

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

REACTIVIDAD DE LAS ARTERIAS CORIONICAS FRENTE  
A FACTORES VASOACTIVOS DERIVADOS DEL  
ENDOTELIO

REGINA ALIAGA PARREÑO

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2005

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 20 de  
Diciembre de 2004 davant un tribunal format per:

- D. Esteban J. Morcillo Sánchez
- D. Vicente Serra Serra
- D. Ángel Luis García Villalón
- D<sup>a</sup>. Silvia Llorens Folgado
- D. Francisco J. Miranda Alonso

Va ser dirigida per:

D. Enrique Alborch Domínguez

D. Alfredo Perales Marín

©Copyright: Servei de Publicacions  
Regina Aliaga Parreño

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6119-9

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115



**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

**REACTIVIDAD DE LAS ARTERIAS  
CORIÓNICAS FRENTE A FACTORES  
VASOACTIVOS DERIVADOS DEL ENDOTELIO**

Memoria presentada por:

**Dña. Regina Aliaga Parreño**

Para optar al Grado de Doctor.

Valencia, Septiembre de 2004.

D. **ENRIQUE ALBORCH DOMÍNGUEZ**, Catedrático de Fisiología de la Universitat de València y Jefe de Sección en el Centro de Investigación del Hospital “La Fe” de Valencia; y D. **ALFREDO PERALES MARÍN**, Jefe del Servicio de Obstetricia del Hospital Maternal “La Fe” de Valencia y Profesor Asociado de Obstetricia y Ginecología de la Universitat de València,

CERTIFICAN:

Que Dña. **REGINA ALIAGA PARREÑO**, Facultativo Especialista en Ginecología y Obstetricia, ha realizado bajo nuestra dirección el presente trabajo experimental para la realización de su Tesis Doctoral: “**REACTIVIDAD DE LAS ARTERIAS CORIÓNICAS FRENTE A FACTORES VASOACTIVOS DERIVADOS DEL ENDOTELIO**”, en el Centro de Investigación del Hospital “La Fe” de Valencia.

Y para que así conste, expedimos el presente en Valencia, a 6 de Septiembre, 2004

Dr. Enrique Alborch

Dr. Alfredo Perales

## **Agradecimientos:**

El trabajo de investigación que he desarrollado no habría sido posible sin la participación y el apoyo de un grupo de personas con las que siempre estaré en deuda.

En primer lugar quiero dar las gracias a todo el equipo de la Unidad de Circulación Cerebral Experimental del Centro de Investigación del Hospital “La Fe” de Valencia, en cuyas instalaciones y de una manera desinteresada he podido realizar la presente Tesis, mi más sincero agradecimiento a todos ellos por su paciencia, apoyo y como no, su amistad, subrayo la colaboración del Dr. Joam Salom y en especial la del Dr. Germán Torregrosa y Xelo Burguete, sin su ayuda y aportación personal esta Tesis no estaría finalizada, sin olvidarme de Carmen Máñez, Fernando Pérez y Carmen Tirados.

A mis directores de Tesis, Dr. Enrique Alborch y Dr. Alfredo Perales, por orientarme y confiar que el trabajo llegaría a buen puerto.

A los compañeros de la Maternidad, por sobrellevar con paciencia mis llamadas de teléfono a altas horas de la noche para recordarles que necesitaba una placenta al día siguiente (todos ellos conocen casi mejor que yo los criterios de inclusión de las pacientes), gracias por vuestra colaboración.

Al Dr. Monleón, fue él quién, en cierto, modo me embarcó en esta investigación.

A mis amigos, por creer siempre que lograría finalizar la Tesis.

A mi familia, en especial a mis padres, por su ejemplo constante y su apoyo, es un privilegio compartir este trabajo con ellos.

Y al finalizar, un recuerdo para la Dra. M<sup>a</sup> Dolores Catalá, mi primera directora en el Departamento de Fisiología, *in memoriam*.

*A mis padres, con amor*

## **ABREVIATURAS:**

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>: concentración intracelular de calcio

5-HT: Serotonina

AA: Ácido araquidónico

ACh: Acetilcolina

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

ANOVA: Análisis de la varianza

ATP: Adenosín trifosfato

Ca<sup>2+</sup>: Ión Calcio

CE<sub>50</sub>: Concentración a la cual el efecto es la mitad del Efecto máximo

CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono

EDHF: Factor hiperpolarizante derivado del endotelio

EEM: Error estándar de la media

E<sub>máx</sub>: Efecto máximo

ET: Endotelina

GPMc: Guanosín monofosfato cíclico

HTA: Hipertensión arterial

L-NAME: N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina metilester clorhidrato

NO: Óxido nítrico

NOS: NO-sintetasa

NPS: Nitroprusiato sódico

O<sub>2</sub>: Oxígeno

PAP: Periodo activo de parto

PG: Prostaglandina

PGF: Factor de crecimiento placentario (Placental growth factor)

PGI<sub>2</sub>: Prostaciclina

RCIU: Retraso de crecimiento intrauterino

TNF: Factor de necrosis tumoral

TX: Tromboxano

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial (Vascular endotelial growth factor)

VIP: Péptido intestinal vasoactivo (Vasoactiv intestinal peptid)



# INDICE

## 1. INTRODUCCIÓN

1. 1. LA PLACENTA HUMANA: CONSIDERACIONES ANATÓMICAS.....	1
1. 2. FUNCIONES DE LA PLACENTA.....	4
1.2.1. Transporte	4
1.2.2. Síntesis	6
1. 3. MECANISMO GENERAL DE REGULACIÓN DEL TONO VASCULAR.....	9
1. 3. 1. El endotelio	9
1. 3. 2 El músculo liso vascular	14
1. 4. CIRCULACIÓN FETO-PLACENTARIA.....	17
1.4.1. Consideraciones anatómicas acerca del lecho placentario	17
1.4.2. Regulación de la circulación feto-placentaria	22
1.4.3. Factores endoteliales placentarios	28
1. 4. 3. 1. Sustancias vasodilatadoras	29
1. 4. 3. 2. Sustancias vasoconstrictoras	31
1.5. MECANISMOS VASCULARES EN LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL DURANTE LA PREECLAMPSIA.....	34

## 2. OBJETIVOS 37

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. 1. OBTENCIÓN DE LAS PLACENTAS.....	39
3. 2. OBTENCIÓN DE LAS ARTERIAS CORIONICA Y SU DISPOSICIÓN PARA EL REGISTRO DE TENSIÓN ISOMÉTRICA.....	40
3. 3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	44
3. 4. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES.....	45
3.4.1. Estudio de los parámetros obstétricos	45
3.4.2. Estudio de la respuesta vasoconstrictora de las arterias de la placa corial	47
3.4.3. Estudio de la respuesta vasodilatadora de las arterias de la placa corial	48

3. 5. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS .....	49
3. 6. FÁRMACOS Y SOLUCIONES.....	52

## 4. RESULTADOS

4. 1. DATOS CLÍNICO-OBSTÉTRICOS.....	55
4. 2. RESPUESTA DE LAS ARTERIAS CORIALES A ENDOTELINAS .....	57
4.2.1. Respuestas a ET-1 y ET-3	57
4.2.2. Respuesta a ET-1 tras incubación con L-NAME	59
4.2.3. Respuesta a ET-3 tras incubación con L-NAME	60
4.2.4. Respuesta a ET-1 en medio libre de Ca <sup>2+</sup>	63
4.2.5. Efecto de ET-1 en presencia del fármaco calcioantagonista, nicardipina	64
4. 3. RESPUESTA DE LAS ARTERIAS CORIALES A DISTINTOS VASODILATADORES.....	67
4.3.1. Agonistas endotelio-dependientes:ACh	67
4.3.2. Agonistas endotelio-independientes	68
4.3.2.1 Nitroprusiato Sódico	68
4.3.2.2 Adenosina	70
4.3.2.3 Nicardipina	72
4.3.2.4 Comparación entre los distintos vasodilatadores	74
4.4. ESTUDIOS DE CORRELACIÓN ENTRE LOS DATOS CLÍNICO-OBSTÉTRICOS Y LAS RESPUESTAS VASOMOTORAS DE LAS ARTERIAS CORIALES HUMANAS.....	77

## 5. DISCUSIÓN

5. 1. CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS .....	83
5. 2. ANÁLISIS DE LAS RESPUESTAS VASOCONSTRICTRAS DE LAS ARTERIAS DE LA PLACA CORIAL.....	85
5.2.1. Endotelina	85
5.2.2. Interrelación ET/NO	88
5.2.3. Participación del Ca <sup>2+</sup> en la respuesta a ET-1	90

5. 3. ESTUDIO DE LAS RESPUESTAS VASODILATADORAS DE LAS ARTERIAS DE LA PLACA CORIAL.....	92
5.3.1. Acetilcolina	96
5.3.2. NPS	99
5.3.3. Adenosina	102
5.3.4. Nicardipina	106
5. 4. CORRELACIÓN ENTRE REACTIVIDAD ARTERIAL Y DATOS CLÍNICO-OBSTÉTRICOS.....	108
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>111</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>113</b>

# **INTRODUCCION**

## **1.1. LA PLACENTA HUMANA: CONSIDERACIONES ANATÓMICAS**

La placenta es un órgano muy especializado característico de los mamíferos superiores. Tocólogos y fisiólogos han abordado su estudio con el fin de comprender los mecanismos básicos de su funcionamiento. Sin embargo, en humanos la información obtenida es escasa debido a las limitaciones éticas y legales que conllevan estos estudios.

La placenta humana desempeña funciones inmunológicas, nutritivas y endocrinas esenciales para el desarrollo del embarazo. Regula activamente todos los intercambios que se producen entre los compartimentos materno y fetal, desempeñando funciones similares a las que en el adulto realizan órganos especializados como el pulmón, el intestino, el riñón o el hígado.

Todo el oxígeno, agua y nutrientes esenciales para el desarrollo fetal pasan a través de ella desde la circulación materna. Simultáneamente y en sentido opuesto, la placenta exporta los productos del catabolismo fetal, excepto aquellos que pasan al líquido amniótico.

Para llevar a cabo todas las funciones mencionadas con eficacia se requiere un desarrollo gradual, tanto de la circulación fetal como de la materna, que satisfaga la

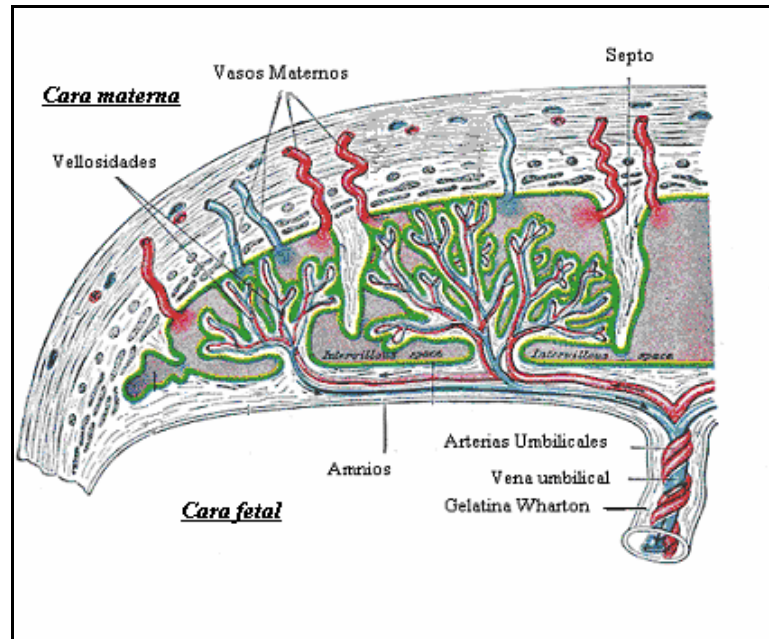
demanda creciente de nutrientes ocasionada por el crecimiento fetal y su metabolismo.

Cunningham y colaboradores, en su tratado de Obstetricia (1996), describen la placenta madura como un órgano con forma discoidal que tiene un diámetro aproximado de 15 a 20 cm, con un espesor de 1,5 a 2,5 cm y un peso medio de 500 g, que se extiende sobre una cuarta parte de la cavidad uterina.

La placenta presenta dos caras: una materna y otra fetal. Por la cara materna se une al útero. Si se examina después del parto, esta cara tiene un color rojizo y un aspecto sangrante, y en ella se comprueba la existencia de un número variable (10-38) de áreas convexas un poco elevadas que se denominan “lóbulos placentarios” o “cotiledones”. Estos lóbulos están separados de manera incompleta por surcos de profundidad variable que se denominan “tabiques placentarios” o “septos”.

La cara fetal, orientada hacia la cavidad amniótica, está tapizada por el “amnios”, una membrana delgada y lisa que permite reconocer los vasos sanguíneos que la recorren y que son continuación de los vasos del cordón umbilical, el cual se inserta en dicha cara. Al final del embarazo el cordón umbilical tiene una longitud media de 50 cm y un diámetro entre 1 y 1,5 cm. Contiene dos arterias y una vena que poseen

musculatura propia y se encuentran rodeadas por un tejido mesenquimatoso denominado “gelatina de Wharton”. La cubierta del cordón umbilical está formada por el “amnios”, que junto con la gelatina de Wharton protegen la circulación sanguínea por los vasos del cordón (Figura 1).



**Fig. 1:** Corte transversal de la placenta.

## 1.2. FUNCIONES DE LA PLACENTA

### 1.2.1. Transporte

Una de las funciones principales de la placenta es la de transferir oxígeno (O<sub>2</sub>) y una gran variedad de principios nutritivos desde la madre al feto y, al contrario, transportar dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y otros productos del metabolismo desde el feto a la madre.

La placenta presenta diversos tipos de transporte:

- a) *Difusión simple* para el agua y la mayoría de electrolitos (sodio, potasio, cloro, yodo, hierro, calcio...).
- b) *Difusión facilitada* para la glucosa.
- c) *Difusión lenta* para los lípidos.
- d) *Transporte activo* para cobre, fósforo, aminoácidos, tiamina, piridoxina, vitamina B<sub>12</sub>, riboflavina, vitamina C, vitamina A (previa transformación a caroteno), y vitaminas D, E y K en escasa cantidad.
- e) *Pinocitosis* para anticuerpos IgG.



El intercambio de sustancias entre la madre y el feto a través de la placenta viene regulado por diversos factores anatómicos, fisiológicos y bioquímicos, como son:

1. Presión hidrostática a ambos lados de la membrana.
2. Flujos sanguíneos placentarios fetal y materno.
3. Concentración de las diferentes sustancias a uno y otro lado de la membrana placentaria.
4. Metabolismo placentario, que afecta a la llegada de sustancias al feto, tanto cuantitativa como cualitativamente, de forma que el tamaño molecular de una sustancia tiene una importancia relativa para su transferencia. Por ejemplo, la placenta retiene para su consumo aproximadamente el 50% de la glucosa que llega hasta ella.

En cuanto a los gases, la placenta se constituye en el primer pulmón fetal, aunque su capacidad es menor que la de este órgano. El índice de difusión de gases por unidad de peso placentario es aproximadamente del 20% respecto la del pulmón. Una diferencia evidente es que el intercambio gaseoso en la placenta se produce entre dos fases líquidas:

sangre materna de la cámara hemática y sangre de los capilares vellositarios.

La sangre que penetra en el espacio intervelloso tiene una presión de O<sub>2</sub> superior a la que existe en la sangre de los capilares vellositarios, por lo que se establece un gradiente de presión parcial de O<sub>2</sub>. A medida que el O<sub>2</sub> disuelto en el plasma pasa desde el lado materno hacia el fetal, la hemoglobina va liberando dicho gas para mantener esa diferencia de presión. En consecuencia, tanto el O<sub>2</sub> como el de CO<sub>2</sub> atraviesan la barrera placentaria por un mecanismo de *difusión simple*. La sangre materna transfiere O<sub>2</sub> a la sangre fetal de los capilares vellositarios, al tiempo que el feto le traspasa CO<sub>2</sub> y otros metabolitos que originan un descenso transitorio de pH en la sangre del lecho materno (Hernández-García, 1997).

### 1.2.2. Síntesis

La placenta sintetiza una elevada cantidad de moléculas de las cuales ya en la década de los 80 se conocían un gran número (Osathanohoh y cols., 1984):

- *Hormonas*: gonadotrofina coriónica humana, lactógeno placentario humano, corticotropina coriónica humana, β-endorfina, tirotrófina coriónica

humana, hormona uterotrópica placentaria humana, hormona folículo-estimulante coriónica humana, esteroides, principalmente estriol, y también estradiol y estrona.

- *Factores de liberación y factor de crecimiento nervioso*: de la hormona luteinizante coriónica humana, de tirotrófina coriónica humana y de crecimiento nervioso humano.
- *Enzimas*: cistoaminopeptidasa u oxitocinasa, diaminoxidasa y fosfatasa alcalina termoestable.
- *Miscelánea*: proteínas plasmáticas asociadas al embarazo y somatostatina.

El desarrollo de nuevas técnicas ha permitido en estos últimos años un mejor aislamiento de sustancias que se asocian a la vasculogénesis y angiogénesis placentaria así como a la actividad contráctil de los vasos placentarios:

- *Factores de crecimiento*: factores de crecimiento endotelial vascular (“vascular endothelial growth factors”, VEGF) y factores de crecimiento placentario (“placental growth factors”, PGF), familias de factores de crecimiento vascular endotelial que son sintetizados por vellosidades trofoblásticas y por macrófagos maternos y fetales.

Los VEGF (A, B, C, D y E) tienen su acción principal en los procesos de angiogénesis. Los PGF actúan como mitógenos de células endoteliales; se relacionan niveles bajos de PGF con mayor probabilidad de preeclampsia.

- *Angiopoyetinas 1 y 2*, nueva familia de factores angiogénicos descubierta recientemente que parecen actuar como mediadores entre los pericitos y las células endoteliales. Parece ser que los pericitos son fundamentales en el mantenimiento de la estabilidad de los vasos y que las células endoteliales necesitan de su presencia para un crecimiento correcto (Charnock-Jones y Burton, 2000).
- *Otras*: citoquinas, enzimas como la ciclooxigenasa, péptidos vasoactivos como el péptido intestinal vasoactivo (“vasoactive intestinal peptide”, VIP), endotelinas (ET), eicosanoides - prostaglandinas (PG) y tromboxanos (TX) -, óxido nítrico (NO), adenosina y sistema renina-angiotensina (Ferré, 2001).

### **1.3. MECANISMO GENERAL DE REGULACIÓN DEL TONO VASCULAR**

El endotelio vascular y el músculo liso son los principales componentes de la pared vascular. Las paredes de los vasos contienen músculo liso cuyo estado contráctil se controla por mediadores liberados localmente en las terminaciones nerviosas, las células endoteliales y por hormonas circulantes. Así, mientras el músculo liso es el agente activo en la regulación del tono vascular, el endotelio juega un papel modulador.

#### **1.3.1. El endotelio**

El endotelio vascular está situado en una posición anatómica estratégica entre la sangre y la pared vascular que le permite actuar como receptor y transmisor de señales. No es, pues, una simple barrera mecánica. El endotelio se constituye como una fuente de numerosos y potentes mediadores químicos que controlan activamente la contracción del músculo liso subyacente, influyen en la función plaquetaria, promueven el crecimiento celular y participan en la respuesta inflamatoria así como en fenómenos inmunológicos.

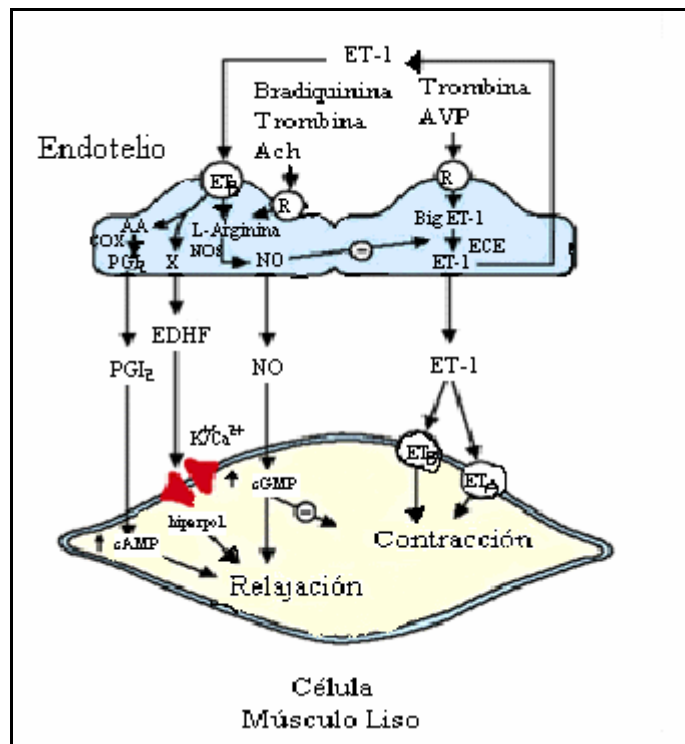
Las células endoteliales constituyen el elemento clave en la homeostasis vascular ya que son capaces de detectar cambios tanto mecánicos como humorales y realizar ajustes en el tono vascular o en la estructura de los vasos mediante la producción de diversas sustancias vasoactivas: PG, NO, ET, TXA<sub>2</sub>, factor VIII, productos de la membrana basal, activador del plasminógeno y sustancias anticoagulantes tipo heparina, VEGF, factor de crecimiento fibroblástico, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, activador del plasminógeno, inhibidor del plasminógeno, etc.

Entre los factores contráctiles derivados del endotelio se encuentra uno de los vasoconstrictores más potentes que se conocen, la ET, un polipéptido de 21 aminoácidos identificado por primera vez en cultivos de células endoteliales porcinas (Yanagisawa et al.,1988). El péptido original pasó a llamarse ET-1 cuando se descubrió la existencia de otros péptidos relacionados, la ET-2 y la ET-3 (Inoue et al., 1989). La ET-1 es la isoforma mas abundante, de origen fundamentalmente endotelial, aunque también se produce en el tejido epitelial y renal, en macrófagos humanos, en el hipotálamo, etc. (Yoshimoto et al., 1990; Masaki, 1995; Miyauchi y Masaki, 1999). Por otra parte, tanto la ET-1 como la ET-3 han sido identificadas en neuronas y en la glía, y también se ha observado

que las células musculares lisas de la pared vascular pueden producir ET-1, aunque en cantidades 100 veces menores que el endotelio (Cardell et al., 1994).

Existen al menos dos tipos de receptores de ET, los ET-A y ET-B. Los receptores ET-A son activados preferentemente por ET-1, se localizan en el músculo liso vascular, además de en el corazón, pulmón y riñón, pero no se encuentra en el endotelio. El receptor ET-B está presente principalmente en el cerebro, en menor medida en aorta, corazón, pulmón, riñón y suprarrenales, y en contraste con el receptor ET-A, se expresa notablemente en el endotelio, encontrándose también presente, al igual que el ET-A, en el músculo liso vascular. El receptor del endotelio se ha denominado ET-B<sub>1</sub>, mientras que el del músculo liso vascular se denomina ET-B<sub>2</sub>. Los agonistas que actúan sobre los receptores ET-B<sub>1</sub> producen vasodilatación al estimular la producción de NO y de prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) (Masaki, 1995). Así, la ET-1, actuando de una manera autocrina y paracrina, puede tener efectos opuestos sobre el tono vascular. La ET-1 liberada desde las células endoteliales ejerce una influencia autocrina provocando vasodilatación secundaria a la activación de los receptores ET-B<sub>1</sub>, y ejerce una influencia paracrina sobre el músculo liso vascular adyacente provocando vasoconstricción y estimulando

su proliferación a través de la estimulación de los receptores musculares ET-A y ET-B2. La acción resultante de la liberación endotelial de ET-1 consiste, por tanto, en una vasodilatación inicial y transitoria por activación de receptores ET-B1, seguida de una contracción persistente y de inicio lento por activación de receptores ET-A y ET-B2 (Figura 2).



**Fig. 2:** Interrelación entre endotelio y músculo liso.



No obstante, la respuesta funcional a la ET-1 varía de unos lechos vasculares a otros dependiendo de la distribución y expresión de ambos tipos de receptores en los mismos (Takuwa, 1993; Masaki 1995; Salom et al., 1995; Miyauchi y Masaki, 1999).

Por otra parte, el endotelio, como ya se ha señalado, también es capaz de liberar TXA<sub>2</sub>, un derivado del ácido araquidónico (AA), que media la contracción producida por noradrenalina y adenosín trifosfato (ATP) (Cardell et al., 1994).

Junto con los anteriores factores contráctiles el endotelio también es capaz de sintetizar y liberar diferentes sustancias con acción vasorrelajante: el NO (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987), el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (“endothelium derived hyperpolarizing factor” ó EDHF) y la PGI<sub>2</sub>.

El NO se sintetiza a partir del aminoácido L-arginina por la acción del enzima NO-sintetasa (NOS) (Moncada et al., 1991) y produce la relajación de la musculatura lisa al activar el enzima guanilatociclasa (Figura 2). La NOS existe en tres isoformas, una forma *inducible*, la iNOS (que se expresa en macrófagos, células de Kupffer, neutrófilos, fibroblastos, el músculo liso vascular y en las células endoteliales, en respuesta a estímulos patológicos) y dos formas *constitutivas* presentes en

el endotelio (eNOS) y en las neuronas (nNOS), y que se expresan en condiciones fisiológicas (Faraci y Brian, 1994).

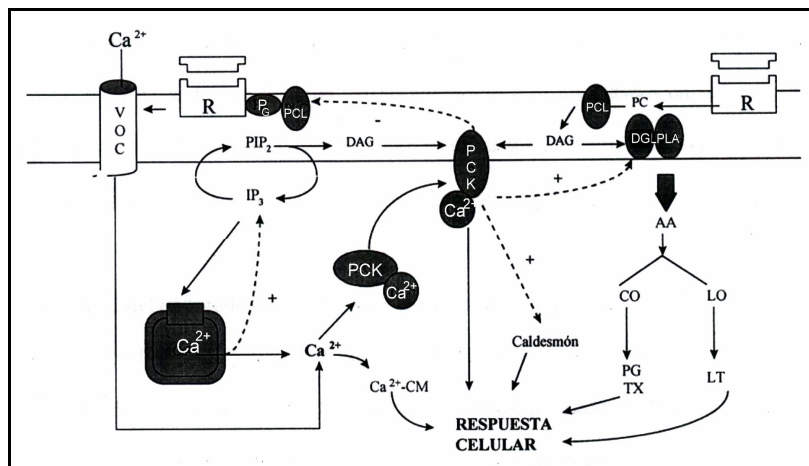
Por su parte, la PGI<sub>2</sub> es un metabolito de la vía del AA que también produce relajación del músculo liso vascular. Su acción está mediada por la adenilatociclasa, cuya activación provoca un aumento en la producción de AMP<sub>C</sub> que desencadena la relajación. Al igual que el NO, la PGI<sub>2</sub> no se sintetiza de forma exclusiva en el endotelio ya que también las células musculares lisas pueden sintetizarla (Hassid y Williams, 1983).

### **1.3.2. El músculo liso vascular**

El músculo liso vascular se contrae cuando la concentración intracelular de calcio, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, aumenta.

La regulación de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en el músculo liso vascular depende de la entrada y salida de iones de calcio (Ca<sup>2+</sup>) a través de la membrana plasmática y del secuestro de Ca<sup>2+</sup> en el retículo sarcoplásmico. El aumento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> activa a la kinasa de cadenas ligeras de miosina, produciendo la fosforilación de la miosina, o inhibiendo la miosín fosfatasa sensibilizando los miofilamentos frente al Ca<sup>2+</sup>.

Se han descrito dos tipos de respuestas contráctiles en las fibras musculares lisas, según sean inducidas por mediadores u hormonas (acoplamiento farmacomecánico) o por despolarización de membrana (acoplamiento electromecánico) (Figura 3).



**Fig. 3:** Mecanismo molecular de la contracción muscular. AA: ácido araquidónico,  $\text{Ca}^{2+}$ : ión calcio, CM: calmodulina, CO: ciclooxigenasa, DAG: diacilglicerol, DGL: diglicéridolipasa,  $\text{IP}_3$ : inositol 1,4,5-trisfosfato, LO: lipooxigenasa, LT: leucotrienos, PC: fosfatilcolina,  $\text{P}_G$ : proteína G, PG: prostaglandinas,  $\text{PIP}_2$ : fosfatidilinositol-bisfosfato, PCK: proteína-quinasa C, PLA: fosfolipasa  $\text{A}_2$ , PCL: fosfolipasa C, R: receptor de membrana, TX: tromboxanos, VOC: canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje.

Es decir, las sustancias que producen contracción pueden:

- a) Liberar  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, secundario a la formación de  $\text{IP}_3$  mediada por receptor.
- b) Permitir la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  controlados por receptor. Ambas son ejemplos de acoplamiento farmacomecánico.
- c) Despolarizar la membrana y permitir así la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales del  $\text{Ca}^{2+}$  regulados por voltaje (Figura 3): acoplamiento electromecánico.

Como se explicará con posterioridad cuando se analicen con más detalle las características del lecho vascular placentario, el mecanismo de contracción que se produce principalmente en las arterias placentarias es del tipo acoplamiento farmacomecánico: fuerzas físicas (estiramiento, presión, cizallamiento), diversos agonistas (angiotensina II, catecolaminas, ET, vasopresina, 5-HT, oxitocina,  $\text{TXA}_2$ ) y factores de crecimiento (plaquetario, fibroblástico, epidérmico) que aumentan la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y generan la respuesta contráctil.

Las sustancias que producen relajación pueden:

- Inhibir la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  regulados por voltaje, directamente o indirectamente mediante hiperpolarización de membrana.
- Aumentar la concentración intracelular de AMPc o GMPc: el AMPc inactiva a la kinasa de cadenas ligeras de miosina, y puede facilitar el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$ . El GMPc se opone al aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducido por agonistas (Tresguerres, 1999).

## **1.4. CIRCULACION FETO-PLACENTARIA**

### **1.4.1. Consideraciones anatómicas acerca del lecho feto-placentario**

El establecimiento de la circulación feto-placentaria tiene su origen a partir del fenómeno conocido como “placentación”.

La placentación hemocorial, como es la de la especie humana, requiere una conexión entre la placenta incipiente y los vasos maternos, los cuales deberán adquirir el calibre suficiente para asegurar el flujo sanguíneo necesario

para los intercambios adecuados. Esta conexión se produce por la infiltración que el trofoblasto realiza sobre estructuras maternas, el cual se comporta, aunque de manera limitada, como un tumor invasivo. Esta ocupación de las estructuras uterinas maternas por las células del trofoblasto determina la existencia de unas arterias uterinas espirales muy dilatadas e insensibles a los agentes vasoconstrictores al final del primer trimestre. Durante este proceso, además, las células del trofoblasto sufren una transformación profunda que les confiere un fenotipo endotelial. Esta invasión es condición indispensable para el establecimiento de una circulación materno-fetal adecuada. La invasión se lleva a cabo por enzimas proteolíticos inducidos y regulados por factores de crecimiento (VEGFs y PGFs), y agentes vasoactivos entre los que se encuentran ET-1 y NO (Ferré, 2001; Beaufils, 2002).

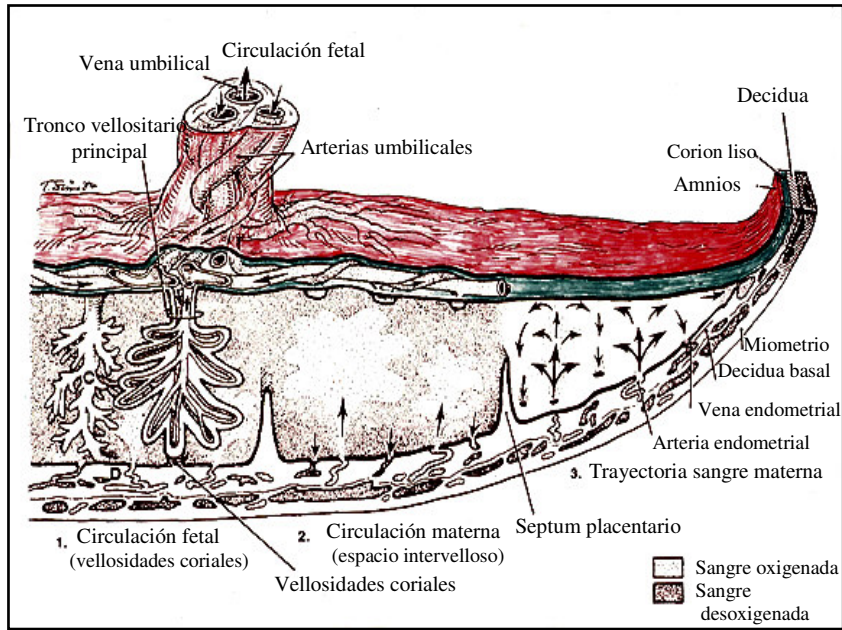
La comprensión de las características de la placentación en sus etapas iniciales tiene gran importancia debido al convencimiento cada vez mayor de que la patología hipertensiva del embarazo es una anomalía muy precoz de la placentación. Esta anomalía puede consistir en una ausencia de transformación o en una transformación incompleta de las arterias espiritadas, a consecuencia de lo cual tiene lugar un desarrollo anómalo de la placenta, se reduce su perfusión y se inicia un cascada de daño endotelial y de liberación de

estímulos vasoconstrictores (ET-1), con consecuencias negativas para el desarrollo fetal y manifestación de una clínica materna de hipertensión, afectación hepática y renal, etc.

En condiciones de desarrollo normal, la circulación fetoplacentaria en una placenta a término está compuesta por (Figura 4):

- Dos arterias umbilicales.
- Las arterias de la placa corial (arterias coriales).
- El sistema vellositario arterial.
- Las terminaciones vellositarias (lugar donde ocurre el intercambio gaseoso y de nutrientes).
- Las venas vellositarias y coriales.
- La vena umbilical.

La sangre fetal pobre en O<sub>2</sub> fluye hacia la placenta a través de las dos arterias umbilicales. Inmediatamente antes o justo después de entrar en la placa coriónica, las dos arterias umbilicales se unen mediante una anastomosis transversal que se conoce como “anastomosis de Hirtl”. En la unión del cordón umbilical con la placenta los vasos umbilicales se ramifican repetidamente por debajo del amnios. La sangre, con un contenido de O<sub>2</sub> significativamente alto regresa de la placenta al feto a través de la vena umbilical única (Figura 4).



**Fig. 4:** Circulación placentaria

Los vasos superficiales de la placenta constituyen ramificaciones de los vasos umbilicales y tienen un curso muy predecible en la superficie coriónica. En general, una rama arterial está acompañada por una rama venosa, y cada par terminal de vasos irriga un cotiledón fetal.

Las arterias son vasos finales que abastecen individualmente un cotiledón conforme la rama vira para penetrar en la placa coriónica. Es importante que exista una relación 1:1 entre la arteria y la vena del cotiledón. *Las arterias superficiales o coriónicas pueden reconocerse porque siempre*



*cruzan por encima de las venas.* Esta disposición resulta de gran utilidad para la identificación de la arteria y vena coriónicas; de hecho, la identificación se realiza así con mayor facilidad que siguiendo criterios histológicos. No hay anastomosis entre los vasos superficiales, y por este motivo nunca se desarrollan tales conexiones entre vasos vellosos; cada distrito está aislado de los otros. Existe una disminución del músculo liso de la pared de los vasos y un aumento de su calibre conforme estas arterias penetran a través de la placa basal.

El número de vasos perforantes terminales determina el número de cotiledones. La circulación intervellosa se logra por la inyección de sangre desde una arteria decidual hacia el centro de un cotiledón fetal, y se dispersa desde una cavidad central en el tejido veloso hacia la periferia del cotiledón y hacia la superficie del corion, desde donde es drenada por venas en los tabiques y base decidual (Ramsey, 1969). Las arterias espirales uteroplacentarias, que tienen forma de embudo cuando se abren al espacio intervellositario, permiten a la sangre materna llegar al espacio intervellositario y rodear a las vellosidades coriales antes de volver a la circulación materna a través de las venas uterinas. Mediante microscopio electrónico se ha confirmado la arquitectura vascular placentaria ya descrita (Thiriot y Panigel,

1978; Lee y Yeh, 1983), revelando además que la superficie de los vasos coriónicos está cubierta por microvellosidades correspondientes a la barrera en forma de cepillo que se observa en las preparaciones histológicas convencionales.

Los capilares vellositarios drenan la sangre a las venas coriónicas profundas, las cuales a su vez drenan a las venas coriónicas superficiales que desde la periferia recogen la sangre venosa y la derivan hacia el centro, aumentando progresivamente su diámetro hasta desembocar todas en la vena umbilical, situada por lo general en el centro de la cara fetal placentaria, y a partir de la cual y a través del cordón umbilical, llevará la sangre oxigenada al feto.

#### **1.4.2. Regulación de la circulación feto-placentaria**

Ha sido en las dos últimas décadas cuando se han explicado las particularidades de la circulación feto-placentaria materna en términos fisiológicos. Puesto que la homeostasis fetal depende de una circulación placentaria materna eficiente, los esfuerzos de los investigadores para dilucidar los factores que regulan el flujo de la sangre hacia y desde el espacio intervilloso han conducido a importantes aplicaciones básicas en Obstetricia.

Para llevar a cabo sus funciones con eficacia, la placenta necesita un desarrollo gradual tanto de la circulación fetal como de la materna que satisfaga la demanda creciente de nutrientes ocasionada por el crecimiento fetal y su metabolismo. La placenta no patológica tiene una gran reserva funcional debido a la gran cantidad de flujo sanguíneo que recibe y a la extensa superficie disponible para el intercambio entre las circulaciones materna y fetal. El desarrollo normal del feto depende en gran medida del mantenimiento de un flujo adecuado. Los aportes al feto de las sustancias más esenciales, incluyendo el O<sub>2</sub>, están más limitados por el aporte sanguíneo que por la difusión y el transporte placentarios. Con las contracciones del miometrio se producen reducciones temporales del flujo uterino que no tienen repercusión en el feto. Sin embargo, reducciones más prolongadas y pronunciadas del aporte sanguíneo pueden producir una hipoxia fetal y muerte intrauterina, pudiendo ocurrir ambas por fármacos o bien por una contracción uterina excesiva secundaria a una sobredosis de agentes oxitócicos.

El flujo sanguíneo, a través de la circulación fetal desde la placenta sana, está controlado fundamentalmente por el gasto cardiaco fetal y la presión vascular a nivel de la aorta fetal. Las arteriolas de las vellosidades placentarias presentan una baja

resistencia vascular, y los cambios en el flujo materno se compensan fundamentalmente por cambios reflejos en la tensión arterial aórtica fetal más que por alteraciones en la resistencia vascular placentaria. Cuando en condiciones experimentales se produce un descenso sustancial del flujo umbilical en ovejas, la disminución de la presión a nivel de las vellosidades placentarias provoca un paso de agua y electrolitos de la circulación materna a la fetal, provocando aumentos de la presión venosa central fetal, del gasto cardiaco y de la tensión arterial (Gilbert y Power, 1986).

Se conoce relativamente poco acerca de la cuantía exacta de flujo sanguíneo que atraviesa la circulación placentaria del ser humano, fundamentalmente por los problemas éticos que conlleva su estudio. No obstante, no existe ninguna duda de que este flujo es considerable en la gestación a término; Castle y Mackenzie (1986) lo han establecido en unos 500 mL/min.

En la parte fetal el flujo es muy alto (entre el 30 y el 50% del valor del gasto cardíaco), la resistencia vascular fetal es baja y la presión arterial media es de cerca de 30 mmHg. La tensión arterial materna uterina hace que la sangre pase a través de unas 80 a 100 arterias espirales en forma pulsátil a los senos placentarios, donde la presión arterial cae a valores cercanos a

los 10-15 mmHg antes de drenar a la circulación venosa (Walsh y Parisi, 1986). En la circulación materna y en los vasos placentarios el factor más determinante del flujo sanguíneo es la presión arterial materna (Panigel, 1986), debido a que las arterias uterinas espirales tienen una resistencia reducida durante la gestación, con lo que se comportan como "vasos conductores pasivos" (Walsh y Parisi, 1986). Como ya se ha mencionado, estos vasos carecen de regulación local y nerviosa del tono como consecuencia de la destrucción de su músculo liso y tejido elástico por las células del trofoblasto.

La existencia de una tensión arterial materna dentro de los límites de la normalidad se produce fundamentalmente por la disminución de la resistencia periférica que ocurre durante la gestación. Si ésta no se produjera, otros cambios cardiovasculares como la expansión del volumen plasmático y los incrementos del gasto cardíaco y actividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona incrementarían la tensión arterial materna (Boura et al., 1994).

Durante la gestación, los vasos maternos se dilatan y disminuyen su sensibilidad a los efectos vasoconstrictores de la angiotensina II y de los estímulos simpáticos (Mak et al., 1984). En esto parece que están implicados el aumento de los niveles de estrógenos y el aumento de producción de autacoides

vasodilatadores como la PGI<sub>2</sub> y el NO (Ezimokhai, 1993). La producción vascular de NO aumenta durante la gestación y puede estar bajo control hormonal. La hipótesis de que la producción endotelial de NO aumenta durante la gestación se apoya en el hallazgo de un aumento de la cantidad de nitritos en orina y de GMPc. En animales no gestantes, la administración de estrógenos puede simular un estado de gestación produciéndose una disminución de la sensibilidad vascular a la angiotensina II. Los estrógenos también producen vasodilatación, que disminuye si se bloquea la síntesis de NO (Boura et al., 1994).

La disminución crónica del flujo útero-placentario se asocia con el retraso de crecimiento intrauterino (RCIU). Por lo general, para que este déficit se produzca, hacen falta factores favorecedores (primiparidad, anomalías de inserción placentarias, trastornos circulatorios uterinos, etc.) y factores determinantes (preeclampsia, hipertensión previa al embarazo, enfermedad renal, diabetes, postmadurez, etc.) (Boura et al., 1994).

En resumen, un flujo sanguíneo inadecuado a la placenta se asocia con RCIU fetal y placentario. El aumento normal de este flujo se consigue gracias a una combinación de características anatómicas de la placenta y también de cambios en los sistemas cardiovasculares materno y fetal.

Es necesario resaltar el hecho de que el control del tono vasomotor en la circulación feto-placentaria no depende de estímulos nerviosos, ya que la placenta carece de inervación autónoma (Reilly y Russell, 1977; Walker y MacLean, 1971; Sastry y Sadavongivad, 1979; Fox y Khong, 1990; Khong et al., 1997). Por lo tanto, la resistencia vascular debe ser fundamentalmente controlada por factores humorales y mecanismos autocrinos o paracrinos (Poston et al., 1995).

Debido a la fragmentación de la información de que se dispone acerca de la fisiología y farmacología de los vasos placentarios, se supone que dicho tono podría estar influenciado por la activación de diversas hormonas y agonistas de receptores presentes en el tejido vascular placentario (Myatt, 1992).

Se han detectado en la circulación placentaria diversas sustancias que pueden afectar el tono vascular feto-placentario de forma directa o indirecta: noradrenalina y adrenalina (Falconer y Hache, 1982), histamina (Mitchell y Porter, 1970), ACh (Boura et al., 1986),  $\text{PGF}_2\alpha$  (Craft et al., 1973),  $\text{PGE}_2$  (Mackenzie et al., 1980), bradiquinina (Melmon et al., 1968), 5-HT (Jones y Rowsell, 1973),  $\text{PGI}_2$  y  $\text{TXA}_2$  (Tuvemo, 1980), leucotrienos (Piper y Levine 1987), angiotensina II (Broughton et al., 1977) y ET (Haegerstrand et al., 1989).

La placenta humana actúa sobre muchas de estas sustancias modificando su actividad; así, el 70-90% de la actividad de la 5-HT desaparece a nivel placentario, y el 98% de la bradiquinina es inactivada tan sólo por el paso a través de los lóbulos placentarios (Prentice et al., 1987).

### **1.4.3. Factores endoteliales placentarios.**

El endotelio es reconocido como una importante fuente de sustancias vasoactivas y se sabe que juega un papel importante en el control del tono vascular placentario. La resistencia vascular está determinada por las pequeñas arterias y arteriolas. Es importante que para el estudio “in vitro” de arterias aisladas se tenga en cuenta y se realice con vasos capaces de contribuir a la resistencia vascular (McCarthy et al., 1994).

Sustancias producidas por las células endoteliales placentarias y con acción local sobre el músculo liso son el NO y la PGI<sub>2</sub>. También son sintetizadas por células endoteliales del lecho vascular placentario angiotensina II, ET-1, ET-3 y TXA<sub>2</sub>. Conocemos ya la importancia fisiológica del NO en el organismo humano (Vallance, 1989). En la circulación placentaria parece jugar un papel destacado, afectando al tono



basal y atenuando los efectos constrictores (Myatt et al., 1991; Myatt, 1992; Gude et al., 1992).

A modo práctico, se pueden formar dos parejas antagonicas, de cuyo equilibrio va a depender en buena medida el mantenimiento del tono vascular placentario: la formada por TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub> y la constituida por ET-1/NO (Ferré, 2001).

#### 1.4.3.1. Sustancias vasodilatadoras

La PGI<sub>2</sub> y el NO son potentes agentes paracrinicos placentarios que no sólo causan vasodilatación, sino que también actúan a nivel sanguíneo inhibiendo la agregación plaquetaria y contribuyendo a la fibrinólisis. La PGI<sub>2</sub> es el producto principal del metabolismo del ácido araquidónico producido por las células endoteliales. El NO producido por las células endoteliales placentarias se sintetiza a partir del aminoácido esencial L-arginina con la mediación del enzima NOS (Myatt et al., 1991; Myatt, 1992). La PGI<sub>2</sub>, antagonista fisiológico del TXA<sub>2</sub>, también ha sido identificada de forma indirecta en la placenta a través de su producto metabólico estable, la 6-keto PGF<sub>1α</sub>. (Walsh et al., 1986; Boura y Walters, 1991).

La producción local de NO por las células endoteliales vasculares placentarias es un importante mecanismo que influye en la baja resistencia vascular (Myatt, 1992). La disminución de la producción de NO puede producir un aumento de la resistencia que se observa en placentas de gestantes con preeclampsia (Pinto et al., 1991). La circulación feto-placentaria puede generar NO intracelularmente y parece que la liberación basal de NO puede contribuir a la vasodilatación generalizada en esta circulación (Myatt et al., 1991). También se ha postulado que una producción disminuida de PGI<sub>2</sub> podría ser la responsable de la disminución del flujo placentario y consiguientemente de la nutrición fetal, así como de las manifestaciones clínicas de la preeclampsia (González et al., 1995). El NO puede ser liberado así mismo por otros estímulos, como la adenosina y otros autacoides producidos en la circulación fetal. Se ha identificado la NOS en las vellosidades placentarias (Myatt, 1992). Estudios inmunohistoquímicos han demostrado que la NOS se localiza en cantidades relativamente elevadas en el endotelio de los vasos de resistencia placentarios, y que está virtualmente ausente en el endotelio de los capilares donde no hay músculo liso (Moncada et al., 1991; Myatt et al., 1993).

En los vasos de resistencia coriales el NO desempeña un papel más importante que la PGI<sub>2</sub>. Así, Chaudhuri et al. (1993)

han demostrado que el NO es más importante que la PGI<sub>2</sub> en el mantenimiento del bajo tono vascular en vasos feto-placentarios, habiendo una mayor liberación de NO (entre 5 y 6 veces), sobre todo a nivel de vasos umbilicales. Cuando se inhibe la síntesis o los efectos del NO, se produce vasoconstricción feto-placentaria (Myatt, 1992). Esto no ocurre cuando se bloquea la síntesis de PGI<sub>2</sub> con fármacos en diferentes fases de la vía del AA (Myatt, 1992; Mak et al., 1984).

#### 1.4.3.2. Sustancias vasoconstrictoras

El TXA<sub>2</sub> ha sido identificado indirectamente en forma de su metabolito estable TXB<sub>2</sub>. Se libera no sólo de plaquetas agregadas, sino también de tejidos de la placenta (Walsh y Parisi, 1986). Se han encontrado receptores de TXA<sub>2</sub> en la circulación fetal idénticos a los de arteria y vena umbilical, y a los de las plaquetas (Boura y Walters, 1991).

Otros agentes endoteliales vasoconstrictores presentes en la circulación placentaria son las endotelinas, que ejercen su efecto biológico uniéndose a los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>. Durante la gestación la placenta es la mayor fuente de producción de ET. El nivel de ET-1 en vena umbilical es más alto que el hallado en circulación venosa periférica materna (Häkkinen et al., 1992).

Parece que las endotelinas pueden desempeñar un papel importante en la regulación de la circulación placentaria (Myatt et al., 1992 a y b). Los tejidos placentarios expresan los genes de las endotelinas y son capaces de producir ET-1, ET-3 y cantidades pequeñas de ET-2 (Myatt, 1992). Según algunos experimentos *in vitro*, la ET-1 es el agente vasoconstrictor más potente en la circulación fetal (Myatt et al., 1992 b; Mak et al., 1984; Myatt et al., 1993), así como, aunque en menor medida, la ET-3 (Myatt et al., 1992 b).

La ET-1 puede desempeñar un papel no sólo en la regulación del flujo placentario en condiciones fisiológicas, sino también en situaciones que conllevan un aumento en la resistencia vascular o vasoespasmo. La concentración de ET-1 en plasma materno se encuentra elevada en la preeclampsia (Nova et al., 1991), lo que sugiere que este péptido podría estar implicado en dicha patología. Más recientemente se ha relacionado un aumento de ET-1 en cordón umbilical con RCIU (Schiff et al., 1993).

En estados normales de gestación se produce un aumento progresivo en la liberación de ET-1 que se estabiliza en el tercer trimestre, presentando en el momento del parto su pico más alto (Usuki et al., 1990; Mastrogiannis et al., 1991). Otros investigadores, sin embargo, no hallan este incremento final

(Nisell et al., 1990). En gestaciones complicadas con preeclampsia parece que los incrementos pueden llegar a ser de más del 50% (Schiff et al., 1992; Sudo et al., 1993). Como dato singular se ha realizado una serie de estudios epidemiológicos que ponen de manifiesto que las mujeres de raza negra presentan un riesgo mayor de hipertensión arterial (HTA) y preeclampsia que las de raza blanca. Carbone et al. (1998) han estudiado este fenómeno en relación a los niveles de ET durante la gestación, encontrando niveles similares en sangre materna pero no en cordón umbilical. En mujeres de raza negra los niveles de las ET están significativamente elevados, lo que sugiere una mayor producción de ET por parte de la unión feto-placentaria en estas mujeres. Por lo tanto, la ET podría ser uno de los factores determinantes de la mayor incidencia de desórdenes de origen hipertensivo en mujeres de raza negra. Sin embargo, y como los autores apuntan, la asociación entre preeclampsia y la elevada producción de ET necesita de un mayor número de investigaciones.

De todo lo expuesto se deduce que el papel tanto fisiológico como fisiopatológico de la ET en gestantes, y en concreto a nivel placentario, está por precisar.

## **1.5. MECANISMOS VASCULARES EN LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL DURANTE LA PREECLAMPSIA**

La gestación normal se asocia con reducciones tanto de la resistencia vascular total como de la presión arterial, debidas posiblemente al aumento de la relajación vascular dependiente del endotelio y a la disminución de la reactividad vascular a agentes vasoconstrictores. Por el contrario, estos cambios beneficiosos no ocurren en gestantes que desarrollan preeclampsia; antes bien, se observan incrementos severos de la resistencia vascular y de la presión arterial.

Aunque la preeclampsia representa una causa principal de morbilidad y mortalidad materna y fetal, los mecanismos celulares y vasculares subyacentes a este desorden no se han identificado claramente. Estudios en gestantes hipertensas y en modelos experimentales animales sugieren que la reducción de la perfusión utero-placentaria, con la consiguiente hipoxia-isquemia placentaria, pueden desencadenar la liberación de factores placentarios que inician una cascada de fenómenos celulares y moleculares que conducen a la disfunción del endotelio y del músculo liso vascular, y por lo tanto al aumento de la resistencia vascular y de la presión arterial. La isquemia placentaria puede promover la liberación de factores biológicamente activos, incluyendo citoquinas tales como el

“factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (“tumor necrosis factor- $\alpha$ ”, TNF- $\alpha$ ) y especies reactivas del oxígeno. Incrementos super-umbrales en los niveles plasmáticos de factores placentarios pueden conducir a la disfunción endotelial, a disminuciones en la liberación de sustancias vasodilatadoras tales como el NO, la PGI<sub>2</sub> y el EDHF, y por lo tanto a la atenuación de las vías de relajación vascular. Por otra parte, los factores placentarios también pueden incrementar la liberación de y la reactividad vascular a factores contráctiles derivados del endotelio tales como la endotelina, el tromboxano y la angiotensina II. Estos factores podrían incrementar la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> y estimular las vías de contracción dependientes de Ca<sup>2+</sup> en el músculo liso vascular.

Por lo tanto, la atenuación de los mecanismos de relajación vascular dependientes del endotelio, junto con la potenciación de los mecanismos de contracción del músculo liso vascular, representan las causas más plausibles del aumento de la resistencia vascular y de la presión arterial asociadas con la preeclampsia (Khendun et al., 2002).





## OBJETIVOS

Hasta ahora el estudio de la circulación fetoplacentaria se ha abordado principalmente desde un punto de vista morfológico o en términos de flujos o de transferencia de sustancias. *El objetivo genérico del presente trabajo es el de investigar las respuestas motoras de las arterias coriales frente a estímulos vasoconstrictores y vasodilatadores (especialmente aquellos relacionados con el endotelio), con el fin de contribuir al mejor conocimiento de los mecanismos de control de la circulación fetoplacentaria.* Se han utilizado arterias de la placa corial porque son más representativas que la arteria umbilical tanto en el control de la resistencia vascular como en la circulación vellositaria.

Los objetivos pormenorizados son los siguientes:

1.- Estudio del efecto y mecanismo de acción de ET-1.

1.1.- Determinación del subtipo de receptor (ET<sub>A</sub> ó ET<sub>B</sub>) que media la respuesta a ET-1.

1.2.- Determinación de la posible existencia de un mecanismo de retroalimentación negativa de NO sobre ET-1 y ET-3, en virtud del cual la activación de los receptores a endotelina podría inducir la liberación de NO el cual, a su vez, inhibiría la respuesta a endotelina.

1.3.- Determinación de la dependencia que la respuesta a ET-1 muestra respecto del  $\text{Ca}^{2+}$ .

2.- Estudio comparativo de los efectos de distintos vasodilatadores, atendiendo principalmente a su dependencia del endotelio y al agente vasoconstrictor inductor del tono activo.

2.1.- Registro de la respuesta al agonista endógeno ACh, cuyo efecto está mediado por mecanismos endoteliales.

2.2.- Registro de la respuesta al fármaco nitrovasodilatador NPS, cuyo efecto se debe a la liberación de NO.

2.3.- Registro de la respuesta al agonista endógeno adenosina, en cuyo efecto no participan mecanismos endoteliales.

2.4.- Registro de la respuesta a nicardipina, fármaco bloqueador de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  del grupo de las dihidropiridinas.

3.- Estudios de correlación entre los datos clínico-obstétricos y las respuestas vasomotoras de las arterias coriales humanas

# **MATERIAL Y METODOS**

## **3.1. OBTENCIÓN DE LAS PLACENTAS**

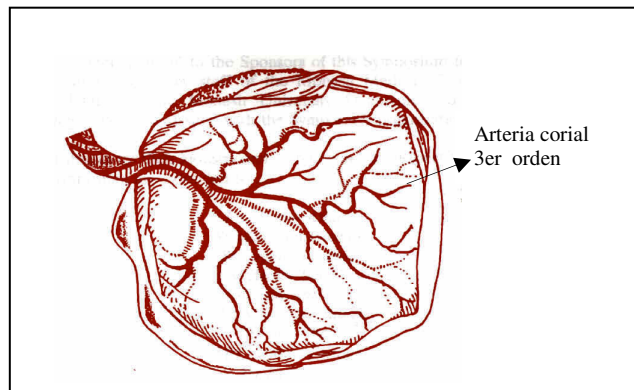
Las placentas utilizadas se obtuvieron en el Centro Maternal del Hospital Universitario La Fe de Valencia, de partos sin complicaciones, es decir, con evolución satisfactoria, líquido amniótico claro, registros cardiotocográficos normales y sin ninguna evidencia de pérdida del bienestar fetal.

Las gestaciones fueron a término (mayor o igual a 37 semanas), de mujeres de raza blanca, sin antecedentes clínicos de interés (sin hábitos tóxicos, hipertensión, metabolopatías, etc.) y con un curso de embarazo normal (sin RCIU, preeclampsia, alteraciones en cantidad de líquido amniótico, antecedentes de amenaza de parto prematuro, placenta previa, etc.).

Las placentas fueron recogidas inmediatamente tras el parto (vaginal o cesárea) y fueron utilizadas en la experimentación en menos de 6 horas (Abad, 1999).

### 3.2. OBTENCION DE LAS ARTERIAS CORIONICAS Y SU DISPOSICIÓN PARA EL REGISTRO DE TENSIÓN ISOMÉTRICA

Las arterias estudiadas son ramas de 2º y principalmente de 3º orden pertenecientes a la placa corial placentaria (Figura 5). Los estudios se han realizado con un total de 429 segmentos arteriales.



**Fig. 5:** Distribución superficial de las arterias coriales en la placenta humana (arterias -tono oscuro- por encima de venas).

Con la ayuda de una lupa binocular (Wild M3B, Heerbrugg) y utilizando una fuente de luz fría (Euromex EK-1) para no deteriorar el tejido, se separa en primer lugar el amnios y se aíslan por disección fina las arterias coriónicas superficiales, de aproximadamente 1 mm de diámetro

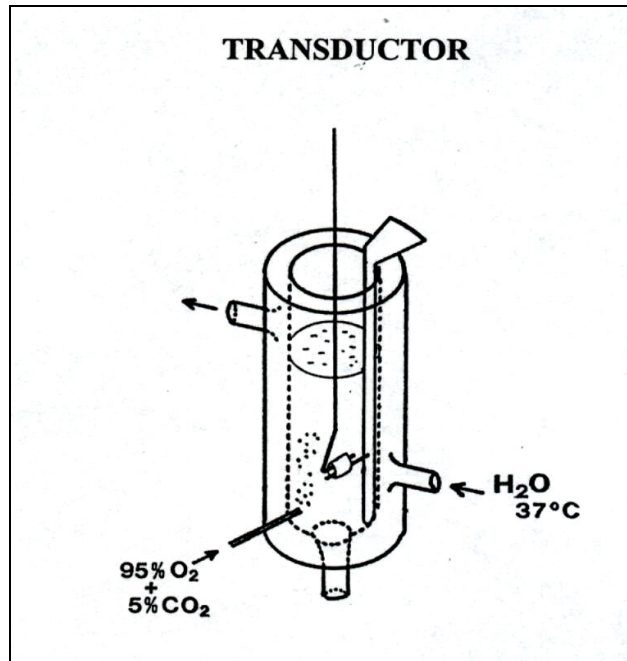
(Figura 5), del tercio externo de la superficie coriónica placentaria.

Se incluye aquí una nueva variable: la diferencia en horas desde el momento del parto hasta el inicio del experimento.

Las arterias son inmediatamente introducidas en solución nutritiva de Ringer Locke con la siguiente composición (mM): NaCl, 119,8; KCl, 5,0; CaCl<sub>2</sub>, 2,2; MgCl<sub>2</sub>, 1,0; glucosa, 5,6; y NaHCO<sub>3</sub>, 23,8. Se eliminan los restos de sangre y tejidos adyacentes y se cortan los vasos para la obtención de anillos de aproximadamente 4 mm de longitud.

Para el registro de la tensión isométrica desarrollada por los segmentos arteriales se introducen los extremos finos y rígidos de dos alambres de tungsteno (con un diámetro de 207  $\mu$ m) a través de la luz vascular. Uno de los alambres queda unido a un soporte fijo, de tal forma que la arteria queda en posición horizontal. El otro se conecta a un transductor de tensión isométrica, de forma que puede traccionar verticalmente, en sentido perpendicular al eje mayor del segmento arterial, en respuesta a los cambios de tensión que se producen en la pared del vaso. El transductor está acoplado a su vez a un amplificador de señal y a un polígrafo, para poder así registrar la variación de

tensión isométrica ejercida por los segmentos arteriales como resultado de su contracción o relajación (Figura 6).



**Fig. 6:** Disposición de un segmento cilíndrico de arteria en el baño de órganos.

Cada segmento vascular, con los alambres en el interior de su luz, se aloja en un baño de órganos que contiene la solución nutritiva de Ringer Locke, burbujeada continuamente con gas carbógeno (95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>), lo que le confiere

un pH de 7,3-7,4. Un circuito de agua caliente que rodea a las copas de los baños, permite mantener la solución con los tejidos vasculares a una temperatura constante de  $37 \pm 0,5$  °C. Se dispone de una reserva de la solución, en condiciones idénticas a las descritas, que se utiliza para renovar el medio en que se hallan inmersos los segmentos arteriales.

El sistema de medida y registro consta, para cada uno de los segmentos arteriales, de un transductor de tensión isométrica (“Universal Transducing Cell” UC3, Gould Statham), un tornillo micrométrico (“Micrometer Boss Head”, Bioscience) adaptado al transductor y capaz de desplazar el conjunto transductor-alambre, un amplificador de tensión (Hewlett-Packard 8805C), y un canal de registrador (Omniscribe, Houston D 5237-5).

Los cambios de tensión isométrica producidos por los diferentes estímulos aplicados sobre los segmentos arteriales se cuantifican midiendo, a partir del trazado basal o del trazado de tono activo, el desplazamiento producido hasta el efecto máximo desarrollado para cada una de las concentraciones. Estos cambios de tensión isométrica se multiplican por un factor de calibración determinado de antemano; ello permite la conversión de unidades de longitud (mm) en unidades de tensión (mg). Las cantidades obtenidas pueden expresarse en términos absolutos (mg) o relativos, es decir, porcentualmente respecto al efecto

máximo producido por un estímulo aplicado con anterioridad ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ , ET-1 o KCl), o bien respecto al tono activo.

### **3.3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

Una vez dispuestos los segmentos arteriales en el baño de órganos y previa calibración del aparato, se les aplica mediante rotación del tornillo micrométrico una tensión basal de 2 g (tensión previamente establecida como óptima). Dado que la respuesta inmediata de los segmentos arteriales es relajarse, la tensión debe ajustarse periódicamente hasta que se estabilizan en dicha tensión. Durante este periodo (60-90 min) el líquido nutritivo se renueva cada 15 min. Una vez alcanzada una tensión basal constante de 2 g y con el fin de analizar la reactividad de los segmentos arteriales, se someten a un estímulo despolarizante (KCl 50 mM). Los segmentos arteriales que desarrollan una contracción frente a este estímulo menor de 1 g son descartados. Posteriormente, se realizan varios lavados de las arterias con la solución nutritiva (cada 10 min), hasta que de nuevo alcanzan su tensión basal, dejando transcurrir siempre un tiempo mínimo de 45–60 min antes del inicio de las curvas concentración-respuesta. Dichas curvas se obtuvieron mediante



la adición al baño de órganos de concentraciones acumulativas del fármaco a estudiar. Cada concentración se añade cuando la inmediatamente anterior ha desarrollado su efecto máximo, siendo la concentración del fármaco en el baño cuando se aplica una concentración, la suma de esta última más las administradas con anterioridad. El volumen total de los fármacos añadidos al baño no supera en ningún caso el 10% del volumen del líquido del baño.

Para la obtención de las curvas concentración-respuesta de vasodilatación, tras aplicar la tensión pasiva a los segmentos arteriales, se utiliza un agente vasoconstrictor para inducir un tono activo, en nuestro caso, mediante la adición al baño de órganos de una concentración única de KCl (50 mM),  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ( $10^{-5}$  M) ó ET-1 ( $10^{-7}$  M). Una vez se alcanza de manera estable el tono activo, se procede al registro de las relajaciones inducidas por los correspondientes fármacos vasodilatadores.

### **3. 4. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES**

#### **3.4.1. Estudio de los parámetros obstétricos**

Accediendo a la historia clínica y una vez se seleccionaron las pacientes, se recogieron datos clínicos de la

madre: edad, gestaciones, peso, aumento ponderal durante la gestación, grupo sanguíneo y Rh; del parto: semanas de gestación, horas con contracciones, horas de bolsa rota, horas de PAP, diferencia en horas desde el parto al inicio del experimento, vía de finalización del parto (vaginal o cesárea), peso de la placenta en g, anestesia utilizada (local, peridural o general) y del recién nacido (sexo del neonato, gasometría de sangre del cordón umbilical, Apgar al minuto y a los 5 minutos, peso del recién nacido) con el objetivo de correlacionar los datos de reactividad vascular con los datos obstétricos.

Se ha realizado el estudio de este apartado analizando todos los parámetros anteriormente descritos, respecto de la contracción vascular frente a una concentración determinada de KCl (50 mM),  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ( $10^{-5}$  M) o ET-1 ( $10^{-7}$  M). La concentración de KCl a la que se hace referencia es la utilizada al comienzo de todos los experimentos para comprobar la vitalidad arterial, así como para obtener el tono activo. En el caso de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y ET-1 es la concentración empleada para conseguir tono activo.

### 3.4.2. Estudio de la respuesta vasoconstrictora de las arterias de la placa corial

Para el estudio de la respuesta contráctil de las arterias de la placa corial placentaria y de los mecanismos que la modulan, nos centramos en el estudio del comportamiento arterial frente a ET-1. Se realizaron curvas concentración-respuesta de ET-1 ( $10^{-11}$ - $10^{-7}$  M), en situación control y en cada una de las siguientes situaciones experimentales:

- a) Con el fin de determinar el tipo de receptor predominante, ET-A o ET-B, se obtuvieron curvas concentración-respuesta de ET-1 ( $10^{-11}$ - $10^{-7}$  M) y de ET-3 ( $10^{-10}$ - $10^{-6}$  M), analizando la potencia relativa entre ambos agonistas.
- b) Con el fin de estudiar la posible participación del NO en la respuesta, se obtuvieron curvas concentración-respuesta de ET-1 y ET-3 tras la incubación (20 min.) de los segmentos arteriales con el inhibidor de la síntesis de NO, N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina metilester (L-NAME,  $10^{-4}$  M).

- c) Para valorar el papel que juega el  $\text{Ca}^{2+}$  en la respuesta, se obtuvieron curvas concentración-respuesta de ET-1:
- en medio sin  $\text{Ca}^{2+}$  y en presencia de un quelante del ión  $\text{Ca}^{2+}$  (EGTA,  $10^{-3}$  M).
  - previa incubación (20 min) con el bloqueante de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , nicardipina ( $10^{-5}$  M).

### **3.4.3. Estudio de la respuesta vasodilatadora de las arterias de la placa corial**

Para el estudio de la respuesta relajante de las arterias de la placa corial se ensayaron sustancias vasodilatadoras que actúan mediante diferentes vías: endotelio-dependientes (ACh), y endotelio-independientes tales como adenosina, NPS (dado de NO) y nicardipina (antagonista del  $\text{Ca}^{2+}$ ).

Para llevar a cabo estos experimentos se exponen previamente las arterias a un estímulo que active la contracción arterial de manera sostenida, lo que permite, tras la adición posterior de la sustancia vasorrelajante, estudiar el comportamiento arterial frente al estímulo dilatador.

Se han llevado a término los siguientes experimentos:

- a) Estudio de la respuesta vasorrelajante vía endotelio-dependiente con ACh ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M).

- b) Estudio de la respuesta vasorrelajante de las arterias de la placa corial humana vía endotelio-independiente. En este apartado se analiza el comportamiento del NPS ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M), de la adenosina ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M) y de la nicardipina ( $10^{-10}$ - $10^{-4}$  M).

Como sustancias inductoras del tono activo se emplea una concentración única de ET-1 ( $10^{-7}$  M) ó  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ( $10^{-5}$  M). En el caso de la nicardipina se completa la investigación con una tercera sustancia vasoconstrictora inductora de tono activo, KCl (50 mM).

### **3.5. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS**

Por tratarse de variables continuas con una distribución normal, los parámetros clínico-obstétricos (edad, peso materno y aumento ponderal materno, semanas de gestación, horas de periodo activo, tiempo transcurrido entre el nacimiento y el experimento, peso de la placenta y del neonato, y la gasometría de cordón umbilical), se han descrito como media, error estándar de la media (EEM) y el intervalo. El índice de Apgar (variable semicuantitativa discreta) se ha descrito como moda y su intervalo.

El tipo de anestesia utilizado, la distribución por sexos y la vía de parto, se han expresado como porcentajes (variables cualitativas).

Para estudiar la influencia de los parámetros antes descritos sobre la reactividad vascular a estímulos contráctiles (ET-1, KCl, PGF<sub>2α</sub>), se realiza un análisis de correlación, efectuando una transformación logarítmica previa en el caso del índice de Apgar.

La posible influencia del sexo del neonato y vía de finalización de parto, se analizó mediante una prueba de “t” de Student para muestras independientes. La influencia del tipo de anestesia utilizada, se realizó mediante un análisis de la varianza (ANOVA), seguido de una prueba de contraste *a posteriori*, en caso de resultar significativa.

La respuesta contráctil frente a ET-1 y ET-3 se expresa como porcentaje respecto de la contracción inducida por KCl (50 mM), mientras que la respuesta vasodilatadora se expresa porcentualmente respecto al tono activo previamente inducido con PGF<sub>2α</sub> (10<sup>-5</sup> M), ET-1 (10<sup>-7</sup> M) o KCl (50 mM).

Se obtienen curvas concentración-respuesta en segmentos arteriales procedentes de placentas diferentes. Los datos se agruparon posteriormente según el tipo de experimento y a partir de los resultados obtenidos para cada una de las concentraciones se calculó la media aritmética, la desviación típica y el EEM.

Con estos datos se construyeron las curvas concentración-respuesta para cada una de las situaciones experimentales.

Por otra parte, también se calculó para cada curva concentración-respuesta el efecto máximo ( $E_{m\acute{a}x}$ ) y la concentración a la cual el efecto es la mitad del  $E_{m\acute{a}x}$  ( $CE_{50}$ ). Para calcular la  $CE_{50}$  se halla la mitad del efecto máximo y las concentraciones que lo acotan, y a continuación se calcula la concentración que corresponde a la mitad del efecto máximo mediante una proporción entre el efecto y el logaritmo de la concentración.

Para calcular el valor medio de la  $CE_{50}$  y su intervalo de confianza del 95%, se calcula la media y el intervalo de confianza de los valores  $pD_2$  ( $-\log CE_{50}$ ), ya que dichos valores se ajustan a una distribución normal. La posterior conversión, aplicando antilogaritmos, proporciona la media geométrica y los intervalos de confianza del 95% de la  $CE_{50}$ .

Para el análisis estadístico que determine las posibles diferencias entre los valores de  $E_{m\acute{a}x}$  y  $CE_{50}$  obtenidos para las distintas situaciones experimentales, se empleó, en el estudio del comportamiento de la ET-1 y las sustancias relacionados con la misma, (L-NAME, medio sin  $Ca^{2+}$ , nicardipina y ET-3), el test t-Student para muestras independientes.

En el estudio de la respuesta de distintos vasodilatadores se utilizó el ANOVA de una vía para comparaciones múltiples. Cuando resultó significativo el ANOVA, se siguió de un test de rango múltiple, bien el test de “mínimas diferencias significativas“ (LSD) o el test de Student-Newman-Keuls.  $p < 0,05$  fue considerado significativo.

### **3.6. FÁRMACOS Y SOLUCIONES**

Los productos utilizados en el presente trabajo y la procedencia de cada uno de ellos son los expuestos en la Tabla 1.

Todos los fármacos fueron preparados en el día de cada experimento.



**Tabla 1.** Productos utilizados y procedencia

<b>Producto</b>	<b>Procedencia</b>
Acetilcolina	Sigma-Aldrich Química (Madrid)
Adenosina	Sigma-Aldrich Química (Madrid)
Bicarbonato sódico	Carlo Erba ( Rodano, Italia)
Cloruro cálcico	Merck ( Darmstadt, Alemania)
Cloruro magnésico	Merck ( Darmstadt, Alemania)
Cloruro potásico	Merck ( Darmstadt, Alemania)
Cloruro sódico	Carlo Erba ( Rodano, Italia)
EGTA	Sigma-Aldrich Química (Madrid)
Endotelina-1	Calbiochem (Bad Salen, Alemania)
Endotelina-3	Calbiochem (Bad Salen, Alemania )
Glucosa	Guinama (Valencia)
N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina metilester	Sigma-Aldrich Química (Madrid)
Nicardipina	Ferrer Internacional (Barcelona)
Nitroprusiato sódico	Sigma-Aldrich Química (Madrid)
Seroalbúmina bovina grado V	Sigma-Aldrich Química (Madrid)
Sol. salina fisiológica	Farma, S.A. ( Madrid)
Papaverina	Sigma-Aldrich Química (Madrid)
Prostaglandina F <sub>2α</sub>	Sigma-Aldrich Química (Madrid)

ACH, adenosina, NPS y la L-NAME fueron disueltas y diluidas en solución salina. Nicardipina y papaverina se

disolvieron en H<sub>2</sub>O bidestilada y se diluyeron en solución salina fisiológica. Para la completa disolución de la nicardipina fue necesaria la aplicación de ultrasonidos. ET-1 y ET-3 se disolvieron en ácido acético 0,1% y se diluyeron en una solución que contiene la siguiente composición: tampón fosfato salino (NaCl 150 mM + NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM) y seroalbúmina bovina 5%.

Para preparar la solución nutritiva de Ringer Locke en primer lugar se preparó una solución concentrada (20x) de cloruros (NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>) que se diluyó en el momento de su uso añadiendo entonces el NaHCO<sub>3</sub> y la glucosa. La solución despolarizante de KCl 50 mM se preparó del mismo modo que la solución Ringer Locke, pero sustituyendo parte del NaCl por una cantidad equimolar de KCl. La solución sin Ca<sup>2+</sup> se preparó de la misma manera que la solución nutritiva y la despolarizante, pero eliminando el CaCl<sub>2</sub> de la composición y añadiendo EGTA 1 mM.

# RESULTADOS

## 4.1. DATOS CLÍNICO-OBSTÉTRICOS

Los datos correspondientes a la parte clínica (maternos, neonatales y del parto) se presentan en la Tabla 2.

Los parámetros clínicos no cuantitativos analizados para el estudio posterior de su posible influencia en la reactividad arterial fueron: tipo de anestesia, vía de finalización de la gestación y sexo de los recién nacidos.

En cuanto al régimen anestésico, el 9% de los casos correspondieron a anestesia general, el 27% a anestesia epidural, y el 64% a anestesia local. En cuanto a la vía de finalización del parto, el 79% de las placentas obtenidas correspondieron a partos vaginales, y el 21% a cesáreas. En cuanto al sexo, el 54% de los recién nacidos fueron mujeres, y el 46% varones.

**TABLA 2.-** Datos clínico-obstétricos registrados en el total de 52 casos incluidos en el presente estudio.

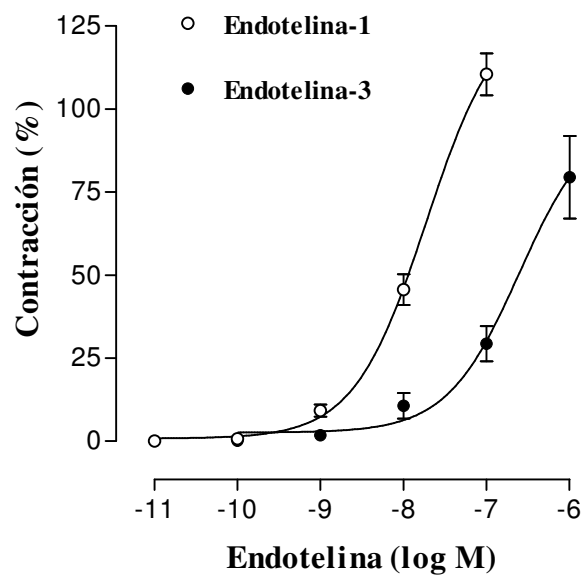
	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Media ± EEM</b>
<b>Edad materna (años)</b>	18	40	31± 5
<b>Peso materno (Kg)</b>	55	96	71± 7
<b>Aumento ponderal (Kg)</b>	6	16	9,5 ± 2,2
<b>Tiempo gestación (semanas)</b>	37	41	39 ± 1
<b>PAP (h)</b>	0	9	3,50±2,30
<b>Tiempo desde el parto hasta el experimento (h)</b>	1	6	2,6 ± 1,35
<b>Peso placenta (g)</b>	400	1.000	654 ±107
<b>Peso neonato (g)</b>	2.500	4.050	3.354± 385
<b>Apgar 1 min</b>	7	10	
<b>Apgar 5 min</b>	9	10	
<b>PH arterial</b>	7,12	7,36	7,27±0,004
<b>PH venoso</b>	7,19	7,42	7,32± 0,004

## 4.2. RESPUESTA DE LAS ARTERIAS CORIALES A ENDOTELINAS

### 4.2.1.- Respuestas a ET-1 y ET-3

La adición al baño de órganos de concentraciones crecientes de ET-1 ( $10^{-11}$ - $10^{-7}$  M) produjo contracciones de los segmentos arteriales de la placa corial de magnitud dependiente de la concentración (Figura 7). En valores absolutos el  $E_{m\acute{a}x}$  medio fue de  $2.161\pm 172$  mg ( $111\pm 6\%$  de la contracción inducida por KCl 50 mM), mientras que el valor medio de  $CE_{50}$  fue de  $8,32 (6,76-10,2)\times 10^{-9}$  M (n=81).

La adición al baño de órganos de concentraciones crecientes de ET-3 ( $10^{-10}$ - $10^{-6}$  M) produjo contracciones de los segmentos de arterias coriales de magnitud dependiente de la concentración (Figura 7). La respuesta de los segmentos arteriales tras la adición al baño de ET-3 alcanzó un  $E_{m\acute{a}x}$  medio de  $1.013\pm 80$  mg ( $80\pm 12\%$  de la contracción inducida por KCl 50 mM), mientras que el valor medio de  $CE_{50}$  fue de  $8,91 (5,50-14,4)\times 10^{-8}$  M (Tabla 3).

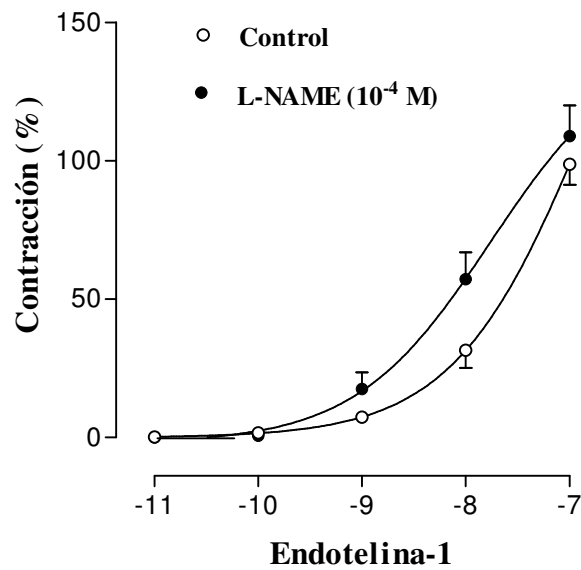


**Fig. 7:** Curvas concentración-respuesta de ET-1 (n=81) y ET-3 (n=17) en segmentos de arterias de placa corial. Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima alcanzada con KCl 50 mM y representan la media  $\pm$  EEM.

El análisis estadístico de los resultados reveló diferencias significativas entre las respuestas a ET-1 y ET-3: el  $E_{m\acute{a}x}$  de ET-1 fue mayor que el de ET-3, y la  $CE_{50}$  fue menor, lo cual pone de manifiesto la mayor potencia contráctil de ET-1 respecto de ET-3.

#### ***4.2.2. Respuesta a ET-1 tras incubación con L-NAME***

Tras la incubación con el inhibidor de la síntesis de NO, L-NAME ( $10^{-4}$  M), la respuesta contráctil inducida por ET-1 presentó un  $E_{m\acute{a}x}$  de  $1.780 \pm 284$  mg ( $109 \pm 11\%$  de la contracción inducida por KCl 50 mM), frente a un  $E_{m\acute{a}x}$  de  $1.549 \pm 262$  mg ( $99 \pm 7\%$  de la contracción inducida por KCl 50 mM) de las arterias control; no se evidencian diferencias significativas entre ambas. Por el contrario, el valor medio de  $CE_{50}$  ( $4,89 [2,75-8,71] \times 10^{-9}$  M) fue significativamente menor que el que se obtuvo en situación control ( $1,02 [0,87-1,2] \times 10^{-8}$  M) (Figura 8, Tabla 3).



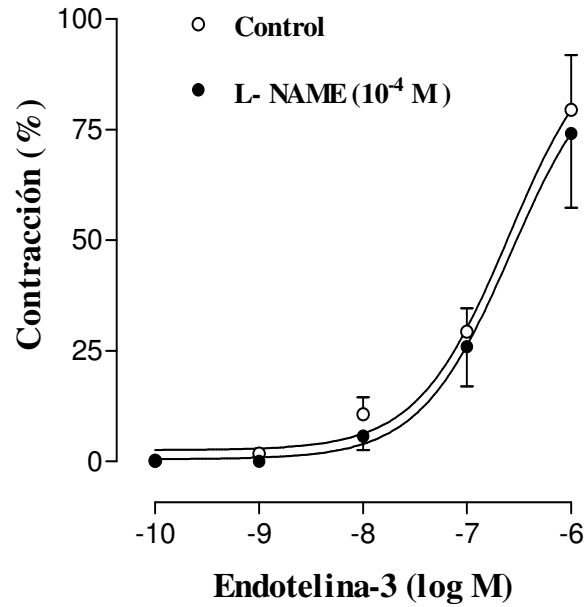
**Fig. 8:** Curvas concentración-respuesta de ET-1 en segmentos de arteria de placa corial, en situación control (n=24) y tras la incubación con L-NAME 10<sup>-4</sup> M (n=19). Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima alcanzada con KCl 50 mM y representan la media  $\pm$  EEM.

#### 4.2.3. Respuesta a ET-3 tras incubación con L-NAME

En las arterias coriales preincubadas con L-NAME (10<sup>-4</sup> M) la respuesta contráctil a ET-3 alcanzó un E<sub>máx</sub> de 1.300 $\pm$ 250 mg (74 $\pm$ 7% de la contracción inducida por KCl (50 mM), el cual no resultó significativamente diferente del obtenido en situación control. El valor medio de CE<sub>50</sub> fue de



$1,38(1,25-1,51)\times 10^{-7}$  M, el cual tampoco fue significativamente diferente del obtenido en situación control (Figura 9, Tabla 3).



**Fig. 9:** Curvas concentración-respuesta de ET-3 en segmentos de arteria de placa corial, en situación control (n=17) y tras la incubación con L-NAME (n=15). Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima alcanzada con KCl 50 mM y representan la media ± EEM.

**TABLA 3.** Valores de  $CE_{50}$  y  $E_{m\acute{a}x}$  de las curvas concentración-respuesta a ET-1 y ET-3 en arterias de placa corial, en situación control y tras incubación con L-NAME  $10^{-4}$  M.

	$CE_{50}$ (M)	$E_{m\acute{a}x}$ (%)	n
ET-1 Control	$1,02(0,9-1,22)\times 10^{-8}$	$99\pm 7$	24
ET-1+L-NAME	$4,89(2,75-8,71)\times 10^{-9}$ <sup>a</sup>	$109\pm 11$	19
////////////////////////////////////			
ET-3 Control	$8,91(5,50-14,4)\times 10^{-8}$ <sup>b</sup>	$80\pm 12$ <sup>c</sup>	17
ET-3+L-NAME	$1,38(1,25-1,51)\times 10^{-7}$	$74\pm 17$	15

Los valores de  $E_{m\acute{a}x}$  se han expresado como porcentaje de la contracción máxima que se produjo al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM, y representan la media  $\pm$  EEM.

Los valores de la  $CE_{50}$  se han expresado como media con sus intervalos de confianza al 95%.

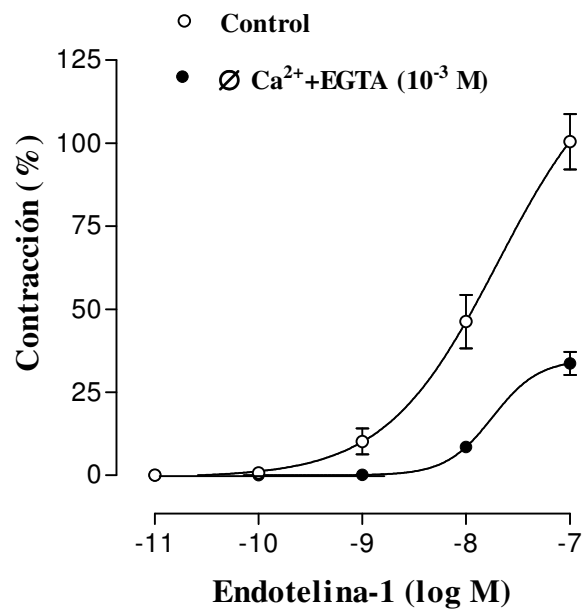
<sup>a</sup> Significativamente mayor que el correspondiente valor control,  $p < 0,05$ .

<sup>b</sup> Significativamente mayor del correspondiente valor de ET-1,  $p < 0,01$ .

<sup>c</sup> Significativamente menor del correspondiente valor de ET-1,  $p < 0,001$ .

#### ***4.2.4. Respuesta a ET-1 en medio libre de Ca<sup>2+</sup>***

La exposición a ET-1 de los segmentos arteriales previamente incubados en medio libre de Ca<sup>2+</sup>, produjo una respuesta contráctil cuyo valor medio de E<sub>máx</sub> fue de 1.285±214 mg (34±4% de la contracción previa inducida por KCl 50 mM). El valor medio de CE<sub>50</sub> fue de 1,34 (1,15-1,58)x10<sup>-8</sup> M. El análisis estadístico puso de manifiesto una reducción significativa en el E<sub>máx</sub> respecto al valor control, y un aumento significativo en la CE<sub>50</sub> (Figura 10, Tabla 4).



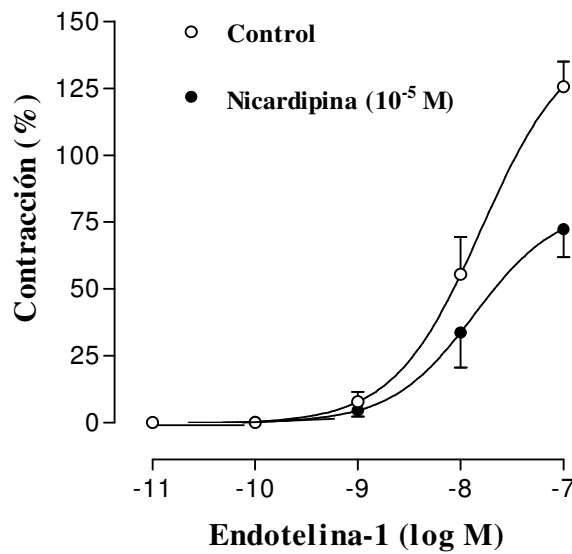
**Fig. 10:** Curvas concentración-respuesta de ET-1 en segmentos de arterias de placa corial, en situación control (n=31), y tras la incubación en ausencia de Ca<sup>2+</sup> (∅Ca<sup>2+</sup>) + EGTA (10<sup>-3</sup> M), (n=24). Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima alcanzada con KCl 50 mM y representan la media ± EEM.

#### 4.2.5. Respuesta a ET-1 en presencia del fármaco calcioantagonista, nicardipina

En arterias coriales preincubadas con el calcioantagonista nicardipina (10<sup>-5</sup> M), la respuesta contráctil inducida por ET-1 alcanzó un E<sub>máx</sub> de 1.173±156 mg (72±10% de la contracción

inducida por KCl 50 mM). El valor de  $CE_{50}$  es de  $7,9(5,6-11,0) \times 10^{-9}$  M (Figura 11, Tabla 4).

El análisis estadístico puso de manifiesto que la disminución en el  $E_{m\acute{a}x}$  es estadísticamente significativa respecto de la situación control ( $1.232 \pm 133$  mg equivalente a un  $125 \pm 9\%$  de la contracción inducida por KCl 50 mM). No se objetivan cambios significativos entre los valores de  $CE_{50}$  (Tabla 4).



**Fig. 11:** Curvas concentración-respuesta de ET-1 en segmentos de arterias de placa corial, en situación control ( $n=10$ ), y tras la incubación con el antagonista del  $Ca^{2+}$ , nicardipina ( $10^{-5}$  M,  $n=9$ ). Los datos se expresan como porcentaje de la tensión máxima alcanzada con KCl 50 mM y representan la media  $\pm$  EEM.

**TABLA 4.** Valores de  $CE_{50}$  y  $E_{m\acute{a}x}$  para ET-1 en arterias de placa corial en situaci3n control y tras incubaci3n en medio carente de  $Ca^{2+}$  ( $\emptyset Ca^{2+}$ ) o con nicardipina  $10^{-5}$  M.

	$CE_{50}$ (M)	$E_{m\acute{a}x}$ (%)	n
ET-1 control	$7(5-9)\times 10^{-9}$	$100\pm 10$	31
ET-1 + $\emptyset Ca^{2+}$	$1,34(1,15-1,58)\times 10^{-8}$ <sup>a</sup>	$34\pm 4$ <sup>b</sup>	24
////////////////////////////////////			
ET-1 control	$6,9(5-9,5)\times 10^{-9}$	$125\pm 9$	10
ET-1 + nicardipina	$7,9(5,60-11,0)\times 10^{-9}$	$72\pm 10$ <sup>c</sup>	9

Los valores de  $E_{m\acute{a}x}$  se han expresado como porcentaje de la contracci3n conseguida al despolarizar previamente los segmentos arteriales con KCl 50 mM, y representan la media  $\pm$  EEM. Los valores de la  $CE_{50}$  se han expresado como media con sus intervalos de confianza al 95%.

<sup>a</sup> Significativamente mayor que ET-1 control,  $p<0,05$ .

<sup>b</sup> Significativamente menor que ET-1 control,  $p<0,05$ .

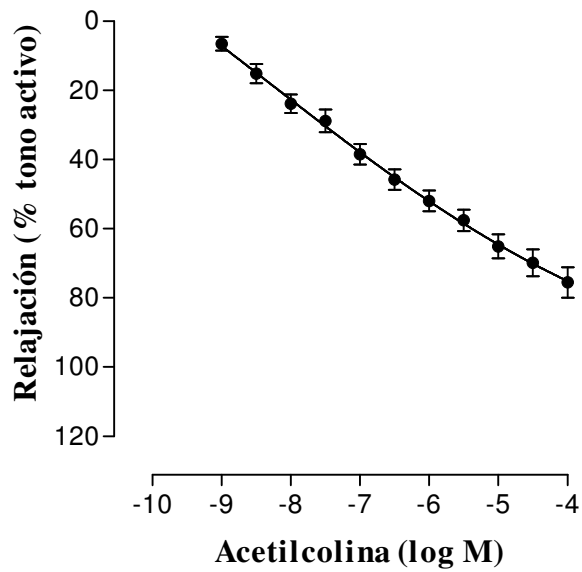
<sup>c</sup> Significativamente menor que ET-1 control,  $p<0,05$ .

### 4.3. RESPUESTA DE LAS ARTERIAS CORIALES A DISTINTOS VASODILATADORES

#### 4.3.1. Agonistas endotelio-dependientes: ACh

La adición al baño de órganos de una concentración única de ET-1 ( $10^{-7}$  M), produjo contracción mantenida de las arterias coriales (tono activo), cuya magnitud media fue de  $1.845 \pm 262$  mg. La adición de concentraciones crecientes de ACh ( $10^{-10}$ - $10^{-4}$  M) produjo relajaciones dependientes de la concentración, con un  $E_{\text{máx}}$  de  $1.348 \pm 173$  mg ( $76 \pm 4\%$  del tono activo inducido por ET-1  $10^{-7}$  M), y con una  $CE_{50}$  de  $9,56 (4,15-22) \times 10^{-8}$  M (Figura 12).

La adición al baño de órganos de una concentración única de  $PGF_{2\alpha}$  ( $10^{-5}$  M) produjo contracción mantenida de las arterias coriales (tono activo), cuya magnitud media fue de  $2.297 \pm 205$  mg. En estas condiciones no se objetivó efecto vasodilatador alguno con la exposición a ACh ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M). Con el fin de descartar la inviabilidad de los segmentos arteriales, en todos y cada uno de los experimentos se administró una concentración única de papaverina ( $10^{-4}$  M) al finalizar cada una de las series de concentraciones, observándose la rápida y completa relajación de dichos segmentos.



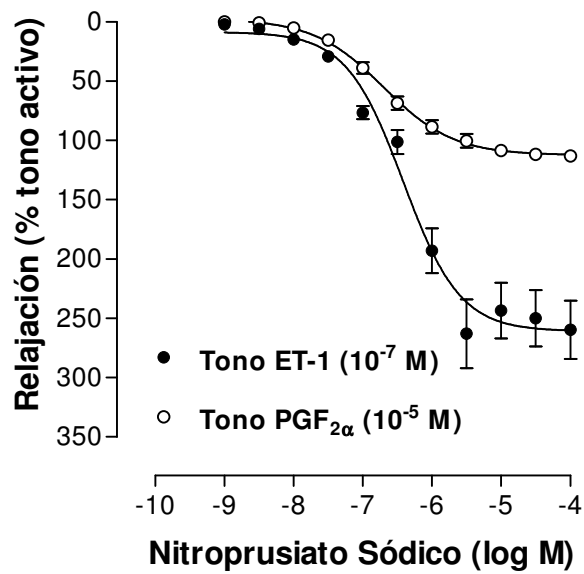
**Fig. 12.** Curva concentración-respuesta de ACh en segmentos de arterias de placa corial previamente contraídos con una concentración única de ET-1 ( $10^{-7}$ M), como tono activo, n=16. Los datos se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media  $\pm$  EEM.

#### 4.3.2. Agonistas endotelio-independientes

##### 4.3.2.1. Nitroprusiato Sódico

En las arterias de la placa corial la adición al baño de órganos de concentraciones crecientes de NPS produjo relajaciones de magnitud dependiente de la concentración.





**Fig. 13.** Curvas concentración-respuesta de NPS en segmentos de arterias de placa corial previamente contraídos con una concentración única de ET-1 ( $10^{-7}$  M) y de PGF<sub>2α</sub> ( $10^{-5}$  M) (tono activo), n=14 y n=21 respectivamente. Los datos se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media  $\pm$  EEM.

Precontrayendo con ET-1 ( $10^{-7}$  M), el  $E_{m\acute{a}x}$  fue de  $5.570 \pm 1.860$  mg ( $260 \pm 92$  % del tono activo que se alcanzó con ET-1  $10^{-7}$  M). El valor de la  $CE_{50}$  fue de  $1,95(1,18-3,32) \times 10^{-7}$  M (Figura 13).

Cuando la precontracción para alcanzar tono activo se indujo con PGF<sub>2α</sub>, el  $E_{m\acute{a}x}$  fue de  $3.556 \pm 390$  mg ( $113 \pm 4$  % del

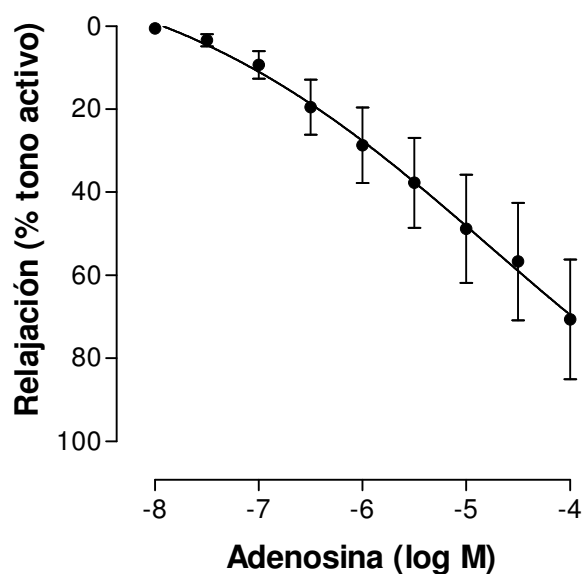
tono activo que se alcanzó precontrayendo con  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ). La  $\text{CE}_{50}$  fue de  $2,28 (1,59-3,26) \times 10^{-7} \text{ M}$  (Figura 13).

El análisis estadístico no reveló diferencias significativas al comparar los valores de  $\text{CE}_{50}$  de las respuestas a NPS respecto del tono activo inducido por ET-1 ó  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Las diferencias sí fueron significativas en lo referente al  $E_{\text{máx}}$  ( $p < 0.05$ ), siendo mayor para el tono activo con ET-1 (Tabla 5).

#### 4.3.2.2. Adenosina

La adición al baño de órganos de una concentración única de ET-1 ( $10^{-7} \text{ M}$ ), produjo contracción mantenida de las arterias coriales (tono activo), cuya magnitud media fue de  $1.106 \pm 169 \text{ mg}$ .

La adición al baño de órganos de una concentración única de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ( $10^{-5} \text{ M}$ ) produjo contracción mantenida de las arterias coriales (tono activo), cuya magnitud media fue de  $2.691 \pm 139 \text{ mg}$ .



**Fig. 14.** Curva concentración-respuesta de adenosina en segmentos de arterias de placa corial previamente contraídos con una concentración única de ET-1 ( $10^{-7}$  M) para tono activo (n=12). Los datos se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media  $\pm$  EEM.

En el estudio de la vasodilatación de las arterias coriales frente a la adición de concentraciones crecientes de adenosina con tono activo inducido por ET-1, la  $E_{m\acute{a}x}$  fue de  $650 \pm 105$  mg ( $70 \pm 14\%$  del tono activo que se alcanzó precontrayendo con ET-1  $10^{-7}$  M), con una  $CE_{50}$  de  $4,8(3,1-7,4) \times 10^{-6}$  M (Figura 14, Tabla 5).

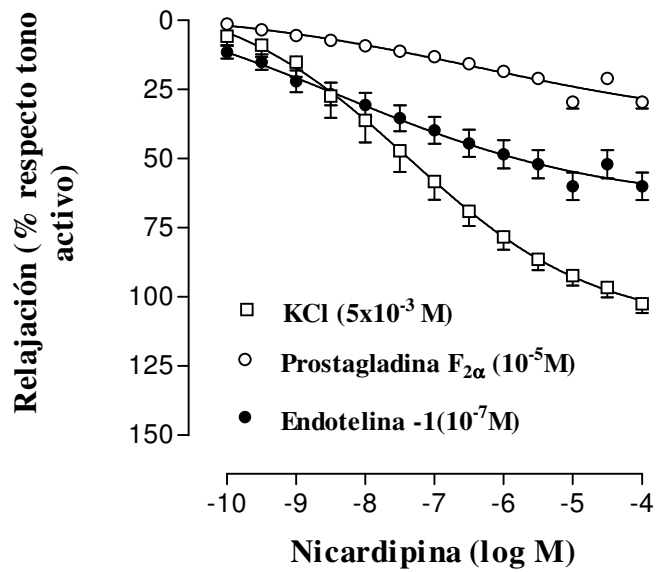
No se evidenció efecto vasodilatador alguno para la adenosina cuando el tono activo se indujo con  $\text{PGF}_{2\alpha}$ .

#### 4.3.2.3. Nicardipina

A efectos comparativos, en este apartado se presenta el efecto del calcioantagonista nicardipina ( $10^{-10}$ - $10^{-4}$  M) en presencia de tono activo inducido por cada uno de los estímulos contráctiles investigados: KCl ( $2.747\pm 292$  mg),  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ( $3.162\pm 210$  mg) y ET-1 ( $2.148\pm 279$  mg). En los tres casos se pusieron de manifiesto relajaciones dependientes de la concentración.

La respuesta con concentraciones crecientes de nicardipina frente a la contracción provocada por ET-1 ( $10^{-7}$  M), fue relajación de magnitud dependiente de la concentración, con un  $E_{\text{máx}}$  de  $1.269\pm 186$  mg ( $60\pm 5\%$  del tono que se alcanzó precontrayendo con ET-1); la  $CE_{50}$  fue de  $9,55 (3,44-27,1)\times 10^{-8}$  M (Figura 15, Tabla 5).

Cuando se estudió la respuesta arterial tras haber conseguido tono activo con  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ( $10^{-5}$  M), se obtuvo una relajación dependiente de concentración con un  $E_{\text{máx}}$  de  $1.366\pm 139$  mg ( $36\pm 2\%$  del tono que se alcanzó con  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ); la  $CE_{50}$  fue de  $8,32(2,98-23,7)\times 10^{-7}$  M (Figura 15, Tabla 5).



**Fig. 15:** Curvas concentración-respuesta de nicardipina en segmentos de arterias de placa corial. Los datos se expresan como porcentaje de la contracción alcanzada al precontraer con ET-1 (n=15), PGF<sub>2α</sub> (n=26) ó KCl (n=12), y representan la media ± EEM.

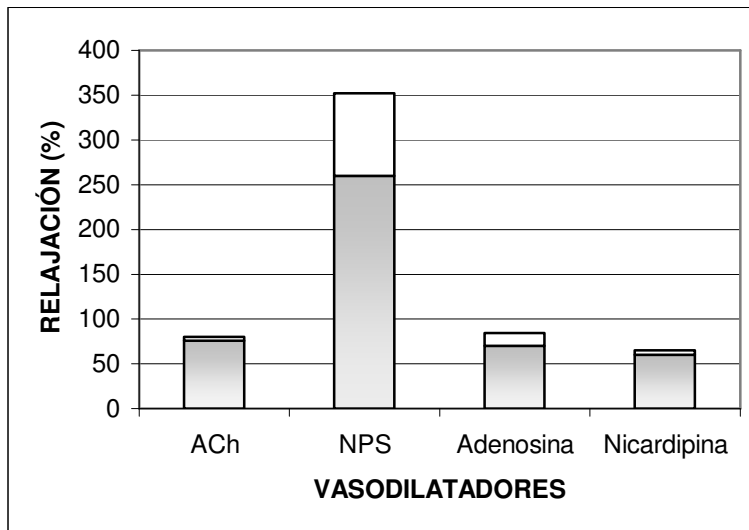
Por último se indujo contracción con KCl 50 mM, y la respuesta que se obtuvo con concentraciones crecientes del calcioantagonista fue de relajación, con un E<sub>máx</sub> de 2.849±318 mg (102±3% del tono activo que se alcanzó con KCl); la CE<sub>50</sub> fue de 4,9(2,7-8,7)×10<sup>-8</sup>M (Figura15, Tabla 5).

El orden de eficacia relajante de nicardipina atendiendo a los diferentes inductores de tono activo (comparación de los

$E_{m\acute{a}x}$ ) fue:  $KCl > ET-1 > PGF_{2\alpha}$ .

#### 4.3.2.4. Comparación entre los diferentes vasodilatadores

Puesto que ET-1 fue el único agente vasoconstrictor frente al cual todos los vasodilatadores investigados pusieron de manifiesto su efecto, resulta de interés la comparación entre la eficacia vasorrelajante de los mismos. Se aplicó el test de ANOVA seguido del test de Student-Newman-Keuls, evidenciándose el siguiente orden de eficacia entre los diferentes vasodilatadores:  $NPS > Ach = Nicardipina = Adenosina$  ( $p < 0,01$ ) (Figura 16).



**Fig. 16:** Respuestas vasodilatadoras de las arterias coriales humanas precontraídas con ET-1 ( $10^{-7}$  M). Los datos se expresan como porcentaje de relajación respecto del tono activo y se representan como media $\pm$ EEM.

**TABLA 5.** Valores de CE<sub>50</sub> y efecto máximo (E<sub>máx</sub>) para las curvas concentración-respuesta de los vasodilatadores en arterias de placa corial. Se han comparado para las distintas sustancias con las que se consigue el tono activo.

Estímulo	Tono activo	CE <sub>50</sub> (M)	E <sub>máx</sub> (%)	n
ACh	ET-1, 10 <sup>-7</sup> M	9,56(4,15-22)×10 <sup>-8</sup>	76±4	16
	PGF <sub>2α</sub> 10 <sup>-5</sup> M	~	~	~
NPS	ET-1, 10 <sup>-7</sup> M	1,95(1,18-3,32)×10 <sup>-7</sup>	260±92 <sup>a</sup>	14
	PGF <sub>2α</sub> 10 <sup>-5</sup> M	2,28(1,59-3,26)×10 <sup>-7</sup>	113±4	21
Adenosina	ET-1, 10 <sup>-7</sup> M	4,8(3,1-7,4)×10 <sup>-6</sup>	70±14	12
	PGF <sub>2α</sub> 10 <sup>-5</sup> M	~	~	~
Nicardipina	ET-1, 10 <sup>-7</sup> M	9,55(3,44-27,1)×10 <sup>-8</sup>	60±5 <sup>a</sup>	15
	PGF <sub>2α</sub> 10 <sup>-5</sup> M	8,32(2,98-23,7)×10 <sup>-7</sup>	36±2	26
	KCl 50 mM	4,9(2,7-8,7)×10 <sup>-8</sup>	102±3 <sup>b</sup>	12

Los valores de la E<sub>máx</sub> se han expresado como porcentaje del tono activo que se produjo tras la tensión activa con ET-1 (10<sup>-7</sup> M), PGF<sub>2α</sub> (10<sup>-5</sup> M) o KCl (50 mM), y se representan como media ± EEM. Los valores de la CE<sub>50</sub> se han expresado como media con sus intervalos de confianza al 95%.

<sup>a</sup> Significativamente mayor que PGF<sub>2α</sub> (10<sup>-5</sup> M), p<0,05.

<sup>b</sup> Mayor dilatación con nivel de significación de p<0,05 respecto de ET-1 y de p<0,01 respecto de PGF<sub>2α</sub>.

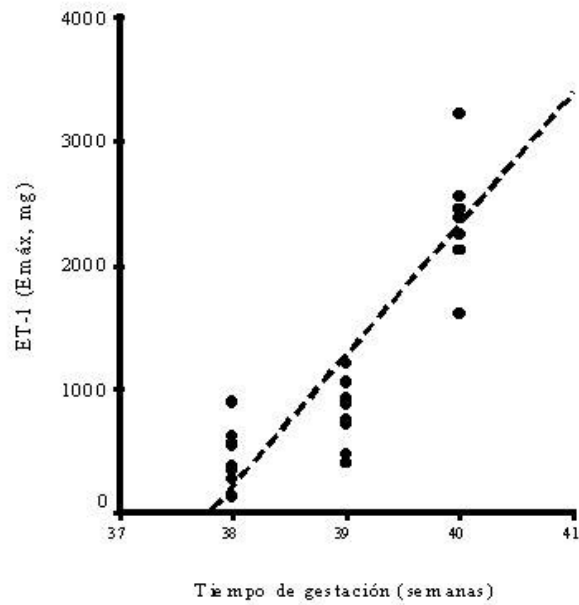


#### **4.4. ESTUDIOS DE CORRELACIÓN ENTRE LOS DATOS CLÍNICO-OBSTÉTRICOS Y LAS RESPUESTAS VASOMOTORAS DE LAS ARTERIAS CORIALES HUMANAS.**

Con el fin de determinar la posible influencia de factores obstétricos y neonatales sobre la respuesta de los vasos coriales, se llevaron a cabo los correspondientes análisis estadísticos entre las semanas de gestación, horas PAP, horas desde el parto hasta el inicio del experimento, peso de la placenta, peso del neonato y pH de arteria y vena de cordón umbilical, con respecto a los valores de  $CE_{50}$  y  $E_{máx}$  obtenidos para todos los estímulos investigados en las diferentes condiciones experimentales.

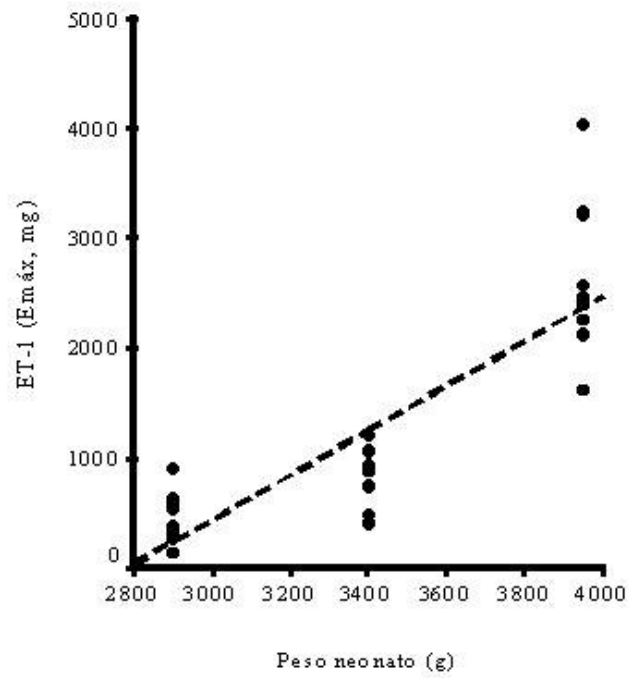
El análisis estadístico de las posibles correlaciones reveló la significación de cuatro de ellas:

1.- Tiempo de gestación vs  $E_{m\acute{a}x}$  de ET-1 en medio sin  $Ca^{+2}$  (Figura 17) ( $r=0.89$ ,  $p<0.001$ ,  $n=24$ ). Dicha correlación es positiva, lo cual indica que cuanto más prolongado es el tiempo de gestación, mayor es el efecto de la ET-1 en medio libre de  $Ca^{2+}$ .



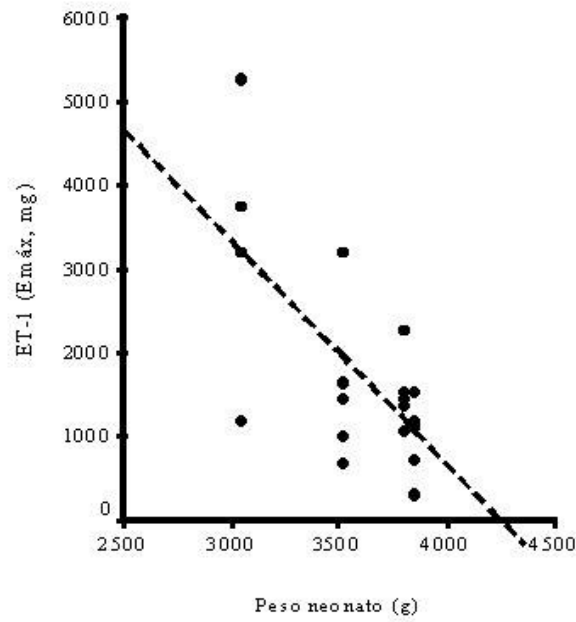
**Fig. 17:** Correlación entre el tiempo de gestación y el  $E_{m\acute{a}x}$  de ET-1 en medio libre de  $Ca^{2+}$ .

2.- Peso del neonato vs  $E_{m\acute{a}x}$  de ET-1 en medio sin  $Ca^{+2}$  (Figura 18) ( $r=0.85$ ,  $p<0.001$ ,  $n=24$ ). Dicha correlaci3n es positiva, lo cual indica que cuanto mayor es el peso del neonato, mayor es el efecto de la ET-1 en medio libre de  $Ca^{2+}$ .



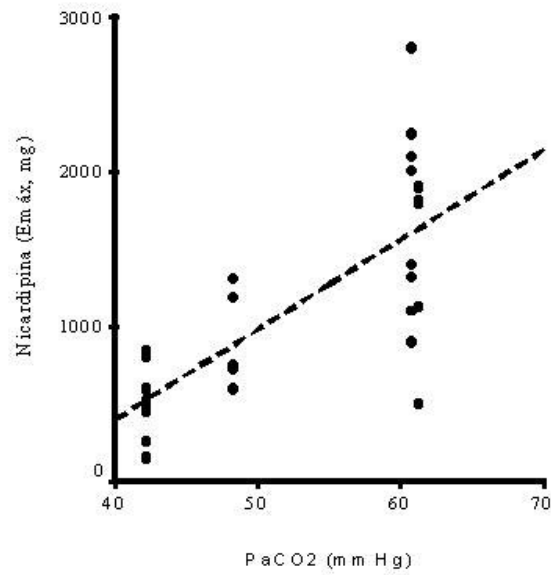
**Fig. 18:** Correlaci3n entre el peso del neonato y el  $E_{m\acute{a}x}$  de ET-1 en medio libre de  $Ca^{2+}$ .

3.- Peso del neonato vs  $E_{m\acute{a}x}$  de ET-1 en presencia de L-NAME (Figura 19) ( $r=-0.67$ ,  $p<0.005$ ,  $n=19$ ). Dicha correlaci3n es negativa, lo cual indica que cuanto mayor es el peso del neonato, menor es el  $E_{m\acute{a}x}$  de ET-1 en presencia de L-NAME.



**Fig. 19:** Correlaci3n entre el peso del neonato y el  $E_{m\acute{a}x}$  de ET-1 en presencia de L-NAME  $10^{-4}$  M.

4.-  $p\text{CO}_2$  en sangre de arteria umbilical vs  $E_{\text{máx}}$  de nicardipina en arterias precontraídas con  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Figura 20) ( $r=0.73$ ,  $p<0.001$ ,  $n=26$ ). Dicha correlación es positiva, lo cual indica que a mayor valor de  $p\text{CO}_2$ , mayor es el  $E_{\text{máx}}$  de nicardipina.



**Fig. 20:** Correlación entre la  $\text{PaCO}_2$  y el  $E_{\text{máx}}$  de nicardipina en situación de tono activo inducido por  $\text{PGF}_{2\alpha} 10^{-5}$  M.



# DISCUSIÓN

## 5.1. CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS

Las respuestas de la vasculatura feto-placentaria a diferentes agentes vasoactivos se han investigado generalmente *in vitro* utilizando anillos o tiras de vasos umbilicales (Breslin et al., 1993; Belfort et al., 1995), seguramente porque su disección y manipulación es más fácil a este nivel. Más recientemente se ha dirigido la atención hacia la función de los vasos de resistencia. A este respecto las investigaciones se han llevado a cabo utilizando lóbulos placentarios aislados y perfundidos en los que la variable objeto de estudio es la presión de perfusión (Walters y Boura, 1991) o anillos de vasos de pequeño calibre de placa corial en los que se registra bien la presión de perfusión o bien la tensión circunferencial (González-Panizza et al., 1981; Marín et al., 1989, 1990; Reviriego et al., 1990 b y c; MacCarthy et al., 1994; Zhang et al., 2001). Esta última aproximación es la que se ha seguido en el presente trabajo. Al igual que en los trabajos de MacCarthy y cols. (1994), se han utilizado ramas arteriales de segundo y, principalmente, tercer orden.

Se ha tenido especial cuidado en la selección de las placentas que iban a servir para la obtención de los segmentos

arteriales a utilizar. Se rechazaron aquellas en las que se encontró cualquier tipo de desviación respecto de los criterios preestablecidos: raza blanca (Carbonne et al., 1998), ausencia de patología materna (amenaza de parto prematuro, diabetes gestacional o pregestacional, alteraciones metabólicas, hipertensión arterial, vasculopatías, tratamientos médicos, etc.) y de anomalías durante la dilatación y el parto (líquido amniótico meconial, alteraciones en el cardiotocograma, sospecha de pérdida del bienestar fetal, valores de pH prepatológicos o patológicos, etc.).

Un factor de gran importancia es la tensión basal (pasiva) a la que deben ser sometidos los segmentos arteriales antes de registrar la respuesta a los agonistas objeto de estudio. Las referencias bibliográficas muestran un rango desde 1 a 4 g (Reviriego et al., 1990a,b,c; Bertrand et al., 1993; Omar et al., 1992), motivo por el cual se realizó un grupo de experimentos preliminares para determinar la tensión pasiva óptima. En nuestra preparación experimental esta tensión resultó ser de 2 g, con un tiempo medio de equilibrado de  $90\pm 15$  min. Condiciones similares se han establecido en las investigaciones de otros autores (Breslin et al., 1993; MacCarthy et al., 1994; Learmont y Poston, 1996).

Otra cuestión metodológica previa fue determinar si el almacenamiento de los vasos coriales para su posterior utilización pudiera afectar a su respuesta. La mayoría de los



autores utilizan vasos frescos en sus experimentos, con un máximo de demora de 6 h entre el parto y la realización del estudio (Bjoro y Spray-Pedersen, 1986; Marín et al., 1989, 1990; Reviriego et al., 1990a,b,c; Figueroa et al., 1990; Omar et al., 1993; Hanson et al., 1998; Abad, 1999). Merecen ser citadas las investigaciones de Abad (1999), en las que se hace especial hincapié en este aspecto. Este autor concluye que más allá de las 6 h la respuesta motora de los vasos placentarios se encuentra modificada. En el presente estudio se ha respetado por lo tanto dicho límite de 6 h desde el parto hasta la preparación de las arterias para los experimentos.

## **5.2. ANÁLISIS DE LAS RESPUESTAS VASOCONSTRICTORAS DE LAS ARTERIAS DE PLACA CORIAL**

### **5.2.1. Endotelina**

La ET es uno de los agentes constrictores más potentes en todos los lechos vasculares (Yanagisawa et al., 1988; Sakata et al., 1989), incluyendo los vasos uterinos (Fried y Samuelson, 1991; Bodelsson et al., 1992) y las arterias miometriales (Word et al., 1990; Fried et al., 1992). Durante la gestación la placenta

se convierte en la mayor fuente de producción de ET del organismo (Häkkinen et al., 1992). Se encuentra presente desde el primer trimestre, por lo que se presupone su participación en el desarrollo vascular feto-placentario (Le et al., 1993). Parece ser que también tiene un papel durante el trabajo de parto y el parto, ya que la oxitocina estimula la producción de ET (Usuki et al., 1990; Peri et al., 1992).

A pesar de su supuesta importancia en diferentes aspectos de la gestación, los trabajos en los que se ha investigado el efecto de la endotelina sobre los vasos coriales son escasos (McCarthy et al., 1994; Fried y Liu, 1994; Sand et al., 1998). La ET-1 es el tipo más abundante de ET en la circulación placentaria y también la más potente de las endotelinas (Myatt et al., 1992b). La bibliografía existente hasta el momento recoge trabajos de la acción de la ET-1 sobre cotiledones (Myatt et al., 1992a,b; Hanson et al., 1998) y sobre vasos umbilicales (Haegerstrand et al., 1989; Breslin et al., 1993). Para evaluar la posibilidad de que la ET pudiera actuar en la fisiología de la placenta participando del control del flujo sanguíneo, en el presente trabajo se han registrado los efectos de ET-1 sobre las arterias coriales.

Los resultados del presente estudio ponen de manifiesto un valor de  $CE_{50}$  para ET-1 en el rango nanomolar, concretamente de  $8,32 \times 10^{-9}$  M. El valor de  $E_{m\acute{a}x}$  fue superior al 100% de la contracción previa producida por KCl 50 mM.

En arterias utero-placentarias Sand et al. (1998) han obtenido una  $CE_{50}$  de  $2,6 \times 10^{-8}$  M; McCarthy et al. (1994) de  $1,45 \times 10^{-8}$  M con un  $E_{m\acute{a}x}$  que alcanza el 71%; y Fried y Liu (1994) informan que con ET-1 ( $10^{-7}$  M) se obtiene un  $E_{m\acute{a}x}$  del 60%. En cotiledones Myatt et al. (1992b) obtienen una  $CE_{50}$  de  $1,45 \times 10^{-8}$  M, y en arteria umbilical Breslin et al. (1993) obtienen una  $CE_{50}$  de  $1,2 \times 10^{-7}$  M. Comparativamente, nuestros resultados ponen de manifiesto un efecto vasoconstrictor de la ET-1 de mayor potencia que el obtenido en investigaciones previas.

Los niveles circulantes de ET durante el parto son marcadamente más altos en cordón umbilical que en sangre materna (Hemsen, 1991), y se encuentran en el rango nanomolar, rango en el que se sitúa el valor de  $CE_{50}$  obtenido en nuestros experimentos. Por lo tanto, durante el parto los vasos placentarios se encuentran expuestos a concentraciones de ET-1 capaces de ejercer un potente efecto vasoconstrictor. Este hecho apoya la sugerencia de que la ET-1 desempeña un papel destacado en la regulación del flujo sanguíneo placentario. Probablemente, el aumento excesivo de sus niveles objetivado durante la preeclampsia (Myatt, 1992; Boura et al., 1994; Carbonne et al., 1998), conllevara una reducción importante del aporte sanguíneo a la placenta.

Para determinar el subtipo de receptor (ET-A ó ET-B) que media la respuesta vasoconstrictora a ET-1, se registró la respuesta a ET-3 con el fin de establecer la potencia relativa entre ambos agonistas. El valor de CE<sub>50</sub> para ET-3 fue un orden de magnitud mayor que el de ET-1, concretamente de  $8,91 \times 10^{-8}$  M. Por lo tanto, la potencia vasoconstrictora de ET-3 es aproximadamente diez veces menor que la de ET-1. Estos resultados son compatibles con la activación de receptores del subtipo ET-A en las arterias coriales, cuya afinidad por la ET-1 es mayor que la que presentan por la ET-3. La razón de la mayor respuesta de la ET-1 respecto de la ET-3 quizá se encuentre en la distinta distribución de los receptores ET-A y ET-B: los receptores del subtipo ET-A se han identificado en la pared de los vasos placentarios (Rutherford et al., 1993; Mondon et al., 1993), mientras que los del subtipo ET-B están presentes con mayor densidad en el sistema vellositario.

### **5.2.2.- Interrelación ET/NO**

De acuerdo con Ferré (2001), una forma simplificada de comprender el tono vascular basal así como las consecuencias de su desequilibrio, es a modo de parejas antagónicas de sustancias derivadas del endotelio: TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub> y ET-1/NO. Centrándonos en la segunda pareja, otro de los objetivos del presente estudio fue evaluar la hipótesis de que la activación de

los receptores para ET-1 pudiera dar lugar a la liberación de NO, el cual podría a su vez, y siguiendo un circuito de retroalimentación negativa, tener un efecto inhibitor sobre la propia respuesta contráctil inducida por ET-1. Este hecho se ha puesto de manifiesto en otros lechos vasculares (Masaki, 1993; Alabadí et al., 1997; Cardillo et al., 2000). El NO se ha mostrado como el vasodilatador placentario por excelencia, atenuando las acciones de la ET y del TX (Myatt et al., 1992 a; Boura et al., 1994).

En presencia del inhibidor de la síntesis de NO, L-NAME, la respuesta contráctil a ET-1 resultó potenciada en tanto en cuanto el valor de  $CE_{50}$  fue significativamente menor, concretamente de  $4,89 \times 10^{-9}$  M. El resultado obtenido es compatible con la estimulación de la producción de NO cuando se activan los receptores para ET-1; el NO liberado limita a su vez la respuesta contráctil inducida por ET. Por el contrario, la respuesta vasoconstrictora inducida por ET-3 no resultó modificada por L-NAME, lo cual demuestra que el mecanismo descrito sólo opera con la activación de los receptores del subtipo ET-A para la ET-1. En arterias útero-placentarias Fried y Liu (1994) también han comparado la respuesta contráctil a ET-1 en presencia de L-NAME, y el resultado obtenido, al igual que en nuestros experimentos, es el aumento de la respuesta

contráctil. No obstante, estos autores expresan el resultado únicamente como  $E_{m\acute{a}x}$  sin especificar la  $CE_{50}$ , y obtienen un  $E_{m\acute{a}x}$  del 90%. El valor de  $E_{m\acute{a}x}$  obtenido en nuestros experimentos no se vió significativamente modificado respecto del control, y en todo caso superó el 100% de la contracción previa producida por KCl 50 mM.

### 5.2.3.- Participación del $Ca^{2+}$ en la respuesta a ET-1

El tono vascular basal resulta de la integración de las acciones contráctiles y relajantes de los distintos agentes liberados en las inmediaciones del músculo liso vascular, bien de origen endotelial o humoral. La contracción del músculo liso se genera en última instancia por movimientos de  $Ca^{2+}$  (Jiang y Stephens, 1994; Tresguerres, 1999). Uno de los objetivos del presente estudio ha sido determinar hasta qué punto la respuesta contráctil de los vasos coriales a ET-1 depende del  $Ca^{2+}$ . Con este fin se ha registrado la respuesta contráctil a este agonista en medio sin  $Ca^{2+}$  y en presencia del calcioantagonista nicardipina.

Los resultados del presente estudio ponen de manifiesto que la respuesta contráctil a ET-1 resulta inhibida en gran medida en un medio carente de  $Ca^{2+}$  ( $E_{m\acute{a}x}$  del 34% frente al

100% en medio normal). Por lo tanto, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, con el consiguiente incremento de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , es un importante mecanismo mediador de la respuesta contráctil a ET-1 en las arterias coriales. A la vista de nuestros resultados podemos estimar que en las arterias de placa corial alrededor del 66% de la respuesta máxima a ET-1 depende de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular.

Del análisis de la bibliografía revisada por Fried y Liu (1994) se sugiere que la ET podría ser un agonista endógeno de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L, y por lo tanto parte de la respuesta provocada por la ET podría estar mediada por la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular o como consecuencia de la movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado en el retículo sarcoplásmico. Este último mecanismo se ha comprobado en músculo liso de arterias coronarias y de aorta (Miasiro et al., 1988; Wagner-Mann et al., 1991). Por el contrario, Sakata y Karkaki (1992) no evidencian liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular inducida por ET en músculo liso miométrial de rata.

Se completa la investigación de este apartado con el estudio del comportamiento arterial en presencia del bloqueador de los canales de calcio, nicardipina. El  $E_{\text{máx}}$  de la ET-1 se

reduce en un 39%, y aunque el menor efecto constrictor de la ET-1 es estadísticamente significativo, el efecto inhibitorio de la potencia vasoconstrictora de la ET-1 es más acusado en un medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo cual sugiere la posible intervención de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  del tipo no-L en la respuesta a ET-1. Por lo que sabemos, ningún autor ha investigado la respuesta a ET-1, a pesar de que esta sustancia se ve involucrada en la fisiología de una patología tan importante como es la preeclampsia.

### **5.3. ESTUDIO DE LAS RESPUESTAS VASODILATADORAS DE LAS ARTERIAS DE LA PLACA CORIAL**

La gestación normal se asocia con un predominio de influencias vasodilatadoras, tanto en la circulación materna como en la fetal (Boura et al., 1991 y 1994; Poston et al., 1995). Estados hipertensivos durante la gestación se asocian a una vasoconstricción generalizada que afecta a la circulación feto-placentaria. La etiología de la preeclampsia parece ser multifactorial, aunque su inicio coincide con una placentación anormal, con invasión deficiente de las arterias espirales del miometrio por parte del trofoblasto, lo cual



impide la instauración de una circulación materno-fetal adecuada y determina la hipoperfusión placentaria con aumento de las resistencias vasculares y disfunción del endotelio vascular (Beaufils, 2002). Con la preeclampsia establecida se produce un desequilibrio a favor de la producción de factores vasoconstrictores respecto de los vasodilatadores, principalmente en lo que se refiere a la ET-1 y al NO (Carbonne et al., 1998; Khendun et al., 2002; Schiff et al., 1992 y 1993), que en la clínica se traduce en hipertensión materna con posibilidad de alteración de las funciones renal y hepática, así como de la hemostasia. En este apartado se ha investigado la respuesta de los vasos de resistencia placentarios frente a diversas sustancias vasodilatadoras, en situación de incremento del tono vascular inducido con concentraciones únicas de KCl (50 mM),  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ( $10^{-5}$  M) y ET-1 ( $10^{-7}$  M).

Al igual que ocurre con los estímulos vasoconstrictores, las referencias bibliográficas acerca de sustancias vasodilatadoras y las respuestas que éstas provocan en vasos coriales son escasas. En estudios con lóbulos placentarios se ha observado que los vasos vellosos precontractados con U46619, un análogo del  $\text{TXA}_2$ , responden con vasodilatación a nitroglicerina (Walters y Boura, 1991), ácido araquidónico,  $\text{PGI}_2$ , 6-ceto  $\text{PGE}_1$  y  $\text{PGE}_1$  (Mak et al., 1984; Howard et al.,

1986), y teofilina (Nielsen-Kudsk, 1985). De igual modo, mediante perfusión placentaria y precontrayendo con angiotensina, se han registrado efectos vasodilatadores con histamina y PGI<sub>2</sub> (Maguire et al., 1985; Howard et al., 1987; Soares de Moura, 1987), así como con isoprenalina y terbutalina (Soares de Moura, 1981). El VIP produce vasodilatación (Maigaard, 1986). Los vasos umbilicales precontraídos también responden con vasodilatación a estímulos como prostaciclina, nitroprusiato sódico, verapamil y VIP (Bjøro y Stray-Pedersen, 1986; Mak et al., 1984; Maigaard, 1987).

En el presente trabajo se han utilizado como agentes constrictores para inducir tono activo KCl (50 mM), PGF<sub>2α</sub> (10<sup>-5</sup> M) y ET-1 (10<sup>-7</sup> M), y se han registrado las respuestas a vasodilatadores de distinta naturaleza: dependientes de endotelio como ACh (agonista endógeno), e independientes de endotelio como adenosina (agonista endógeno), SNP (dador de NO sintético) y nicardipina (calcioantagonista sintético).

Respecto de la respuesta alcanzada con los vasoconstrictores, se puede establecer el siguiente orden de potencia según el nivel de contracción medio alcanzado: PGF<sub>2α</sub> > ET-1 = KCl. Es decir, el tono activo medio alcanzado mediante activación de receptores (PGF<sub>2α</sub>) es de mayor

magnitud que el alcanzado por despolarización de membrana (KCl), también hay que señalar que en términos absolutos se alcanza mayor contracción media con ET-1 que con KCl, aunque la diferencia no es estadísticamente significativa.

No hay ningún trabajo en vasos placentarios que compare la potencia relativa de contracción en relación a su mecanismo de actuación a nivel del músculo liso vascular. En los trabajos revisados se utiliza KCl al inicio del experimento para comprobar la viabilidad arterial y como medida de referencia posterior a la hora de calcular el porcentaje de contracción o relajación de las distintas sustancias utilizadas respecto del tono activo. Sorprende que a pesar de la implicación que parece tener la ET-1 no sólo en el mantenimiento del tono vascular en condiciones fisiológicas sino también en la génesis y mantenimiento de la preeclampsia, no exista hasta el momento ningún trabajo que determine el comportamiento de los vasos de resistencia frente a sustancias vasodilatadoras cuando dichos vasos se encuentran bajo el estímulo contráctil de la ET-1.

### 5.3.1.- Acetilcolina

La ACh relaja la fibra muscular lisa afectando al tono vascular, acción mediada por la liberación de NO desde el endotelio. A su vez, el NO provoca la relajación del músculo liso vascular mediante la activación de la guanilato ciclasa soluble y el aumento en los niveles intracelulares de GMPc (Moncada et al., 1991). Nuestros resultados ponen de manifiesto una respuesta dilatadora por acción de la ACh que llega a ser de un 76% respecto de la contracción alcanzada con ET-1. Por el contrario, en presencia de tono activo inducido con PGF<sub>2α</sub>, la ACh no ejerce efecto relajante alguno. Puesto que la adenosina muestra este mismo comportamiento, su posible explicación se discute conjuntamente más adelante.

Como ya se ha reseñado, la placenta y los vasos umbilicales no presentan inervación autonómica, y por lo tanto cabría esperar que un neurotransmisor como la ACh no tuviera influencia sobre la función de los mismos. Sin embargo, todos los autores parecen coincidir en la presencia de ACh en placenta y vasos umbilicales a pesar de la falta de inervación de estas estructuras. La mayor parte de los autores llegan a la conclusión de que a pesar de que la ACh está presente en grandes cantidades en la placenta, no contribuye al control vascular (Boura et al., 1986; Walters y Boura, 1991; Svane et al., 1992).

Se han estudiado los efectos de la ACh (Panigel, 1959), pero las altas concentraciones endógenas parecen enmascarar los efectos de la administración exógena. Boura et al. (1986) no encuentran evidencias de que la ACh modifique las respuestas vasoconstrictoras en vasos umbilicales. Myatt et al. (1992) utilizando cotiledones, y MacCarthy et al. (1994) utilizando arterias de placa corial, tampoco encuentran efecto sobre la presión de perfusión.

Se sugiere que la ACh no neuronal juega un papel en la regulación de los procesos de transporte de membrana, en los mecanismos que controlan el paso transplacentario de aminoácidos y electrolitos, así como en la liberación de las hormonas placentarias (Sastry y Sadavongvivad, 1979; Stabile et al., 1989). Se sabe que los niveles de ACh dependen de la integridad del sincitiotrofoblasto, pudiendo ser afectados por cambios endocrinos e inmunológicos y por procesos patológicos. La producción de ACh se reduce en la preeclampsia. También puede estar involucrada en mecanismos asociados al desencadenamiento del parto, ya que se ha observado un descenso de sus niveles en sangre materna durante esta fase (Brennecke et al., 1988).

Sin embargo, se ha descrito relajación independiente de endotelio en respuesta a ACh en placenta y en vasos umbilicales

(Xie y Triggle, 1994). A la vista de sus resultados, estos autores postulan un “nuevo” modelo de regulación del flujo sanguíneo respecto de la ACh, la cual activaría el enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, y/o a través de canales de  $\text{K}^+$ . El enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa es un enzima de membrana responsable del intercambio celular de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . Su actividad controla el potencial de membrana de las células del músculo liso vascular, afectando los niveles intracelulares de  $\text{Na}^+$ , la disponibilidad de  $\text{Ca}^{2+}$  para los mecanismos contráctiles, el tono vascular o la reactividad a estímulos vasoactivos. La actividad de este enzima aumenta durante la gestación tanto en los eritrocitos maternos como en los fetales, y en el músculo liso vascular (Ezimokhai et al., 1993).

Se ha sugerido que este aumento de actividad puede contribuir a la disminución de la resistencia vascular periférica que se produce durante la gestación, gracias a la estabilización de las membranas celulares del músculo liso (Ezimokhai et al., 1993). Así, la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en el músculo liso vascular placentario y las células endoteliales puede contribuir de forma importante al mantenimiento de la baja resistencia vascular, como lo demuestra la gran vasoconstricción que se produce cuando su función es bloqueada por la ouabaína (Bertrand et al., 1993).

Nuestros resultados permiten afirmar que la ACh tiene un efecto relajante en arterias de placa corial, si bien la existencia de dicho efecto depende del agente inductor del tono activo.

### **5.3.2.- NPS**

El NO, potente vasodilatador sistémico producido continuamente por las células endoteliales ejerce, junto con la PGI<sub>2</sub>, una función fundamental en la resistencia vascular y la coagulación (Gude et al., 1990; Moncada, 1991; Myatt et al., 1991 y 1992b). El NO se considera actualmente el más importante factor endógeno en la regulación del flujo placentario (Gude et al., 1990; Boura y Walters, 1991; Boura et al., 1994; Izumi et al., 1995). Sabemos que la reducción de la producción de NO puede contribuir a patologías gestacionales tan importantes como el RCIU y la preeclampsia (Pinto et al., 1991).

Los efectos biológicos del NO son de corta duración puesto que su gran inestabilidad le lleva a combinarse con el oxígeno y metaloproteínas. Su vida media en solución acuosa es tan sólo de unos segundos. Se ha identificado la NO sintetasa en

las vellosidades placentarias (Myatt et al.,1992b). Estudios inmunohistoquímicos han demostrado que la NO sintetasa se localiza en cantidades relativamente grandes en el endotelio de los vasos de resistencia placentarios, y que está virtualmente ausente en el endotelio de los capilares donde no hay músculo liso (Myatt et al., 1993; Moncada et al., 1991).

El NO es también el mediador activo de una serie de compuestos usados en la clínica diaria y a los que de forma genérica se les denomina nitrovasodilatadores. En el presente trabajo se han investigado los efectos de uno de ellos: NPS. Los resultados ponen de manifiesto una respuesta vasodilatadora de gran magnitud, tanto si el tono activo se indujo con  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ( $E_{\text{máx}}$  del 113%) como con ET-1 ( $E_{\text{máx}}$  del 260%).

Dos grupos de trabajo han estudiado la respuesta a los nitrovasodilatadores. González et al. (1997) demuestran que los vasos placentarios tanto de mujeres sanas como de mujeres con preeclampsia presentan una sensibilidad semejante frente a los nitrovasodilatadores, registrando relajaciones cercanas al 100%. Estos autores concluyen que si lo que prima en la preeclampsia es una disfunción endotelial, los dadores del NO podrían ser de utilidad terapéutica en este trastorno.

Por otra parte, Zhang et al. (2001) estudian la vasorrelajación frente a distintos dadores de NO en placentas de



mujeres sanas, concluyendo que el NPS, junto con la nitroglicerina, son los nitrovasodilatadores más potentes. Los experimentos se realizan en condiciones de alta y baja presión de oxígeno, registrándose relajaciones que sobrepasan el 100% del tono activo. Los autores recaban información contradictoria respecto al uso de nitrovasodilatadores en el control de la tensión arterial materna y en la mejora del flujo feto-placentario. Existen varios estudios en los que se usan dadores de NO y en los que se aprecia la mejora del cuadro materno sin afectación para el feto (Ramsay et al., 1994; Lees et al., 1998; Oyelese et al., 1998). Byrne et al. (1997), por el contrario, advierten de que el uso de nitroglicerina en la gestación puede interferir en la regulación local de las concentraciones de NO placentario, y subsiguientemente en el equilibrio de flujos materno-fetales con detrimento del transporte de oxígeno al feto. Se concluye que se necesitan nuevos estudios que examinen los efectos de los dadores de NO a nivel placentario.

Los datos expuestos hasta el momento indican que las arterias de la placa corial presentan una pobre o nula dilatación endotelio-dependiente, pero los efectos del SNP demuestran que el músculo liso tiene la capacidad de responder siguiendo la vía del NO.

### 5.3.3.- Adenosina

La adenosina es un metabolito regulador del flujo en diferentes órganos, en los que actúa como vasodilatador incrementando la perfusión. La placenta presenta mecanismos de síntesis y metabolización de la adenosina, especialmente en situaciones de hipoxia (Irestedt et al., 1989), y en la placenta a término se encuentra el nucleósido en concentraciones significativas. Estas evidencias sugieren que la adenosina podría jugar un papel regulador en la función placentaria (Maguire et al., 1985).

En las condiciones experimentales establecidas en el presente trabajo no se han registrado variaciones significativas del tono activo inducido por  $\text{PGF}_{2\alpha}$  en los segmentos arteriales expuestos a concentraciones crecientes de adenosina. Sí se logra respuesta vasodilatadora cuando el tono activo es inducido con ET-1, alcanzándose un  $E_{\text{máx}}$  del 70%.

Las investigaciones acerca de los efectos de la adenosina sobre la circulación feto-placentaria son escasas y los resultados en ocasiones contradictorios. En estudios realizados en vasos umbilicales y coriónicos se ha objetivado un efecto bifásico:

vasoconstricción inicial seguida de relajación mantenida. Por el contrario, también se ha descrito que la arteria umbilical es relativamente resistente a los efectos vasodilatadores de la adenosina y del nitrito sódico (White, 1989). En estudios de perfusión placentaria *in vitro* la adenosina produce vasoconstricción en presencia de bajas tensiones de oxígeno y vasodilatación a altas tensiones de oxígeno (Read et al., 1995). Únicamente Reviriego et al. (1990a) han investigado la acción de la adenosina y sus receptores en el sistema vascular placentario, concretamente en vasos coriónicos obtenidos en el punto de inserción del cordón umbilical. El tono activo se indujo con KCl (75 mM) o con  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ( $10^{-6}$  M), y en ambos casos se obtuvo respuesta vasodilatadora. En dicho estudio se llega a la conclusión de que existe una población similar de receptores  $A_1$  y  $A_2$  en vasos coriónicos, cuya activación induce relajación secundaria al bloqueo de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ .

El hallazgo experimental de que ni ACh ni adenosina fueran capaces de relajar las arterias coriales previamente contraídas con  $\text{PGF}_{2\alpha}$  merece una consideración detallada. Para intentar explicar dicho hallazgo es preciso tener en cuenta el mecanismo de acción de los tres agonistas implicados.

La  $\text{PGF}_{2\alpha}$  es uno de los cinco prostanoideos básicos liberados durante el metabolismo del ácido araquidónico. La participación de los prostanoideos en procesos tan importante

como la inflamación, la agregación plaquetaria y la vasomotricidad se lleva a cabo mediante su unión a receptores específicos. Hasta el momento se han descrito siete tipos de receptores para prostanooides que se agrupan en tres categorías: a) receptores IP, EP<sub>2</sub>, EP<sub>4</sub> y DP, que median relajación estimulando la producción de AMPc; b) receptores TP, EP<sub>1</sub> y FP, que median contracción incrementando la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>; y c) receptores EP<sub>3</sub>, que inhiben el enzima adenilato ciclasa. La PGF<sub>2α</sub> se une a receptores contráctiles del tipo FP, si bien dicha unión no es selectiva y se ha demostrado que la PGF<sub>2α</sub> también puede unirse a receptores EP<sub>1</sub> y EP<sub>3</sub> (Bos et al., 2004).

Por lo que respecta a la circulación feto-placentaria, estudios farmacológicos con agonistas y antagonistas sugieren la existencia de receptores TP (activados por tromboxanos) y FP (activados por prostagandinas F) que median la respuesta contráctil de la vena umbilical humana (Daray et al., 2003). Por el contrario, en otras investigaciones en las que se ha utilizado la arteria umbilical humana, se ha llegado a la conclusión de que la PGF<sub>2α</sub> activa receptores de tipo TP, cuestionándose la existencia de receptores FP en este lecho vascular (Boersma et al., 1999).

Sea cual fuere el receptor activado por PGF<sub>2α</sub>, parece evidente que este agonista desencadena determinadas cascadas de señalización, entre las que se encuentra la activación de la fosfolipasa C y subsiguiente liberación intracelular de Ca<sup>2+</sup> y

activación de la proteína quinasa C, la cual a su vez activa la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (“mitogen-activated protein kinases”, MAPK). En resumen, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular no parece estar implicada en la respuesta contráctil a  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . De hecho, en nuestro laboratorio se ha demostrado que la respuesta de la arteria cerebral humana a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  no se modifica en medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo cual apoya dicha suposición (Alborch et al., 1992). Por lo tanto, si un agonista desarrolla su efecto relajante interfiriendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, parece lógico que si el tono activo no depende de dicha entrada la mencionada respuesta relajante no se produzca. Este podría ser el caso de la ausencia de respuesta relajante de las arterias coriales precontraídas con  $\text{PGF}_{2\alpha}$  frente a ACh y adenosina. Reviriego et al. (1990 a), utilizando vasos coriónicos obtenidos en el punto de inserción del cordón umbilical, llegan a la conclusión de que existen receptores específicos para la adenosina cuya activación induce relajación secundaria al bloqueo de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### **5.3.4.- Nicardipina**

Los antagonistas del  $\text{Ca}^{2+}$  producen vasodilatación generalizada, aunque según el tipo actúan con mayor especificidad en unos tejidos que en otros. Las dihidropiridinas ejercen su acción principalmente sobre el músculo liso vascular, bloqueando los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. El efecto vasodilatador se produce especialmente en los vasos de resistencia.

Las dihidropiridinas se utilizan durante la gestación como tratamiento para inhibir contracciones en amenazas de parto prematuro y en la preeclampsia en un intento de controlar tensiones arteriales. No se ha profundizado en la repercusión de este tipo de fármacos sobre los vasos coriales. Este es el objetivo del presente apartado.

La nicardipina, calcioantagonista del grupo de las dihidropiridinas, produjo un grado significativo de relajación en arterias coriales, siendo la respuesta de diferente magnitud en función de la sustancia utilizada para obtener el tono activo: cuando la precontracción se indujo con KCl se obtuvo una respuesta que alcanzó el 130% del tono activo; cuando se indujo con ET-1 el 60%; y cuando se indujo con  $\text{PGF}_{2\alpha}$  el 29%. Estos resultados son coherentes con la dependencia que las arterias

coriales presentan respecto del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular para desarrollar la contracción durante la exposición a ET-1.

Estos hallazgos sugieren que los canales voltaje-dependientes activados por  $\text{K}^+$  son más sensibles a los calcioantagonistas que los canales dependientes de receptor, al igual que ocurre a nivel sistémico. Las contracciones inducidas por despolarización de membrana (KCl) dependen de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (voltaje-dependientes), mientras que las inducidas por la activación de receptores dependen en mayor medida del  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado en el retículo sarcoplásmico, y por lo tanto el bloqueo de los canales de membrana influye en menor proporción.

Marín y Reviriego (1989) estudian el efecto de la nicardipina en la placenta humana, concluyendo que la nicardipina induce vasodilatación de gran magnitud y que su actuación tiene lugar preferentemente sobre canales dependientes de voltaje. Los autores utilizan  $\text{K}^+$  y 5-HT para inducir vasoconstricción. El protocolo seguido difiere del utilizado en el presente trabajo ya que la nicardipina se añade al baño de órganos con anterioridad a la exposición al vasoconstrictor. El mismo protocolo ha sido utilizado para otros dos calcioantagonistas como nifedipina y diltiazem (Marín et al., 1990; Reviriego et al., 1990 c), llegando a las mismas

conclusiones. Fried y Liu (1994) examinan el comportamiento arterial placentario a ET-1 y 5-HT en presencia de nifedipina y diltiazem, y en ambos la respuesta vasoconstrictora se ve atenuada.

#### **5.4. CORRELACIÓN ENTRE REACTIVIDAD ARTERIAL Y DATOS CLÍNICO-OBSTÉTRICOS**

Con el fin de determinar la posible influencia de factores obstétricos y neonatales sobre la respuesta de los vasos coriales, se llevaron a cabo los correspondientes análisis estadísticos entre las semanas de gestación, horas PAP, tipo de anestesia utilizada, vía de finalización del parto, sexo del recién nacido, horas desde el parto hasta el inicio del experimento, peso de la placenta, peso del neonato y equilibrio ácido base de arteria y vena de cordón umbilical, con respecto a los valores de  $CE_{50}$  y  $E_{máx}$  obtenidos para todos los estímulos investigados en las diferentes condiciones experimentales.

Los análisis demuestran que no existen diferencias significativas cuando se consideran el sexo del recién nacido y el tipo de anestesia utilizada: local, peridural o general. En cuanto a la vía de finalización del parto (vaginal o por cesárea), la bibliografía revisada no le atribuye, en general, especial importancia en cuanto a su influencia sobre la reactividad



vascular, siempre y cuando se tenga especial cuidado en la manipulación durante la extracción de la placenta cuando se trate de una cesárea (Kingdom et al., 1993; George et al., 1995; Abad, 1999). Nuestros resultados coinciden con los de estos autores en tanto en cuanto las respuestas vasculares no son diferentes entre los vasos procedentes de cesáreas y los procedentes de partos vaginales.

Sin embargo, se observaron funciones de regresión lineal estadísticamente significativas en cuatro casos: 1) tiempo de gestación vs  $E_{máx}$  de ET-1 en medio sin  $Ca^{+2}$  (correlación positiva); 2) peso del neonato vs  $E_{máx}$  de ET-1 en medio sin  $Ca^{+2}$  (correlación positiva); 3) peso del neonato vs  $E_{máx}$  de ET-1 en presencia de L-NAME (correlación negativa); y 4)  $pCO_2$  en sangre de arteria umbilical vs  $E_{máx}$  de nicardipina en arterias precontractadas con  $PGF_{2\alpha}$  (correlación positiva). La interpretación de estas correlaciones se expone a continuación.

Si se consideran el tiempo de gestación y el peso del neonato como parámetros indicativos de madurez fetal, resulta evidente que cuanto mayor es dicha madurez, menor es la dependencia que la respuesta a ET-1 muestra respecto de la entrada de  $Ca^{2+}$  (la diferencia entre las respuestas a ET-1 en medio normal y libre de  $Ca^{2+}$  se hace menor). Dicho de otro modo, en la fase final del embarazo se produce una

redistribución de las fuentes de  $\text{Ca}^{2+}$  necesario para que se desarrolle la contracción inducida por ET-1, a favor de su liberación desde los depósitos intracelulares. Por otra parte, a medida que el feto es más maduro (mayor peso del neonato), el mecanismo de inhibición de NO sobre ET-1 adquiere mayor relevancia (la diferencia entre las respuestas a ET-1 en situación control y en presencia de L-NAME se hace mayor). Por último, la respuesta relajante de nicardipina en arterias precontraídas con  $\text{PGF}_{2\alpha}$  es mayor cuanto mayor es el valor de  $\text{pCO}_2$  en sangre de arteria umbilical. Por lo que sabemos, no existen trabajos previos en los que se hayan tenido en cuenta estos aspectos, y por lo tanto no se pueden establecer comparaciones. La significación funcional de estas evidencias obtenidas a partir del análisis estadístico está por determinar y de momento está sujeta necesariamente a la especulación. Se hacen necesarias investigaciones adicionales para establecer hasta qué punto nuestras observaciones pudieran ser relevantes en la fisiología de la circulación feto-placentaria.

## CONCLUSIONES

1.- Las arterias coriales humanas exhiben una potente respuesta contráctil cuando se exponen a ET-1. El hecho de que el valor de  $CE_{50}$  se encuentre en el mismo rango que los niveles de ET-1 en cordón umbilical durante el parto, apoya la participación de ET-1 en la regulación del flujo sanguíneo fetoplacentario en la fase final del embarazo.

2.- La respuesta contráctil de las arterias coriales humanas a ET-1 se produce tras la activación de receptores específicos del tipo ET-A.

3.- La exposición de las arterias coriales humanas a ET-1 desencadena un mecanismo de retroalimentación negativa, en virtud del cual la activación de los receptores ET-A induce la liberación de NO el cual, a su vez, ejerce un efecto inhibitor sobre la respuesta a ET-1.

4.- La respuesta contráctil de las arterias coriales humanas a ET-1 muestra gran dependencia del  $Ca^{2+}$ , cuyo flujo desde el medio extracelular a través de canales selectivos resulta decisivo para la contracción del músculo liso vascular. Aunque en menor medida, la liberación de  $Ca^{2+}$  desde los depósitos intracelulares también parece participar en dicha contracción.

5.- La respuesta relajante de las arterias coriales humanas a los diferentes estímulos investigados depende

fundamentalmente del agente inductor de tono activo. En presencia de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , ni Ach (agonista endógeno dependiente de endotelio) ni adenosina (agonista endógeno no dependiente de endotelio) son capaces de inducir relajación. Además, las respuestas relajantes a los otros dos agentes vasorrelajantes investigados (NPS y nicardipina) también son de menor magnitud en presencia de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . La no dependencia de la respuesta a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  respecto del  $\text{Ca}^{2+}$  podría explicar este hallazgo.

6.- Las arterias coriales humanas desarrollan respuestas relajantes de gran magnitud cuando se exponen a NPS o nicardipina. Este hecho demuestra la operatividad de las vías del NO y del  $\text{Ca}^{2+}$  en estas arterias en condiciones fisiológicas, y fundamenta la adopción de estrategias farmacológicas relacionadas con ambas para limitar el aumento de resistencia vascular que se produce en la preeclampsia.

7.- La existencia en cuatro casos de funciones de regresión lineal estadísticamente significativas, demuestra que algunos parámetros clínico-obstétricos, especialmente los indicadores de madurez fetal, se correlacionan con la reactividad de las arterias coriales frente a determinados estímulos, principalmente ET-1. La significación funcional de dichas correlaciones está por determinar.

## BIBLIOGRAFIA

**Abad, A.** Estudio de la respuesta de los vasos corionicos humanos in vitro. *Tesis Doctoral. Universidad de Valencia. Facultad de Medicina: Dpto de Pediatria, Obstetricia y Ginecologia; 1999.*

**Alabadí JA, Torregrosa G, Miranda FcoJ, Salom JB, Centeno JM, Alborch E.** Impairment of the Modulatory Role of Nitric Oxide on the Endothelin-1-elicited contraction of cerebral Arteries: A Pathogenetic Factor in Cerebral Vasospasm after Subarachnoid Hemorrhage?. *Experimetal Studies Neurosurgery 1997Jul; 41(No1).*

**Alborch E, Salom JB, Perales AJ, Torregrosa G, Miranda FJ, Alabadí JA, Jover T.** Comparison of the anticonstrictor action of dihydropyridines (nimodipine and nicardipine) and  $Mg^{2+}$  in isolated human cerebral arteries. *European Journal of Pharmacology 1992; 229.83-89.*

**Beaufils M.** Hipertensión Gravídica. In: *Encyclopedie Médico-Chirurgicale. Editions Scientifiques et Médicales Elviesier SAS, París 2002; E-5-036-A10.*

**Belfort MA, Saade GR, Suresh M, Johnson D, Verdernikov YP.** Human umbilical vessels : Responses to agents frequently used in obstetric patients. *Am J Obstet Gynecol 1995; 172:1395-403.*

**Bertrand C, Duperron L, St-Louis J.** Umbilical and placental vessels: Modifications of their mechanical properties in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 168:1537-1546

**Bjøro K, Stray-Pedersen S.** Effects of vasoactive autacoids on different segments of human umbilicoplacental vessels. *Gynecol Obstet Invest* 1986; 22:1-6.

**Bodelsson G, Sjöberg N, Stjernquist M.** Contractile effect of endothelin in the human uterine artery and autoradiographic localization of its bindings sites. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167:745-750.

**Boersma JI, Janzen KM, Oliveira L, Crankshaw DJ.** Characterization of excitory prostanoid receptors in the human umbilical artery *in vitro*. *British Juornal of Pharmacology* 1999; 128:1505-1512.

**Bos CL, Richel DJ, Ritsema T, Peppelenbosch MP, Versteeg HH.** Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2004; 36:1187-1205.

**Boura ALA, Gude NM, King RG, Walters WAW.** Acetylcoline output and fetal vascular resistence of human perfused placental cotyledon. *Br J Obstet Gynaecol* 1986; 88:301-6.

**Boura ALA, Walters WAW, Read MA, Leitch IM.** Autacoids and control of human placental blood flow.

*Clinical and experimental Pharmacology and Physiology* 1994;21:737-748.

**Boura ALA, Walters WAW.** Autacoids and the control of vascular tone in the human umbilical placental circulation. *Placenta* 1991; 12:456-77.

**Brennecke SP, Chen S, King R, Boura ALA.** Human placental acetylcholine content and release at parturition. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1988; 15:715-25.

**Breslin EM, Tiong MB, Teoh G, Docherty JR.** Investigations of vascular responses of human umbilical vessels from normal and preeclamptic pregnancies. *Hypertension in pregnancy* 1993;12(3):463-473.

**Broughton PF, Simons EM.** Factors affecting angiotensin II concentrations in the human infant at birth. *Clin Sci Mol Med* 1977; 52:449-56.

**Byrne BM, Howard RB, Morrow KJ, Whiteley KJ, Adamson SL.** Role of the L-arginine nitric oxide pathway in hypoxic fetoplacental vasoconstriction. *Placenta* 1997; 18:627-634.

**Carbonne B, Mignot T-M, Papiernik E, Ferré, F.** Higher endothelin concentrations in the fetoplacental unit of pregnant women of African ancestry. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178:491-2.

**Cardell LO, Uddman R, Edvisson L.** Endothelins: a role in cerebral disease? *Cephalalagia* 1994; 14:259-265.

**Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO Panza JA.** Interactions between nitric oxide and endothelin in the regulation of vascular tone of human resistance vessels in vivo. *Hypertension* 2000; 35:1237-124.

**Castle B, Mackenzi IZ.** In vivo observations on cardiovascular blood pressure in the fetus during mid-pregnancy. In: Fetal and neonatal physiology measurements. *London: Rolfe P.W. Butterworths* 1986:65-69.

**Charnock-Jones DS, Burton GJ.** Placental morphogenesis. *Baillère's Clinical Obstetrics and Gynaecology* 2000; 14(No6):953-968.

**Chaudhuri G, Cuevas J, Buga GM, Ignarro LJ.** NO is more important than PGI<sub>2</sub> in maintaining low vascular tone in feto-placental vessels. *Am J Physiol* 1993; 264 (*Heart Circ Physiol* 34):H2036-H2043.

**Craft IL, Scrivener R, Dewhurst CJ.** Prostaglandin F<sub>2</sub> levels in the maternal and fetal circulation in late pregnancy. *J Obstet Gynaecol Br Commomw* 1973; 80:616-8.

**Cunningham FG, MacDonald PC, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap III LC.** Williams. Obstetricia. 4<sup>a</sup> ed. *Barcelona (E): Masson, S.A.; 1996.*



- Daray FM, Minvielle AI, Puppo S, Rothlin RP.** Pharmacological characterization of prostanoid receptors mediating vasoconstriction in human umbilical vein. *British Journal of Pharmacology* 2003; 139:1409-1416.
- Ezimokhai M, Aloamaka CP, Cherian T, et al.** Plasma from normal pregnant women alters the reactivity of rabbit aortic smooth muscle with functional endothelium. *Clinical and experimental pharmacology and physiology* 1993; 20:435-442.
- Falconer AD, Hake DM.** Circumstances influencing umbilical cord plasma catecholamines at delivery. *Br J Obstet Gynaecol* 1982; 89:44-9.
- Faraci FM, Brian JE.** Nitric oxide and the cerebral circulation. *Stroke* 1994; 25:692-703.
- Ferré F.** Régulation de la circulation fœtal placentaire. *Gynécol Obstét Fertil* 2001; 29:521-7.
- Figuroa R, Omar HA, Tejani N, Muray R, et al.** Tromboxane A<sub>2</sub> synthesis in pregnancy-induced hypertension. *Lancet* 1990; 335:751-4.
- Fox SB, Khong TY.** Lack of innervation of human umbilical cord. An immunological and histochemical study. *Placenta* 1990; 11:59-62.
- Fried G, Liu Y-A.** Effects of endothelin, calcium channel blockade and EDRF inhibition on the contractility of human

uteroplacental arteries. *Acta Physiol Scand* 1994; 151:477-484.

**Fried G, Lui YA, Andersson E.** Endothelium contracts human uterine myometrium by a partially dihydropyridine sensitive mechanism. *Acta Physiol Scand* 1992; 147:131-136.

**Fried G, Samuelson U.** Endothelin and neuropeptide Y are vasoconstriction in human uterine blood vessels. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164:1330-1336.

**George PR, Deward PJ, Elstein M.** Short communication: The effect of mode of delivery on contractile function of placental arteries in vitro. *Placenta* 1995; 16:743-7.

**Gilbert RD, Power GP.** Fetal and interplacental heat production in sheep. *J Physiol* 1986; 61:2018-22.

**González C, Cruz Ma, Gallardo V, Miguel P, Carrasco G.** Relative potency of nitrovasodilators on human placental vessels from normal and preeclamptic pregnancies. *Gynecol Obstet Invest* 1997; 43:219-224.

**González C, Cruz MA, Gallardo V, Varela J, Albornoz J, Schulz C.** Nitric oxide and prostaglandin systems inhibition on the isolated perfused human placenta from normal and preeclamptic pregnancies. *Gynecol Obstet Invest* 1995; 40:244-248.

- González-Panizza VH, Álvarez H, Benedetti WL.** The in vitro contractility of human placental chorial vessels. *J Reprod Med* 1981; 26:478-82.
- Gude NM, King RG, Brennecke SP.** Role of endothelium-derived nitric oxide in maintenance of low fetal vascular resistance in placenta. *Lancet* 1992; 2:1589-90.
- Haegerstrand A, Hemsén A, Gillis C, Larsson O, Lundberg JM.** Endothelin: presence in human umbilical vessels, high levels in fetal blood and potent constrictor effect. *Acta physiol Scand* 1989; 137:541-542.
- Häkkinen LM, Vuolteenaho OJ, Leppäluoto JP, Laatikainen TJ.** Endothelin in maternal and umbilical cord blood in spontaneous labor and at elective caesarean delivery. *Obstet Gynecol* 1992; 80:72-5.
- Hanson GC, Wide-Swenson D, Andersen K, Lindberg BF.** Conversion of big endothelin-1 and characterization of its contractile effects on isolated human placental arteries. *Gynecol Obstet Invest* 1998; 45:1-6.
- Hassid A, Williams C.** Vasoconstrictor-evoked prostaglandin synthesis in cultured vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 1983; 245:C278-C282.
- Hemsén A.** Biochemical and functional characterization of endothelin peptides with special reference to vascular effects. *Acta Physiol Scand* 1991; 142(Suppl 602).

**Hernández-García JM.** Placenta. Fisiología del embarazo. En: Usandizaga JA, De La Fuente P. *Tratado de Obstetricia y Ginecología. Vol.I. Madrid (E): McGraw-Hill; 1997.p.67-86.*

**Howard RB, Hosokawa T, Maguire MH.** Hypoxia-induced fetoplacental vasoconstriction in perfused human placental cotyledons. *Am J Obstet Gynecol 1987; 157:1261-6.*

**Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Woods KS.** Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacological and chemical properties that are identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res 1987; 61:866-879.*

**Inue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, et al.** The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isipeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci 1989; 8:2863-2867.*

**Irestedt L, Dahlin Y, Hertzberg T, Sollevi A, Lagercrantz H.** Adenosine concentration in umbilical cord blood of newborn infants after vaginal delivery and caesarean section. *Ped Res 1989; 26:106-8.*

**Izumi H, Makino Y, Shirakawa K, Garfield, R.E.** Role of nitric oxide on vasorelaxation in human umbilical artery. *Am J Obstet Gynecol 1995; 172:1477-84.*

- Jiang H, Stephens NL.** Calcium and smooth muscle contraction. *Mol Cel Biochem* 1994; 135:1-9.
- Jones JB, Rowsell A.** Fetal 5-hydroxytryptamine levels in late pregnancy. *J Obstet Gynaecol Br Commomw* 1973; 80:687-9.
- Khendun SM, Naicker T, Moodley J.** Endothelin-1 activity in pregnancy. *Journal of Obstetrics and Gynecology* 2002; 22(No 6):590-593.
- Khong TY, Tee J-H, Kelly AJ.** Absence of innervation of the uteroplacental arteries in normal and abnormal human pregnancies. *Gynecol Obstet Invest* 1997; 43:89-93.
- Kingdom JC, Mcqueen J, Connel JM, Whittle MJ.** Fetal angiotensin II levels and vascular A II receptors in pregnancies complicated by intrauterine growth retardation. *Br J Obstet Gynaecol* 1993; 100:476-82.
- Le SQ, Waserstrum N, Mombouli JV, Vanhoutte PM.** Contractile effect of endothelin in human placental veins: Role of endothelium prostaglandins and thromboxane. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169:919-24.
- Learmont JG, Poston L.** Nitric oxide is involved in flow-induced dilation of isolated human small fetoplacental arteries. *Am J Obstet Ginecol* 1996; 174:583-8.
- Lee MML, Yeh MN.** Fetal circulation of the placenta: a comparative study of human and baboon placenta by

scanning electron microscopy of micrivascular casts. *Placenta* 1983; 4:515-27.

**Lees C, Valensise H, Black R, Harrington K, Byiers S, Romanini C, Campbell S.** The efficacy and fetal-maternal cardiovascular effects of transdermal glyceryl trinitrate in the prophylaxis of pre-eclampsia and its complications: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1998; 12:334-338.

**MacCarthy AL, Taylor P, Graves J, Raju SK, Poston L.** Endothelium-dependent relaxation of human resistance arteries in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171:1309-15.

**Mackenzie IZ, MacLean DA, Mitchell MD.** Prostaglandins in the human circulation in mid-trimester and term pregnancy. *Prostaglandins* 1980; 20:649-54.

**Maguire MH, Howard RB, Hosokawa T.** Autacoid receptors in the human feto-placental vasculature. *Contrib Gynecol Obstet* 1985; 13:170-2.

**Maigaard S, Forman, Andersson KE.** Relaxant and contractant effects of some amines and prostanoids in myometrial and vascular smooth muscle within the human uteroplacental arteries in term pregnancy. *Acta Physiol Scand* 1986; 128:33-44.

**Maigard S.** Contraction and relaxation of human uterine and placental smooth muscle. Endogenous control and calcium activation mechanisms. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1987; *Supp.143*:9-39.

**Mak KKW, Gude NM, Walters WAW, Boura ALA.** Effects of vasoactive autacoids on the human umbilical-placental vasculature. *Br J Obstet Gynaecol* 1984; *91*:99-106.

**Marín J, Reviriego J, Fernández-Alonso MS, Guerra P.** Effect of nifedipine in arterial vasculature of human placenta. *Gen Pharmac* 1990; *21*(No 5):629-633.

**Marín J, Reviriego J.** Effects of nicardipine on human placental vasculature. *Arch Int Pharmacodyn* 1989; *302*:209-219.

**Masaki T.** Endothelins: homeostatic and compensatory actions in the circulatory and endocrine systems. *Endocrin Rev* 1993; *14*:256-268.

**Masaki T.** Possible role of endothelium in endothelial regulation of vascular tone. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995; *35*:235-255.

**Mastrogiannis DS, O'Brien WF, Krammer J, Benoit R.** Potential role of endothelin-1 in normal and hypertensive pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 1991; *165*:1711-1716.

**McCarthy AL, Woolfson RG, Evans BJ, Davies DR, Raju SK, Poston L.** Functional characteristics of small placental arteries. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170:945-51.

**Melmon KL, Cline M.J, Hughes T, Nies AS.** Kinins: possible mediators of neonatal circulatory changes in man. *J Clin Invest* 1968; 47:1295-1302.

**Miasiro N, Yamamoto H, Kanaide H, Nakamura M.** Does endothelin mobilize calcium from intracellular storage sites in rat aortic vascular smooth muscle cells in primary cultura?. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 156:312-317.

**Mitchell RG, Porter JF.** Histamine and granulocytes in the umbilical cord blood of infant at birth. *Br J Pharmacol* 1970; 40:310-6.

**Miyauchi T, Masaki T.** Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol* 1999; 61:391-415.

**Moncada S, Palmer RMJ, Higgs, EA.** Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109-142.

**Mondon F, Malassiné A, Robuat C, Vial M, Bandet J, Tanguy G, et al.** Biochemical characterization and autoradiographic localization of [<sup>125</sup>I] endothelin-1 binding sites on trophoblast and blood vessels of human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76:237-44.



**Myatt L, Brewer A, Brockman E.** The action of nitric oxide in the perfused human fetal-placental circulation. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164:687-92.

**Myatt L, Brewer AS, Brockman DE.** The comparative effects of big endothelin-1, endothelin-1 and endothelin-3 in the human fetal-placental circulation. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167:1651-6 (b).

**Myatt L, Brewer AS, Langdon G, Brockman DE.** Attenuation of the vasoconstrictor effects of thromboxane and endothelin by nitric oxide in the human feto-placental circulation. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166:224-30 (a).

**Myatt L, Brockman DE, Eis ALW, Pollock JS.** Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the human placenta. *Placenta*, 1993; 14:487-495.

**Myatt, L.** Current topic: Control of vascular resistance in the human placenta. *Placenta* 1992; 13:329-341.

**Nielsen-Kudsk J E.** Enprofylline and teophylline on small human placental arteries: in vitro effects and mode of action. *Acta Pharmacologica et Toxicologica* 1985; 56:176-82.

**Nisell H, Hemsén A, Lunell NO, Wolff K, Lundberg MJ.** Maternal and fetal levels of a novel polypeptide, endothelin: evidence for release during pregnancy and delivery. *Gynecol Obstet Invest* 1990; 30:129-132.

- Nova A, Sibai BM, Barton JR, Mercer BM, Mitchell MD.** Maternal plasma level of endothelin is increased in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165:724-727.
- Omar H, Figueroa R, Omar RA, Wolin MS.** Properties of an endogenous arachidonic acid-elicited relaxing mechanism in human placental vessels. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167:1064-70.
- Osathanohoh R, Tulchinsky D.** Hormonas polipeptídicas placentarias. In: *Tulchinski D, Ryan KJ: Endocrinología materno-fetal. Buenos Aires: Inter-médica 1984.p17.*
- Oyelese KO, Blake RS, Lees CC, Cambell S.** A novel approach to the management of pregnancies complicated by uteroplacental insufficiency and previous stillbirth. *Aust NZ J Obstet Gynaecol* 1998; 38:391-395.
- Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S.** Nitric oxide accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 32:524-526.
- Panigel M.** Anatomy and morphology of the placenta. *Clin Obstet Gynaecol* 1986; 13:421-45.
- Panigel M.** Observations on the vasomotricity of the arteries in the umbilical cord. *Compt Rend Soc Biol* 1959; 153:1441-43.

- Peri A, Vannelli GB, Fantoni G, Giannini S, Barni T, Orlando C, et al.** Endothelin in rabbit uterus during pregnancy. *Am J Physiology* 1992; 263:E158-E167.
- Pinto A, Sorrentino R, Sorrentino P.** Endotelial-derived relaxing factor released by endotelial cells of human umbilical vessels and its impairment in pregnancy-induced hipertensión. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164:507-13.
- Piper PJ, Levene S.** Human umbilical arteries and veins: generation of leukotrienes and response to exogenous leukotrienes. *Biol Neonate* 1987; 52:9-15.
- Poston L, McCarthy AL, Ritter JM.** Control of vascular resistance in the maternal and feto-placental arterial beds. *Pharma Ther* 1995; 65:215-239.
- Prentice DA, Boura ALA, Gude NM, Walters AWA, King RG.** Changes in the biological activity of autacoids during passage through the human perfused fetoplacental lobule. *Eur J Pharmacol* 1987; 141:79-86.
- Ramsay B, De Belder A, Campbell S, Moncada S, Martín JF.** A nitric oxide donor improves uterine artery diastolic blood flow in normal early pregnancy and in women at high risk of pre-eclampsia. *Eur J Clin Invest* 1994; 24:76-78.
- Ramsey EM.** New appraisal of an old organ: The placenta. *Proc Am Physoph Soc* 1969; 113:296-302.

**Read MA, Boura ALA, Walters WAW.** Effects of variation in oxygen tension on responses of the human fetoplacental vasculature to vasoactive agents in vitro. *Placenta* 1995; 16: 667-78.

**Really FD, Russell PT.** Neurohistochemical evidence supporting and absence of adrenergic and cholinergic innervation in the human placenta and umbilical cord. *Anat Rec* 1977; 188:277-86.

**Reviriego J, Alonso MJ, Ibañez C, Marín J.** Action of adenosine and characterization of adenosine receptors in human placental vasculature. *Gen Pharmac* 1990; 31:227-233(a)

**Reviriego J, Fernández-Alonso MS, Guerra P, Marín J.** Effects of Ca<sup>2+</sup> antagonists nifedipine and diltiazem on isolated human chorionic arteries and veins. *Journal of cardiovascular. Pharmacology* 1990; 16:128-138(c)

**Reviriego J, Fernández-Alonso MS, Marín, J.** Actions of vasoactive drugs on human placental vascular smooth muscle. *Gen Pharmac* 1990; 21:719-727(b)

**Rutherford RAD, Wharton J, McCarthy A, Gordon L, Sullivan MHF, Elder MG.** Differential localization of endothelin ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> binding sites in human placenta. *Br J Pharmacol* 1993; 109:544-52.

**Sakata K, Karaki H.** Effects of endothelin on cytosolic Ca<sup>2+</sup> level and mechanical activity in rat uterine smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 1992; 221: 9-15.

**Sakata K, Ozaki H, Kwon SC, Karaki H.** Effects of endothelin on the mechanical activity and cytosolic calcium level of various types of smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1989; 98:483-492.

**Salom JB, Torregrosa G, Alborch E.** Endothelins and the circulation. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1995; 7:131-152.

**Sand A, Ostlund E, Andersson E, Fried G.** Endothelin-induced contractions in placental arteries is mediated by both ET-A and ET-B receptors. *Acta Physiologica Scandinavica* 1998 Jun; 163:3.

**Sastry BVR, Sadavongvivad C.** Cholinergic systems in non-nervous tissues. *Pharmacol Rev* 1979; 30:65-132.

**Schiff E, Ben-Baruch G, Peleg E, Rosenthal T, Alcalay M, Mashiach S.** Immunoreactive circulating endothelin-1 in normal and hypertensive pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166:624-628.

**Schiff E, Sibai BM, Weiner E, Zalel Y, Shalev E.** Endothelin-1, 2 levels in umbilical vein serum of second-trimester fetuses and growth-retarded third-trimester fetuses at time of cordocentesis. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 168:329.

**Soares de Moura R.** Effect of terbutaline on the human fetoplacental circulation. *Br J Obstet Gynaecol* 1981; 88:730-33.

**Soares de Moura R.,** Effect of prostacyclin on the perfusion pressure and on the vasoconstrictor response of angiotensinII in the human isolated foetal placental circulation. *Br J Obstet Gynaecol* 1987; 23:765-8.

**Stabile I, Teaf CM, Harbinson RD.** Role of cholinergic and carnitineric systems in placental toxicology. *Contemporary Review of Obstetrics and Gynaecology* 1989; 1:253-60.

**Sudo N, Kasmoi K, Ishibashi M, Yamaji, T.** Plasma endothelin-1 and big endothelin-1 levels in women with preeclampsia. *Acta Endocrinol Copenh* 1993; 129:114-120.

**Svane D, Skajaa K, Anderson KE, Forman A.** Effects of the thromboxan-receptor antagonists AH 23848 and BM 13.177 on human uteroplacental arteries. *Obstet Gynecol* 1992; 80:234-40.

**Takuwa Y.** Endothelin in vascular and endocrine systems: Biological activities and its mechanisms of action. *Endocrine J* 1993; 40:489-506.

**Thiriot M, Panigel M.** La microvascularisation des vellosités placentaires humaines. *Comptes Rendus de l'Académie de les Sciences de Paris* 1978; series D 287:709-12.

**Tresguerres JAF.** Fisiología del músculo. En: *Fisiología Humana*. 2ª ed. Madrid (E): McGraw-Hill-Interamericana;1999.p.29-35.

**Tuvemo T.** Role of prostaglandins, prostacyclins, and thromboxanes in the control of the umbilical-placental circulation. *Semin Perinatol N.Y.* 1980; 4:91-5.

**Usuki S, Saitoh T, Sawamura T, Suzuki N, Shigemitsu S, Yanagisawa M, et al.** Increased maternal plasma concentration of endothelin-1 during labor pain or on delivery and existence of a large amount of endothelin-1 in amniotic fluid. *Gynecol Endocrinol* 1990; 4:85-97.

**Vallance P, Collier J, Moncada S.** Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arterial tone in man. *Lancet* 1989; 2:997-1000.

**Wagner-Mann C, Bowman L, Sturek, M.** Primary action of endothelium on Ca<sup>2+</sup> release in bovine coronary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1991; 260:C763-C770.

**Walker SW, MacLean JR.** Absence of adrenergic nerves in human placenta. *Nature* 1971; 229:344-5.

**Walsh SW, Parisi VM.** The rol of arachidonic acid metabolites in preeclampsia. *Seminars in Perinatology* 1986; 10:334-55.

**Walters WAW, Boura ALA.** Regulation of fetal vascular tone in the human placenta. *Reprod Fertil Dev* 1991; 3:475-81.

**White RP.** Pharmacodynamic study of maturation and closure of human umbilical arteries. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 160:229-37.

**Word RA, Kamm KE, Stull JT, Casey ML.** Endothelium increases cytoplasmic calcium and myosin phosphorylation in human myometrium. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162:1103-1108.

**Xie H, Triggle CR.** Acetylcholine Relaxes the human umbilical artery by endothelium-independent but ouabain and tetrathylammonium-sensitive process. *Proc West Pharmacol Soc* 1994; 37:31-33.

**Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al.** A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332:411-415.

**Yanagisawa M, Yazaki Y, Masaka T, Takakura K, Murota S.** Cerebral microvessel endothelium is producing endothelin. *Brain Res* 1990; 508:283-285.

**Yoshimoto S, Ishazaki Y, Kuruhara H, Sasaki T, Yoshizumi M, Yanagisawa M, et al.** Cerebral microvessel endothelium is producing endothelin. *Brain Res* 1990; 508:283-285.



**Zhang XQ, Kwek K, Read MA, Donoghue JF, Walters WAW.** Effects of nitrovasodilators on the human fetal-placental circulation in vitro. *Placenta* 2001; 22:337-346.