

## ORIGINALES

# Influencia de la edad gestacional en la contractilidad de los vasos coriónicos humanos *in vitro*

A. Abad, L. Estañá, F.J. Morales Olivas<sup>a</sup> y V. Serra

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología. <sup>a</sup>Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad de Valencia. Valencia. España.

## SUMMARY

Human placental vessels lack autonomic nervous system, and thus vascular resistance must be controlled by humoral factors and also autocrine and paracrine mechanisms.

These factors may vary at different stages of pregnancy, thus, the response of the placental vessels may be different depending on gestational age. Various substances originating in the foetus, the mother or the umbilical cord are known, which may affect the foetal-placental tone in a direct or indirect manner.

We investigate if it is gestational age which modifies *in vitro* response of the placental vessels, or a vasoconstrictor such as potassium chloride.

## INTRODUCCIÓN

Los vasos placentarios humanos carecen de inervación autónoma<sup>1</sup>. Por tanto, la resistencia vascular debe ser controlada por factores humorales y mecanismos autocrinos o paracrinos.

Se han detectado diversas sustancias que, originadas en el feto, la madre o en el cordón umbilical, pueden afectar el tono vascular feto-placentario de forma directa o indirecta. Durante las gestaciones normales, las influencias vasodilatadoras son las dominantes. Sin embargo, en algunos procesos patológicos, como en la preeclampsia, existen alteraciones en el balance entre estímulos vasopresores y vasodilatadores que pueden contribuir al aumento de resistencias y a la disminución del flujo placentario<sup>2</sup>.

La placenta humana, en condiciones normales, actúa sobre muchas de estas sustancias modificando su actividad; la placenta protege al feto y a los vasos umbilicales

de las acciones de agentes vasoconstrictores muy potentes, como la serotonina y la histamina, mientras que no actúa o incluso incrementa las acciones de otros<sup>3</sup>.

El desarrollo adecuado del feto depende en gran medida del mantenimiento de un flujo adecuado. Los aportes al feto de las sustancias más esenciales, incluyendo el oxígeno, están más limitados por el aporte sanguíneo que por la difusión y el transporte placentarios. Los cambios de PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub> y pH pueden afectar al flujo umbilicoplacentario<sup>4</sup>. La concentración de serotonina en la circulación placentaria y en la sangre materna aumenta al final de la gestación hasta el momento del parto<sup>5</sup>, y se ha sugerido su importancia a la hora del cierre de los vasos umbilicales en el momento del nacimiento<sup>6</sup>.

Investigamos si la edad gestacional modifica la respuesta vascular *in vitro* de los vasos placentarios a un agente vasoconstrictor como el cloruro potásico (ClK).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Los vasos coriónicos superficiales (arterias y venas), de aproximadamente 2 mm de diámetro, fueron meticulosamente disecados del tercio externo de la superficie coriónica placentaria. Diferenciamos las arterias de las venas mediante la inyección de un colorante inerte en las arterias umbilicales, lo cual nos permitió facilitar la disección de los vasos. Estos vasos aislados fueron inmediatamente sumergidos en solución de Krebs-Henseleit a 4 °C y transportados al laboratorio en un recipiente hermético. Las piezas obtenidas se depositaron en una placa de Petri con solución de Krebs-Henseleit (ClNa 117,9 mmol/l; ClK 4,75 mmol/l; Cl<sub>2</sub>Ca 2,53 mmol/l; SO<sub>4</sub>Mg 2,8 mmol/l; PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K 1,25 mmol/l; CO<sub>2</sub>HNa 24,9 mmol/l, y glucosa 5,5 mmol/l) a temperatura ambiente. Obtuvimos anillos de aproximadamente 3 mm de longitud, que fueron introducidos en un baño de órganos con una

Aceptado para su publicación el 22 de abril de 2002.

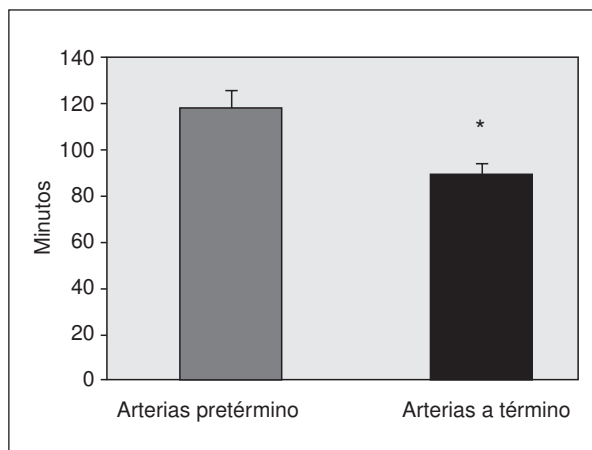


Fig. 1. Tiempo de estabilización en arterias pretérmino y a término.

solución de Krebs-Henseleit a 37 °C, la cual fue continuamente aireada con carbógeno (un 95% O<sub>2</sub> y un 5% CO<sub>2</sub>). El pH de la solución fue constantemente 7,4.

Los anillos vasculares fueron conectados a transductores isométricos (Dynamometer UF1), acoplados a un sistema de registro informatizado (Panlab Datasystem 60031).

En estas condiciones experimentales, se deja la preparación en reposo durante el tiempo necesario para conseguir un registro estable de motilidad espontánea regular y se someten las preparaciones a una tensión inicial de 4 g para las arterias coriónicas y de 3 g para las venas coriónicas, por ser estas tensiones las óptimas para investigar la respuesta contráctil al CIK, tal y como establecimos en experimentos previos llevados a cabo por nuestro grupo<sup>7</sup>. Posteriormente, y tras un tiempo óptimo de estabilización<sup>8</sup>, se estudia la respuesta contráctil al CIK a dosis crecientes: 5, 10, 20, 40, 80 y 120 mmol/l.

En las diferentes experiencias hemos comprobado la integridad del endotelio vascular de nuestras preparaciones mediante la técnica de Caplan<sup>9</sup>, con el fin de evitar modificaciones en las respuestas observadas como consecuencia de la destrucción del mismo durante la manipulación de los especímenes vasculares.

Utilizamos 5 anillos vasculares venosos y 5 anillos arteriales en cada grupo. En este experimento se utilizaron 20 anillos vasculares: 5 arterias de partos vaginales, 5 venas de partos vaginales, 5 arterias de partos pretérmino y 5 venas de partos pretérmino. Se descharon 2 arterias de partos vaginales, una arteria de parto pretérmino y 2 venas de parto pretérmino por ausencia de vitalidad.

La edad de las pacientes fue de 31 ± 3 años en las gestantes con partos pretérmino y de 30 ± 3 años en las gestantes con partos normales. La edad gestacional fue de 33 ± 3 semanas en gestaciones pretérmino y 39 ± 4 semanas en gestaciones a término.

Evaluamos la influencia de la prematuridad en la respuesta vascular placentaria, comparando la respuesta de estos vasos frente a la de los vasos de gestaciones a término sin enfermedad. Para ello, obtuvimos vasos coriónicos arteriales y venosos procedentes de gestaciones pretérmino, todas ellas menores de 35 semanas.

Los resultados de los datos categóricos se expresan como n (%). La descripción de los datos continuos se efectuó en función de la distribución de dichos datos.

La distribución normal de los datos continuos se confirmó usando el test de normalidad de Ryan-Joiner (equivalente al test de Shapiro-Wilk).

Los análisis estadísticos de significación de diferencias se realizaron utilizando tests paramétricos: t de Student bilateral o análisis de la variancia de unilateral cuando fue apropiado. Los datos categóricos se compararon utilizando un análisis de la  $\chi^2$  y el test exacto de Fisher, cuando éstos eran apropiados. Se consideró como significativo un valor de  $p < 0,05$ .

Sobre el registro isométrico de la respuesta de arterias y venas coriónicas se analizan los siguientes parámetros:

- Medida de la respuesta contráctil para cada concentración de CIK a diferentes tensiones iniciales y expresión de ésta en mg-fuerza.
- Medida de la dosis eficaz 50% (DE50) –concentración de contracturante (CIK) con la que se obtiene el 50% del efecto máximo– mediante método gráfico para cada experiencia.

## RESULTADOS

Encontramos diferencias significativas con un tiempo de estabilización mayor en los vasos procedentes de partos pretérmino, tanto en arterias (88 ± 11 min a término frente a 118 ± 13 min en pretérmino;  $n = 5$ ;  $p < 0,006$ ) (fig. 1) como en venas (85 ± 8,66 min a término frente a 116 ± 5,48 min pretérmino;  $n = 5$ ;  $p < 0,0005$ ) (fig. 2).

La respuesta contráctil máxima en gestaciones normales se alcanzó con 80 mmol/l de CIK en arterias (2,17 ± 0,18 g) y en venas (2,4 ± 0,3 g;  $p = \text{NS}$ ).

En gestaciones pretérmino, el efecto máximo también se alcanzó con 80 mmol/l en arterias (1,02 ± 0,03 g) y en venas (1,05 ± 0,05 g;  $p = \text{NS}$ ).

No encontramos diferencias significativas entre los vasos arteriales y los venosos en la respuesta a concentraciones más elevadas de CIK.

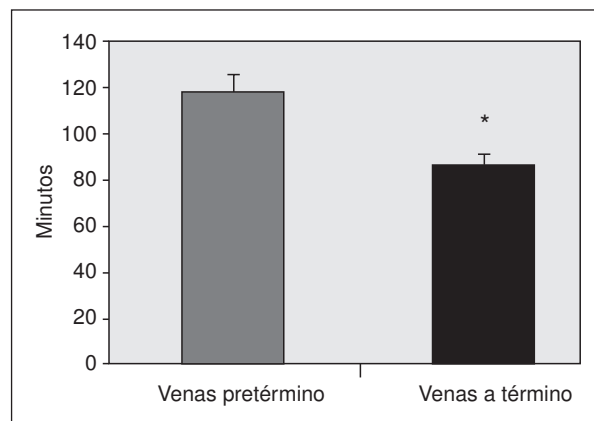


Fig. 2. Tiempo de estabilización en venas pretérmino y a término.

La dosis eficaz 50 (DE50) en gestaciones normales fue de  $13,9 \pm 1,6$  mmol/l en arterias y  $23 \pm 1,8$  mmol/l en venas, y la diferencia entre arterias y venas fue significativa ( $p < 0,007$ ).

En gestaciones pretérmino, la DE50 fue de  $26,2 \pm 2,6$  mmol/l en arterias y de  $25 \pm 0,04$  mmol/l en venas ( $p = \text{NS}$ ).

Encontramos diferencias en la respuesta de las arterias procedentes de vasos a término ( $2,17 \pm 0,18$  g) frente a arterias de partos pretérmino ( $1,02 \pm 0,03$  g) en la dosis de máxima respuesta (80 mmol/l;  $p < 0,05$ ) (fig. 3).

Hallamos diferencias significativas en la DE50 de arterias a término ( $13,9 \pm 1,6$  mmol/l) frente a la de partos pretérmino ( $26 \pm 1,3$  mmol/l;  $p < 0,005$ ).

Encontramos diferencias significativas en la respuesta de las venas procedentes de partos a término ( $2,4 \pm 0,3$  g) frente a las venas de partos pretérmino ( $1,05 \pm 0,06$  g) en la dosis de máxima respuesta (80 mmol/l) (fig. 4).

No encontramos diferencias significativas en la DE50 de venas a término ( $23 \pm 0,18$  mmol/l) frente a la de partos pretérmino ( $25 \pm 0,84$  mmol/l).

La DE50 fue de  $26 \pm 1,26$  mmol/l en arterias y de  $25 \pm 0,84$  mmol/l en venas ( $p = \text{NS}$ ).

## DISCUSIÓN

Se ha descrito una respuesta significativamente menor de los vasos umbilicales pretérmino al CIK<sup>10</sup>, en concordancia con nuestros resultados. No existen estudios previos en vasos coriónicos humanos. Nuestras observaciones indican una respuesta menor de estos vasos en gestaciones pretérmino.

En el estudio de White<sup>10</sup>, los vasos umbilicales pretérmino se contraían más con angiotensina II y ácido

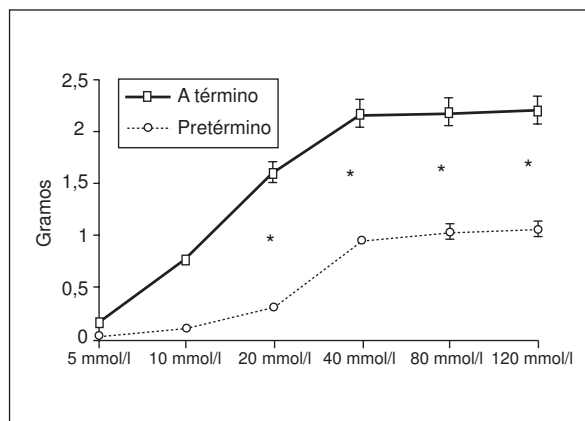


Fig. 3. Comparación de la respuesta de arterias a término y pretérmino. Los datos se expresan como media  $\pm$  EEM; \* $p < 0,05$ .

araquidónico y eran más sensibles a la oxitocina que los vasos umbilicales a término, siendo mayor la respuesta de los vasos a término a vasopresina, noradrenalina, prostaglandina  $D_2$  y prostaglandina  $E_2$  y similar en ambos grupos a bradicinina, histamina, acetilcolina y prostaglandina F2-alfa.

La serotonina produjo contracciones de gran intensidad y duración en los vasos umbilicales pretérmino, que persistieron durante más de 2 h y media, lo cual lleva a estos autores a postular que esta sustancia está relacionada con el cierre de la circulación extracorpórea que se produce en el momento del nacimiento<sup>10,11</sup>. A una concentración de serotonina de  $10^{-7}$  mmol/l se obtuvieron respuestas que fueron mayores que la contracción máxima inducida por el CIK, lo cual indica una gran potencia. La respuesta a concentraciones mayores de serotonina duró horas sin una disminución significativa y no se redujo con los lavados efectuados en el baño de órganos, lo cual indica una gran afinidad de la serotonina por los receptores de la pared vascular en vasos umbilicales procedentes de partos pretérmino.

White<sup>10</sup> sugiere que las células que rodean a los vasos en el cordón umbilical son las productoras de la serotonina necesaria para el cierre de los vasos en el momento del nacimiento. Estas células también liberan histamina, heparina y diversos tipos de prostaglandinas. La histamina también produce respuestas importantes en los vasos umbilicales, por lo que también podría estar implicada en el proceso del cierre de los vasos.

Por otra parte, se sabe que la vasorrelajación inducida por el óxido nítrico en los vasos umbilicales disminuye a medida que la gestación avanza<sup>12</sup>. Los vasos umbilicales tienen la capacidad de relajarse y aumentar el paso de oxígeno y nutrientes para el crecimiento fetal en los vasos pretérmino pero, a medida que la

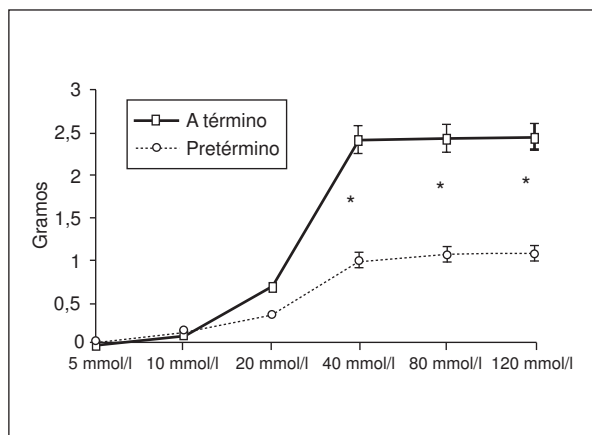


Fig. 4. Comparación de la respuesta venosa a término y pretérmino. Los datos se expresan como media  $\pm$  EEM; \* $p < 0,05$ .

gestación avanza, estos vasos han de estar preparados para una gran facilidad de contracción, ya que se deben cerrar justo tras el nacimiento.

Los vasos de gestaciones con retraso de crecimiento intrauterino (RCIU) o preeclampsia responden menos a los agentes vasodilatadores en etapas más tempranas de la gestación. Se ha observado una ausencia de respuesta al óxido nítrico en gestantes con RCIU en las arterias umbilicales entre las semanas 30 y 32<sup>12</sup>.

White<sup>10</sup> midió la respuesta de los vasos umbilicales ante incrementos de oxígeno para comprobar si podría tener importancia en el fenómeno de cierre vascular en el momento del nacimiento, observando una vasoconstricción moderada y de corta duración. Otros autores no han observado respuesta a aumentos en la  $\text{PaO}_2$ <sup>13</sup>.

Otra posibilidad para explicar el fenómeno de obliteración de los vasos umbilicales en el momento del nacimiento es que, durante la separación de la placenta, la hipoxia produzca vasoconstricción de los vasos umbilicales<sup>10,11</sup>. La hipoxia puede estimular la síntesis de prostanoïdes vasoconstrictores y producir vasoconstricción por sí misma. Según nuestra experiencia, la hipoxia aislada en gestaciones normales a término ocasiona vasoconstricción de los vasos coriônicos.

El estudio comparativo realizado por White<sup>10</sup> indica que los receptores vasculares a diferentes agentes maduran en diferentes etapas de la gestación. La menor intensidad de contracción observada en los vasos coriônicos pretérmino podría explicarse por una menor cantidad de masa muscular en los vasos en etapas tempranas de la gestación<sup>14</sup>.

## RESUMEN

Los vasos placentarios humanos carecen de inervación autónoma y, por lo tanto, la resistencia vascular debe ser controlada por factores humorales y mecanismos anteriores autocrinos o paracrinos.

Estos factores pueden variar en las diferentes etapas de la gestación; asimismo, la respuesta de los vasos placentarios puede ser diferente según la edad gestacional. Se conocen diversas sustancias que, originadas en el feto, la madre o el cordón umbilical, pueden afectar al tono vascular fetoplacentario de forma directa o indirecta.

Investigamos si la edad gestacional modifica la respuesta vascular *in vitro* de los vasos placentarios a un agente vasoconstrictor como el cloruro potásico (ClK).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Fox SB, Khong TY. Lack of innervation of human umbilical cord. An immunological and histochemical study. *Placenta* 1990;11:59-62.
2. Trudinger BJ, Connelly AJ, Giles WB, Hales JR, Wilcox GR. The effects of prostacyclin and thromboxane analogue (U46619) on the fetal circulation and umbilical flow velocity waveforms. *J Dev Physiol* 1989;11:179-84.
3. Walters WAW, Boura ALA. Regulation of fetal vascular tone in the human placenta. *Reprod Fertil Dev* 1991;3:475-81.
4. Templeton AGB, McGrath JC, Whittle MJ. The role of endogenous thromboxane in contractions to U46619, oxygen, 5-HT, and 5-CT in the human isolated umbilical artery. *Br J Pharmacol* 1991;103:1079-84.
5. Reviriego J, Fernández Alfonso MS, Marín J. Actions of vasoactive drugs on human placental vascular smooth muscle. *Gen Pharmacol* 1990;21:719-27.
6. Nair X, Dyer DC. Responses of guinea pig umbilical vasculature to vasoactive drugs. *Eur J Pharmacol* 1974;27:294-304.
7. Estañ L, Abad A, Morales Olivares FJ, Serra Serra V. Isolated human chorionic vascular reactivity: technical considerations for fresh preparations. *Gen Pharmacol* 1998;30:89-93.
8. Tulenko TN. Regional sensitivity to vasoactive polypeptides in the human umbilicoplacental vasculature. *Am J Obstet Gynecol* 1979;135:629-36.
9. Caplan BA, Schwartz CJ. Increased endothelial cell turnover in areas of *in vivo* Evans blue uptake in the pig aorta. *Atherosclerosis* 1973;17:401-17.
10. White RP. Pharmacodynamic study of maturation and closure of human umbilical arteries. *Am J Obstet Gynecol* 1989;160:229-37.
11. White RP. Comparison of vasorelaxants in human basilar arteries and umbilical arteries. *Eur J Pharmacol* 1988;160:229-37.
12. Izumi H, Garfield RD, Makino Y, Shirakawa K, Itoh T. Gestational changes in endothelium-dependent vasorelaxation in human umbilical artery. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170:236-45.
13. Bjoro K, Haugen G, Stray-Pedersen S. Altered prostanoïd formation in human umbilical vasculature in response to variations in oxygen tension. *Prostaglandins* 1987;34:377.
14. Bertrand C, Duperron L, St-Louis J. Umbilical and placental vessels: modifications of their mechanical properties in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1993;168:1537-46.

Abad A, et al. Influencia de la edad gestacional en la contractilidad de los vasos cori6nicos humanos *in vitro*