilución final 1:200) y anti-TH (dilución final: 1:1000). Estos fueron preparados en simultáneo, en el mismo diluyente de anticuerpos primarios e incubados durante toda la noche en cámara húmeda. Luego de los lavados se incubaron con los anticuerpos secundarios GAR-488 (dilución final 1:400) y GAM-555 (dilución final 1:1000) para unirse a anti-Sema3A y anti-TH, respectivamente. Estos fueron preparados en el diluyente de anticuerpos secundarios y se incubaron en cámara húmeda y en condiciones de oscuridad durante 90 min. Los preparados fueron lavados siguiendo los pasos descritos en el ítem 5.2.1. Para el montaje de los preparados se utiliza el medio de montaje *Citifluor AF1*.

Los antecedentes sobre el estudio de las semaforinas y su expresión en el útero en modelos animales generados por la Dra. Analía Richeri (Richeri, 2014) sirvieron de guía para la evaluación microscópica de estas señales y su cuantificación.

Microscopía y análisis de imágenes – Sema3A-TH

Los preparados inmunomarcados con anti-Sema3A se analizaron en el microscopio confocal (*ZEISS Airyscan LSM 800, EEUU*) de la Plataforma de Microscopía de Fluorescencia y Confocal del IIBCE, empleando el programa de adquisición de imágenes *ZEN Microscopy Software (ZEISS Microscopy)*. Los criterios de adquisición de imágenes fueron establecidos, se utilizó la misma técnica de muestreo que en los análisis de inervación, tomando la primera imagen y las consiguientes en sentido horario y sin solapamiento de estas. Se determinaron automáticamente los valores óptimos de SNR (signal-to-noise-ratio).

Como forma de evaluar el nivel de expresión de la proteína Sema3A se midió la intensidad de fluorescencia de la inmunorreactividad en las imágenes obtenidas de los cortes del CU, utilizando el programa de análisis Fiji (ImageJ – NIH). Dado que las paredes musculares de los vasos sanguíneos tienen distinto grosor, la intensidad de fluorescencia de Sema3A se midió como la densidad óptica integrada (o ID, del inglés *Integrated Density*). Esta se calcula teniendo en cuenta el “*mean gray value*” (MGV) y el área marcada, $ID = MGV \times \text{área}$. Los resultados de expresión de Sema3A se evaluaron en correlación con los valores del área nerviosa ocupada por las fibras IR-TH en cada muestra.

La adquisición de imágenes pertenecientes a ambas poblaciones de estudio (control y cocaína) se realizó el mismo día, para evitar variaciones en las condiciones microscópicas.

5.5. Análisis estadísticos

Para el análisis estadístico de los datos clínicos recabados y de los resultados obtenidos se utilizó el software *GraphPad Prism 8.0*. Se utilizaron test estadísticos paramétricos y no paramétricos según la distribución de los datos. Para definir la distribución de datos se utilizó la prueba de análisis de normalidad *Shapiro-Wilk*. Para aquellos datos que presentaron una distribución normal se utilizaron test paramétricos para realizar comparaciones, principalmente se utilizó la prueba de *t-Student* para datos no pareados. Los datos fueron expresados como Media $\pm$ Error Estándar de la Media (EEM). Los datos que no presentaron distribución normal fueron comparados mediante la prueba de *Mann-Whitney* o *Kruskal Wallis* para datos no paramétricos. Los datos fueron expresados como Mediana (min; max).

Los resultados del análisis densitométrico del patrón de inervación a lo largo del CU, fueron comparados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, para la variable

consumo, región y la interacción entre ambas, seguido de la prueba de comparación múltiple Tukey Kramer. Para el análisis de diferencias en la inervación de arterias y vena umbilical se realizó la prueba no paramétrica de *Kruskal- Wallis*, seguido de la prueba de Dunn. En el caso del análisis de expresión de Sema3A se realizó un ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Tukey.

Para analizar la relación entre las variables antropométricas del RN y el área IR-PGP y -TH de los vasos umbilicales se realizó una regresión lineal simple. Consiste en ajustar una línea recta a los datos para describir cómo se relacionan estas variables. El coeficiente R^2 en la regresión lineal es una medida estadística que indica el grado de ajuste de los datos a la línea de regresión. Es una medida de la bondad del ajuste, que va de 0 a 1. Cuanto más cercano sea R^2 a 1, mejor es el ajuste del modelo a los datos observados.

Los valores de $p \leq 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos (*).

6. RESULTADOS

6.1.1. Efecto de la exposición prenatal a cocaína en el patrón de inervación a lo largo del CU

En el cordón umbilical de los RN de madres que cursaron gestaciones sin consumo de drogas de abuso (grupo control) se detectaron fibras nerviosas inmunorreactivas para PGP (IR-PGP) (Figuras 11 A y Fig. 12). Estas fibras no se encontraron a lo largo de todo el CU, sino particularmente en la región proximal, cercana al RN. En la región medial y distal no se detectaron fibras nerviosas IR-PGP (Figura 11 A).

En las muestras estudiadas de gestaciones expuestas al consumo de cocaína (grupo cocaína) también se detectaron fibras nerviosas IR-PGP en la región proximal del CU (Figura 11 A). El análisis de varianza ANOVA de dos vías (consumo, región del CU) para la inmunorreactividad de PGP, no reveló un efecto significativo de la variable consumo ($p=0,447$), pero sí de la variable región del CU ($p<0,01$). La interacción entre ambas variables no fue significativa ($p=0,553$). El análisis post-hoc de Tukey en el grupo control no mostró diferencias significativas en ninguna de las regiones específicas, aunque la distribución de las fibras IR-PGP se observó principalmente en la región proximal de los RN. En el grupo cocaína el análisis post-hoc mostró diferencias significativas en la inervación entre la región proximal, con la medial ($p<0,05$) y con la distal ($p<0,05$), indicando que la inervación se localiza principalmente en la región proximal (Figura 11 A).

El análisis de varianza ANOVA de dos vías (consumo, región del CU) para la inmunorreactividad de TH no reveló diferencias significativas para la variable consumo ($p=0,392$), región ($p=0,120$) o la interacción ($p=0,466$). El análisis post-hoc de Tukey no mostró diferencias significativas en ninguna de las regiones específicas, aunque la distribución de las fibras IR-TH se observó principalmente en la región proximal de los RN tanto del grupo control como del grupo cocaína (Figura 11 B).

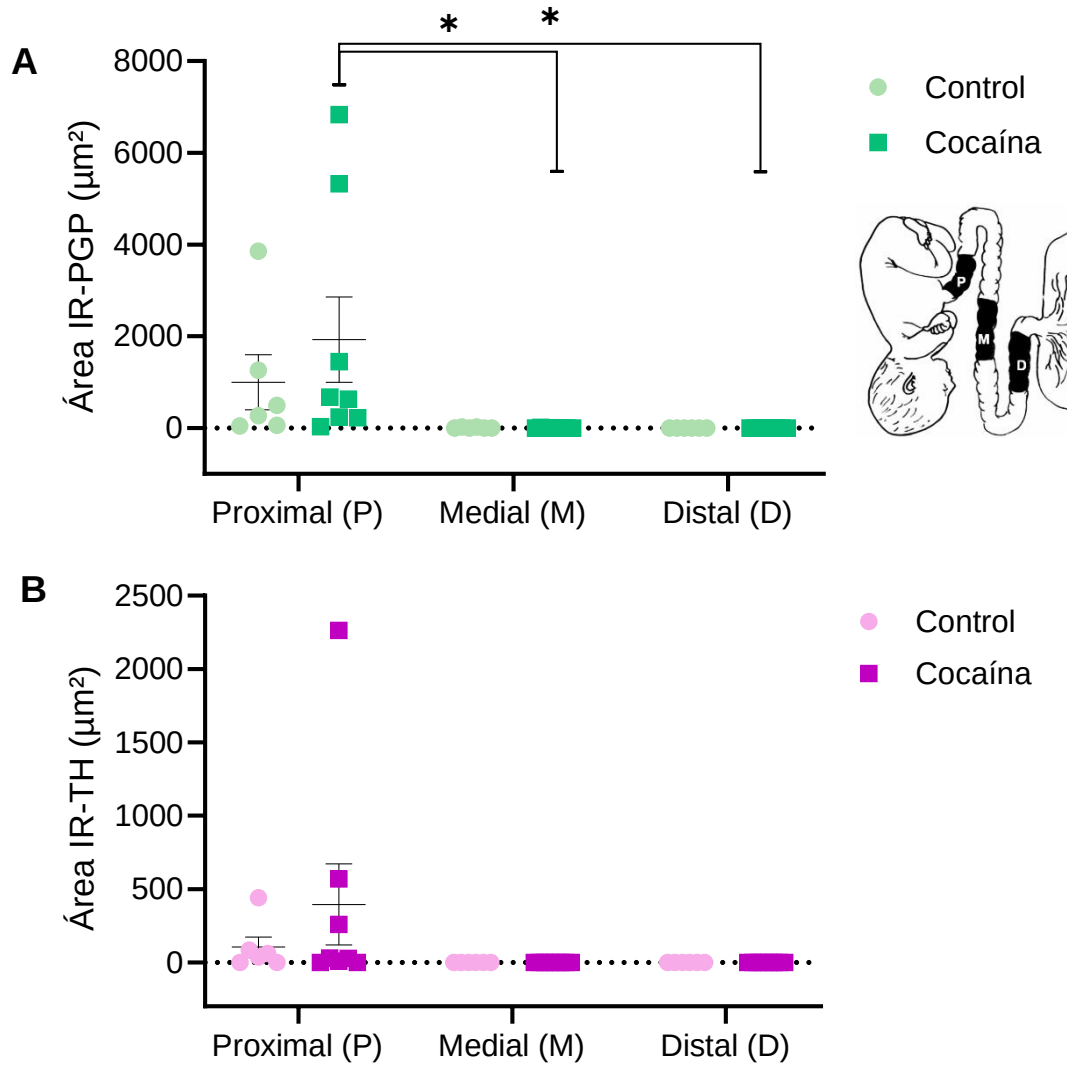


Figura 11: Inervación a lo largo del CU de RN de gestaciones saludables (grupo control; n=6) y expuestos prenatalmente a cocaína (grupo cocaína; n=8). Cuantificación del área nerviosa total (μm^2) ocupada por fibras nerviosas IR-PGP (A) y por fibras simpáticas IR-TH (B) en las 3 regiones del cordón: P=proximal, M=medial, D=distal al RN (esquema tomado de Sato, 1998). Datos expresados como Media $\pm$ EEM. ANOVA de dos vías, seguido de Test Tukey de comparación múltiple. (*) indica diferencia significativa con respecto a la región proximal del grupo cocaína.

En su conjunto, estos resultados indican que la inervación se restringe a una región específica del CU (región proximal), y la variable consumo no modificó el patrón de inervación regional con respecto al grupo control.

6.1.2. Efecto de la exposición prenatal a cocaína en la densidad de innervación en la región proximal del CU

En todos los cortes de CU de la región proximal estudiados, las fibras nerviosas fueron detectadas principalmente innervando los vasos sanguíneos (región peri-vascular).

En los RN del grupo de gestaciones control, se observó que las arterias umbilicales estaban principalmente innervadas por fibras inmunorreactivas para PGP (Figura 12 A, B, C). Se detectaron axones con varicosidades (Figura 12 A) y ocasionalmente se observaron fibras nerviosas más gruesas, sobre todo en los CU provenientes del grupo cocaína (Figura 12 A1). La co-marcación con anti-TH indicó que dentro de la población de fibras IR-PGP existe escasa innervación simpática en los CU provenientes del grupo control (Figura 12 B y C).

Los resultados obtenidos de la cuantificación del área nerviosa IR-PGP y -TH en las arterias umbilicales del grupo cocaína mostraron una tendencia al aumento, aunque no estadísticamente significativo, en la innervación IR-PGP vascular del grupo cocaína, en comparación a las arterias umbilicales del grupo control (Figura 12 A1; D). En las arterias de los RN expuestos a cocaína la innervación simpática IR-TH también mostró una tendencia al aumento, si bien este cambio no alcanzó a ser estadísticamente significativo respecto a las arterias umbilicales del grupo control (Fig. 12 B1; E).

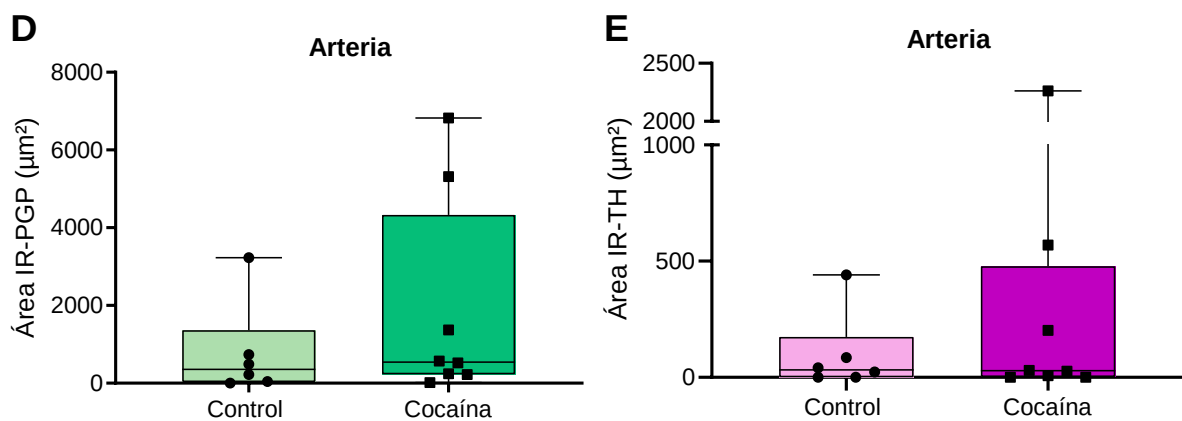
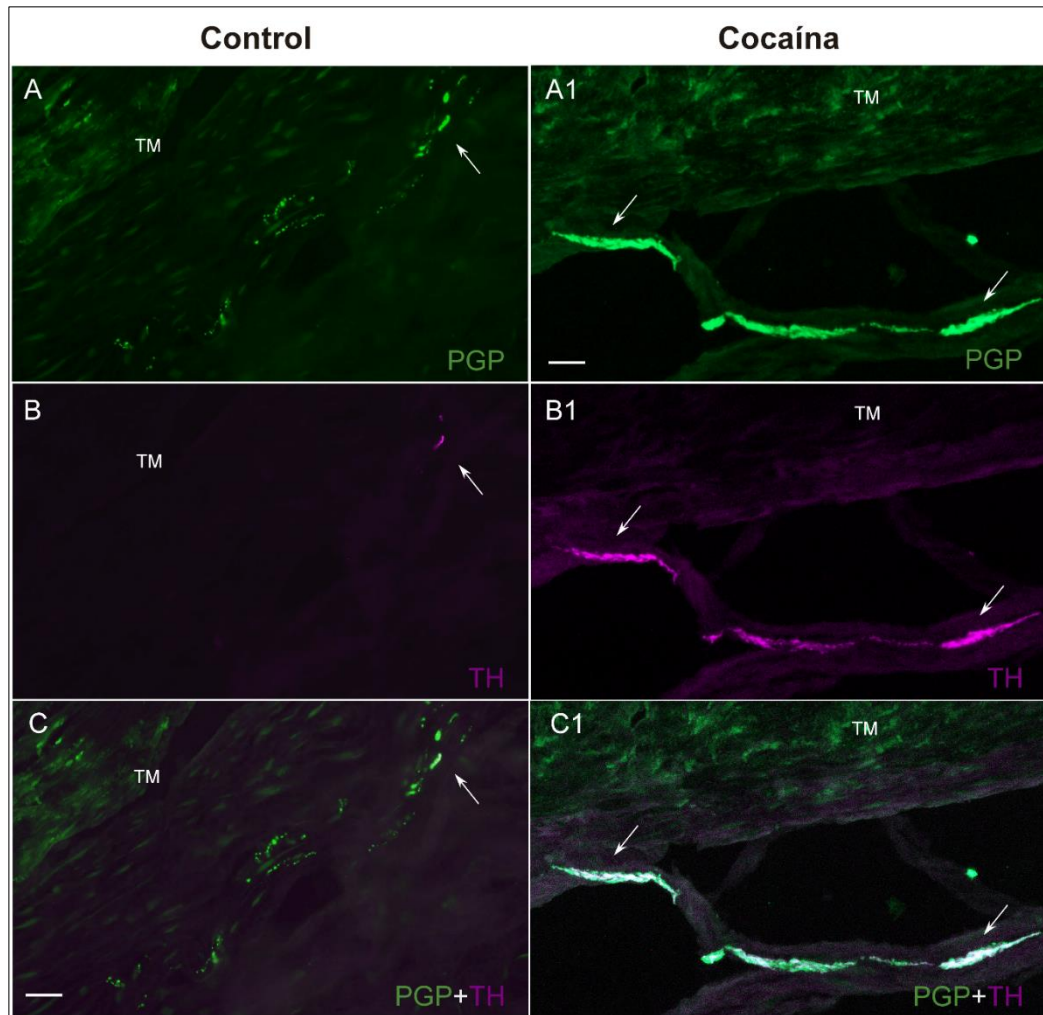
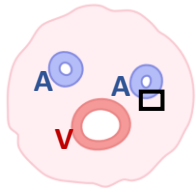


Figura 12: Inervación de arterias umbilicales de RN del grupo control (n=6) y grupo cocaína (n=8). Imágenes de cortes de CU, de la región proximal, co-marcados con anti-PGP (A, A1; marcador general de nervios) y anti-TH (B, B1; marcador de neuronas simpáticas) del grupo control (A-C) y expuestos prenatalmente a cocaína (A1-C1). Flechas: fibras inmunorreactivas para PGP y TH en la gelatina de Wharton que rodea la túnica media (TM) de la arteria. Barra de calibración: 50 μm. Cuantificación del área nerviosa peri-arterial IR-PGP (D) e IR-TH (E). Datos expresados como Mediana (min; max) y comparados usando test Mann-Whitney.

El mismo análisis se realizó para evaluar la innervación de la vena umbilical. Los resultados mostraron que la inmunorreactividad para PGP y TH de la vena umbilical en general es limitada en relación a lo observado en las arterias (Figura 13). La cuantificación del área nerviosa IR-PGP indicó que no hubo diferencias significativas entre el grupo control y cocaína (Figura 13 A y 14). Al cuantificar el área IR-TH evidenciamos que la vena umbilical no está innervada por fibras simpáticas, ni en el grupo control ni en el grupo cocaína (ver escala en Figura 13 B).

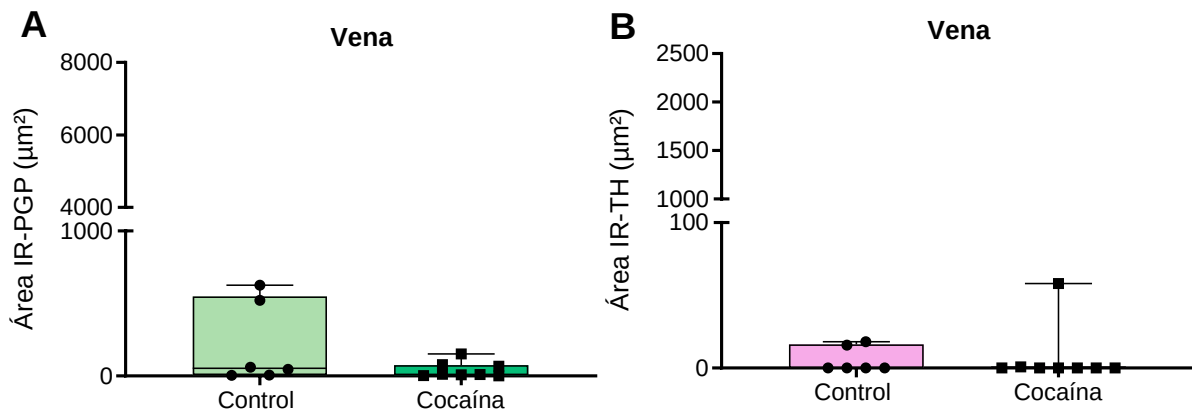


Figura 13: Innervación en vena umbilical de RN del grupo control (n=6) y grupo cocaína (n=8). Cuantificación del área nerviosa IR-PGP (A) e IR-TH (B) en grupo control vs. cocaína. Se utiliza el mismo rango de valores en el eje “y” de la figura 12 D y E con fines comparativos. Datos expresados como Mediana (min; max) y comparados usando test Mann-Whitney.

Basados en los resultados del análisis anterior que muestran que en ambas poblaciones de RN las fibras nerviosas fueron principalmente detectadas en las arterias y no en las venas, decidimos realizar un análisis de comparación múltiple teniendo en cuenta el tipo de vaso sanguíneo (arteria vs. vena) (Figura 14 A y B).

En el grupo control en algunas ocasiones se detectaron fibras nerviosas IR-PGP alrededor de la vena, sin embargo, al cuantificar el área nerviosa obtuvimos valores más bajos de innervación en comparación con las arterias umbilicales (Figura 14 C). Al realizar una prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis, seguido de la prueba Dunn vimos que esta diferencia no fue significativa ($p > 0,99$)

En los CU del grupo cocaína, la diferencia entre la innervación PGP+ de arterias y vena umbilical fue estadísticamente significativa con la prueba de Dunn ($p < 0,05$) (Figura 14 C). En cuanto a la innervación simpática (IR-TH), el análisis estadístico de Kruskal Wallis seguido del post-hoc Dunn no mostró diferencias significativas para este marcador (Figura 14 D).

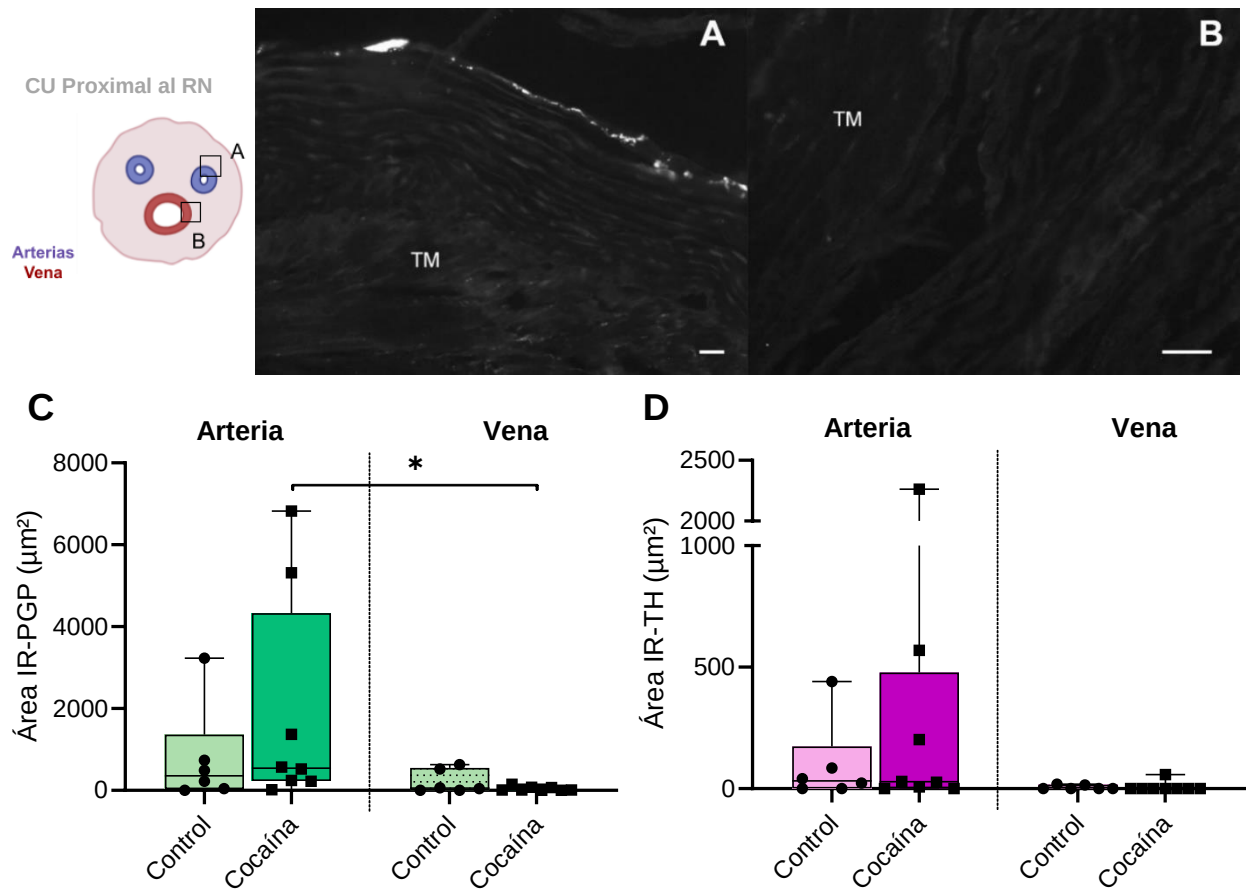


Figura 14: Inervación arteria vs vena umbilical del grupo control (n=6) y grupo cocaína (n=8). Esquema que ilustra un corte transversal del cordón umbilical en el que se reconocen las dos arterias umbilicales (azul) y la vena umbilical (rojo). Microfotografías representativas que muestran la distribución de las fibras nerviosas detectadas en arterias (recuadro A) y la ausencia de fibras en la vena umbilical (recuadro B). Barra de calibración: 50 μm . Cuantificación del área nerviosa IR-PGP (C) y -TH (D) por tipo de vaso sanguíneo en el grupo control y cocaína. Datos expresados como Mediana (min; max) y comparados mediante el análisis de Kruskal- Wallis, seguido de la prueba Dunn. (*) indica diferencia significativa entre vasos umbilicales dentro del grupo cocaína.

6.1.3. Diámetro de los vasos sanguíneos umbilicales

El análisis histológico de cada muestra de la región proximal del CU, teñida con hematoxilina y eosina, permitió medir el diámetro de los vasos umbilicales (Figura 15 A). Al comparar el diámetro de las arterias umbilicales de los RN en ambos grupos, no se encontró una diferencia significativa en los CU del grupo cocaína con respecto al grupo control (Figura 15 B). Tampoco se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre el diámetro de la vena umbilical de ambas poblaciones (Figura 15 C), aunque parece haber una diferencia mayor en el valor promedio del diámetro de vena en grupo cocaína vs. su respectivo grupo control ($2,98 \pm 0,37$ vs. $2,29 \pm 0,02$ mm), en relación a lo observado en arterias ($1,76 \pm 0,09$ vs. $1,64 \pm 0,03$ mm).

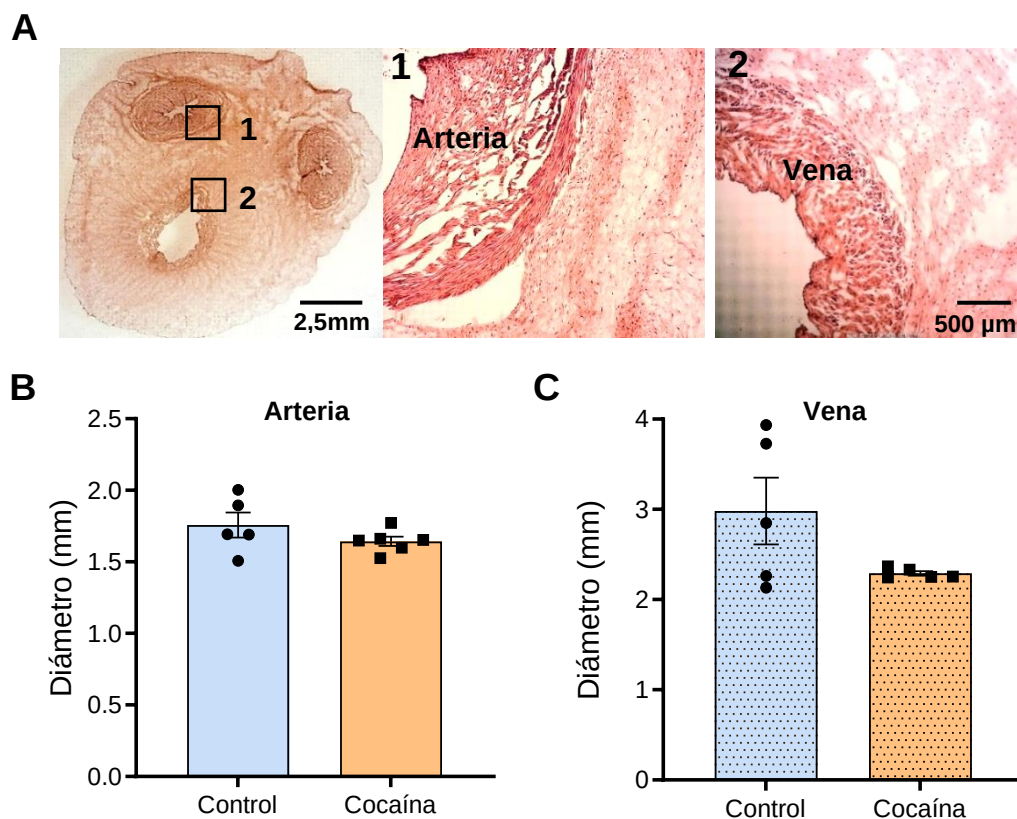


Figura 15: Análisis histológico y diámetro (mm) de los vasos umbilicales de RN del grupo control (n=5) y del grupo cocaína (n=6). Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina y eosina en un corte de CU humano (A) en donde se identifican las arterias (1) y la vena umbilical (2). A la derecha se muestran detalles a mayor aumento. Se midió el diámetro de las arterias (B) y de las venas del cordón umbilical (C) del grupo control (celeste) y del grupo cocaína (naranja). Datos expresados como Media $\pm$ EEM y comparados utilizando test-t de Student.

6.2.1. Análisis de las historias clínicas maternas

Se recopiló la información clínica materna de las donantes del grupo control y cocaína. El análisis comparativo de los parámetros como la edad, la talla, el peso o el IMC materno, no reveló diferencias significativas en ningunos de estos valores, al comparar ambas poblaciones (Tabla 1). Tampoco se encontraron diferencias entre el número de gestas previas de las madres de cada grupo.

Datos maternos	Control	Cocaína
Edad	23 ± 4	25 ± 2
Talla (m)	1,6 ± 0,03	1,6 ± 0,04
Peso (Kg)	61,2 ± 7,7	59,7 ± 4,0
IMC (Kg/m ²)	23,9 ± 2,5	23,5 ± 1,8

TABLA 1: Datos maternos del grupo control (n=6) y del grupo cocaína (n=9). Datos expresados como Media ± EEM y comparados utilizando test-t de Student. IMC=Índice de masa corporal.

6.2.2. Análisis de la información clínica perinatal de los donantes de CU, impacto de la exposición prenatal a cocaína.

La información clínica colectada asociada a cada muestra de CU en la que se estudió la inervación, fue analizada y se compararon los datos de los RN entre ambos grupos (control y cocaína).

Los RN del grupo cocaína presentaron una disminución estadísticamente significativa ($p<0,01$) en su edad gestacional, respecto al grupo control, con una diferencia en las medias de casi 3 semanas (37,3 vs. 39,7, respectivamente) indicando además que los RN estaban en el límite de la prematurez (Figura 16 A).

Debido a este resultado, los parámetros antropométricos de los recién nacidos, como el peso, la talla y el perímetro cefálico, se compararon utilizando los percentiles. De esta forma se normaliza el valor medido, con la edad gestacional. Los percentiles del peso al nacer y del

perímetro cefálico en el grupo cocaína fueron significativamente menores, en comparación con los RN del grupo control ($p<0,01$ y $p<0,05$, respectivamente) (Figura 16 B y C). Los percentiles de la talla de los RN del grupo cocaína no presentaron diferencias significativas respecto al grupo control (Figura 16 D).

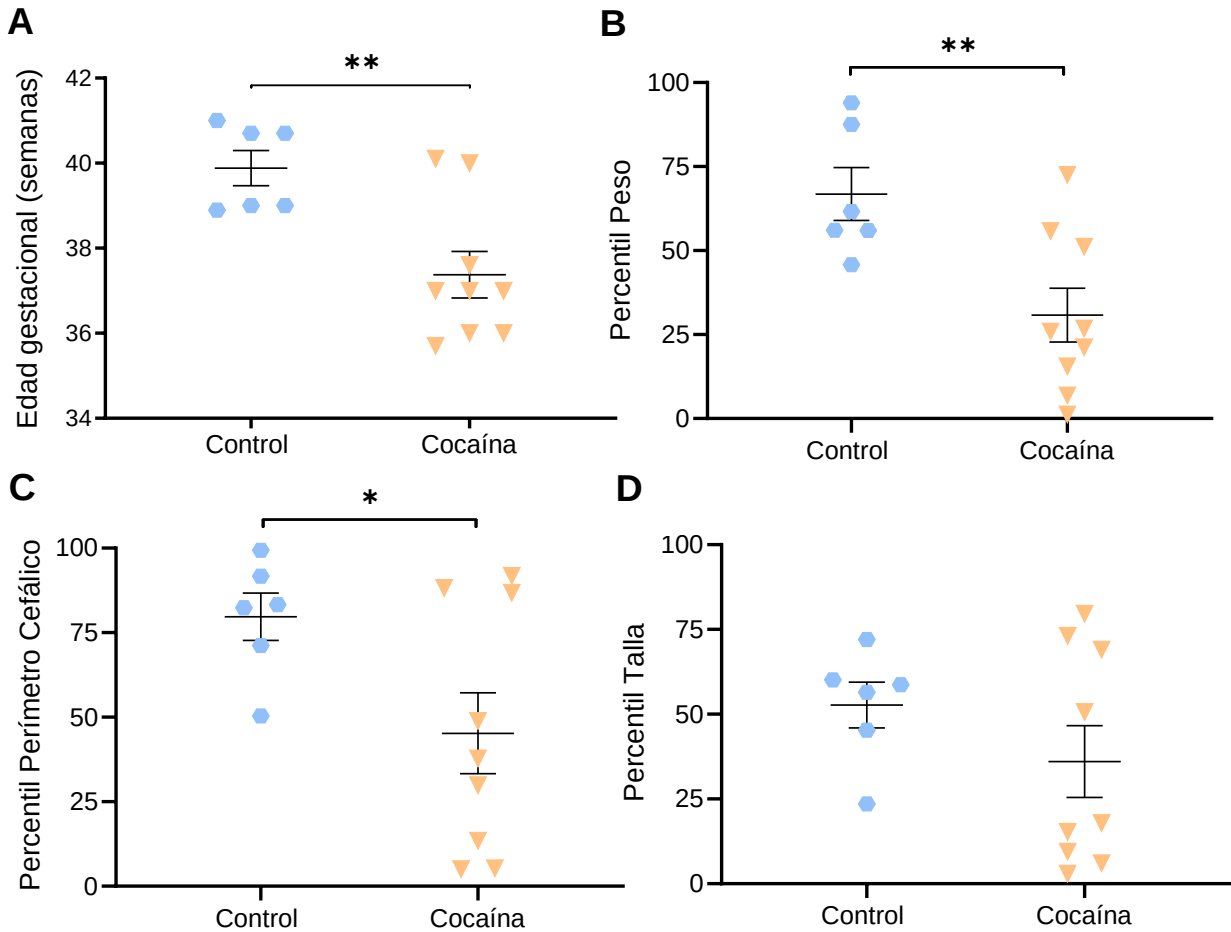


Figura 16: Información clínica de RN donantes de CU de grupo control (n=6) y grupo cocaína (n=9). Se comparó la edad gestacional (A), y los percentiles del peso (B), perímetro cefálico (C) y talla (D) al nacer, en ambos grupos. Datos obtenidos del Sistema Informático Perinatal (SIP), facilitado por los médicos que muestrearon el CU al momento del nacimiento en el Hospital de Clínicas Dr. Manuel Quintela. Datos expresados como Media ± EEM y comparados utilizando test-t de Student. (*) indica diferencia significativa $p<0,05$ respecto a los controles. (**) indica diferencia significativa $p<0,01$ respecto a los controles.

6.2.3. Análisis comparativo entre la innervación de los vasos sanguíneos del CU y las variables antropométricas del RN

Luego de analizar los datos antropométricos de los RN se buscaron asociaciones con los resultados de la innervación vascular del CU. Se compararon los percentiles de peso, talla y perímetro cefálico de cada RN (control y cocaína) con los valores obtenidos de innervación IR-PGP e IR-TH de las arterias umbilicales mediante el método estadístico de regresión lineal simple (Figura 17). Este método utiliza el R^2 como medida de bondad de ajuste, cuanto más cercano a 1 es el valor, más se ajustan las variables a comparar. Cabe señalar que esta comparación se realizó únicamente en arterias dado que la innervación en vena era muy escasa.

En todos los casos, la pendiente de la recta de ajuste lineal fue negativa, sugiriendo que existe una relación inversa entre las variables comparadas (Figura 17 A-F). Si bien se observó una variabilidad similar en los tres parámetros (peso, talla y perímetro cefálico) para el grupo control y cocaína, se destaca que, los valores más altos de innervación vascular del CU corresponden a percentiles antropométricos bajos de peso del RN (Fig. 17 A y B), y de talla (Fig. 17 C y D) tanto para la innervación IR-PGP como para IR-TH, y que a su vez estos valores corresponden a los RN hijos de madres que consumieron cocaína en el embarazo. En el caso del perímetro cefálico la asociación entre estas variables no es clara (Fig. 17 E y F).

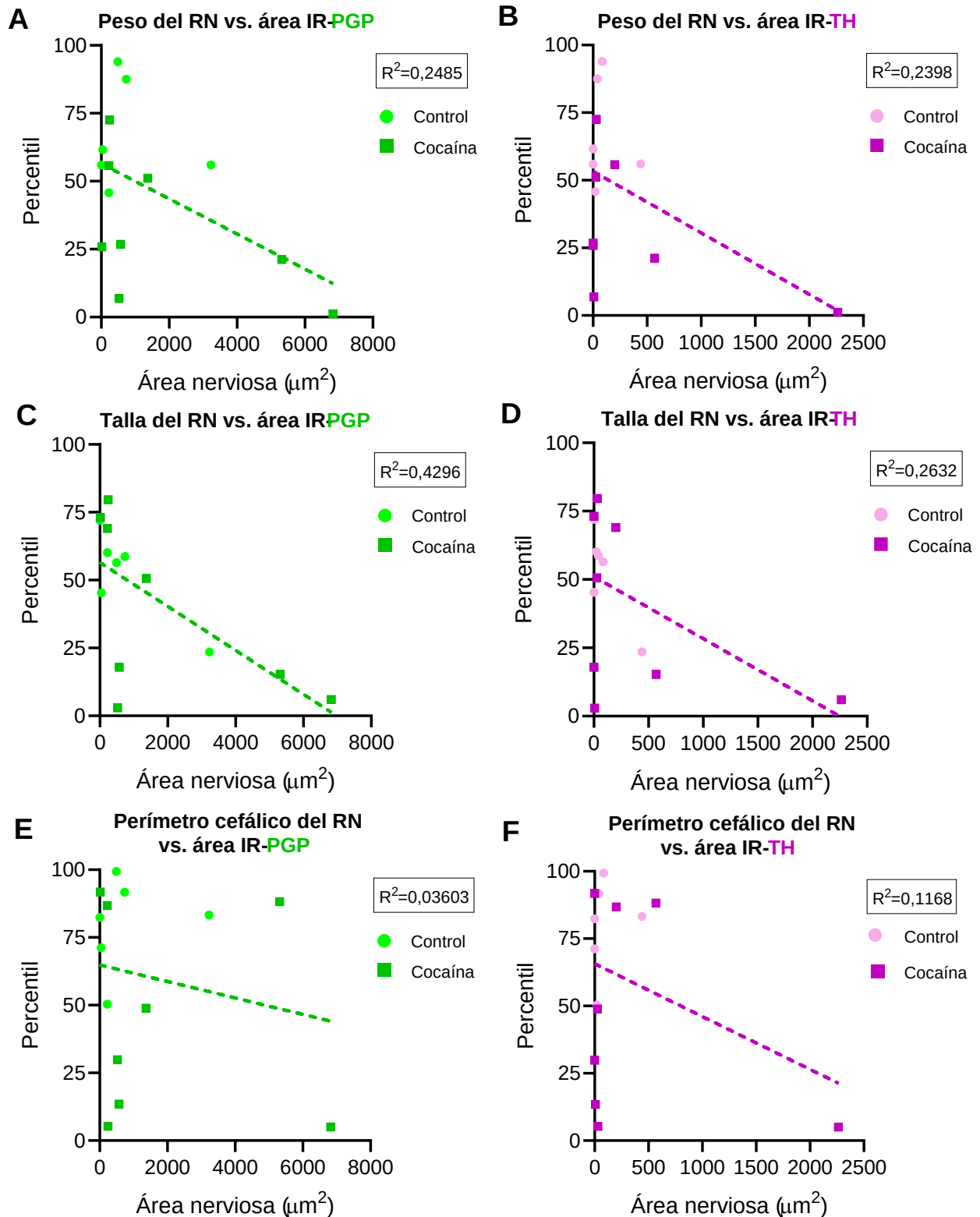


Figura 17: Relación inversa entre los datos antropométricos de los RN donantes de CU y la densidad de invasión de sus arterias umbilicales de los grupos control (círculo) y cocaína (cuadrado). Los percentiles de peso (A), talla (B) y perímetro cefálico (C) de los RN de ambos grupos fueron relacionados con los resultados obtenidos de los análisis densitométricos de invasión vascular, expresado como área nerviosa (μm^2) IR-PGP (verde, marcador general de fibras nerviosas); e IR-TH (magenta, marcador de fibras simpáticas) alrededor de las arterias umbilicales. La línea punteada representa la línea de regresión lineal y se utilizó el R^2 como medida de bondad de ajuste.

6.3. Efecto de la exposición prenatal a cocaína en la expresión de Sema3A en los vasos sanguíneos del CU y asociación con los cambios de innervación simpática vascular

Se analizaron las imágenes de CU de RN del grupo control y cocaína inmunomarcados con los anticuerpos para semaforina-3A y tirosina hidroxilasa (TH) (Figura 18) y se cuantificó la intensidad de fluorescencia de Sema3A en los vasos umbilicales (Figura 19).

La capa muscular (Túnica Media - TM) de las arterias umbilicales mostró inmunorreactividad para Sema3A tanto en el grupo control como en el grupo cocaína (Figura 18 A-C). Adyacente a esta capa es donde encontramos las fibras nerviosas IR-TH, en el caso de los vasos de CU inervados, en la región de la Gelatina de Wharton peri-arterial (Figura 18 C1).

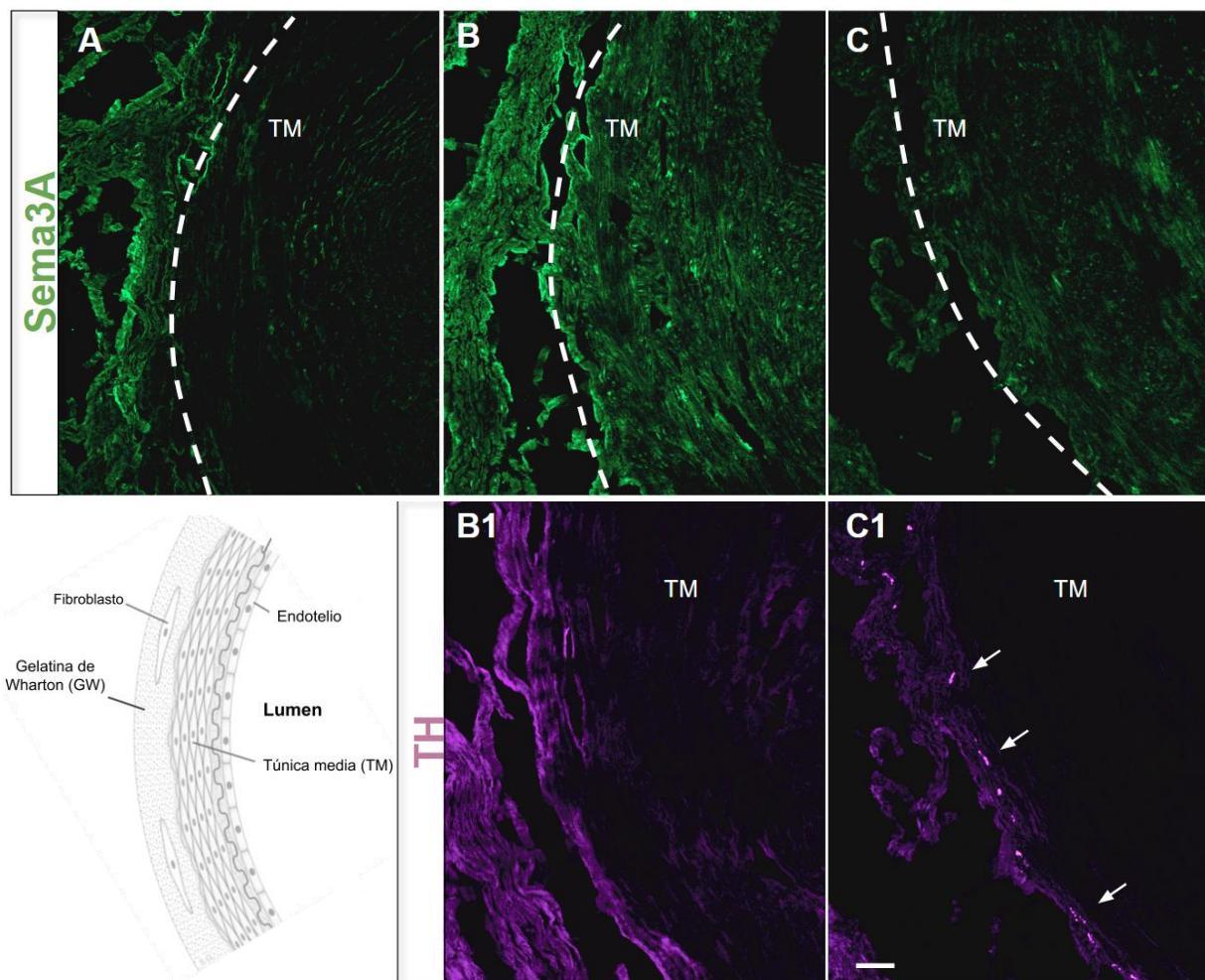


Figura 18: Inmunorreactividad para Sema3A en las arterias umbilicales. Imágenes representativas de cortes transversales del cordón umbilical co-marcado con anti-Sema3A (verde) y anti-TH (magenta) de recién nacidos del grupo control (B, B1) y cocaína (C, C1). Control negativo de Sema3A sin Ac. primario (A). Las flechas señalan las fibras IR-TH. Las líneas punteadas indican el límite entre la túnica media (TM) de la arteria umbilical y la gelatina de Wharton (GW) como se ilustra en el esquema de la izquierda, representativo de la región en donde se adquirieron las fotos. Barra de calibración: 50 μ m.

Los niveles de intensidad de fluorescencia (ID) de Sema3A medidos en las arterias umbilicales de los RN del grupo cocaína no cambiaron significativamente respecto al grupo control (Figura 19). El mismo perfil se observó en la vena ya que este vaso mostró inmunorreactividad para Sema3A, que no se vio modificada por la exposición prenatal a cocaína en relación al grupo control (Figura 19).

Si bien parece haber menor expresión de Sema3A en arterias que en vena (ver grupo control), el análisis ANOVA de una vía seguido de una comparación múltiple utilizando el test Tukey no mostró una diferencia estadísticamente significativa entre ambos vasos ni en el grupo control ($p=0,59$) ni en el grupo cocaína ($p=0,51$).

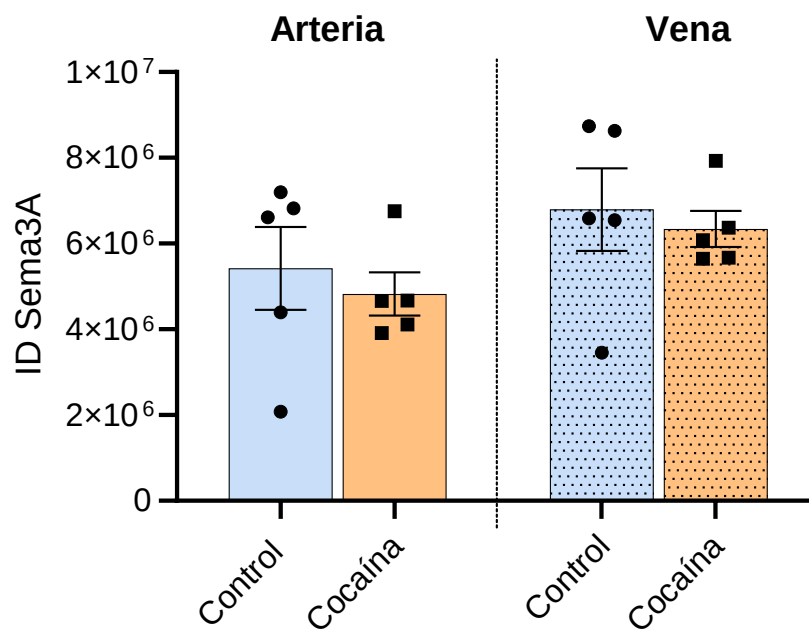


Figura 19: Sema3A en las arterias y vena umbilical de RN del grupo control (n=5) y cocaína (n=5). Cuantificación de la densidad óptica integrada (ID=MGV*área) de las imágenes obtenidas de la inmunofluorescencia de Sema3A, medida por tipo de vaso sanguíneo en el grupo control y cocaína. Datos expresados como Media $\pm$ EEM y comparados utilizando ANOVA de una vía seguido del test de Tukey.

7. DISCUSIÓN

7.1. Patrón y densidad de innervación de los vasos sanguíneos del CU

El control neural del tono vascular sanguíneo en el CU a través de la innervación ha sido ampliamente discutido en la literatura, con numerosas publicaciones negándolo o desconociéndolo (S. B. Fox y Khong, 1990; Lorigo y cols., 2018; Zhu y cols., 2016) en base al fundamento de que los vasos sanguíneos del cordón umbilical carecen de innervación autónoma.

Este estudio demostró que las **arterias del cordón umbilical humano** están innervadas en la región más próxima al recién nacido. La metodología utilizada de co-marcación de fibras nerviosas con un marcador general (PGP+) y con el marcador de fibras simpáticas (TH+) nos permitió confirmar además la existencia de innervación simpática en esta región. En todos los casos analizados, la innervación vascular deja de detectarse a medida que se avanza a lo largo del CU hacia el lado placentario (Figura 11). En la región distal (placentaria) del CU, descartamos la presencia de fibras nerviosas. Por lo tanto, demostramos también que existe un patrón característico de innervación, en el que la región a lo largo del CU (próxima al RN, media o distal) es importante. Este patrón de innervación en los CU de la población control, confirma lo reportado por Sato (1998) y Marzioni y cols. (2004) en embarazos saludables. En los CU de MCC la innervación vascular mostró un patrón comparable a los controles, aunque con una densidad que tiende a ser mayor en la región proximal en un subgrupo de los RN expuestos a esta droga (Figura 11 y 12). Las fibras nerviosas perivasculares detectadas en la región proximal del CU se encontraron rodeando la superficie externa del músculo liso (túnica media - TM) arterial (Figura 12 A-C; Figura 14 A). La distribución de las fibras nerviosas simpáticas (IR-TH) alrededor de las arterias umbilicales, y su densidad particularmente aumentada en el subgrupo de los RN de MCC (Figura 12 B1, E; 14 D) es consistente, al menos en parte, con un control neural de la vasoconstricción potencialmente estimulado por cocaína a nivel de estos vasos.

En **la vena umbilical** evidenciamos que la innervación, en general es baja. La naturaleza de la misma es diferente a la simpática (Figura 13 y 14), e incluso no cambia luego de la exposición prenatal a cocaína (Figura 13 B). Por lo tanto, podemos inferir que, bajo las condiciones estudiadas, el tono de la vena umbilical no estaría sujeto a una regulación neural simpática.

En suma, los resultados obtenidos demostraron que la exposición prenatal a cocaína tiende a aumentar la inervación simpática respecto a los RN no expuestos (Figura 14), mientras que no modifica la ausencia de inervación simpática de la vena del CU.

El uso de ciertas drogas de abuso como la cocaína, que es simpaticomimética, puede impactar directamente sobre el tono vascular sanguíneo (Clare y cols., 2024). Cuando el consumo ocurre durante un embarazo y dado que la cocaína atraviesa la placenta (Ganapathy, 2011; Kain y cols., 1993), podemos pensar que además de impactar en la circulación materna, también podría llegar a tener un impacto en el correcto desarrollo del feto, que depende de la circulación a través de la placenta y el CU. Las arterias umbilicales, contrario a lo que ocurre en la mayoría de las arterias del resto del cuerpo, son las encargadas de facilitar la eliminación de desechos y del dióxido de carbono desde el feto hacia la placenta, para ser eliminados posteriormente a través de la circulación materna. Un aumento en la inervación simpática de estos vasos podría aumentar el tono vasoconstrictor, afectando la circulación feto-placentaria y en consecuencia la eliminación de estos desechos durante el desarrollo fetal. Esto podría tener un impacto a corto plazo, por ejemplo, en las medidas antropométricas del recién nacido. Nuestros análisis de los datos clínicos perinatales y las asociaciones con la inervación vascular apoyan esta posibilidad (Figura 16 y 17).

Si bien el eje de nuestros estudios está enfocado en la población de fibras simpáticas, porque son las mediadoras de la vasoconstricción y en cuya neurotransmisión interfiere la cocaína, no podemos descartar la inervación por fibras de tipo sensoriales y/o parasimpáticas, ya que detectamos fibras IR-PGP que no colocaron con TH. La identidad de estas fibras no fue evaluada específicamente en el marco de esta tesis. Para evaluar la inervación por fibras sensoriales derivados del ganglio de la raíz dorsal, se podría inmunomarcarse el tejido con un anticuerpo anti-CGRP (Péptido relacionado al gen de la Calcitonina). La detección de fibras inmunorreactivas para CGRP y NPY (Neuro péptido Y) ya ha sido demostrada en la región proximal del CU (Sato, 1998), lo que puede sugerir un involucramiento de estos péptidos en la regulación de la circulación umbilical. Ambos son péptidos vasoactivos, CGRP actuaría como vasodilatador y NPY como vasoconstrictor. El NPY es el co-transmisor más común, que intensifica y prolonga la actividad noradrenérgica (Thomas y cols., 1995). Para examinar las fibras parasimpáticas se podría utilizar un anticuerpo anti-vATCh (transportador vesicular de acetilcolina). De interés para futuros experimentos sería evaluar también la función descrita de la ACh como mediadora de la vasoconstricción de los vasos sanguíneos del cordón umbilical (Chen y cols., 2014; Zhu y cols., 2016). Estos autores reportan a partir de estudios ex vivo, con vasos sanguíneos del CU de humanos, ratas y ovejas, que la ACh provoca vasoconstricción de la vena y las arterias umbilicales pero no de otros vasos, incluyendo vasos sanguíneos del feto. Esta vasoconstricción se bloquea con atropina, un

antagonista de receptores muscarínicos, y los vasos umbilicales humanos expresan ARN mensajero para receptores muscarínicos del tipo M1-M5 (Chen et al., 2014). A pesar de estos reportes, se cuestiona la relevancia clínica de la vasoconstricción inducida por ACh en los vasos del CU humano, dado que no ha sido probada en condiciones in vivo (Haugen, 2014).

7.2. Diámetro de los vasos sanguíneos del CU

Un aumento en el tono vasoconstrictor de los vasos sanguíneos umbilicales podría significar una reducción en su diámetro que podría comprometer el flujo sanguíneo materno-fetal, impactando en mayor o menor medida en el desarrollo fetal. En las muestras analizadas no se encontraron diferencias significativas entre el diámetro de las **arterias umbilicales** de RN de MCC y RN control (Figura 15 B). Este resultado sugiere que la innervación simpática detectada en estos vasos no estaría alterando el diámetro vascular. Sin embargo, esta interpretación debe tomarse con cautela. En primer lugar, el aumento de la innervación simpática peri-arterial fue observado principalmente en un subgrupo de RN expuestos prenatalmente a cocaína, mientras que en la comparación del diámetro fue incluido todo el grupo de los RN expuestos. En segundo lugar, teniendo en cuenta la anatomía de los vasos umbilicales a lo largo del CU, la cual varía en el sentido longitudinal, proponemos profundizar el análisis morfométrico, para contemplar esta variable. Se podría medir, por ejemplo: el diámetro de la luz de los vasos umbilicales, además del diámetro externo, y extender este análisis a las regiones medial y distal del CU. En este estudio demostramos que en dichas regiones las arterias umbilicales de los RN de MCC no están innervadas (Figura 11) y sería interesante evaluar si el diámetro vascular presenta una regionalización a lo largo del CU como lo demostramos en esta tesis para la innervación.

Por su parte, la cuantificación del diámetro de la **vena umbilical** tampoco mostró diferencias significativas entre el grupo control y el grupo de los RN de MCC (Figura 15 C); sin embargo, se observó una tendencia a la disminución en el diámetro vascular en el grupo cocaína, a pesar de la escasa innervación observada. Este resultado podría reflejar la participación de otros mecanismos moleculares influyendo en una reducción del diámetro de estos vasos, en respuesta a la exposición a cocaína. Estos mecanismos moleculares podrían estar asociados al endotelio del vaso, ya que existen sustancias vasoactivas derivadas de las células del endotelio, como la endotelina, que favorecen la vasoconstricción (Samuels y cols., 1993; Yakubu y cols., 2002). También podría participar la serotonina que ejerce efectos vasoconstrictores (Cruz y cols., 1997; Zhang y Hu, 1998).

Weissman y colegas observaron que el diámetro del CU, incluyendo el diámetro de las arterias y la vena umbilical aumenta con la edad gestacional hasta la semana 32 aproximadamente, y luego permanece sin aumentar hasta el final de la gestación (Barbieri y cols., 2012; Weissman y cols., 1994). Los fetos con un cordón umbilical con menor diámetro tienen mayor riesgo de ser pequeños para la edad gestacional y de tener más signos de estrés al momento del parto (Raio y cols., 1999). Raio y colegas encontraron una alta correlación entre el área de la sección transversal del cordón umbilical y los parámetros de crecimiento fetal, y el peso del RN. Además, ha sido reportado que en condiciones de exposición prenatal a drogas como cannabis, tabaco o alcohol, el diámetro de las arterias umbilicales fue mayor comparado a los controles (Ortigosa y cols., 2012). Este efecto es opuesto a la tendencia que se observa en las muestras analizadas de CU de MCC en este estudio, lo que podría estar indicando un predominio del tono vasoconstrictor provocado por cocaína en los vasos umbilicales frente a los efectos aparentemente vasodilatadores de otras drogas de abuso. En relación a lo reportado, y del potencial del CU como predictor de situaciones perinatales materno-fetales adversas, sería importante establecer valores normales estandarizados de estas medidas para cada edad gestacional en embarazos de bajo riesgo en las poblaciones de referencia, con el fin de que estas medidas puedan ser validadas como predictores de posibles complicaciones pre o postnatales.

Hasta nuestro conocimiento, este estudio es pionero en la investigación de la inervación de los vasos umbilicales en condiciones de exposición prenatal a cocaína. De todos modos, para poder confirmar una disminución en el flujo sanguíneo, se deberían realizar estudios que midan específicamente el flujo a través de los vasos umbilicales, por ejemplo, mediante una ecografía Doppler de cordón umbilical. Sin embargo, este estudio no fue posible realizarlo en las poblaciones de madres gestantes reclutadas. Sería interesante para futuros estudios a nivel clínico, coordinar con los especialistas la indicación de realizar EcoDoppler de CU para poder evaluar el flujo sanguíneo a través de él, y atender con los tratamientos adecuados las posibles afecciones causadas por una reducción en el flujo sanguíneo en respuesta al consumo de cocaína en el embarazo. Pensamos que los resultados obtenidos contribuyen a esclarecer los mecanismos que participan en las afecciones provocadas por la exposición prenatal a cocaína reportadas en la literatura. Estas pueden manifestarse en etapas tempranas y están relacionadas con el desarrollo fetal, algunos ejemplos son: la restricción del crecimiento intrauterino (RCIU), bebés pequeños para la edad gestacional (PEG), partos pretérminos (PT), y bajo peso al nacer (BPN). Se trata de las manifestaciones clínicas con mayor incidencia en los RN de madres consumidoras de cocaína (Behnke y Smith, 2013; Moraes Castro y cols., 2015; Moraes y cols., 2010).

7.3. Información clínica de las madres y de los RN donantes de CU y relación con la inervación vascular del CU

En nuestro estudio la **identificación del consumo materno durante el embarazo** se realizó mediante entrevista y auto-reporte principalmente. En tres casos además se realizó el análisis de detección de cocaína en la orina materna, indicado por toxicología, con resultado positivo. Este resultado indica que las pacientes habían consumido hasta 72hs antes del momento del parto o cesárea. En la bibliografía se mencionan dos métodos básicos para estimar la exposición a drogas durante el embarazo: los métodos “subjetivos” que serían las encuestas y auto-reportes de las pacientes y los “objetivos”, que corresponderían a la detección en muestras biológicas como meconio, pelo y/u orina (Behnke y Smith, 2013; Risso y cols., 2023). Por un lado, la encuesta es el método más económico y práctico para identificar la exposición prenatal a drogas. Por otro lado, tiene la desventaja de depender de la veracidad de la información brindada, del operador que interviene y de la precisión del recuerdo de la entrevistada (Behnke y Smith, 2013). La información que aportan las gestantes con consumo de drogas de abuso se puede ver recortada o subestimada por causas sociales, psicológicas y/o judiciales, como son el estigma social, el miedo a la condena del personal que la asiste y el temor a la pérdida de la custodia de sus hijos (Cestonaro y cols., 2022). La utilización de muestras de meconio permite identificar a los fetos expuestos a drogas de abuso, con mayor seguridad que los basados en el reporte de la paciente aunque es un método más costoso (Moraes Castro y cols., 2015).

Las consecuencias de la exposición de los RN a drogas de abuso durante el embarazo son multifactoriales y dependen en gran medida del tipo de droga, del momento del consumo, de la duración, la dosis, la vía de administración, el estado nutricional de la madre, la psicopatología materna y la falta de atención prenatal (Behnke y Smith, 2013). Por lo tanto, no podemos atribuir estos riesgos al efecto exclusivo de la exposición prenatal a la cocaína, debido a que los factores ambientales asociados, el policonsumo y la comorbilidad biopsicosocial materna también son ampliamente perjudiciales (Moraes y cols., 2010).

Los estudios epidemiológicos sobre consumo de sustancias en Argentina muestran que la frecuencia de dependencia o adicción es mayor en las consumidoras de cocaína que en las consumidoras de marihuana o alcohol (SEDRONAR, 2017). Sin embargo, muchas veces el consumo de cocaína está asociado al **policonsumo** de otras drogas de abuso como tabaco y alcohol. En las muestras analizadas del presente estudio, los reportes indican que algunas de las consumidoras de cocaína consumían también tabaco. Pudimos evaluar paralelamente un grupo pequeño de madres que sólo fumaron cigarrillos de tabaco durante el embarazo (muestras no incluidas en esta tesis) y, los resultados primarios (n=3) muestran

que, en los vasos sanguíneos del CU de RN de madres fumadoras severas no se observan cambios en la inervación simpática de las arterias ni de la vena en la región proximal del CU respecto al grupo control. Este dato refuerza el efecto observado en los CU de MCC, sugiriendo que los cambios en la inervación están asociados al consumo de cocaína y no al de tabaco.

El uso de cocaína también genera una incidencia significativamente más alta de algunas **infecciones maternas** como la hepatitis C (HCV) y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Ortigosa y cols., 2012). Cabe destacar que en este estudio esto fue un criterio de exclusión para coleccionar algunas de las muestras. Al comparar las características maternas como la edad, el peso y la talla entre las MCC y las madres del grupo control, no hallamos diferencias significativas entre estos valores. Esto indica que los resultados clínicos de los RN no estarían influenciados por la edad materna ni el **estado nutricional**. Las **características socio-económicas y/o psicológicas** de las madres están por fuera del foco de este estudio. Sería de gran importancia que estas variables puedan ser evaluadas en futuros estudios para seguir profundizando en la comprensión del fenómeno de consumo de drogas durante el embarazo, así como en la implementación de políticas públicas destinadas al tratamiento de esta problemática.

El análisis de las **medidas antropométricas de los RN**, cuyos cordones umbilicales fueron evaluados, reveló que aquellos expuestos intrauterinamente a cocaína presentaron menores percentiles en el peso y el perímetro cefálico que los RN del grupo control (Figura 16). Además, tenían menor **edad gestacional** y estuvieron en el límite de la prematuridad (Figura 16). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas y confirman lo reportado en la literatura sobre las afecciones más frecuentes de los RN expuestos prenatalmente a cocaína (Behnke y Smith, 2013; Moraes Castro y cols., 2015; Moraes y cols., 2010).

Al evaluar estos valores en percentiles, estamos sorteando el error de medir los valores absolutos sin tener en cuenta la edad gestacional. Esto no sería correcto ya que, si el RN nace prematuro, puede tener menor peso y talla que uno nacido a término; sin embargo, estos valores podrían ser los adecuados para su edad gestacional. Al calcular los percentiles podemos normalizar las medidas antropométricas con la edad gestacional en cada caso. Una disminución en estos percentiles, podrían estar relacionados con ciertas patologías asociado al consumo de drogas de abuso durante la gestación, tales como las mencionadas: RCIU, BPN, PEG. Además, la disminución de la edad gestacional, es decir el hecho de que los RN de MCC nazcan en promedio 3 semanas antes que los RN no expuestos a cocaína, es consistente con la mayor incidencia de partos pretérminos reportada para esta población. Estos datos son fundamentales ya que se manifiestan y pueden ser medidos en las primeras etapas de la vida (a corto plazo).

Se ha reportado, que el uso de drogas durante el embarazo también podría tener consecuencias en el mediano y largo plazo (Singer y cols., 2018; Wouldes y Lester, 2019). En nuestro estudio no se contempló el seguimiento de estos RN luego de las etapas tempranas por limitaciones éticas. Sería interesante realizar estudios longitudinales en los que se pueda evaluar los efectos tanto a corto como a largo plazo. Pueden existir afecciones en etapas tempranas que luego no impacten en el desarrollo futuro, así como puede haber condiciones que no se expresen a corto plazo, pero si más adelante, por ejemplo en el desarrollo cognitivo (Larson y cols., 2019; Singer y cols., 2018; Wouldes y Lester, 2019).

La restricción del crecimiento intrauterino se define como un feto que no logra alcanzar su potencial de crecimiento biológicamente determinado (Biks y cols., 2021; Blencowe y cols., 2019). Se sugiere que la prevalencia global de esta condición es de alrededor del 20.5% de los embarazos, y está reportado que la incidencia es mayor en países de ingresos medianos y bajos (Biks y cols., 2021; Blencowe y cols., 2019). Se ha demostrado que los fetos con RCIU presentan un mayor riesgo de complicaciones perinatales y complicaciones neonatales inmediatas. El desarrollo neurológico también debe ser monitorizado, principalmente en los primeros años de vida, con el fin de diagnosticar precozmente posibles retrasos en el desarrollo y para el tratamiento temprano de los mismos. El riesgo de tener RCIU además está significativamente relacionado con el estado nutricional materno (Bolzan y cols., 2000). La desnutrición materna es considerada un factor de riesgo para el desarrollo fetal (Atalah y Castro, 2004; Moraes y cols., 2010). En las madres donantes de CU, evaluamos el estado nutricional (peso y talla) al inicio de la gestación reportado en el SIP, y excluimos los casos de desnutrición para que esta variable no incida en los resultados.

El niño pequeño para su edad gestacional es un recién nacido que presenta una longitud y/o peso al nacimiento menor al percentil 3 para su edad gestacional (percentiles normales 3-97), es un concepto estático que utiliza el peso y/o la talla en el momento del nacimiento. Esto es importante para distinguir el bajo peso en un RN pretérmino (nacido antes de la semana 37 de gestación) con el recién nacido a término, de bajo peso (peso al nacimiento menor a 2.500 g) (Forray y Foster, 2015; Su, 2015).

Los partos pretérminos son la causa principal de morbilidad y mortalidad infantil (*Born too soon* - OMS, 2023). Se define a un RN prematuro cuando nace antes de completar la semana 37 de gestación. Se pueden clasificar 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 (≤ 27 semanas + 6 días). La estimación adecuada de la edad gestacional es importante para informar al equipo médico del recién nacido y asesorar adecuadamente el desarrollo neurocognitivo. La edad gestacional dentro del rango normal a término está significativa y positivamente relacionada a los aprendizajes

de lectura y matemáticas en la primera infancia (Noble y cols., 2012). Este efecto es independiente del peso al momento del nacimiento, así como de otros factores obstétricos, sociales y económicos.

Dadas las repercusiones, a nivel nacional e internacional, de los gastos humanos y de recursos que implica la morbi-mortalidad neonatal por RCIU, BPN, PEG y PT, es importante conocer los mecanismos que llevan a estas manifestaciones clínicas. Por lo tanto, si bien estas presentaciones son multi-causales todo aporte que contribuya al conocimiento de los mecanismos subyacentes a estas patologías es un avance para fundamentar estrategias terapéuticas.

La relación inversa encontrada al comparar los valores de inervación vascular de los cordones umbilicales y los percentiles antropométricos de los RN, particularmente en el caso del peso y de la talla, indica una asociación entre ambas variables (Figura 17). Los valores más altos de inervación, asociados a percentiles antropométricos bajos en el caso del peso y la talla, corresponden al subgrupo de RN de madres que consumieron cocaína durante el embarazo (Figura 17 A, B). Basándonos en un análisis específico por individuo, sería posible inferir que una mayor inervación simpática peri-arterial del CU, particularmente en el subgrupo de RN de MCC explicaría, al menos en parte, las consecuencias reportadas en el desarrollo de los recién nacidos expuestos prenatalmente a cocaína. De todas formas, lo reducido de la muestra limita las consideraciones generales que puedan hacerse del análisis. No podemos desconocer que en todos los casos también existieron percentiles bajos de las variables antropométricas asociados a valores de inervación bajos, por lo tanto, la inervación de las arterias umbilicales no sería el único factor determinante en la asociación de estas variables.

7.4. Semaforina-3A como mecanismo molecular subyacente a los cambios de inervación de los vasos sanguíneos del CU

Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que la inervación de los vasos umbilicales, particularmente de las arterias, podría estar siendo modulada por cocaína. El cambio observado (Figuras 12 y 14) podría explicarse por una acción de la cocaína sobre la regulación de alguna/s molécula/s de guiado axonal, que favorezcan el aumento del área ocupada por fibras nerviosas. Este resultado podría involucrar la inducción de la expresión de moléculas promotoras del crecimiento axonal o la represión de moléculas que repelen a los nervios en los vasos sanguíneos. En línea con esta última idea fue que investigamos la regulación de la expresión de la Sema3A, una glicoproteína secretada que es repulsiva para las fibras nerviosas periféricas.

Las semaforinas-3A y 3F específicamente, son inducidas por las hormonas ovárico-placentarias en los microambientes de las fibras nerviosas uterinas y han sido vinculadas a procesos de denervación del útero (Richeri y cols., 2011, 2020). El significado funcional de este fenómeno de plasticidad de la innervación simpática intrauterina es el de garantizar el bienestar fetal ya que, al retirar la señalización simpática de contracción muscular, se promueve la quiescencia del músculo liso uterino, lo que favorece un intercambio sanguíneo feto-placentario adecuado frente a posibles episodios de estrés de la madre. En línea con estos estudios realizados en roedores, Marzioni y cols., (2004) reportaron que Sema3A además de producirse en el miometrio del útero gestante humano, también se expresa en la placenta y en el CU. En el CU, se describió que Sema3A es producida por las células musculares y el epitelio de los vasos umbilicales a lo largo de todo el cordón umbilical en gestaciones saludables (Marzioni y cols., 2004). Se hipotetiza que la producción de factores neuro-repulsivos en el CU y en la placenta podrían restringir la entrada de axones a dichos órganos en gestaciones saludables. Se demostró que los axones que inervan la región proximal del CU muestran una significativa inmunorreactividad a los receptores de esta semaforina, la neuropilina-1 (NRP-1) y la Plexina-A1 (Marzioni y cols., 2004). Con lo cual, podrían responder a esta señal neuro-repulsiva.

La evidencia sugiere que Sema3A podría participar en la modulación de la innervación de los vasos umbilicales; sin embargo, hasta el presente no se conocía si su expresión podía ser regulada en los CU de madres que consumieron cocaína durante el embarazo. Ya ha sido reportado que la cocaína, efectivamente regula la expresión de un conjunto de moléculas de guiado axonal como las semaforinas y neuropilinas en varias regiones del cerebro (Bahi y Dreyer, 2005). Pero se desconocía que dicho fenómeno ocurriese en el SNP y particularmente en el CU.

En este trabajo, evaluamos los niveles de Sema3A en los CU de nuestra población de estudio y en la población control. Utilizamos la co-marcación con anti-Sema3A y anti-TH para evaluar los cambios en la señal de Sema3A asociados con el grado de innervación simpática de los vasos umbilicales. Estos marcadores entonces encuentran su blanco en regiones distintas pero adyacente. En el caso de Sema3A la señal se detectó en la capa de músculo liso de los vasos sanguíneos umbilicales (Figura 18). Su distribución es consistente, con la idea de que Sema3A secretada por el músculo liso (TM), ejerza su acción en las fibras nerviosas TH+ localizadas en la región de la Gelatina de Wharton peri-arterial (Figura 18 C1).

Los resultados confirmaron la expresión de Sema3A tanto en la vena como en las arterias. En ambos tipos de vasos umbilicales de recién nacidos de MCC, los niveles de Sema3A no alcanzaron diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control, por lo cual no podemos confirmar que la cocaína esté alterando los niveles de Sema3A

(Figura 19). El resultado esperado era que la expresión de Sema3A fuera menor que en los controles; lo que reflejaría una menor señalización neuro-repulsiva que favorecería una mayor innervación de las arterias, pero no explicaría la ausencia de innervación en la vena en los CU de RN expuestos prenatalmente a cocaína.

Con estos hallazgos, aun no es posible confirmar que cambios en la innervación vascular en respuesta a cocaína estén siendo modulados por Sema3A. Para poder definir la participación de Sema3A en la modulación de la innervación, deberíamos evaluar también la modulación por cocaína de la expresión de sus receptores NRP1 y Plexina-A1 en las fibras simpáticas IR-TH detectadas en el CU. Las moléculas de guiado axonal, como Sema3A, sólo ejercerán su efecto si se unen a los receptores adecuados para que se transduzca la señal. Por lo tanto, la modulación de la vía Sema3A-NRP1/Plexina-A1 va a estar determinada no solo por cambios en la expresión de Sema3A en el músculo liso vascular sino también por la regulación de la expresión de sus receptores NRP1 y Plexina-A1 en las fibras nerviosas simpáticas que lo inervan. En línea con esta idea, como se mencionó previamente, existen evidencias mostrando que cocaína modula la expresión de NRP1 en el cerebro de roedores (Bahi y Dreyer, 2005). Además, es necesario evaluar otras moléculas de guiado axonal que podrían contribuir al cambio estructural de la innervación. Por ejemplo, la semaforina-3F (Sema3F), en este caso también se debería estudiar si las fibras simpáticas expresan su receptor Neuropilina-2 (NRP2). Estas moléculas no han sido estudiadas en el contexto de la innervación del CU, a diferencia de NRP1 y PlexinaA1 (Marzioni y cols., 2004) pero si en el útero de rata (Richeri y cols., 2011). En este modelo, estudios funcionales de bloqueo de función de la vía Sema3F/NRP2 demostraron que la Sema3F producida por el miometrio del útero, es secretada y que el bloqueo del receptor NRP2 revierte el efecto repulsivo de Sema3F sobre axones simpáticos (Richeri y cols., 2020).

8. CONCLUSIONES

8.1. Patrón y densidad de la innervación vascular

Nuestros resultados de innervación del CU nos permitieron esclarecer la todavía cuestionada innervación del CU humano, confirmando que ésta se limita a la región proximal y no se extiende a lo largo de todo el CU. Nuestros estudios de co-marcación evidenciaron la presencia de innervación de tipo simpática, y aseguran que hay otros tipos de innervación, no identificadas al momento.

La tendencia al aumento en la densidad de innervación periarterial del CU observado en la región proximal en los RN expuestos prenatalmente a cocaína plantea la necesidad de seguir evaluando esta variable en un mayor número de cordones umbilicales para poder validar nuestra hipótesis de trabajo.

8.2. Diámetro vascular

Aunque la medida del diámetro vascular no es del todo concluyente, ya que no encontramos diferencias estadísticamente significativas, la presencia de innervación simpática no se acompaña de cambios significativos en el diámetro de las arterias. Siendo escasa la innervación en la vena, y habiendo un menor valor de diámetro, se sugiere que cocaína podría estar actuando a través de otros mecanismos, aparte de su acción simpatomimética.

8.3. Relación entre la innervación vascular y las variables antropométricas

La evaluación de las variables antropométricas de los RN y de la edad gestacional mostraron efectos robustos en nuestra población de estudio en cuanto la disminución de estas medidas en el contexto de exposición prenatal a cocaína, dado que aún con una población relativamente pequeña, se pudieron evidenciar los efectos reportados en la literatura.

La relación inversa encontrada entre las variables antropométricas y la innervación, sugiere que estas variables podrían estar asociadas de forma causal. De todas formas, lo reducido de la muestra limita las inferencias que pueden hacerse del análisis.

8.4. Mecanismo molecular: Sema3A

La ausencia de cambios significativos en la inmunorreactividad de la Sema3A vascular asociados a la exposición prenatal a cocaína sugiere que ésta no estaría involucrada en la modulación de la innervación del CU reportada en esta tesis. Sin embargo, resta evaluar la expresión de sus receptores (neuropilina-1 y plexina) en las fibras nerviosas perivasculares y la posibilidad de un cambio de función de la molécula en el contexto de cocaína.

9. APORTES

En conjunto, nuestros resultados aportan conocimiento básico respecto a potenciales mecanismos celulares y moleculares que podrían ser responsables de provocar cambios en el tono vascular del CU, como consecuencia del consumo de cocaína durante el embarazo. Los datos obtenidos contribuyen, por un lado, a la comprensión del papel que podría tener una alteración estructural y funcional del control neural de la vasoconstricción de las arterias umbilicales tras el consumo de cocaína. Pensamos que este resultado es importante debido a la relación inversa que encontramos entre la innervación del CU y las manifestaciones clínicas del RN, que pueden tener impacto tanto en el período perinatal como en etapas posteriores, por ejemplo, en la primera infancia. Por otro lado, nuestros resultados evidenciaron que la innervación simpática no sería la única variable moduladora del tono vascular del CU en respuesta a cocaína. Esto abre la posibilidad de evaluar otros mecanismos no neurales que puedan estar participando en una modulación de la vasoconstricción por cocaína.

Los resultados obtenidos de la innervación de los vasos sanguíneos umbilicales podrán colaborar en la identificación de una variable biológica, que pueda ser utilizada por el equipo médico en el diagnóstico de las repercusiones clínicas asociadas al consumo de drogas de abuso. Esta variable podría ser considerada para asesorar en el diseño de un tratamiento que permita atender las necesidades de la madre gestante y/o su RN, incluyendo posibles tratamientos con especialistas, los cuales podrán resultar en un impacto positivo para el desarrollo del niño/niña.

Debido al contexto socioeconómico que puede representar la población objetivo, y el estigma hacia las mujeres embarazadas y en posparto que consumen drogas de abuso, los resultados obtenidos también pueden colaborar en la elaboración e implementación de políticas públicas destinadas a atender esta población. La adicción es una condición médica crónica que requiere de recursos y tratamientos. Los resultados obtenidos además contribuirán al conocimiento de los fenómenos que afectan la salud del RN para el diseño de programas de prevención de consumo de drogas en el embarazo.

10. LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS

Como ha sido mencionado, el consumo de drogas de abuso entre la población femenina tiene algunas características distintivas como son: la mayor progresión en el consumo y el mayor riesgo de desarrollar el desorden de uso de sustancias. Sin embargo, también se reporta una menor demanda y acceso a tratamientos, una mayor estigmatización social, la asociación a historia de violencia de género y abuso sexual y la afectación de sus hijos si tienen responsabilidades de cuidadoras (Risso y cols., 2023). Estos motivos pueden llevar a que las mujeres no declaren el abuso de sustancias.

Consideramos que trabajar con muestras humanas implica una serie de limitaciones en cuanto a la variabilidad de los resultados, ya que inherentemente no se puede controlar completamente las condiciones ambientales y sociales que influyen en las personas que integran este tipo de estudios. En relación a esto, actualmente en el laboratorio se está comenzando a trabajar con un modelo preclínico para imitar las condiciones de exposición a cocaína (aguda y repetida) y poder seguir estudiando los mecanismos moleculares asociados a los cambios en la inervación simpática de los vasos umbilicales, provocados por cocaína.

Originalmente contábamos con un N=7 de CU de recién nacidos de madres control y un N=10 de CU de MCC. Nos vimos obligadas a prescindir para nuestros análisis de dos cordones umbilicales colectados (uno de cada grupo). En el caso del grupo control el cordón que no se utilizó para los análisis fue porque la madre tuvo diabetes gestacional; y en el caso del cordón del grupo cocaína que no se utilizó fue porque la madre sufrió preeclampsia. En ambos casos se tratan de complicaciones del embarazo que podrían incidir en los resultados.

Si bien el número de madres reclutadas en cada población de estudio es relativamente pequeño ya que pasó por un proceso muy selectivo en el que se descartaron posibles variables confundentes, creemos que los resultados obtenidos podrían usarse también para continuar investigando la inervación simpática de los vasos umbilicales humanos, así como otros factores no neurales con propiedades vasoconstrictoras. Esto permitirá obtener resultados más representativos en distintas poblaciones, con el propósito de validar el potencial de esta variable biológica (inervación del CU) como biomarcador y además diseñar estrategias preventivas y políticas destinadas a evitar y detectar la exposición prenatal a drogas de abuso. Además, queda pendiente analizar otros tipos de fibras nerviosas y evaluar qué sucede con la inervación simpática, con el uso de otro tipo de drogas de abuso durante el embarazo.

El análisis del nivel de fluorescencia para los distintos marcadores moleculares utilizados tales como el anti-PGP, -TH y -Sema3A, nos permitió realizar un estudio

semicuantitativo del nivel de expresión de cada molécula. Este criterio fue útil en las muestras analizadas de tejido fijado ya que nos permitió evaluar la ubicación tisular de los distintos marcadores. Para poder realizar estudios cuantitativos que permitan valorar con mayor precisión el nivel de expresión de estas moléculas y los cambios en su expresión en diversos contextos, se podrían utilizar otras técnicas analíticas, como detección electroquímica por HPLC de noradrenalina en homogenatos de CU, o bien estudios moleculares de expresión diferencial, pero para ello se debe trabajar con tejido vivo, no fijado. Algunos de estos aspectos están siendo abordados en investigaciones en curso en el laboratorio.

Los estudios de Sema3A como mecanismo molecular subyacente no son todavía concluyentes ya que queda pendiente analizar la potencial regulación por cocaína de la expresión de sus receptores neuronales, así como el análisis de otras moléculas de guiado axonal, que pudieran participar en la modulación de la innervación en respuesta a cocaína. Otras metodologías podrían ser utilizadas para el estudio de la expresión génica de estas moléculas, por ejemplo, a través del uso de qPCR (la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real), o mediante Western Blot, que permite identificar proteínas específicas en una mezcla compleja de proteínas, tal como la que se presenta en extractos celulares o de tejidos. Asimismo, se podría realizar estudios ómicos de expresión ya sea a nivel transcripcional o traduccional.

El estudio del flujo sanguíneo a través de los vasos umbilicales mediante ecografía Doppler de CU también requiere ser realizado en el período antenatal, e involucraría la interacción con los clínicos especialistas capaces de indicarle este estudio a las gestantes, así como los técnicos que las realicen. Este dato se podría asociar con las medidas del diámetro de la luz vascular para evaluar si el diámetro refleja un compromiso del flujo sanguíneo vascular. Si bien pensamos que realizar estudios in vivo sería muy ventajoso, al tratarse de un tejido humano vital para el mantenimiento fetal, estas aproximaciones pueden estar limitadas por cuestiones éticas.

Otra limitante de nuestro estudio es la imposibilidad de evaluar a largo plazo el impacto de las afecciones reportadas en el RN, por ejemplo, en las medidas antropométricas. Existe una encuesta nacional llamada ENDIS (Encuesta de Nutrición, Desarrollo Infantil y Salud; MIDES, MSP; Uruguay Crece Contigo) que es una investigación a través de la cual se accede sistemáticamente a datos representativos acerca de la situación de la primera infancia por ejemplo el Cohorte 2018 involucra a N=2599 niños entre 0 y 5 años de edad. Esta encuesta es un estudio sociodemográfico longitudinal y descriptivo, orientado a profundizar en el conocimiento acerca del desarrollo infantil, la nutrición, el derecho a la salud y los cuidados, el acceso a la educación, generando conocimiento para orientar las políticas públicas. Dentro de esta encuesta también se reporta el consumo de drogas durante el embarazo de las

madres de los niños en etapa de primera infancia. Estos datos se pueden utilizar para evaluar si el consumo de drogas de la madre durante el embarazo impacta de alguna forma en el desarrollo del niño/a a largo plazo, en la primera infancia.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Atalah, E., Castillo, C., Castro, R., & Aldea, A. (1997). Proposal of a new standard for the nutritional assessment of pregnant women. *Revista médica de Chile*, 125(12), 1429-1436.
- Atalah S, E., & Castro S, R. (2004). Obesidad materna y riesgo reproductivo. *Revista médica de Chile*, 132(8), 923-930. <https://doi.org/10.4067/s0034-98872004000800003>
- Bahi, A., & Dreyer, J. L. (2005). Cocaine-induced expression changes of axon guidance molecules in the adult rat brain. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 28(2), 275-291. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2004.09.011>
- Barbieri, C., Cecatti, J. G., Surita, F. G., Marussi, E. F., & Costa, J. V. (2012). Sonographic measurement of the umbilical cord area and the diameters of its vessels during pregnancy. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 32(3), 230-236. <https://doi.org/10.3109/01443615.2011.647129>
- Behnke, M., & Smith, V. C. (2013a). Prenatal substance abuse: Short- and long-term effects on the exposed fetus. *American Academy of Pediatrics*, 131(3), 1009-1024. <https://doi.org/10.1542/peds.2012-3931>
- Benirschke, K., Burton, G. J., & Baergen, R. N. (2012). Pathology of the human placenta, sixth edition. En *Pathology of the Human Placenta*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-23941-0>
- Biks, G. A., Blencowe, H., Hardy, V. P., Geremew, B. M., Angaw, D. A., Wagnew, A., Abebe, S. M., Guadu, T., Martins, J. S. D., Fisker, A. B., Imam, M. A., Netey, O. E. A., Kasasa, S., Di Stefano, L., Akuze, J., Kwesiga, D., Lawn, J. E., Byass, P., Waiswa, P., ... Machiyama, K. (2021). Birthweight data completeness and quality in population-based surveys: EN-INDEPTH study. *Population Health Metrics*, 19(Suppl 1), 1-16. <https://doi.org/10.1186/s12963-020-00229-w>
- Blencowe, H., Krusevec, J., de Onis, M., Black, R. E., An, X., Stevens, G. A., Borghi, E., Hayashi, C., Estevez, D., Cegolon, L., Shiekh, S., Ponce Hardy, V., Lawn, J. E., & Cousens, S. (2019). National, regional, and worldwide estimates of low birthweight in 2015, with trends from 2000: a systematic analysis. *The Lancet Global Health*, 7(7), e849-e860. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(18\)30565-5](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(18)30565-5)

- Bobzean, S. A. M., DeNobrega, A. K., & Perrotti, L. I. (2014). Sex differences in the neurobiology of drug addiction. *Experimental Neurology*, 259, 64-74. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.01.022>
- Brauer, M. M., & Richeri, A. (2013). Highlights in basic autonomic neuroscience: Semaphorins in the remodeling of autonomic innervation. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 174(1-2), 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2013.01.002>
- 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(8), 527-543. [https://doi.org/10.1016/0007-1226\(94\)90136-8](https://doi.org/10.1016/0007-1226(94)90136-8)
- Cestonaro, C., Menozzi, L., & Terranova, C. (2022). Infants of Mothers with Cocaine Use : Review of Clinical and Medico-Legal Aspects. *Children*, 9(67), 1-17.
- Chakraborty, P., Khamit, A., & Hermes, E. (2021). Fetal oxygen supply can be improved by an effective cross-talk between fetal erythrocytes and vascular endothelium. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1867(11), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166243>
- Chen, N., Lv, J., Bo, L., Li, N., Wu, C., Yin, X., Li, J., Tao, J., Chen, J., He, Y., Huang, S., Xiao, J., Mao, C., & Xu, Z. (2014). Muscarinic-mediated vasoconstriction in human, rat and sheep umbilical cords and related vasoconstriction mechanisms. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 122(12), 1630-1639. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.13144>
- Clare, K., Park, K., Pan, Y., Lejuez, C. W., Volkow, N. D., & Du, C. (2024). Neurovascular effects of cocaine: relevance to addiction. *Frontiers in Pharmacology*, 15(February), 1-17. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1357422>
- Cook, J. L., Green, C. R., de la Ronde, S., Dell, C. A., Graves, L., Ordean, A., Ruiter, J., Steeves, M., & Wong, S. (2017). Epidemiology and Effects of Substance Use in Pregnancy. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, 39(10), 906-915. <https://doi.org/10.1016/j.jogc.2017.07.005>
- Cruz, M. A., Gallardo, V., Miguel, P., Carrasco, G., & González, C. (1997). Serotonin-induced vasoconstriction is mediated by thromboxane release and action in the human fetal-placental circulation. *Placenta*, 18(2-3), 197-204. [https://doi.org/10.1016/S0143-4004\(97\)90093-X](https://doi.org/10.1016/S0143-4004(97)90093-X)

- Damon, D. H. (2006). Vascular endothelial-derived semaphorin 3 inhibits sympathetic axon growth. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 290(3). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01232.2004>
- Davies, J. E., Walker, J. T., & Keating, A. (2017). Concise Review: Wharton's Jelly: The Rich, but Enigmatic, Source of Mesenchymal Stromal Cells. *STEM CELLS TRANSLATIONAL MEDICINE*, 6, 1620-1630.
- Degani, S., Reuven, M. L., Hayem, B., & Doron, S. (1995). Sonographic estimation of umbilical coiling index and correlation with doppler flow characteristics. *Obstetrics and Gynecology*, 86(6), 990-993. [https://doi.org/10.1016/0029-7844\(95\)00307-D](https://doi.org/10.1016/0029-7844(95)00307-D)
- Donlon, C. R., Furdon, S. A., & Clark, D. A. (2002). Look Before You Clamp: Delivery Room Examination Of The Umbilical Cord. *Advances*, 2(1), 19-26.
- Ellis, J. E., Byrd, L. D., Sexson, W. R., & Patterson-Barnett, A. C. (1993). In utero exposure to Cocaine: A review. *Southern Medical Journal*, 86(7), 725-731.
- Ellison, J. P. (1971). The nerves of the umbilical cord in man and the rat. *American Journal of Anatomy*, 132(1), 53-59. <https://doi.org/10.1002/aja.1001320107>
- Ernst, L. M. (2011). Color Atlas of Fetal and Neonatal Histology. *Color Atlas of Fetal and Neonatal Histology*, 363-388. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0019-6>
- Erskine, L., François, U., Denti, L., Joyce, A., Tillo, M., Bruce, F., Vargesson, N., & Ruhrberg, C. (2017). VEGF-A and neuropilin 1 (NRP1) shape axon projections in the developing CNS via dual roles in neurons and blood vessels. *Development (Cambridge)*, 144(13), 2504-2516. <https://doi.org/10.1242/dev.151621>
- Fan, D., Lin, D., Rao, J., Li, P., Chen, G., Zhou, Z., Sun, L., Liu, L., Ma, Y., Guo, X., & Liu, Z. (2024). Factors and outcomes for placental anomalies: An umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Journal of Global Health*, 14, 1-11. <https://doi.org/10.7189/JOGH.14.04013>
- Fawcett, D. W., & Bloom, W. (1995). *Tratado de histología* (12.^a ed.). McGraw-Hill, Interamericana.
- Ferguson, V. L., & Dodson, R. B. (2009). Bioengineering aspects of the umbilical cord. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 144, 108-113. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2009.02.024>

- Forray, A., & Foster, D. (2015). Substance use in the perinatal period Ariadna. *Current Psychiatry Report*, 17(11), 1-19. <https://doi.org/10.1007/s11920-015-0626-5>.Substance
- Fox, H., & Jacobson, H. N. (1969). Innervation of the human umbilical cord and umbilical vessels. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 103(3), 384-389. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(69\)90498-0](https://doi.org/10.1016/0002-9378(69)90498-0)
- Fox, S. B., & Khong, T. Y. (1990). Lack ofInnervation of Human Umbilical Cord . An Immunohistological and Histochemical Study. *Placenta*, 11, 59-62.
- Fujisawa, H. (2004). Discovery of Semaphorin Receptors, Neuropilin and Plexin, and Their Functions in Neural Development. *Journal of Neurobiology*, 59(1), 24-33. <https://doi.org/10.1002/neu.10337>
- Ganapathy, V. (2011). Drugs of abuse and human placenta Vadivel. *Life Science*, 88(0), 920-930. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.09.015>.Drugs
- Gouin, K., Murphy, K., & Shah, P. S. (2011). Effects of cocaine use during pregnancy on low birthweight and preterm birth: Systematic review and metaanalyses. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 204(4), 340.e1-340.e12. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.11.013>
- Hatsukami, D. K., & Fitchman, M. W. (1996). Crack and Cocaine Hydrochloride Are the Differences Myth or Reality? *JAMA*, 276(19), 1580-1588.
- Haugen, G. (2014). Is acetylcholine constriction of umbilical vessels clinically relevant? *Royal colage of Obstetrics and Gynaecology*, 1640. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.13147>
- Hutton, E. K., & Hassan, E. S. (2007). Late vs early clamping of the umbilical cord in full-term neonates: Systematic review and meta-analysis of controlled trials. *Jama*, 297(11), 1241-1252. <https://doi.org/10.1001/jama.297.11.1241>
- Jacobson, H. N., & Chapler, F. K. (1967). Intrinsic Innervation of the Human Placenta. *Nature Publishing Group*, 214, 103-104.
- Kain, Z. N., Rimar, S., & Barash, P. G. (1993). Cocaine abuse in the parturient and effects on the fetus and neonate. *Anesthesia and Analgesia*, 77(4), 835-845. <https://doi.org/10.1213/00000539-199310000-00030>
- Kolodkin, A. L., Levengood, D. V., Rowe, E. G., Tai, Y. T., Giger, R. J., & Ginty, D. D. (1997). Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell*, 90(4), 753-762.

[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80535-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80535-8)

- Kolodkin, A. L., Matthes, D. J., & Goodman, C. S. (1993). The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell*, 75(7), 1389-1399. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90625-Z](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90625-Z)
- Kolodkin, A. L., & Tessier-Lavigne, M. (2011). Mechanisms and Molecules of Neuronal Wiring: A Primer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1), 1-14. <https://doi.org/10.1177/001946466900600103>
- Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2016). Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *The Lancet Psychiatry*, 3(8), 760-773. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(16\)00104-8](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(16)00104-8)
- Larson, J. J., Graham, D. L., Singer, L. T., Beckwith, A. M., Terplan, M., Davis, J. M., Martinez, J., & Bada, H. S. (2019). Cognitive and behavioral impact on children exposed to opioids during pregnancy. *Pediatrics*, 144(2), 1-17. <https://doi.org/10.1542/peds.2019-0514>
- Lorigo, M., Mariana, M., Feiteiro, J., & Cairrao, E. (2018). How is the human umbilical artery regulated? *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 44(7), 1-9. <https://doi.org/10.1111/jog.13667>
- Luo, Y., Raible, D., & Raper, J. A. (1993). Collapsin: A protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell*, 75(2), 217-227. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)80064-L](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)80064-L)
- MacMillan, W. H. (1959). A hypothesis concerning the effect of cocaine on the action of sympathomimetic amines. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 14(3), 385-391. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1959.tb00263.x>
- Mann, F., Chauvet, S., & Rougon, G. (2007). Semaphorins in development and adult brain: Implication for neurological diseases. *Progress in Neurobiology*, 82(2), 57-79. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.02.011>
- 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(4), 839-848. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20178>
- Mauro, A., Buscemi, M., Provenzano, S., & Gerbino, A. (2011). Human umbilical cord expresses several vasoactive peptides involved in the local regulation of vascular tone: Protein and gene expression of Orphanin, Oxytocin, ANP, eNOS and iNOS. *Folia*

- Histochemica et Cytobiologica*, 49(2), 211-218. <https://doi.org/10.5603/FHC.2011.0029>
- Moraes Castro, M., González Rabelino, G., Castelli Rodríguez, L., Umpiérrez, E., & Fuertes, C. S. (2015). Consumo de pasta base de cocaína y cocaína en mujeres durante el embarazo. En *Interdisciplinarias* 2015.
- Moraes Castro, M., Pinto, F., Pereiras, C., Fischer, A., Vogel, C., Duarte, V., Barceló, J., Sosa, C., & Gonzalez, G. (2020). Autodeclaración del consumo de marihuana, tabaco, alcohol y derivados de cocaína en embarazadas en 2013 y 2016, Montevideo, Uruguay. *Adicciones*, 32(3), 173-180.
- Moraes Castro, 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(2), 100-104.
- Noble, K. G., Fifer, W. P., Rauh, V. A., Nomura, Y., & Andrews, H. F. (2012). Academic achievement varies with gestational age among children born at term. *Pediatrics*, 130(2), 257-264. <https://doi.org/10.1542/peds.2011-2157>
- Olaya-Contreras, M., Vargas-Moreno, W., & Bernal-Villegas, J. E. (2015). A physics approach to the consequences of excess umbilical cord length. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 66(1), 53-60. <https://doi.org/10.18597/rcog.8>
- Organization, W. H. (2023). Born Too Soon: decade of action on preterm birth. En *Unexpected Pleasures*. <https://doi.org/10.3828/liverpool/9781949979688.003.0009>
- Orndorff, M., Shipp, G. M., Kerver, J. M., Ondersma, S. J., & Alshaarawy, O. (2023). Trends in cocaine use among United States females of reproductive age, 2005–2019. *American Journal on Addictions*, September, 1-7. <https://doi.org/10.1111/ajad.13502>
- Ortigosa, S., Friguls, B., Joya, X., Martinez, 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(1), 73-79. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.04.002>
- Pasterkamp, R. J. (2012). Getting neural circuits into shape with semaphorins. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(9), 605-618. <https://doi.org/10.1038/nrn3302>
- Pierce, R. C., & Kumaresan, V. (2006). The mesolimbic dopamine system: The final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neuroscience and Biobehavioral*

- Reviews*, 30(2), 215-238. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.04.016>
- Pugsley, M. K., & Tabrizchi, R. (2000). The vascular system An overview of structure and function M.K. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 44, 333-340. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-55201-4>
- Raio, L., Ghezzi, F., Di Naro, E., Gomez, R., Franchi, M., Mazor, M., & Brühwiler, H. (1999). Sonographic measurement of the umbilical cord and fetal anthropometric parameters. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 83(2), 131-135. [https://doi.org/10.1016/S0301-2115\(98\)00314-5](https://doi.org/10.1016/S0301-2115(98)00314-5)
- Reilly, F. D., & Russell, P. T. (1977). Neurohistochemical evidence supporting an absence of adrenergic and cholinergic innervation in the human placenta and umbilical cord. *The Anatomical Record*, 188(3), 277-285. <https://doi.org/10.1002/ar.1091880302>
- Richeri, A. (2014). Semaforinas y neuropilinas: aportes a la plasticidad de la innervación uterina. *Tesis de Doctorado PEDECIBA*.
- Richeri, A., Bianchimano, P., Crutcher, K. A., & Brauer, M. M. (2010). Reduced sympathetic neurite outgrowth on uterine tissue sections from rats treated with estrogen. *Cell and Tissue Research*, 340(2), 287-301. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-0956-x>
- Richeri, A., Chalar, C., Martínez, G., Greif, G., Bianchimano, P., & Brauer, M. M. (2011). Estrogen up-regulation of semaphorin 3F correlates with sympathetic denervation of the rat uterus. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 164(1-2), 43-50. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2011.06.002>
- Richeri, A., Martinez, G. F., Vierci, G., Sosa Redaelli, I., Brauer, M. M., & Taboada, A. (2020). Neuropilin-2, but not Neuropilin-1, regulates sympathetic axon outgrowth inhibition by E2-myometrial explants in 3D co-cultures. *XXXV Annual Meeting Sociedad Argentina de Neurociencias (SAN)*.
- Richeri, A., Vierci, G., Martínez, G. F., Latorre, M. P., Chalar, C., & Brauer, M. M. (2020). Neuropilin-1 receptor in the rapid and selective estrogen-induced neurovascular remodeling of rat uterus. *Cell and Tissue Research*, 381(2), 299-308. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03196-8>
- Risso, M., Saa, G., González Alcántara, M., Cortese, S., Bertola, O., Madera, C., Cañete, M., San Martín, P., Damín, C., & Valdéz, P. (2023). Consumo de alcohol y drogas en embarazadas internadas en un hospital de la ciudad de Buenos Aires, Argentina.

- Evaluación del impacto inicial en el recién nacido. *Vertex Rev Arg Psiquiatr.*, 34(162), 7-15. https://revistavertex.com.ar/descargas/primeronline/vertex_162_articulo_1_RISSO_ok.pdf
- Roca, A., Jarque, P., Gomila, I., Marchei, E., Tittarelli, R., Elorza, M. Á., Sanchís, P., & Barceló, B. (2021). Características clínicas y factores de riesgo asociados a la exposición prenatal a drogas de abuso. *Anales de Pediatría*, 95(5), 307-320. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2020.08.003>
- Roth, L., Koncina, E., Satkauskas, S., Crémel, G., Aunis, D., & Bagnard, D. (2009). The many faces of semaphorins: From development to pathology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(4), 649-666. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8518-z>
- Samuels, P., Steinfeld, J. D., Braitman, L. E., Rhoa, M. F., Cines, D. B., & McCrae, K. R. (1993). Plasma concentration of endothelin-1 in women with cocaine-associated pregnancy complications. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 168(2), 528-533. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(93\)90486-3](https://doi.org/10.1016/0002-9378(93)90486-3)
- Sato, N. (1998). Calcitonin Gene-Related Peptide-, Neuropeptide Y- and Tyrosine Hydroxylase-Immunoreactive Nerve Fibers in the Human Umbilical Cord. *Article Kurume Medical Journal*, 45, 327-331.
- Schenker, S., Yang, Y., Johnson, R. F., Downing, J. W., Schenken, R. S., Henderson, G. I., & King, T. S. (1993). The transfer of cocaine and its metabolites across the term human placenta. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 53(3), 329-339. <https://doi.org/10.1038/clpt.1993.29>
- SEDONAR. (2017). *Estudio Nacional en Población de 12 a 65 Años Sobre Consumo de Sustancias Psicoactivas*. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/2020/10/oad_2017._tabaco-alcohol_intensidad_del_consumo_estudio_nacional_en_poblacion_sobre_consumo_de_sustancias_psicoactivas.pdf
- Sheng, Y., & Zhu, L. (2018). The crosstalk between autonomic nervous system and blood vessels. *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology*, 10(1), 17-28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29593847> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5871626>
- Sinavszki, M., Sosa, N., Silvera, F., & Rossello Díaz, J. L. (2011). Clampeo tardío de cordón

- umbilical : saturación de oxígeno en recién nacidos. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 82(3), 141-146.
- Singer, L. T., Min, M. O., Minnes, S., Short, E., Lewis, B., Lang, A., & Wu, M. (2018). Prenatal and concurrent cocaine, alcohol, marijuana, and tobacco effects of adolescent cognition and attention. *Drug and Alcohol Dependence*, 191, 37-44. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2018.06.022>
- Smid, M. C., Metz, T. D., & Gordon, A. J. (2019). Stimulant Use in Pregnancy: An Under-recognized Epidemic among Pregnant Women. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 62(1), 168-184. <https://doi.org/10.1097/GRF.0000000000000418>
- Sola, A. (2011). *Cuidados Neonatales: Descubriendo la vida de un recién nacido enfermo*. EDIMED.
- Spurway, J., Logan, P., & Pak, S. (2012). The development, structure and blood flow within the umbilical cord with particular reference to the venous system. *Australasian Journal of Ultrasound in Medicine*, 15(3), 97-102. <https://doi.org/10.1002/j.2205-0140.2012.tb00013.x>
- 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(40), 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.06.038>.Role
- Takechi, K., Kuwabara, Y., & Mizuno, M. (1993). Ultrastructural and immunohistochemical studies of Wharton's jelly umbilical cord cells. *Placenta*, 14(2), 235-245. [https://doi.org/10.1016/S0143-4004\(05\)80264-4](https://doi.org/10.1016/S0143-4004(05)80264-4)
- Tessier-Lavigne, M., & Goodman, C. S. (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science*, 274, 1123-1132.
- Thomas, S. A., Matsumoto, A. M., & Palmiter, R. D. (1995). Noradrenaline is essential for mouse fetal development. En *Nature* (Vol. 374, Número 6523, pp. 643-646). <https://doi.org/10.1038/374643a0>
- United Nations Office on Drugs and Crime, UNODC (2023) World Drug Report 2023 (United Nations publication, 2023), (2023).
- Viетро, L., & Richeri, A. (2019). 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. *Fondo Carlos Vaz Ferreira*

2017.

- Vo, T., Carulli, D., Ehler, E. M. E., Kwok, J. C. F., Dick, G., Mecollari, V., Moloney, E. B., Neufeld, G., de Winter, F., Fawcett, J. W., & Verhaagen, J. (2013). The chemorepulsive axon guidance protein semaphorin3A is a constituent of perineuronal nets in the adult rodent brain. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 56, 186-200. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2013.04.009>
- Walker, D. W., & McLean, J. R. (1971). Absence of Adrenergic Nerves in the Human Placenta. *Nature*, 229, 344-345.
- Wang, Y., & Zhao, S. (2010). Vascular Biology of the Placenta. En *Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function to Disease* (Vol. 9).
- Weissman, A., Jakobi, P., Bronshtein, M., & Goldstein, I. (1994). Sonographic measurements of the umbilical cord and vessels during normal pregnancies. *Journal of Ultrasound in Medicine*, 13(1), 11-14. <https://doi.org/10.7863/jum.1994.13.1.11>
- Westcott, E. B., & Segal, S. S. (2013). Perivascular innervation: A multiplicity of roles in vasomotor control and myoendothelial signaling. *Microcirculation*, 20(3), 217-238. <https://doi.org/10.1111/micc.12035>. Perivascular
- Wouldes, T. A., & Lester, B. M. (2019). Stimulants: How big is the problem and what are the effects of prenatal exposure? *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 24(2), 155-160. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2019.01.011>
- Yakubu, M. A., Pourcyrus, M., Randolph, M. M., Blaho, K. E., Mandrell, T. D., Bada, H. S., & Leffler, C. W. (2002). Consequences of maternal cocaine on cerebral microvascular functions in piglets. *Brain Research*, 947(2), 174-181. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)02917-7](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)02917-7)
- Young, H. M., Anderson, R. B., & Anderson, C. R. (2004). Guidance cues involved in the development of the peripheral autonomic nervous system. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 112, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2004.02.008>
- Zhang, L., & Hu, X. Q. (1998). Endothelium-dependent potentiation by cocaine of serotonin-induced contractions in sheep fetal umbilical artery. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 5(2), 72-74. [https://doi.org/10.1016/S1071-5576\(97\)00107-X](https://doi.org/10.1016/S1071-5576(97)00107-X)
- Zhu, Z., Tang, J., Zhou, X., Xiang, S., Zhu, X., Li, N., Shi, R., Zhong, Y., Zhang, L., Sun, M., & Xu, Z. (2016). Roles of ion channels in regulation of acetylcholine-mediated

vasoconstrictions in umbilical cords of rabbit/rats. *Reproductive Toxicology*, 65, 95-103.
<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.07.003>