

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad Ciencias de la Vida

Desarrollo de un sistema de soporte artificial de placenta humana para la evaluación del flujo de anticuerpos contra Zika para la protección del feto.

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Biólogo

Presentado por:

Ricardo Ernesto Correa Fierro

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2018

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo no hubiera sido posible sin la tutela de la Dra. Fernanda Bertuccez y el Dr. Washington B. Cárdenas, quienes siempre me apoyaron con su tiempo, paciencia y dedicación. Con ellos quedo inmensamente agradecido por hacer posible este estudio. Así como todos los integrantes del grupo de Biomedicina de la ESPOL por sus valiosos y oportunos aportes.

Al Dr. Francis Loayza, director del proyecto, por su incansable gestión y motivación en todo momento. Al grupo médico del Hospital de la Mujer Alfredo Paulson: Dr. Francisco Egüez Mora, Dr. Sergio Barrera Mejía y Dra. Carolina Mora por su paciencia y buena voluntad de colaborar a pesar del limitado tiempo en su incansable y honorable labor.

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, me corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; Yo, *Ricardo Ernesto Correa Fierro* doy mi consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”

Ricardo Ernesto Correa Fierro

EVALUADORES

M.Sc. Diego Arturo Gallardo Pólit

PROFESOR DE LA MATERIA

Ph.D. Fernanda Bertuccez Cordeiro

PROFESOR TUTOR

RESUMEN

La identificación reciente del síndrome congénito por Zika (SCZ) ha generado gran interés en el estudio de la patogenicidad del virus y la necesidad de desarrollar tratamientos para la protección del feto en etapas críticas de su desarrollo, en casos de infección durante el período gestacional. Se han realizado importantes avances en el estudio de los mecanismos placentarios en la transmisión vertical de algunos arbovirus y las fases críticas en las cuales una infección conlleva consecuencias más severas. Existen hasta la actualidad cerca de 50 vacunas contra Zika en varias fases de desarrollo; 14 de ellas en las primeras fases clínicas. Resultados de estudios en cultivos celulares y modelos animales han permitido identificar las etapas más vulnerables de la transmisión vertical del virus, sin embargo, no se han aplicado modelos que simulen la limitación que la barrera placentaria representa para el flujo vertical de vacunas o anticuerpos. El presente proyecto estableció un sistema de soporte artificial de placenta humana, para simular la transferencia *ex vivo* de nanoanticuerpos de camélidos, a través de la barrera placentaria. Estas moléculas inmunitarias podrían ser modificadas para el reconocimiento de partículas virales como método de protección al feto contra los efectos adversos del SCZ. Por lo tanto, este estudio multi-disciplinario implementó el diseño, construcción y evaluación de un sistema *ex vivo* de perfusión placentaria para desarrollar ensayos innovadores en salud materno infantil, sin representar riesgo alguno para la madre o el feto.

Palabras Clave: Zika, microcefalia, transmisión vertical, placenta, perfusión *ex vivo*

ABSTRACT

The recent identification of congenital Zika syndrome has raised a great deal of interest to study this virus pathogenicity and to develop effective fetal protection treatments, particularly on critical fetal development stages in cases where the mother was infected during pregnancy. Significant progress has been made in the study on placental mechanisms with vertically transmitted arbovirus and the critical stages of maternal infection where the fetal consequences are more severe. To date only 14 vaccine candidates are on the first stages of clinical trials out of 50 vaccines in development. Knowledge from cell culture and animal experiments have helped on the identification of the most vulnerable gestational stages in the viral vertical transmission. Notwithstanding, there are no models being applied that could simulate the limitation for vaccines or antibodies to cross the placental barrier. In this project, we established an artificial human placenta supporting system to simulate ex vivo transference of camelid nanobodies across the placenta. These immunity molecules could be modified for viral recognition as a fetal protection method against congenital Zika syndrome. Therefore, this multidisciplinary study implemented the design, construction and evaluation of an ex vivo placental perfusion system to develop innovative essays in maternal and child health, without any risks for the mother nor the fetus.

Key Words: *Zika, microcephaly, vertical transmission, placenta, ex vivo perfusion.*

ÍNDICE GENERAL

EVALUADORES.....	4
RESUMEN.....	5
<i>ABSTRACT</i>	6
ÍNDICE GENERAL	7
ABREVIATURAS.....	9
SIMBOLOGÍA.....	10
ÍNDICE DE TABLAS.....	11
ÍNDICE DE FIGURAS	12
CAPÍTULO 1.....	13
1. Introducción	13
1.1 Descripción del problema.....	16
1.2 Justificación del problema	16
1.3 Objetivos	18
1.3.1 Objetivo General.....	18
1.3.2 Objetivos Específicos	18
1.4 Marco teórico.....	19
1.4.1 Arbovirus y embarazo.....	19
1.4.2 Síndrome Congénito por Zika.....	19
1.4.3 Mecanismos de la Infección	20
1.4.4 La barrera placentaria.....	21
1.4.5 Desarrollo de inmunoterapias contra el virus del Zika.....	22
1.4.6 Sistema de perfusión placentaria <i>ex vivo</i>	24
CAPÍTULO 2.....	28
2. Método.....	28
2.1 Diseño del estudio.....	28

2.2	Equipos de perfusión.....	29
2.2.1	Diseño del sistema mecánico	29
2.2.2	Control y monitoreo de variables	30
2.3	Medios de perfusión.....	31
2.3.1	Medio 1.....	31
2.3.2	Medio 2.....	31
2.3.3	Medio 3.....	31
2.4	Colección, transporte y enjuague.....	32
2.5	Aislamiento y canulación de los cotiledones.....	33
2.6	Fase de lavado.....	33
2.7	Inicio de la perfusión	34
3.	Resultados.....	35
3.1	Resultados experimentales	35
3.2	Análisis de costo	37
4.	Conclusiones Y RECOMENDACIONES.....	40
4.1	Conclusiones.....	40
4.2	RECOMENDACIONES	41
	BIBLIOGRAFÍA.....	42
	ANEXOS.....	45
	ANEXO A. Protocolo del experimento.....	45
	ANEXO B. Hoja de seguimiento de la perfusión	47
	ANEXO C. Literatura consultada para desarrollo del protocolo experimental.....	49
	ANEXO D. Preparación y elección de medios buffer	50

ABREVIATURAS

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
OMS	Organización Mundial de la Salud
Ig	Inmunoglobulina
VHH	Dominio variable de cadena pesada de anticuerpos de camélidos
DMEM	Medio de Eagle Modificado por Dulbecco
USP	United States Pharmacopeia
SCZ	Síndrome Congénito por Zika
HAP	Hospital Alfredo Paulson

SIMBOLOGÍA

L	Litro
mL	Mililitro
g	Gramo
mg	Miligramo
h	Hora
pH	Potencial de Hidrógeno
mm	Milímetro
NaCl	Cloruro de Sodio
KCl	Cloruro de Potasio
KH ₂ PO ₄	Fostato monopotásico
MgSO ₄	Sulfato de magnesio
CaCl ₂	Cloruro de Calcio
1N	Uno normal
HCl	Ácido clorhídrico
NaOH	Hidróxido de Sodio

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Registros de OMS de vacunas contra el Virus Zika en las diferentes etapas de pruebas clínicas.	23
Tabla 1.2. Modelos comúnmente usados para el estudio para transferencia placentaria humana y mecanismos asociados.	25
Tabla 3.1. Identificación de las placentas utilizadas durante las experiencias en cuatro días de visita al HAP para procesos previos de perfusión.	35
Tabla 3.2. Costos de equipos y materiales adquiridos para la construcción del sistema mecánico	38
Tabla 3.3. Costos de servicios de manufactura y construcción del sistema mecánico de perfusión.	38
Tabla 3.4. Costos de sustancias e insumos necesarios para el experimento de perfusión placentaria.	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.1.1. Esquema gráfico del sistema dual recirculante de perfusión placentaria <i>ex vivo</i> .	26
Fig.2.1. Esquema general del procedimiento para realizar las perfusiones placentarias en el sistema de soporte <i>ex vivo</i> .	28
Fig.2.2. Representación del sistema mecánico para soporte de las placentas.	30
Fig.2.3. Esquema de las fases de perfusiones y los procedimientos principales en fases previas a la perfusión.	31
Fig.2.4. Imágenes de algunas de las placentas durante las fases previas a la perfusión placentaria.	32
Figura 3.1. Grafica del número de placentas en las cuales se experimentaron las fases previas de perfusión placentaria <i>ex vivo</i>	36
Figura.3.2 Resultados de las fases de pre-perfusión durante la última experiencia con el uso de placentas para el sistema <i>ex vivo</i> .	37

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones por virus transmitidos por artrópodos (arbovirus) es un tema de salud pública en creciente preocupación por la patogenicidad de cerca de 100 distintos virus de ARN, de los cuales muchos han generado brotes emergentes y re-emergentes, algunos de estos al infectar mujeres embarazadas suelen asociarse a enfermedades en la madre y el feto [1].

En los últimos años se empezó a identificar una fuerte correlación geográfica y temporal entre mujeres embarazadas infectadas por Zika y una serie de alteraciones en la funcionalidad de la placenta y el desarrollo prenatal y neonatal, como los numerosos casos de bebés con microcefalia [1] [2]. Desde el año 2015, el estudio retrospectivo de casos clínicos de Brasil y Polinesia Francesa [3], permitieron a los expertos concluir que Zika es un virus teratogénico de preocupación mayor, en base al estudio de la correlación antes mencionada, el uso de experimentos animales y la analogía con otros virus patógenos [1].

Se conoce actualmente como síndrome congénito por Zika al conjunto de complicaciones que incluyen defectos de desarrollo, restricción del crecimiento y defectos del feto y neonatales, e incluso la pérdida del producto. Este síndrome incluye la microcefalia, volumen cerebral reducido, hipoplasia cerebral, y otras complicaciones neurológicas, auditivas, visuales y lesiones cráneo-faciales [4].

Los casos de microcefalia se asocian en mayor medida con diagnósticos de infección durante el primer trimestre de embarazo, los cuales son considerados por definición como casos primarios de microcefalia. Sin embargo, las infecciones en las semanas posteriores se han relacionado con resultados adversos como restricción del crecimiento intrauterino o pérdida del producto [2].

El tropismo neural de Zika virus se evidencia con una mayor titulación de ARN viral en el cerebro que la encontrada en hígado, bazo o pulmones [5]. Siendo los progenitores corticales del cerebro su destino luego de cruzar la barrera placentaria y diseminarse en el feto [1]. Para poder infectar el cerebro en desarrollo del feto, el virus presente en el torrente sanguíneo materno debe penetrar la barrera placentaria, la cual presenta células

altamente resistentes a infecciones, al menos al término del embarazo [5] [6]. Esta barrera sincitial es capaz de producir interferones tipo I y III. Sin embargo no se conoce si durante el primer trimestre del embarazo se obtienen niveles suficientes de interferones para mantener la protección [4]. La evidencia sugiere que es una de las razones por la cual la transmisión vertical del virus presenta resultados más graves cuando la infección en la madre se produjo al inicio del embarazo. En un estudio reciente, Sheridan y otros (2017) examinaron en dos modelos análogos al trofoblasto placentario humano tanto al inicio como al final del embarazo, para analizar la vulnerabilidad al virus del Zika. Encontraron que las células correspondientes al término del embarazo presentan genes asociados a protección antiviral de manera general, sin presentar genes codificantes para factores de reconocimiento específicos para Zika. Al contrario, las células madres embrionarias propias del trofoblasto temprano expresan genes que codifican factores de anclaje para la entrada del virus [5].

El estudio del virus del Zika y las enfermedades que induce han elucidado grandes dudas en el tropismo del virus, los mecanismos de infección, alcances en la patogenicidad del virus, técnicas de diagnóstico y prevención. Sin embargo, aún hay procesos que necesitan ser investigados para el desarrollo de vacunas. En 2016, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó que se conocen 18 vacunas contra el Zika en desarrollo [7]. En la actualidad, más de 50 vacunas se desarrollan a nivel mundial de las cuales solo 14 han alcanzado las primeras fases de pruebas clínicas [8]. Entre estos intentos de protección contra el virus del Zika, se han utilizado los siguientes enfoques o técnicas: utilizar el virus de Zika inactivado; cepas atenuadas del virus; partículas semejantes a virus expresando proteínas de membrana; vacunas con conjugados de nanopartículas proteicas; plásmidos de ADN; proteínas recombinantes; entre otros [7]. Sin embargo, el uso de anticuerpos para inmunización pasiva y neutralización de virus es un abordaje que podría ser potenciado con el uso de nano-anticuerpos monoclonales que permitan el reconocimiento de epítomos virales esenciales en el proceso de reconocimiento celular e infección.

Este enfoque terapéutico presenta prometedores beneficios, en parte por su capacidad de acceder a tejidos con permeabilidad limitada como es el caso de la barrera placentaria [9]. Estos nanoanticuerpos son producidos por organismos de la familia Camelidae (camellos, dromedarios, llamas y vicuñas) quienes además de los

anticuerpos heterotetraméricos convencionales poseen una estructura de dominio simple, ausentes de cadenas ligeras, constituyendo un tipo de Inmunoglobulinas para estos animales.

Actualmente se aprovecha las propiedades farmacocinéticas y fisicoquímicas de los nanoanticuerpos en distintas áreas de aplicaciones biomédicas [10]. Se ha reportado la capacidad de los nanoanticuerpos de unirse a virus y bacteriófagos con la capacidad de neutralizarlo [11], por lo que puede ser una opción viable en el desarrollo de terapias específicas para el reconocimiento de epítomos que sean candidatos potenciales para el desarrollo de vacunas como la glucoproteína de envoltura E, ampliamente utilizada en la neutralización de flavivirus [12].

Se han realizado importantes avances en el estudio de los mecanismos que describen la acción del sincitiotrofoblasto placentario como barrera en la transmisión vertical de arbovirus y las fases críticas en las cuales una infección conlleva consecuencias más severas, además de importantes estudios con modelos *in vitro* y estudios preclínicos enfocados en el desarrollo de terapias de protección del feto.

A pesar de que se han realizado estudios del mecanismo de transmisión vertical del virus Zika en ratones y simios [13], existen diferencias anatómicas como la presencia de una capa trofoblástica adicional en ratones que no simularían la misma complejidad de la placenta humana en la selectividad de las sustancias que atraviesan la barrera hemato-placentaria, limitando los alcances de las investigaciones y demorando el escalamiento hacia pruebas clínicas [14].

Una integración de las técnicas actuales en la lucha contra las patologías generadas por el virus de Zika permitiría aprovechar el gran potencial farmacocinético de nanoanticuerpos neutralizantes contra arbovirus, siempre y cuando se pueda evaluar la difusión de agregados que puedan proveer una inmunidad adquirida al feto, creando una alternativa prometedora contra el síndrome congénito por Zika.

La evaluación de vacunas y fármacos se puede abordar mediante el uso de técnicas no-invasivas y efectivas que no generen controversia por el desarrollo ético de procedimientos de biomedicina experimental. En 1967 se describió el primer modelo *ex vivo* de perfusión en placentas humanas, facilitando el estudio del transporte de sustancias sin comprometer la salud del feto o la madre [15]. El procedimiento de perfusión ha sido modificado a lo largo del tiempo, siendo el sistema de perfusión con

recirculación dual el método más usado y que más se acerca a las condiciones *in vivo* de la placenta [16]. Este modelo pensado inicialmente para el estudio de la transferencia de fármacos y otros compuestos exógenos ambientales podría ser aprovechado al evaluar la perfusión de terapias con anticuerpos que permitan una dotación inmunitaria pasiva a los fetos de madres virémicas por Zika.

1.1 Descripción del problema

En los últimos dos años se ha descrito el síndrome congénito por Zika como un conjunto de complicaciones causadas por la infección de este virus en mujeres embarazadas, afectando el desarrollo normal del producto. En Ecuador se han reportado 5363 casos desde el 2016, de los cuales 722 corresponden a mujeres embarazadas. Se considera como un tema prioritario el desarrollo de tecnologías que doten de inmunidad a los fetos en las etapas con mayor vulnerabilidad. Por lo tanto, el estudio de complejidad de la placenta humana en la selectividad de las sustancias que atraviesan la barrera hemato-placentaria requiere de ensayos que direccionen el uso de placentas humanas para la optimización de la inmunoterapia hacia pruebas clínicas. La falta de modelos que representen la fisiología, arquitectura y heterogeneidad natural del tejido placentario han retrasado la confirmación del conocimiento levantado hasta la actualidad de cultivos 2D y modelos animales.

1.2 Justificación del problema

El desarrollo de ensayos con modelos de perfusión placentaria es un método no invasivo ampliamente usado en los estudios de la transferencia vertical de fármacos y compuestos ambientales. Las modificaciones del ensayo a lo largo del tiempo han contribuido a superar las limitaciones en la incorporación rutinaria en laboratorios asociada a su compleja naturaleza. Publicaciones más recientes de largas series de perfusiones reportan un mayor porcentaje en el éxito del experimento [15] [16] [17].

Es evidente el consenso, en la comunidad científica y las entidades que velan por la salud pública, en que es de alta prioridad el financiamiento y desarrollo de nano-anticuerpos listas para la experimentación en fases clínicas. La evaluación en placentas humanas permitirá una mayor relevancia en los estudios de protección antiviral, al representar la fisiología única en los períodos de exposición a la transmisión vertical.

A pesar de que el método de perfusión *ex vivo* ha venido siendo usado desde la década de los 60's, no se encuentra sistemas de perfusión disponibles en el mercado nacional o internacional, sino que son diseñados y construidos por los grupos de investigación. Es por ello que se considera necesaria la construcción de un sistema de soporte, que simule las condiciones *in vivo* en la transferencia placentaria y el establecimiento del protocolo experimental que valide su funcionamiento.

Estos resultados contribuirán a posteriores investigaciones de novedosas y prometedoras técnicas como el uso del dominio variable de cadena pesada de anticuerpos de camélidos (VHH), también llamados nanoanticuerpos, los cuales presentan varias ventajas sobre las Ig como la facilidad de penetrar en tejidos de permeabilidad limitada, su capacidad de unión a epítomos virales, mayor estabilidad y costo de producción con respecto a aquellas proteínas transferidas normalmente durante la gestación [11] [9].

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Construir un sistema *ex vivo* de perfusión placentaria humana para la evaluación de transferencia de anticuerpos mediante la integración de componentes biológicos y electromecánicos que simulen condiciones fisiológicas

1.3.2 Objetivos Específicos

Ingeniería Mecánica:

- Plantear el diseño de un soporte de tejido con materiales esterilizables para sujetar parcialmente la placenta durante el proceso de experimentación.
- Proyectar el diseño de un calentador para generar la temperatura idónea durante los experimentos.
- Evaluar la articulación de las partes del equipo de soporte para verificar su óptimo funcionamiento

Biología:

- Realizar las fases críticas de canulación y pre-perfusión utilizando placentas humanas para la identificación de cotiledones viables.

Ingeniería en Electrónica y automatización:

- Diseñar un sistema de control que mantenga a 37 °C un cotiledón placentario para la simulación de la temperatura corporal del ser humano mediante una tarjeta Arduino MEGA.
- Desarrollar una interfaz de usuario en un ordenador para la monitorización de las variables fisiológicas con ayuda de un software de ingeniería.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Arbovirus y embarazo

La infección por Arbovirus (virus transmitidos por artrópodos) ha sido un problema para la salud de las poblaciones humanas a lo largo de la historia debido a múltiples factores como la cantidad de especies de insectos que pueden servir como vectores, su amplio rango de distribución y la variabilidad que los virus presentan. Estas enfermedades han generado un enorme gasto a los gobiernos y entidades que administran la salud pública en todo el mundo. Se estima que cerca de 100 diferentes especies de virus transmitidos por artrópodos son patogénicas para los humanos, distribuidos en varias familias (Flaviviridae, Togaviridae, Bunyaviridae, Thabdoviridae, Reoviridae y Orthomyxoviridae). Virus como Zika, Fiebre Amarilla, Chikungunya, y Dengue son transmitidos por mosquitos del género *Aedes* spp. (*A. aegypti* y *A. albopictus*) [7], que generalmente por las limitaciones geográficas de distribución del vector, suelen generar brotes limitados a regiones tropicales, o estacionales en los subtrópicos. La infección de Zika, según reportes recientes, podría evadir estas restricciones geográficas, ya que la transmisión de humano a humano por vía sexual facilitaría la distribución de la epidemia fuera de las zonas endémicas, sin la necesidad del ciclo zoonótico [18].

Algunas de las especies de virus conocidos por causar complicaciones más graves en mujeres embarazadas que en la media de la población. Los riesgos de los arbovirus durante el período de gestación se pueden resumir en: infección más agravada en mujeres embarazadas; transmisión materno-fetal previa al parto y transmisión fetal durante el parto [1].

A pesar de que el virus de Zika fue aislado en 1947, muchas características del virus y las estrategias de infección no habían sido reveladas sino hasta los últimos tres años [18] debido a los brotes en la Polinesia Francesa (2013-2014), expandiéndose más tarde en las Américas (2015-2016), la identificación de su teratogenicidad por los casos de microcefalia en recién nacidos y en Febrero del 2016 la declaración de la epidemia de Zika como una emergencia en salud pública de preocupación internacional [7].

1.4.2 Síndrome Congénito por Zika

La enfermedad pasó de una infección leve y autocontrolada a un tema prioritario de acción por parte de las organizaciones ligadas a la salud pública debido a dos

complicaciones principales: el Zika congénito (transmisión vertical); y las neuropatologías en el feto y recién nacido (microcefalia principalmente) [3].

A pesar de que la mayoría de infecciones (80%) son asintomáticas, las complicaciones más preocupantes se producen en mujeres embarazadas, ya que esta infección puede causar serias complicaciones del desarrollo fetal [7]. En estos últimos dos años se volvió claro que el virus del Zika produce daños en el desarrollo debido a la significativa relación de mujeres embarazadas infectadas durante el embarazo y recién nacidos con defectos congénitos tal como sucede en otros virus teratogénicos conocidos como rubeola, donde los efectos más graves del feto se producen en las infecciones en las fases más vulnerables del embarazo [4].

En una serie de casos sintomáticos por Zika de mujeres embarazadas en Brasil se registraron anomalías fetales en 42% de los casos mediante ultrasonido [18], pero la magnitud del problema posiblemente está siendo subestimada, ya que las infecciones por arbovirus en zonas endémicas no son siempre reportadas o tratadas [1].

Se conoce actualmente como síndrome congénito por Zika al conjunto de complicaciones que incluyen defectos de desarrollo, restricción del crecimiento y defectos del feto y neonatales, e incluso la pérdida del producto. Este síndrome incluye la microcefalia, volumen cerebral reducido, hipoplasia cerebral, lesiones craneofaciales y otras complicaciones neurológicas, auditivas, visuales [4].

Los casos de microcefalia se asocian en mayor medida con diagnósticos de infección durante el primer trimestre de embarazo, los cuales se conocen como casos primarios de microcefalia. Sin embargo, las infecciones en las semanas posteriores se han relacionado con resultados adversos como restricción del crecimiento intrauterino o pérdida del producto [2].

1.4.3 Mecanismos de la Infección

La infección tiene un periodo de incubación de 3 a 12 días. La sintomatología clínica provocada por el virus Zika en humanos afecta solo al 20% de individuos [18], y generalmente incluye cuadros febriles similares al resfriado común, malestar, erupciones cutáneas, vómitos, conjuntivitis, dolores de cabeza, musculares y de articulaciones. Estos síntomas duran de 2 a 7 días y se auto-controla en pacientes que no están inmunocomprometidos [7].

El mecanismo propuesto, por el cual el virus del Zika tiene impactos en el desarrollo neuronal, es la preferencia de este virus por células neurales progenitoras, induciendo su apoptosis, infectando además neuronas maduras en menor medida. Esto basado en ensayos de inoculación directa en fetos de ratón, que, a pesar de no representar la fisiología normal de la transferencia vertical, sugiere que se produce un adelgazamiento cortical e inhibición de la especialización de las células neurales progenitoras. El cultivo *in vitro* e infección con ZIKV en neuroesferas humanas resultó en alteraciones del crecimiento y desarrollo normal, mostrándose consistente con los casos de microcefalia [18].

Numerosos estudios, modelos (cultivos celulares, modelos animales) e historiales clínicos han revelado que el virus de Zika tiene un amplio tropismo celular y tisular, con la remarcable característica de producir infecciones placentarias y congénitas.

En los recientes estudios desarrollados para comprender los mecanismos virales involucrados en la transmisión vertical del virus, se ha detectado la presencia del virus en células de la placenta como las células de Hofbauer (a las cuales utiliza como caballos de Troya para diseminarse en el flujo fetal), trofoblastos y células endoteliales. Se ha detectado el virus en múltiples fluidos como saliva, orina, líquido conjuntival, lágrimas, mucosa cervical, leche materna, líquido amniótico, lavados vaginales y semen. La presencia del virus en el tracto reproductivo masculino y femenino es consistente con los hallazgos de la transmisión sexual del virus [18].

1.4.4 La barrera placentaria

La placenta representa un vínculo primordial en la interfaz madre-feto y juega un rol crucial en el desarrollo durante la gestación al actuar como portal de transferencia de oxígeno y nutrientes desde la madre y en la recepción de los materiales de desecho productos del metabolismo, funcionando como una barrera física e inmunológica [19]. Existen diversos mecanismos de transferencia trans-placentaria como difusión facilitada, transporte activo y pasivo, filtración y pinocitosis. Estos mecanismos y otros, asociados a la presencia de enzimas y proteínas transportadoras, podrían estar involucradas en aumentar o disminuir la transferencia de compuestos endógenos y exógenos [14].

Algunos virus (Hepatitis E, Influenza, Herpes, Cytomegalovirus, Viruela, Sarampión) son conocidos por provocar mayores daños durante el embarazo, lo cual generó la sospecha

de que existen etapas particulares en la cual la vulnerabilidad es mayor frente a estos patógenos. Para que se produzca la transmisión vertical del virus, los viriones presentes en el torrente sanguíneo materno deben atravesar la placenta, dotada de una barrera sincitial que puede producir Interferones tipo I y III, otorgando un alta resistencia a infecciones en placentas maduras [4], pero se desconoce si los niveles de Interferon III es suficiente en etapas tempranas del embarazo.

Las infecciones perinatales o intrauterinas son una importante causa de muerte y morbilidad. Un mecanismo de inmuno-protección del feto frente a estas infecciones es la transmisión materna de anticuerpos, dotando de inmunidad pasiva contra patógenos al inmaduro sistema de defensa fetal [20].

En un estudio reciente, Sheridan y otros (2017) examinaron modelos celulares análogos al trofoblasto placentario humano tanto al inicio como al final del embarazo, para analizar la vulnerabilidad ante el virus del Zika. Encontraron que las células correspondientes al término del embarazo presentan genes asociados a protección de virus en general, sin presentar genes codificantes para factores de reconocimiento específicos para Zika. Mientras que las células madres embrionarias, propias del trofoblasto temprano, presentan genes que codifican factores de anclaje para la entrada del Zika y un pobre sistema de resistencia antiviral en general [5]; esto sugiere que el feto es más vulnerable a la entrada del Virus durante el primer trimestre de gestación ya que el trofoblasto veloso aún no se ha madurado para generar una efectiva protección.

1.4.5 Desarrollo de inmunoterapias contra el virus del Zika

La creciente crisis asociada a la epidemia del virus resalta la necesidad de desarrollar medidas terapéuticas para limitar la replicación y contagio [19]. Zika es un virus de ARN+ de cadena sencilla con un genoma de unas 10.7 miles de pares de bases que codifica una sola poliproteína, que con acción de proteasas produce tres proteínas estructurales (C, prM/M y E) y otras siete no estructurales. La proteína E de los Flavivirus son responsables de la entrada de virus y suelen representar un blanco para anticuerpos neutralizantes [12].

La infusión de inmunoglobulinas podría prevenir la transmisión vertical, dotando al feto de inmunoterapia pasiva al reducir la carga viral y la seriedad de la infección neonatal, tal como se ha reportado para Hepatitis B. Otro ejemplo es el uso de inmunoglobulinas

purificadas de plasma de pacientes convalecientes de chikungunya, que se han mostrado efectivas en modelos de ratón, las cuales permitirán el diseño de “hiper-inmunoglobulinas” anti-chikungunya con la intención de ser aplicados en la protección de bebés de madres virémicas [1].

Tabla 1.1. Registros de vacunas contra el Virus Zika en las diferentes etapas de pruebas clínicas según el portal web de rastreador de vacunas de la OMS. [21]

ID de Vacuna	Tipo de Vacuna	Inmunogen	Grupo de Investigación / Desarrollo	Pruebas Clínicas
GLS-5700	ADN	prME	GeneOne Life Science, Inc. / Inovio Pharmaceuticals	Fase 1
GLS-5700	ADN	prME	GeneOne Life Science, Inc. / Inovio Pharmaceuticals	Fase 1
AGS-v	Péptidos	Proteínas salivales de mosquito	NIH	Fase 1
MV-Zika	Vector viral recombinante	prME	Themis Bioscience	Fase 1
mRNA-1325	mRNA	prME	Moderna Therapeutics	Fase 2
VRC-ZKADNA085-00-VP	ADN	prME	NIAID	Fase 1
VRC-ZKADNA090-00-VP	ADN	prME	NIAID	Fase 1
VRC-ZKADNA090-00-VP	ADN	prME	NIAID	Fase 2
ZIKV PIV	Virus completo inactivado	Virus completo	NIAID	Fase 1
ZIKV PIV	Virus completo inactivado	Virus completo	NIAID	Fase 1
ZIKV PIV	Virus completo inactivado	Virus completo	BIDMC	Fase 1
ZIKV PIV	Virus completo inactivado	Virus completo	NIAID	Fase 1
PIZV or TAK-426	Virus completo inactivado	Virus completo	Takeda	Fase 1
VLA1601	Virus completo inactivado	Virus completo	Valneva Austria GmbH	Fase 1

Cerca de 50 vacunas contra el Zika se encuentran actualmente en distintas fases de investigación y desarrollo [8] por diferentes universidades, compañías farmacéuticas, entidades gubernamentales y colaboraciones multi-institucionales. Entre estos intentos de protección contra el virus del Zika, se han utilizado los siguientes enfoques o técnicas: utilizar el virus de Zika inactivado, cepas atenuadas del virus, partículas semejantes a virus expresando proteínas de membrana, vacunas con conjugados de nanopartículas proteicas, plásmidos de ADN, proteínas recombinantes, entre otros [7].

De estos enfoques, 14 de las vacunas candidatas se encuentran en las primeras fases de pruebas clínicas (Tabla 1).

Se ha reportado la capacidad de nanoanticuerpos, producidos por especies de la familia Camelidae, de unirse a virus y bacteriófagos con la capacidad de neutralizarlos [11], por lo que puede ser una opción viable en el desarrollo de técnicas terapéuticas específicas para el reconocimiento de epítomos que sean candidatos potenciales para el desarrollo de vacunas como la glucoproteína de envoltura E, ampliamente utilizada en la neutralización de flavivirus [12].

El grupo de investigación de Biomedicina de la ESPOL ha propuesto la investigación de una terapia usando los nanoanticuerpos modificados, destinados a limitación de la replicación del virus y posterior progresión de la infección en fases críticas del desarrollo gestacional.

Los resultados de dicho estudio, justifica la necesidad del presente trabajo multidisciplinario, en donde estudiantes de tres carreras (Ingeniería Mecánica, Biología e Ingeniería Electrónica y automatización) integran componentes que permiten el diseño de un modelo que permita asegurar el desarrollo de futuras pruebas de transferencia de nanoanticuerpos a través de la barrera placentaria.

1.4.6 Sistema de perfusión placentaria ex vivo

Frente a la necesidad de desarrollar modelos que permitan confirmar los resultados obtenidos en cultivos celulares y modelos animales; se propone como un reto el desarrollo de nuevos enfoques que permitan simular la estructura de la barrera placentaria, conservando la arquitectura y heterogeneidad celular [7] para representar la fisiología única de los períodos vulnerables en la infección vertical.

Se han utilizado varios enfoques para determinar la transferencia de compuestos exógenos y endógenos (Tabla 1.2), entre ellos modelos animales y cultivos celulares

(citotrofoblastos primarios, linajes celulares de coriocarcinoma, vesículas de membrana plasmática, explantes de tejido placentario, modelo celular BeWo, entre otros) [17]. El uso de explantes placentarios ofrece la ventaja de que se puede estudiar la decidua basal y vellosidades que retengan las funciones celulares e inmunes del primer trimestre de embarazo [22]. Aunque los modelos animales pueden servir para conocer la embriotoxicidad, no se puede extrapolar data de la farmacocinética (toxicodinámica) debido al tipo de placenta hemocorial propio de humanos [17]. El uso de modelos animales es de gran utilidad para el desarrollo de potenciales vacunas, mas no permite la extrapolación de los resultados de la transferencia placentaria, ya que la placenta de tipo hemocorial es exclusiva de primates [15].

Tabla 1.2. Modelos comúnmente usados para el estudio para transferencia placentaria humana y mecanismos asociados [14].

Material	Modelo	Uso
Tejido completo	Perfusión de placenta humana <i>ex vivo</i>	Transferencia trans-placentaria incluyendo metabolismo de xenobióticos y transportadores.
Porciones de tejido	Explantes placentarios	Mecanismos como captura, flujo y metabolismo que afectan la transferencia.
	Explantes de cultivos vellosos	
Células	Células trofoblásticas primarias	Mecanismos como captura, flujo y metabolismo que afectan la transferencia.
	Linajes celulares de coriocarcinoma	
Cultivos de monocapa celular en membranas permeables	BeWo b30	Transferencia trans-placentaria incluyendo metabolismo de xenobióticos y transportadores.

Durante las últimas décadas se han realizado numerosos experimentos relacionados a los mecanismos de transferencia trans-placentaria con procedimientos modificados a partir del sistema de perfusión introducido por Panigel en 1962, destinado inicialmente al estudio de la transferencia de fármacos, incluyendo actualmente compuestos ambientales y contaminantes [16].

Estos sistemas utilizan un cotiledón (unidad funcional de la placenta), el cual es aislado en un sistema recirculante doble (Fig.1.1) para cálculos de transferencia de drogas, metabolismo de xenobióticos y la distribución en la interfaz materna – placentaria – fetal [15]. El ensayo de perfusión *ex vivo* es complejo y toma tiempo de desarrollar, pero a su

vez provee valiosa información de la farmacocinética y metabolismo aprovechando tejido placentario, que normalmente es desechado luego del alumbramiento [14].

Se lo considera a este método como el más prometedor entre los modelos experimentales de placenta humana al acercarse a las condiciones *in vivo* [16] haciendo posible el estudio de la transferencia trans-placentaria, guardando la complejidad estructural sin representar amenaza alguna al feto o la madre.

A pesar de que se han generado publicaciones en las últimas cuatro décadas de los resultados de evaluación de transferencia de fármacos y contaminantes usando este modelo, no se lo ha validado formalmente, presentando variantes entre los grupos de investigación que lo han llevado a cabo. Los datos preliminares muestran una buena comparación de resultados entre laboratorios [23], en donde se ha llegado a algunos consensos en parámetros cruciales durante el experimento.

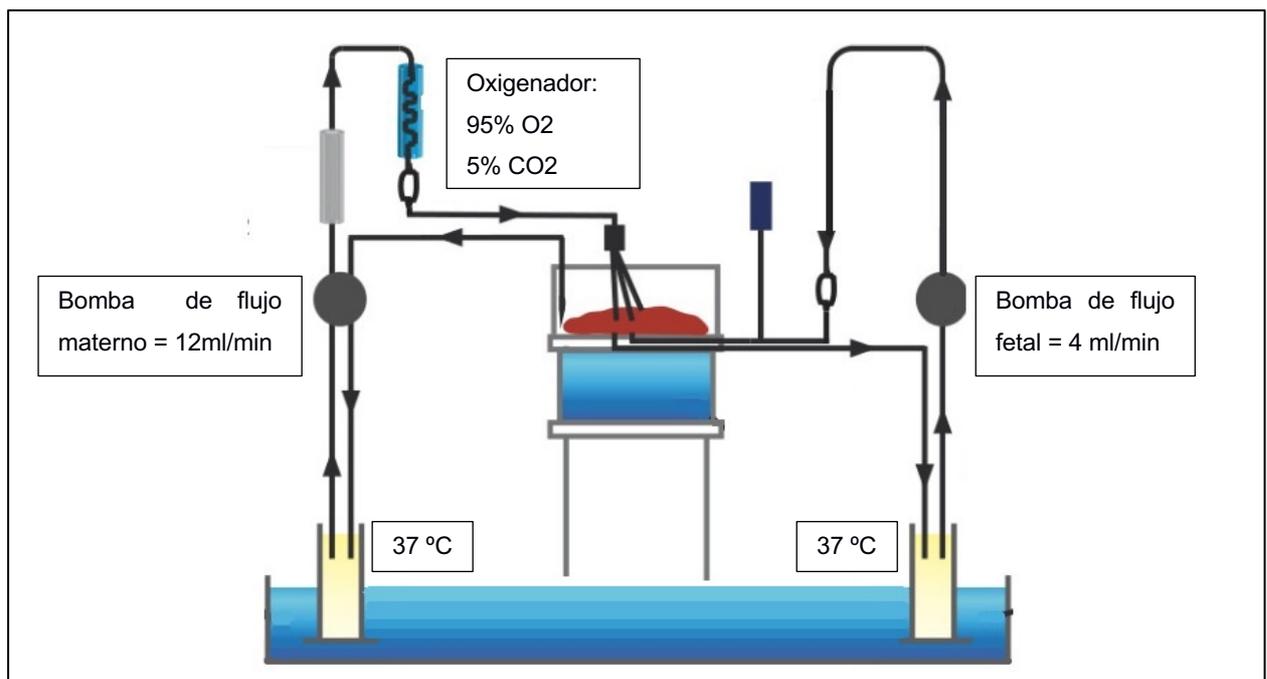


Fig.1.1. Esquema gráfico del sistema dual recirculante de perfusión placentaria *ex vivo*, propuesta por Grafmüller y colaboradores [17]

La revisión de publicaciones de estudios realizados con el modelo de perfusión placentaria *ex vivo* ha permitido analizar el estado del arte de este experimento. Considerando a este, el método más idóneo para evaluar la transferencia de anticuerpos inmunitarios debido a la conservación de arquitectura y heterogeneidad tisular de la

placenta humana, superando así el desafío de traducir y confirmar el conocimiento levantado en modelos de dos dimensiones [6].

Además de obtener pruebas experimentales directamente relevantes, facilitarán el escalamiento hacia fases clínicas necesario en el desarrollo de vacunas [7], aprovechando la donación de placentas humanas gracias a la colaboración del Hospital Alfredo Paulson (HAP) de la Junta de Beneficencia, en donde se facilitará el desarrollo de pruebas experimentales con el consentimiento previo de las madres donantes.

CAPÍTULO 2

2. MÉTODO

Para el desarrollo del diseño de un prototipo de perfusión placentaria *ex vivo* que permita la evaluación de transferencia de anticuerpos, se estableció una colaboración entre el laboratorio de Biomedicina de la ESPOL y un equipo médico del Hospital de la Mujer Alfredo G. Paulson del complejo hospitalario “Alejandro Mann” de la Junta de Beneficencia de Guayaquil. Se colectaron placentas de pacientes que han firmado un consentimiento, el cual ha sido previamente considerado por un comité de ética del hospital. Se obtuvo placentas de embarazos que hayan llegado a término (37 a 42 semanas de gestación) independientemente del tipo de alumbramiento y la condición médica de la donante. No se incluyeron placentas procedentes de abortos o en caso de muerte materna o fetal durante el parto.

2.1 Diseño del estudio

Se realizó un estudio prospectivo mediante las experiencias de aplicación del procedimiento de perfusión placentaria, adaptado a partir de los métodos reportados en varias publicaciones de alta relevancia de implementación del sistema de perfusión placentaria *ex vivo* (Anexo C) [14-17,23-25]. El sistema de perfusión placentaria, de tipo dual y recirculante, ha sido modificado del modelo descrito inicialmente por Schneider y colaboradores en 1972. Se utilizaron las placentas para la implementación de las etapas previas a la de perfusión placentaria durante varias experiencias en los meses de junio y julio del 2018. La sala dispuesta para las perfusiones se encuentra ubicada dentro del área de partos y cirugías del HAP.



Fig.2.1. Esquema de los pasos generales del procedimiento para realizar las perfusiones placentarias en el sistema de soporte *ex vivo*. Desde que se obtiene la placenta, el tejido debe pasar por una serie de fases de inspección, enjuague, canulación, selección de cotiledones y lavado del contenido sanguíneo antes de empezar con la perfusión.

La revisión de literatura y el criterio del personal médico y tutores del proyecto se utilizaron para la elección de los medios de perfusión, métodos de oxigenación, calentamiento de los reservorios, velocidad del flujo, duración de las fases del experimento, diseño de anillos de perfusión, número de catéteres de infusión maternos, entre otros aspectos prácticos.

2.2 Equipos de perfusión

El sistema de perfusión está estructurado por una cabina transparente que aloja la cámara de perfusión, con un soporte metálico para los anillos que fijan los cotiledones. El sistema se articula a dos bombas de flujo peristáltico, un sistema de oxigenación para el circuito materno, vías de infusión, dos reservorios para los medios de los circuitos materno y fetal. La cabina posee un sistema integrado de calentamiento y adquisición de datos de sensores de temperatura, presión y pH y una interfaz de usuario con una pantalla táctil para monitorear los datos.

2.2.1 Diseño del sistema mecánico

Los anillos de fijación de los cotiledones placentarios fueron adaptados a partir del diseño en plexiglass descrito por Schneider [26]. Sin embargo, en el presente trabajo se optó por usar resina dental SG de las impresoras 3D Formlabs 2 de alta resolución (Formlabs Inc, Somerville, USA). Este material tiene certificación de biocompatibilidad y resistencia a esterilización en autoclave. Los modelos preliminares, se imprimieron en biopolímero (PLA) de ácido poliláctico (Verbatim, Japón).

El modelo de la cabina de perfusiones se adaptó de la cámara de perfusión descrita inicialmente por Conings y colaboradores [15]. Utilizando láminas de metil-metacrilato polimerizado de alta calidad (T.M. Margacipta Wirasentosa; Tangerang, Indonesia) se construyen dos cámaras que permiten mantener el sistema de perfusión en un ambiente aislado. La cabina posee un reservorio de agua, fabricado en acero inoxidable, que funciona como un baño maría y genera un ambiente de temperatura controlada en la cabina. Los diseños se llevaron a cabo por Jaqueline Litardo en Autodesk Inventor 2017 (Microsoft, USA), estudiante de la Facultad de Ingeniería Mecánica de la ESPOL. La simulación termodinámica de la eficiencia de la cámara para la distribución de temperatura se llevó a cabo en el software ANSYS.

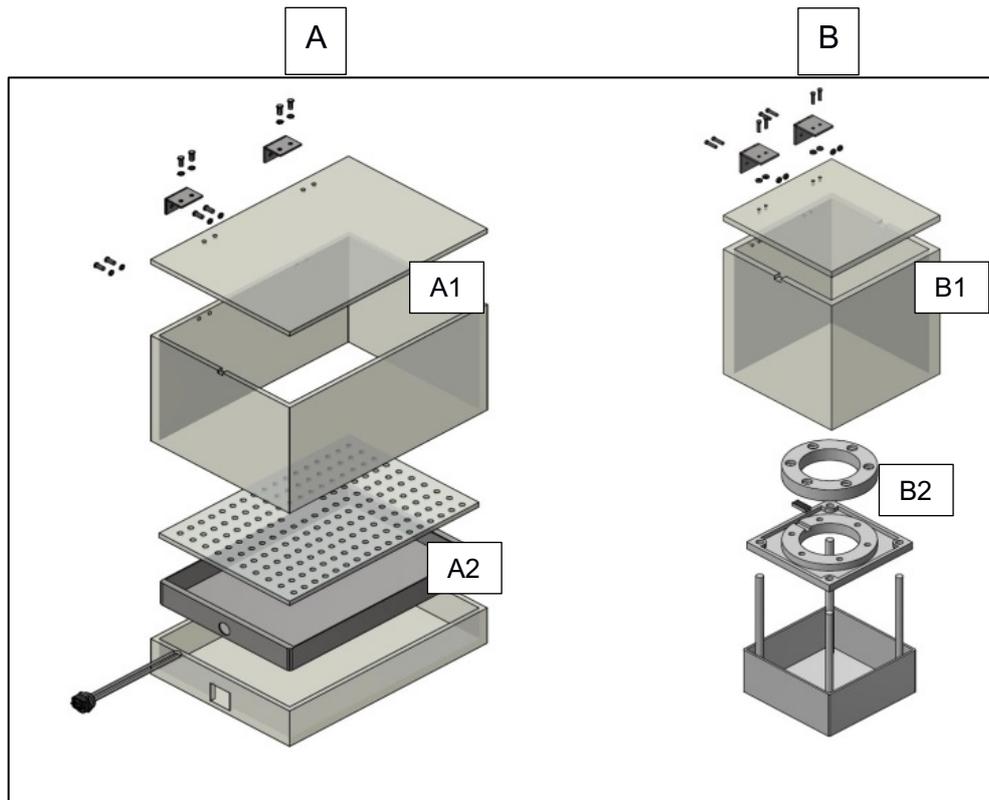


Fig.2.2. La cabina de perfusiones (A) está estructurada con paredes y una cubierta (A1) de metil-metacrilato polimerizado y una bandeja inferior (A2) de acero inoxidable para almacenamiento de agua, que será calentada utilizando una resistencia térmica. Dentro de la cabina se encuentra la cámara de perfusión (B1), la cual aloja los anillos de perfusión (B2), en un soporte de acero inoxidable.

2.2.2 Control y monitoreo de variables

Para asegurar el control de temperatura fisiológica de los reservorios materno y fetal, y del ambiente interno de la cámara, se programó en la Facultad de Ingeniería Eléctrica de ESPOL, una tarjeta de adquisición de datos Arduino MEGA 2560(Arduino TM, Italia). La monitorización de tres variables (temperatura, pH y presión) se facilita mediante el desarrollo de una interfaz de usuario presentada en un display táctil integrado en la cabina de perfusión.

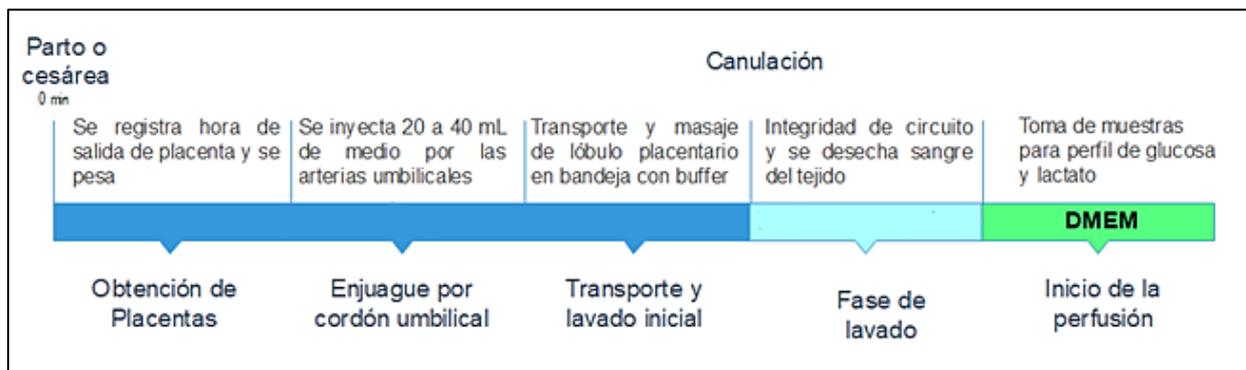


Fig.2.3. Esquema de las fases de perfusiones y los procedimientos que incluyen los principales procedimientos en las fases previas a la perfusión placentaria. El diseño ha sido adaptado de los métodos de varias publicaciones de perfusiones *ex vivo* mencionadas en sección 2.1.

2.3 Medios de perfusión.

Los medios de perfusión están destinados a la suplementación de nutrientes, sales y gases necesarios en la viabilidad celular en el tejido placentario (Anexo D).

2.3.1 Medio 1.

Se preparó un buffer (8.30 g NaCl, 0.42 g KCl, 0.19 g KH_2PO_4 , 0.35 g MgSO_4 , 0.44 g CaCl_2) / L, con composición similar a la solución buffer de Krebs Ringer que evita la coagulación y daño isquémico del tejido durante las fases de transporte y enjuague [27]. El medio 1 es suplementado con glucosa (2.61 g / L y heparina (25000 UI / L). Este buffer favorece a la recuperación de la isquemia fría en las fases de enjuague y transporte previas a la perfusión.

2.3.2 Medio 2.

Para el inicio del lavado del cotiledón, el medio 1 es calentado en la cabina de perfusión hasta 37 °C y luego burbujeado durante 15 minutos hasta alcanzar concentraciones gaseosas de 95% O_2 y 5% CO_2 para el circuito materno, y 95% N_2 y 5% CO_2 en el circuito fetal.

2.3.3 Medio 3.

Durante la fase experimental de perfusión se utilizará el Medio de Eagle Modificado por Dulbecco 'Gibco DMEM-11995065' (Invitrogen, Thermo Fisher; USA) suplementado con:

glucosa (1.6 g / L y L-glutamina (1%) para favorecer el metabolismo celular; Penicilina y estreptomicina (1%) para prevenir la formación de brotes y biofilms bacterianos; y solución salina de heparina (25000 UI / L) para evitar acumulación de coágulos. La mezcla gaseosa fue establecida en el circuito materno mediante un sistema de oxigenación pediátrico (95% O₂ y 5% CO₂) Los valores de pH se ajustan en niveles entre 7.3 – 7.4 y se agrega 40 mg / mL de Albúmina de Suero Bovino (BSA, Sigma Aldrich; Darmstadt, Germany) en el reservorio fetal y 30 mg / mL en el reservorio materno para simular los niveles fisiológicos de albúmina [15].

Los cambios de pH en todos los medios de perfusión son monitorizados y ajustados con 1N HCl o 1N NaOH para mantenerlos en niveles fisiológicos (7.2 – 7.4) [15,17].

2.4 Colección, transporte y enjuague

Dentro de un margen de 10 minutos desde la extracción (cesárea) o expulsión de la placenta (parto vaginal), esta fue pesada, e inspeccionada visualmente (Fig. 2.4) para confirmar la integridad y la ausencia de rupturas significativas del tejido. Se enjuagó con 20-40 mL del medio 1, inyectando el buffer por las dos arterias del cordón umbilical con sondas flexibles Nelaton de cateterismo uretral #6 (Meditec S.A; Bogotá, Colombia) y una bomba de infusión Volumat MC Agilia (Frenesius Kabi, España) con un flujo de 160 mL / h.

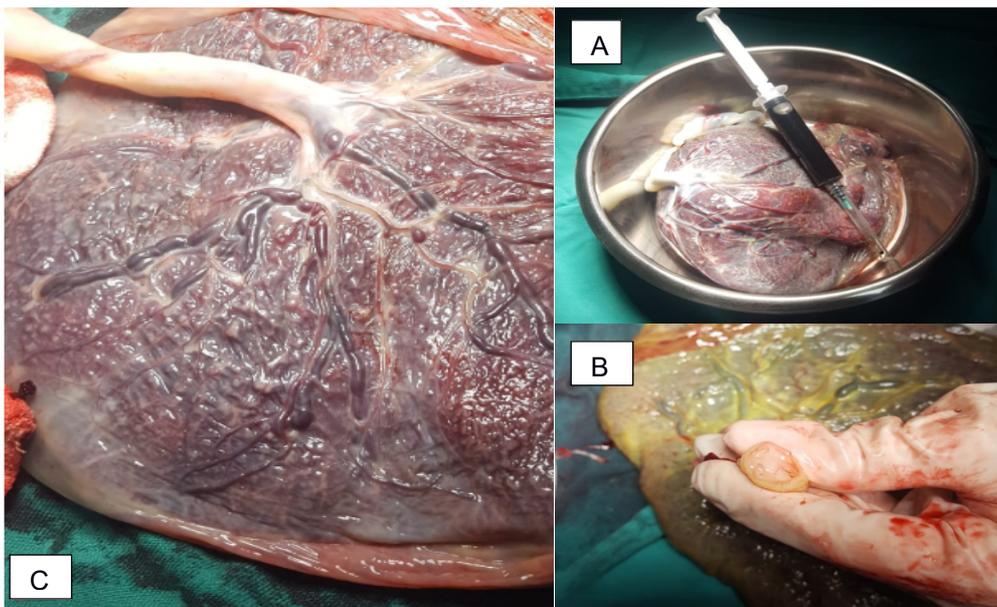


Fig.2.4. Las placentas son transportadas (A) en una bandeja con el medio 1, se inicial inmediatamente el enjuague identificando las arterias del cordón umbilical (B). Se realiza una primera inspección de la condición física de la placenta(C), comprobando que no haya rupturas, malformaciones o coágulos.

Durante el enjuague del lóbulo placentario, este fue bañado en la bandeja de transporte con 400 mL del medio 1 y gentilmente masajeado para enjuagar los restos de sangre. Se registra el tiempo de transporte de la placenta hasta la sala de perfusiones [17,25] (Anexo B).

2.5 Aislamiento y canulación de los cotiledones.

Se realizó una nueva inspección del lado materno removiendo la membrana amniótica y localizando desde el lado fetal un cotiledón íntegro, con buena vascularización, ubicado en la zona marginal de la placenta. Una vez identificado el cotiledón, se aisló con sutura de seda USP3-0 (Atramat; DM, México) la vena y arteria que irrigan al cotiledón seleccionado [15,17].

Se canuló primero la arteria fetal realizando una leve incisión con tijeras afiladas para introducir un catéter pediátrico #24 (NIPRO, Japón), y se ajustó con doble nudo. Se procedió de la misma manera con la vena [17]. Se inició el flujo arterial utilizando la bomba de infusión, circulando el medio 1 inicialmente con 120 mL / h, y luego de una confirmación óptica de la integridad del flujo, se cambió el flujo a 240 mL / h, controlando que la presión en la arteria fetal no exceda los 70mm Hg [17]. Cuando se determinó que el flujo de ingreso arterial es igual al flujo que se drena por el catéter venoso, se inició la fijación del tejido al anillo de perfusión [16] .

Se conectaron llaves de tres vías (Frenesius Kabi, España) a los catéteres de la arteria y vena fetal y se estabilizaron las vías al tejido utilizando apósitos transparentes (Tegaderm, 3M, USA). Cuidadosamente se empujó el tejido sobre las puntas metálicas, procurando mantener el cotiledón aislado en el centro del anillo. Se fijó los anillos con el tejido en el armazón de acero, asegurándose que el lado materno se muestre hacia arriba.

2.6 Fase de lavado

El circuito materno se inició con un flujo de 720 mL/min usando el medio 2 con el sistema de oxigenación artificial. Se insertaron cuatro cánulas de infusión en el espacio

intervelloso. El conducto venoso materno se estableció con una sonda de cateterismo uretral Nelaton #10 (Meditec S.A; Bogotá, Colombia) ubicada en la parte más inferior alrededor del tejido. Los primeros 50 mL del perfusato que es exudado en los espacios intervellosos fue drenado antes de empezar la fase de lavado [16].

Las bombas de infusión se establecieron con un flujo de 240 mL/h (fetal) y 720 mL/h (materno) para la fase de lavado, circulando el medio 2 previamente calentado a 37°C y pH ajustado entre 7.2 – 7.4 estableciendo la mezcla gaseosa antes descrita.

Por un tiempo de 20 minutos se desechó el fluido de las vías venosas de ambos circuitos [17].

2.7 Inicio de la perfusión

Una vez concluida la pre-fase de 20 minutos y no se observó pérdidas, el medio es reemplazado por el Medio 3, con un contenido de 250 mL en los reservorios para el inicio de la perfusión [17] (Anexo A). La valoración de la funcionalidad del tejido se realiza tomando muestras de 5 mL cada 30 minutos de medio del reservorio fetal para realizar pruebas de saturación de O₂ y CO₂, consumo de glucosa y producción de lactato.

3. RESULTADOS

3.1 Resultados experimentales

Se obtuvo un total de siete placentas humanas durante 4 experiencias en los meses de Junio y Julio del 2018 en el HAP, de las cuales cuatro son provenientes de cesáreas, dos de partos normales programados y una de parto no programado (Tabla 3.1). Según la inspección visual por parte del personal médico, no se observaron diferencias macroscópicas en la integridad de los vasos sanguíneos entre placentas obtenidas de cesáreas y partos normales.

Tabla 3.1. Identificación de las placentas utilizadas durante las experiencias en cuatro días de visita al hospital para procesos previos de perfusión (P=placenta).

Identificación de placentas	Fecha de la experiencia	Tipo de alumbramiento
P1	(28/06/2018)	Cesárea
P2	(28/06/2018)	Parto normal
P3	(11/07/2018)	Parto normal (no programado)
P4	(11/07/2018)	Parto normal
P5	(30/07/2018)	Cesárea
P6	(30/07/2018)	Cesárea
P7	(31/07/2018)	Cesárea

Se realizaron las fases previas a la perfusión placentaria. La primera experiencia con las placentas P1 Y P2 permitieron al personal médico la familiarización con el procedimiento de aislamiento de los cotiledones en los anillos de perfusión y fijación al soporte. Para una mejor identificación del sistema de irrigación de la placenta se inyectó solución salina de Yodo-povidona por las dos arterias del cordón umbilical, permitiendo la dilatación de la zona irrigada por cada arteria y la identificación del área de la placenta irrigada por cada rama arterial del cordón umbilical. No se realizaron las fases de transporte y enjuague en las dos primeras placentas, ya que el procedimiento se realizó en uno de los quirófanos, mas no en la sala de tratamiento de placentas (Fig. 3.1). Durante la estabilización del tejido entre los anillos de perfusión se registró la necesidad aumentar la capacidad de almacenamiento del anillo superior y usar tornillos más largos por el grosor de la placenta.

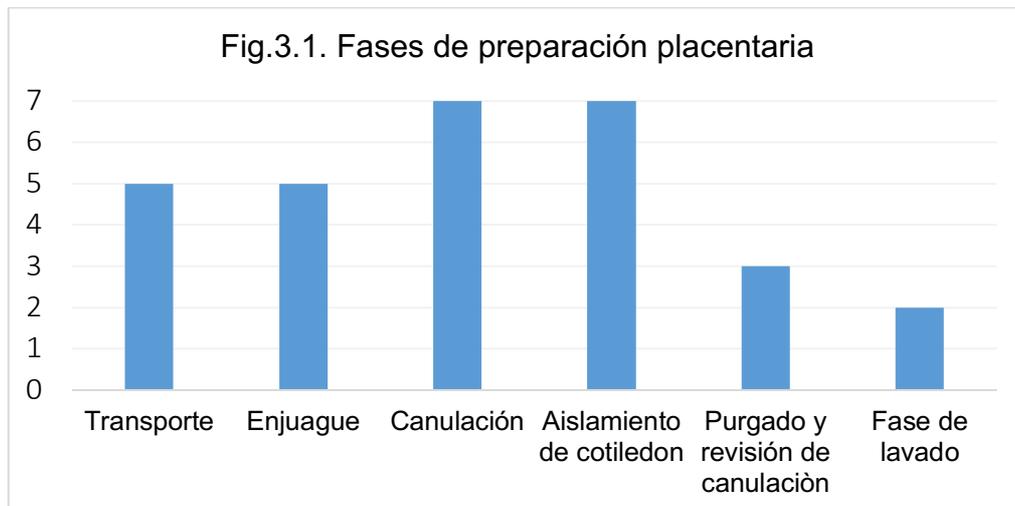


Figura 3.1. Grafica del número de placentas en las cuales se experimentaron las fases previas de perfusión placentaria *ex vivo*.

Para el proceso de canulación, en las primeras experiencias (P1 – P4) se canuló las placentas ingresando sondas de cateterismo uretral por una de las arterias y la vena del cordón umbilical. A pesar de que dicho procedimiento no restringía el sistema a un solo cotiledón para la irrigación, sirvió para identificar el calibre de las sondas a utilizar que permitan el acceso a las arterias y vena del cordón.

Para la segunda experiencia con las placentas P3 y P4 se probaron las modificaciones en los anillos de perfusión propuestas durante la experiencia anterior. Se modificó la capacidad de almacenamiento en el anillo superior (anillo materno) mediante el aumento del grosor del cilindro interno. A partir de la experiencia con la placenta P4 se implementa el paso de transporte y enjuague. El enjuague para la placenta P3 se realizó inyectando 40 mL del medio 1 usando jeringuillas, proceso con el que se observó la presencia de burbujas en las sondas, por lo que desde los procedimientos con la placenta P4 se implementa el uso de la bomba de flujo peristáltico, al incluir un sistema automatizado de purga y detección de burbujas, evita el daño que estas puedan producir en el tejido. El masaje de los lóbulos placentarios durante la fase de transporte en la bandeja con 400 mL del medio 1 no removía totalmente la sangre alojada en la cara materna de la placenta, por lo que se descarta el contenido de la bandeja y se vuelve a bañar la placenta en 400 mL del buffer. El proceso se repitió dos veces por comodidad de la manipulación y lavado de coágulos.

Una de las placentas se obtuvo después de una cesárea (P5) de una donante que sufrió preeclampsia. Las diferencias morfológicas fueron evidentes por la presencia de

numerosas placas de calcificaciones entre las lagunas del espacio interveloso. Sin embargo, se llevó a cabo la inspección visual de la placa coriónica, se identificaron los vasos asociados a un cotiledón y se procedió a realizar la canulación. Se observó integridad en el flujo del circuito fetal, mas no se completó la fase de lavado por falta de vías de infusión ajustables a la bomba de flujo peristáltico. Se probó durante esta experiencia el nuevo diseño del anillo inferior, el cual presenta un canal para recolección de sangre y medio exudado luego del corte del tejido alrededor del cotiledón seleccionado.

En la experiencia con las placentas P6 y P7 se completó la fase de lavado (circulación abierta) en el circuito fetal, luego de confirmar la integridad del venoso-arterial. Las dos placentas correspondían a cesáreas. En los procedimientos realizados en estas placentas se tomó los tiempos de transporte, de enjuague del cordón y del fin de canulación (Fig. 3.2). Se registró un tiempo de canulación desde el momento de la cesárea de 19 minutos para P6 y 24 minutos para P7.



Figura.3.2 Resultados de las fases de pre-perfusión durante la última experiencia con el uso de placentas para el sistema *ex vivo*.

3.2 Análisis de costo

Los costos de la construcción del sistema de perfusión incluyen la compra de materiales y equipos necesarios (Tabla 3.2) y los costos del servicio de mano de obra durante la construcción de las partes diseñadas (Tabla 3.3).

Tabla 3.2. Costos de equipos y materiales adquiridos para la construcción del sistema mecánico.

Descripción	Costo / unidad	Cantidad	Costo final
Equipo de oxigenación	\$772,80 / Equipo	1 Unidad	\$ 772,80
Tarjeta Arduino Mega	\$68,88 / Unidad	1 Unidad	\$ 68,88
Láminas de metilmetacrilato polimerizado.	\$265,00 / Plancha	½ Plancha	\$ 132,50
Acero inoxidable AISI-304 (3 mm)	\$350,00 / Plancha	¼ Plancha	\$ 87,50
Varillas de acero inoxidable AISI-304 (10 mm diámetro, 200 mm longitud)	\$2,50	4 Unidades	\$ 10,00
Resistencia eléctrica	\$40,00	1 Unidad	\$ 40,00
Resina dental SG	\$660,00	½ Litro	\$ 330,00
Perno M6	\$0,50	6 Unidades	\$ 3,00
Tuerca mariposa M6	\$0,25	6 Unidades	\$ 1,50
		TOTAL	\$ 1446,18

El resumen de costos descritos en las tablas 3.2 y 3.3 corresponden al presupuesto destinado a la construcción del sistema.

Tabla 3.3. Costos de servicios manufactura y construcción del sistema mecánico de perfusión.

Servicio	Costo total
Manufactura y soldadura del soporte metálico para el tejido	\$ 30,00
Manufactura y soldadura del reservorio de agua de la cabina de perfusión	\$ 40,00
Manufactura de las partes de la cabina elaboradas en acrílico	\$200,00
Mecanizado de tuerca NPT de 1in	\$ 10,00
TOTAL	\$280,00

Los materiales y sustancias e instrumentos necesarios para el proceso de perfusión placentaria se describen a continuación en la tabla 3.4. Debido a que no se completó el

proceso de perfusión, los precios unitarios de algunas sustancias son calculadas a partir de la cotización de precios comerciales de proveedores locales. El precio estimado de una perfusión placentaria está sujeta a cambios debido a que algunos de los insumos han sido donados por el laboratorio de Biomedicina de la ESPOL y el HAP.

Tabla 3.4. Costos de sustancias e insumos necesarios para el experimento de perfusión placentaria.

Descripción	Costo / Unidad	Cantidad	Costo final
DMEM (Gibco)	\$475,00 /10L	0,75 L	\$ 35,63 *
Heparina solución	\$5,77 / 5000 UI* 5mL	2 unidades	\$ 11,54
Solución de Penicilina-Estreptomicina	\$36,43 / 100 mL	0,195 mL	\$ 0,07
Solución Balanceada de Earle's	\$25,12 / 100 mL	400	\$301,48 *
L-Glutamina	\$97,68 / 100 g	0,75 g	\$ 7,63*
Albúmina de Suero Bovino	\$101,64 / 10 g	21 g	\$213,44
Equipo de infusión Volumat	\$5,32 / 1 Unidad	2 unidades	\$ 10,64
Sutura de seda 2.0	\$1,34 / 1 kit	2 unidades	\$ 2,68
Sondas Nelaton #6	\$0,70 / 1 Unidad	2 unidades	\$ 1,4
Sondas Nelaton #10	\$0,70/ 1 Unidad	1 unidad	\$ 1,4
Catéter #18	0,54/ 1 Unidad	1 unidad	\$ 0,54
Catéter #24	0,55/ 1 Unidad	2 unidades	\$ 1,1
Consumo energético	\$0,09 / 1kWh	12	\$ 1,12
TOTAL			\$540,38

*Los productos marcados no fueron adquiridos para el presente proyecto. Los precios fueron estimados usando como referencia cotizaciones de proveedores locales.

Los costos de las perfusiones placentarias pueden ascender en gran medida ya que algunos gastos han sido cubiertos gracias al convenio entre directivos del HAP y el Laboratorio para Investigaciones Biomédicas. Entre dichos gastos se encuentran: el uso de una sala exclusiva para el tratamiento de placentas, las horas de mano de obra del personal médico, el uso de bombas de infusión, equipos quirúrgicos, material estéril, servicios de limpieza y desecho de restos de tejido. La valoración de estos gastos estimadas para la propuesta del estudio se estimó en \$3000.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

El desarrollo de un estudio prospectivo, implementando sistemáticamente pruebas de las fases de obtención, transporte, enjuague, canulación y lavado de placentas permite la revisión de los pasos del diseño experimental, la definición de los materiales de cateterismo y la identificación oportuna de problemas del diseño mecánico de soporte.

Se logró realizar las fases previas al experimento de perfusión en 7 placentas humanas, en donde el procedimiento de canulación se considera como una fase crítica por el bajo porcentaje de placentas canuladas con éxito, según el criterio de integridad del flujo fetal. Una estandarización de los procedimientos, materiales y diseño del mecanismo físico de soporte favorecen al cumplimiento de las fases previas al experimento de perfusión placentaria *ex vivo*.

El baño de los lóbulos placentarios, durante y después de la fase de transporte, ayudó a remover del contenido excesivo de sangre alojado en las lagunas de los espacios intervellosos, facilitando a su vez la manipulación del tejido y la identificación de fugas durante las fases canulación y de lavado.

La implementación de una fase de enjuague por medio de las arterias umbilicales utilizando una bomba de flujo peristáltico ayuda a prevenir la entrada de burbujas de aire al sistema, que según la literatura, puede causar daños en la integridad del tejido y los vasos sanguíneos.

Con los resultados preliminares del presente proyecto se ha logrado identificar la viabilidad de cotiledones placentario durante las fases críticas para el sistema *ex vivo* de perfusión y abordar las limitaciones de utilizar placentas humanas con el diseño de un sistema de soporte artificial.

La colaboración multi-disciplinaria contribuye al desarrollo de un prototipo con componentes biocompatibles, eficiente y que permita un control integral durante la simulación de las variables fisiológicas en la interfaz materno-fetal.

4.2 RECOMENDACIONES

Con los resultados preliminares del presente estudio se ha logrado identificar la viabilidad de cotiledones placentario durante las fases críticas para el sistema *ex vivo* de perfusión y abordar las limitaciones presentadas durante el diseño, e implementación del sistema de soporte artificial.

La continuación de los estudios en las fases de experimentación con el sistema de soporte construido podría dar más indicios de la viabilidad para la evaluación de la transferencia de nanoanticuerpos neutralizantes contra el virus de Zika.

El desarrollo de estudios aplicando el sistema de perfusión *ex vivo* es un proceso costoso, laborioso, que, aunque ha sido ampliamente implementado en varios grupos de investigación en el mundo, no tiene procedimientos, sustancias y materiales totalmente estandarizados. Por lo tanto, se considera necesaria la validación de protocolos y comparación de resultados.

Se recomienda continuar con las siguientes fases de proceso de perfusión, de modo que la viabilidad celular, y la comprobación de la transferencia trans-placentaria permita validar el funcionamiento del sistema diseñado. Se considera como una prioridad el financiamiento y disposición de novedosas terapias antivirales contra Zika, que permitan aprovechar las placentas humanas y los resultados tengan una mayor relevancia para el desarrollo hacia fases clínicas.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] C. Charlier, M.-C. Beaudoin, T. Couderc, O. Lortholary y L. Marc, «Arboviruses and pregnancy: maternal, fetal, and neonatal effects,» *Lancet Child Adolesc Health*, p. 1: 134–46, 2017.
- [2] J. Alvarado, Á. Idrovo, G. Contreras, G. Rodríguez, A. Rodríguez, T. Audcent, A. Mogollon y A. Paniz, «Congenital microcephaly: A diagnostic challenge during Zika epidemics,» *Travel Medicine and Infectious Disease*, p. (Accepted manuscript), 2018.
- [3] G. Acuña y C. Perret, «¿En qué consiste la infección humana por Virus Zika?,» *Revista Médica de Chile*, pp. 144: 1322-1325, 2013.
- [4] N. King, M. Teixeira y S. Mahalingam, «Zika Virus: Mechanisms of infection during pregnancy,» *Trends in Microbiology*, pp. Vol. 25, No. 9. 701-702, 2017.
- [5] M. Sheridan, D. Yunusov, V. Balaraman, A. Alexenco, S. Yabe, S. Verjovski, D. Schuts, A. Franz, Y. Sadovsky, T. Ezashi y M. Roberts, «Vulnerability of primitive human placental trophoblast to Zika virus,» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, pp. 114 (9) E1587-E1596, 2017.
- [6] J. Adibi, Y. Zhao, A. Cartus, P. Gupta y L. Davidson, «Placental Mechanics in the Zika-Microcephaly Relationship,» *Cell Host and Microbe* 20, pp. 9-11, 2016.
- [7] G. Poland, R. Kennedy, I. Ovsyannikova, R. Palacios, P. Lee y J. Kalil, «Development of vaccines against Zika virus,» *The Lancet Infectious Diseases. Published Online*, pp. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30063-X, 2018.
- [8] H.-H. Lin, B.-S. Yip, L.-M. Huang y S.-C. Wu, «Zika virus structural biology and progress in vaccine development,» *Biotechnology Advances*, pp. 47-53, 2018.
- [9] S. Muyldermans, «Nanobodies: Single domain antibodies,» *Annual Review of Biochemistry*, p. 82:775–97, 2013.
- [10] C. Siontorou, «Nanobodies as novel agents for disease diagnosis and therapy,» *International Journal of Nanomedicine*, p. 4215–4227, 2015.
- [11] A. Desmyter, S. Spinelli, A. Roussel y C. Cambillau, «Camelid nanobodies: killing two birds with one stone,» *Current Opinion in Structural Biology*, pp. 32: 1 - 8, 2015.
- [12] L. Dai, J. Song, X. Lu, C.-F. Qin, J. Qi y G. Gao, «Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody,» *Cell Host & Microbe*, pp. 19: 1 - 9, 2016.
- [13] A. Martinot, P. Abbink, O. Afacan, A. Prohl, R. Bronson, J. Hecht, E. Borducchi, R. Larocca, R. Peterson, W. Rinaldi, M. Ferguson, P. Didier, D. Weiss, M. Lewis, R. De La Barrera, E. Yang, S.

- Warfield y D. Barouch, «Fetal Neuropathology in Zika Virus-Infected Pregnant Female Rhesus Monkeys,» *Cell*, p. 173: 1111–1122, 2018.
- [14] P. Myllynen y K. Vähäkangas, «Placental transfer and metabolism: An overview of the experimental models utilizing human placental tissue,» *Toxicology in Vitro*, p. 507–512, 2013.
- [15] S. Conings, F. Amant, P. Annaert y K. Van Calsteren, «Integration and validation of the *ex vivo* human placenta perfusion model,» *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, pp. 25-31, 2017.
- [16] V. Karttunen, H. Sahlman, J. Repo, C. Woo, K. Myöhänen, P. Myllynen y K. Vähäkangas, «Criteria and challenges of the human placental perfusion – Data from a large series of perfusions,» *Toxicology in Vitro*, p. 1482–1491, 2015.
- [17] S. Grafmüller, P. Manser, H. Krug, P. Wick y U. von Mandach, «Determination of the Transport Rate of Xenobiotics and Nanomaterials Across the Placenta using the *ex vivo* Human Placental Perfusion Model,» *Journal of Visualized Experiments*, p. DOI: 10.3791/50401, 2013.
- [18] J. Miner y M. Diamond, «Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism,» *Cell Host & Microbe*, pp. 134-142, 2017.
- [19] A. Bayer, N. Lennemann, Y. Ouyang, J. Bramley, S. Morosky, E. Torres de A, S. Cherry, Y. Sadovsky y C. Coyne, «Type III Interferons produced by human placental trophoblasts confer protection against Zika virus infection,» *Cell Host and Microbe*, pp. 1-8, 2016.
- [20] A. Malek, «*Ex vivo* human placenta models: transport of immunoglobulin G and its subclasses,» *Vaccine*, p. 3362–3364, 2003.
- [21] WHO, «WHO Vaccine Pipeline Tracker,» 09 Julio 2018. [En línea]. Available: http://www.who.int/immunization/research/vaccine_pipeline_tracker_spreadsheet/en/.
- [22] M. Petitt, T. Tabata, H. Puerta y E. Harris, «Zika virus infection of first-trimester human placentas: utility of an explant model of replication to evaluate correlates of immune protection *ex vivo*,» *Current opinion in Virology*, p. 27:48–56, 2017.
- [23] P. Myllynen, L. Mathiesen, M. Weimer, K. Annola, E. Immonen, V. Karttunen, M. Kummu, T. Mørck, J. Nielsen, L. Knudsen y K. Vähäkangas, «Preliminary interlaboratory comparison of the *ex vivo* dual human placental perfusion system,» *Reproductive Toxicology*, p. 94–102, 2010.
- [24] C. Vinot, L. Gavard, J. Tréluyer, S. Manceau, E. Courbon, J. Scherrmann, X. Declèves, D. Duro, G. Peytavin, L. Mandelbrot y C. Giraud, «Placental transfer of maraviroc in an *ex vivo* human cotyledon perfusion model and influence of ABC transporter expression,» *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 57, nº 3, p. p. 1415–1420, 2013.

- [25] L. Mathiesen, T. Mose, T. Mørck, J. Nielsen, L. Nielsen, L. Maroun, M. Dziegiel, L. Larsen y L. Knudsen, «Quality assessment of a placental perfusion protocol,» *Reproductive Toxicology*, pp. 138-146, 2010.
- [26] H. Schneider, M. Panigel y J. Dancis, «Transfer across the perfused human placenta of antipyrine, sodium and leucine,» *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, pp. pp: 822-828 , 1972.
- [27] J. Escalante y F. Del Río, «Preservación de órganos,» *Medicina intesiva*, pp. 282-292, 2009.
- [28] J. Escalante y F. Gallegos, «Preservación de órganos,» *Medicina intensiva*, pp. 282-292, 2009.

ANEXOS

ANEXO A. Protocolo del experimento

Obtención y transporte de placentas:

1. Inmediatamente luego de la extracción (c-section) o expulsión de la placenta (parto vaginal), esta es pesada.
2. Se inspecciona que no existan rupturas. El control visual de los cotiledones es un paso crítico. *Las rupturas en el tejido pueden significar fugas entre la circulación materna y fetal.*
3. Enjuagar con 20-40 mL de Krebs Ringer Buffer (*suplementado con heparina y glucosa, temperatura ambiente*) inyectando el buffer por las dos arterias del cordón umbilical. *El lavado de los glóbulos rojos del espacio intervilloso, arterias y venas ayuda a prevenir adhesión de sustancias durante la perfusión.*
4. Preparar una hielera con suficiente volumen de Krebs Ringer Buffer como para sumergir la superficie materna y gentilmente masajear lóbulo placentario bañándolo en el medio y enjuagando los restos de sangre. *El tiempo máximo de transportación es de 30 minutos a partir del alumbramiento*

Aislamiento y Canulación de los cotiledones:

1. Realizar una nueva inspección macroscópica del lado materno removiendo la membrana amniótica.
2. Localizar desde el lado fetal un cotiledón en el margen de la placenta sin rupturas visibles.
3. Atar con doble nudo la vena y arteria periféricas asociadas al cotiledón seleccionado, aislándolas con sutura de seda (USP 2-0, tamaño 3. Atramat).
4. Aplicar una sutura alrededor de la arteria fetal, sin atar inmediatamente, sujetar el vaso con fórceps e introducir la cánula de menor diámetro. Se utiliza una sonda Nelaton de cateterismo uretral #6 (MEDEX, Meditec S.A.). Luego se sutura con doble nudo.
5. Realizar el mismo procedimiento con la vena, utilizando una cánula Nelaton de cateterismo uretral #10 (MEDEX, Meditec S.A.).
6. Se utiliza una llave de tres vías con (Manifold 3way stopcock) previamente purgadas para conectar a las cánulas fetal y arterial.
7. Encender la bomba de minipulso inicialmente de 2 mL/min (120 mL/h). En caso de que no haya fugas incrementar el flujo a 4 mL/min (240 mL/h). La presión en la arteria fetal no debe exceder los 70mm Hg.

8. Revisar existencia de fugas, en tal caso, se fija las cánulas con otra sutura de seda (USP 2-0, tamaño 3. Atramat).
9. Colocar la placenta en el anillo de perfusión con el fijador del tejido, procurando mantener el cotiledón aislado en el centro del anillo, con la cara fetal en la misma dirección de las puntas de los tornillos. Cuidadosamente empujar el tejido sobre las puntas metálicas. Se puede utilizar apósitos transparentes (Tegaderm) para mantener las cánulas estables.
10. Estabilizar el tejido con una membrana de silicona o láminas de Parafilm y fijar con los pernos el anillo de perfusión complementario.
11. Voltar los anillos de perfusión con el tejido y fijarlo en el armazón de acero asegurándose que el lado materno se muestre hacia arriba. Las cánulas del lado fetal deben estar sujetas pero no muy presionadas.

Circuito materno

1. Asegurarse de que todo el sistema arterial materno haya sido purgado y fijar el flujo en 12 mL/min.
2. Se establece la circulación materna insertando entre dos a cinco cánulas de infusión en el espacio intervelloso. Evitar penetrar los vasos fetales en el proceso.
3. Introducir los (2-4) catéteres de infusión de punta roma en la decidua basal intentando distribuirlos en un solo cotiledón.
4. Establecer el conducto venoso materno con una sonda de cateterismo uretral ubicada en la parte más inferior alrededor del tejido y drenar los primeros 50 mL del perfusato que es exudado en los espacios intervellosos.

Fase de Lavado.

5. Las bombas de infusión han sido establecidas con un flujo de 4 mL/min y 12 mL/min, se mide el flujo de salida venosa fetal, en caso de ser 4mL/min se da paso al período de lavado.
6. Se utiliza el medio 2 (KRB, 37 °C, O₂,Co₂, Heparina, Glucosa). Los cuales han sido previamente calentados, pH ajustado (7.2 – 7.4) suministrados con la mezcla de gases diferenciada para el circuito materno y fetal.
7. Se inicia el período de lavado por 20 minutos.

Inicio de la perfusión

1. Una vez concluida la pre-fase de 20 minutos el medio es reemplazado por el Medio 3 (tabla x), usando 250 mL en los dos reservorios.

ANEXO B. Hoja de seguimiento de la perfusión

Médico a cargo:	
Fecha y Hora:	

Condiciones de la Placenta	
Peso del recipiente + Contenido de Buffer =	
Peso de recipiente con Placenta =	
Peso de la Placenta =	
Presenta calcificaciones:	
Presenta rupturas visibles:	

Fase de Transporte y Lavado	
Hora de llegada a sala de perfusión:	
Hora de inicio del enjuague y lavado:	
Volumen utilizado en lavado:	
Volumen KRB inyectado en arterias umbilicales:	
Se observó burbujas de aire durante el enjuague:	SI
	NO

Canulación e inicio de pre-fase fetal		
Cotiledón en parte periférica, íntegro	SI	Hora de inicio canulación:
	NO	
Se identificó ramas arterial y venosa asociadas a un solo cotiledón:	SI	
	NO	
Hora de finalización de la canulación:		
Se purgó las vías y manifolds:	SI	
	NO	

Prueba del circuito fetal				
			Hora inicio:	Hora fin:
Flujo inicial = 2				
Hay rupturas visibles u oclusión		SI		
		NO		
Flujo = 4				
Presión menor a 70 mmHg		SI		
		NO		
Se observaron fugas		SI	Suturar.	
		NO		

Inicio circuito materno				
			Hora inicio:	Hora fin:
Flujo inicial = 12				
Se purgó catéteres, vías y manifold		SI		
		NO		
Drenaje de Buffer exudado		Volumen =	mL	
Un solo cotiledón coloración blanca		SI		
		NO		

Fase de Lavado 20 min					
Flujo materno = 12			Flujo fetal = 4		
Hora de inicio:					
Se mide el flujo de salida fetal Flujo fetal = 4		SI			
		NO			
Medio 2 Krebs Ringer Buffer + Heparina +Glucosa	Temp.		Materno		O2
	pH				N2
	Temp		Fetal		CO2
	pH				N2
Hora de finalización					

ANEXO C. Literatura consultada para desarrollo del protocolo experimental

Año de Publicación	Autor(es)	Título de publicación	Inclusión de placentar	Porcentaje de éxito en las perfusiones	N
2017	Conings et al.	Integración y validación del modelo de perfusión de placenta humana <i>ex vivo</i> .	37-41 semanas	38%	89
2015	Karttunen et al.	Criterios y desafíos de la perfusión de placenta humana: datos de una serie de numerosas perfusiones.	A Término de embarazo	54%	222
2013	Grafmüller et al.	Determinación de la tasa de transporte de xenobióticos y nanomateriales a través de la placenta usando el modelo de perfusión de placenta humana <i>ex vivo</i> .	A Término de embarazo	20%	
2013	Vinot et al	Transferencia placentaria de Maraviroc en un modelo <i>ex vivo</i> de perfusión de cotiledón humano y la influencia de la expresión de transportadores ABC.	38-42 semanas	Todas validadas (AP)	16 10(M-F) 6(F-M)
2010	Mathiesen et al.	Evaluación de la calidad de un protocolo de perfusión placentaria	A Término de embarazo	15%	202
2010	Myllynen et al.	Comparación preliminar entre laboratorios del sistema dual de perfusión placentaria humana entre laboratorios.			

ANEXO D. Preparación y elección de medios buffer

	Composición básica	Suplemento	Mezcla de Gases	Temperatura	Uso
Medio 1	Krebs Ringer Buffer	Glucosa (2.61 g/L) Heparina (25000 UI/L)		Temperatura ambiente	Enjuague al momento del alumbramiento
Medio 2	Krebs Ringer Buffer	Glucosa (2.61 g/L) Heparina (25000 UI/L)	95% O ₂ 5% CO ₂ 95% N ₂ 5% CO ₂	37°C	Fase de lavado en circuito materno y fetal
Medio 3	Hank's Balanced Salt Solution	Glucosa (1.6 g/L) Heparina (25000 UI/L) L-glutamina (1%) Pen-Strep (1%) BSA (30 mg/mL)	95% O ₂ 5% CO ₂ 95% N ₂ 5% CO ₂	37°C	Estabilización y medio experimental en circuito materno y fetal

Sustancia		Concentración	Gases reservorio materno	Gases reservorio fetal
Bicarbonato de Sodio	NaHCO ₃	2.52	95% O ₂ 5% CO ₂ Bubujeo por 15min. Hasta alcanzar pH 7.2 – 7.4	95% N ₂ 5% CO ₂ Bubujeo por 15min. Hasta alcanzar pH 7.2 – 7.4
Cloruro de Sodio	NaCl	8.30		
Cloruro de Potasio	KCl	0.42		
Fosfato monopotásico	KH ₂ PO ₄	0.19		
Sulfato de Magnesio	MgSO ₄	0.35		
Cloruro de Calcio	CaCl ₂	0.44		
Glucosa		2.61		
Heparina		25000		

Medio experimental					
	Suplemento			Gases reservorio materno	Gases reservorio fetal
Hank's Balanced Salt Solution	Penicilina- Streptomycina		1%	95% O ₂ 5% CO ₂ Burbujeo por 15min. Hasta alcanzar pH 7.2 – 7.4	95% N ₂ 5% CO ₂ Burbujeo por 15min. Hasta alcanzar pH 7.2 – 7.4
	Albúmina de suero bovino	BSA	40 Fetal 30 Materno		
	L-glutamina		1%		
	Glucosa		1.60		
	Heparina		25000		

	EBSS		31600-DMEM, powder		11995-DMEM	
	Sustancia	Concentración	Sustancia	Concentración	Sustancia	Concentración
Sales inorgánicas	Calcium Chloride (CaCl ₂) (anhyd.)	0.2	Calcium Chloride (CaCl ₂) (anhyd.)	0.2	Calcium Chloride (CaCl ₂) (anhyd.)	0.2
			Ferric Nitrate (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	0.0001	Ferric Nitrate (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	0.0001
	Magnesium Sulfate (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0.2	Magnesium Sulfate (MgSO ₄) (anhyd.)	0.09767	Magnesium Sulfate (MgSO ₄) (anhyd.)	0.09767
	Potassium Chloride (KCl)	0.4	Potassium Chloride (KCl)	0.4	Potassium Chloride (KCl)	0.4
	Sodium Chloride (NaCl)	6.8	Sodium Chloride (NaCl)	6.4	Sodium Chloride (NaCl)	6.4
	Sodium Phosphate monobasic (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	0.14	Sodium Phosphate monobasic (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	0.125	Sodium Phosphate monobasic (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	0.125
	Sodium Bicarbonate (NaHCO ₃)	2.2			Sodium Bicarbonate (NaHCO ₃)	3.7
	Sustancia	Concentración	Sustancia	Concentración	Sustancia	Concentración
D-Glucose (Dextrose)	1.0	D-Glucose (Dextrose)	1.0	D-Glucose (Dextrose)	4.5	
Phenol Red	0.01	Phenol Red	0.015	Phenol Red	0.015	
L-Glutamine	0.720	L-Glutamine	0.584	L-Glutamine	0.584	