

Crecimiento intrauterino restringido: estudio de la apoptosis en la placenta

E. Barrio^a, M.T. Calvo^a, A. Romo^b, R. Alvarez^c, J.I. Gutierrez^a y A. Ferrández Longás^d

^aDepartamento de Genética Molecular. ^bUnidad de Neonatología. ^cDepartamento de Anatomía Patológica. ^dUnidad de Endocrinología. Hospital Infantil Miguel Servet. Zaragoza.

INTRODUCCIÓN

La muerte celular programada, comúnmente llamada apoptosis¹, es un fenómeno biológico fundamental² que sucede bajo una gran variedad de situaciones fisiológicas y patológicas. Las características morfológicas de la apoptosis son descenso del volumen celular, fragmentación nuclear, modificación del citoesqueleto, condensación de la cromatina y degradación del ADN en fragmentos nucleosomales. Como consecuencia de lo anterior se forman cuerpos apoptóticos que son fagocitados rápidamente por macrófagos sin respuesta inflamatoria. Estas características morfológicas de la apoptosis pueden ser detectadas por microscopía de luz, de fluorescencia y microscopía electrónica. Los estudios de apoptosis en placentas de embarazos normales y anormales son cada vez más numerosos, habiéndose identificado núcleos apoptóticos en todos los tipos de células placentarias. El objetivo de este estudio ha sido comprobar la existencia de apoptosis en placentas de embarazos complicados con crecimiento intrauterino restringido (RCIU) y compararla con la de embarazos normales. El RCIU se definió como el de aquellos recién nacidos cuyo peso y talla se hallaban por debajo del percentil 10 para la edad gestacional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de tejido fueron obtenidas de 21 embarazos no complicados, del tercer trimestre y de 11 embarazos complicados con RCIU. El grupo control fue seleccionado al azar. Las muestras de placenta fueron obtenidas de partos normales y de cesáreas inmediatamente después del nacimiento, cortadas en secciones pequeñas de 2x2x2 cm³, lavadas para eliminar la sangre y rápidamente fijadas en formol. Después de la fijación las muestras fueron cortadas al azar para cada placenta, incluidas en bloques y embebidas en parafina. Se comprobó que no hay diferencia significativa en la incidencia de apoptosis dentro de las diferentes áreas de cada placenta⁶. Posteriormente se cortaron dos secciones de 4 µm de cada muestra y fijadas en porta-objetos tratados con poli L-Lisina.

La técnica para estudiar la apoptosis fue la denominada TUNEL⁹ (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labelling*) usando el producto Fluorescein FragEL DNA Fragmentation Detection Kit (Oncogene Research Products). Las secciones fueron desparafinadas en xilol, rehidratadas, permeabilizadas en proteinasa K. En esta técnica el enzima terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) une a los extremos 3'-OH de los fragmentos de DNA generados en respuesta a la señal de apoptosis y cataliza la adición de deoxinucleótidos marcados con fluoresceína. Se utilizó también Mounting Media que mantiene la señal de fluorescencia de las muestras en los porta-objetos y ayuda en la evaluación morfológica y la caracterización de las células normales y de las apoptóticas. La inclusión de 4,6-diAmidino-2-PhenylIndole (DAPI) en el Mounting Media permite la visualización de las células marcadas y las no marcadas con una longitud de onda de excitación de 330-380 nm (fig. 1) Como control positivo se usaron células HL-60 incubadas con 0,5 µg/ml de actinomicina D durante 19 horas para inducir la apoptosis y células HL-60 no inducidas como controles positivo y negativo. Cada porta fue examinado con una magnificación de 1000X con el objetivo de aceite de inmersión del microscopio de fluorescencia (Axioskop, Zeiss).

El número de células apoptóticas por núcleo identificado fue expresado como porcentaje del número total de células por núcleo contado.

Análisis estadístico

Los valores fueron expresados en medias y desviaciones estándar. El análisis estadístico entre los grupos fue hecho con el test t de Student y el test U de Mann-Whitney, considerando como diferencia significativa $p < 0,05$.

RESULTADOS

Se ha identificado apoptosis en las células de la placenta usando técnicas histológicas⁴.

Con la técnica TUNEL demostramos la presencia de apoptosis. La distribución de las células apoptóticas en el tejido

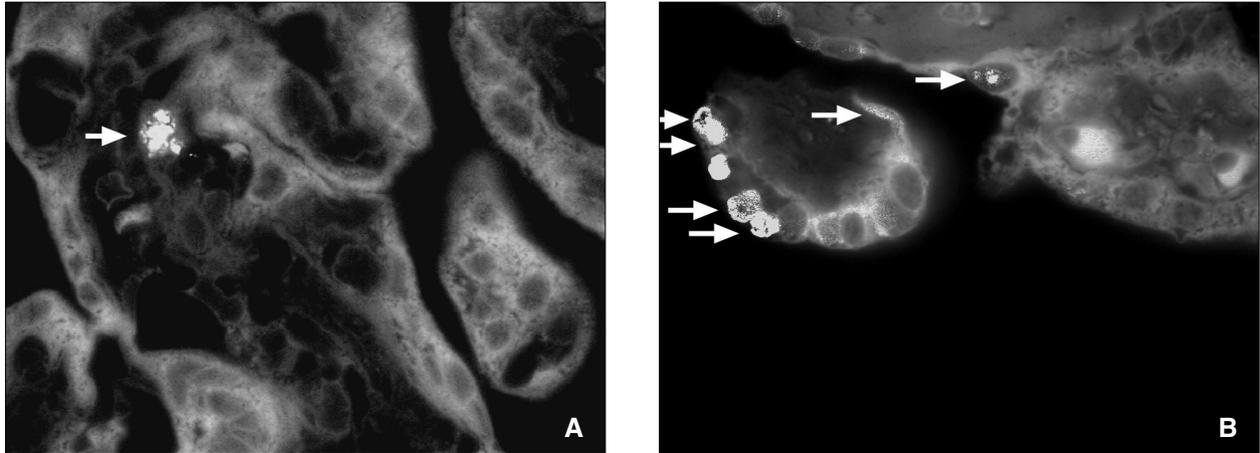


Figura 1. En esta figura se muestra el aumento de núcleos apoptóticos representados con flechas de una placenta RCIU (B) y una placenta normal (A).

placentario fue la siguiente: citotroblastos (36%), sincitiotroblastos (61%), células endoteliales y estromales (3%).

Cuantificación de la apoptosis

Los porcentajes de células apoptóticas de placentas normales y placentas de embarazos con RCIU se refleja en la tabla 1.

La apoptosis de células de placentas complicadas con RCIU fue significativamente más alta que en células de las placentas normales (fig. 2).

En el caso de las células endoteliales y estromales la diferencia, aunque aparentemente importante, no es significativa debido probablemente al escaso número de células y la gran dispersión de los valores.

TABLA 1. Estudio estadístico en el que comparamos los porcentajes de núcleos apoptóticos por núcleos totales

	% de células estudiadas que muestran apoptosis	
	Placentas normales (N = 21)	Placentas CIR (N = 11)
Células totales		
\bar{X}	0,8	2,78
Ds	0,52	0,76
P = 0,00		
Células sincitiales		
\bar{X}	1,04	3,74
Ds	0,93	2,70
P = 0,00		
Citotroblastos		
\bar{X}	0,68	2,12
Ds	0,52	1,45
P = 0,00		
Células endoteliales y estromales		
\bar{X}	0,62	2,19
Ds	5,36	14,03
P = 0,134		

En nuestro caso contamos entre 1500 y 2000 núcleos para cada muestra; de hecho algunas publicaciones demuestran que la incidencia de apoptosis no difiere si se cuentan muchos más núcleos, entre 5000 y 7000⁴⁻⁷.

DISCUSIÓN

El crecimiento intrauterino es un fenómeno biológico muy complejo en el que intervienen gran cantidad de factores entre ellos genes, hormonas, nutrición y placenta. Un aporte adecuado de nutrientes a la circulación fetal y la expresión correcta de factores de crecimiento tisulares son fundamentales para el crecimiento del feto.

La implantación, placentación y desarrollo del lecho vascular uteroplacentario constituyen un aspecto muy importante en el crecimiento fetal. Son muchas las funciones placentarias con relación al crecimiento fetal: inmunológicas, en relación con la tolerancia materna al feto, homeostáticas, con difusión de productos del metabolismo fetal, hormonales, como síntesis de esteroides, hormonas peptídicas y factores de crecimiento. La placenta crece durante toda la gestación. La placenta es, en su mayor parte, de origen fetal y existe una clara asociación entre el peso placentario y el peso fetal. La placenta contribuye al crecimiento fetal aportando nutrientes y oxígeno, regulando la difusión a la circulación materna de los productos del metabolismo fetal y actuando como auténtico órgano endocrino que sintetiza hormonas específicas como el lactógeno placentario humano, la gonadotropina coriónica, la hormona de crecimiento placentaria, esteroides, diversos factores de crecimiento peptídicos y citoquinas relacionadas con la regulación del propio crecimiento placentario y la tolerancia inmunológica fetal.

En los casos de RCIU se encuentra insuficiencia placentaria. Las alteraciones histopatológicas por afectación del espacio intervilloso indica un flujo sanguíneo deficiente con la aparición de depósitos fibrinoides¹².

Se ha descrito la apoptosis como un fenómeno normal en la placenta^{6,9}, sobre todo en el tercer trimestre.

El término apoptosis fue descrito por Kerr et al (1972) para describir los distintos hechos morfológicos de la muerte programada frente a la muerte accidental, denominada necrosis. Los mecanismos de inducción de ambos procesos son distintos; la necrosis esta inducida por eventos químicos, físicos o biológicos letales mientras que la apoptosis requiere la coordinación de procesos biológicos dependientes de la expresión de genes (Cotter et al 1990)¹⁷. La muerte celular por apoptosis implica la acción de activadores, efectores y reguladores negativos. Es una cascada de sucesos que lleva a la célula a la muerte apoptótica. La apoptosis puede ser inducida por varios factores:

1. Ligandos que se unen a sus respectivos receptores, (como ocurre en el caso de células que expresan Fas y que se une al ligando FasL o la unión de TNF a su receptor).
2. Inducción por medio de perforina, proteína cuya función parece ser hacer poros en la membrana y posterior acción de las granzimas A y B, que podrían actuar como caspasas.
3. Presencia o ausencia de factores de crecimiento específicos.
4. Incremento o decrecimiento de los niveles de hormonas específicas.
5. Estímulos no fisiológicos como puede ser la radiación.

Tras los heterogéneos factores de inducción, se llega a la activación de las caspasas que son una familia de proteasas intracelulares (cisteín proteasas con especificidad de aspártico) cuya función es la proteólisis de sustratos entre los que están ellas mismas. Se pueden dividir en caspasas iniciadoras (caspasas 8, 9, 10) que son activadas por los inductores de apoptosis y ejecutoras (caspasas 3, 6, 7) que conducen a la activación de nucleasas y a la degradación de proteínas nucleares.

Para que las caspasas iniciadoras se activen se necesitan unas moléculas llamadas adaptadores (Ej. FADD) y que poseen lo que se denomina dominios mortales. Estas moléculas se unen al receptor por la parte intracelular y a la caspasa de tal forma que son capaces de activar a las caspasas iniciadoras que se autoproteolizan. Como resultado de la activación de las caspasas iniciadoras comienza la modificación del citoesqueleto, empieza a disminuir el volumen celular y la membrana celular empieza a presentar una especie de burbujeo (blebbing) característico de la apoptosis.

Otra de las vías de apoptosis es la intrínseca, que implica la salida del citocromo c de la mitocondria y provoca el cambio conformacional de otro adaptador, Apaf-1, que, a su vez provoca la proteólisis de la caspasa 9 y que inicia la cascada de activación de las caspasas.

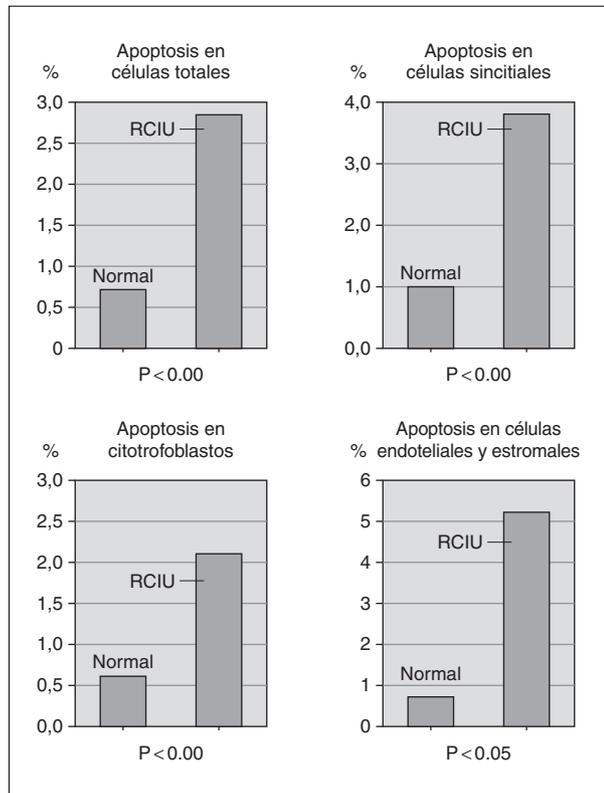


Figura 2. La incidencia de apoptosis en las células de placentas complicadas con RCIU es significativamente más alta que en las placentas de embarazos normales.

Cuando se han activado las caspasas ejecutoras (caspasa 3) se llega a un punto de no retorno en el cual la célula muere por apoptosis. Se inicia la degradación de proteínas como la catenina, citoqueratina 18. Se activan las nucleasas que llevan a la degradación del ADN y se produce degradación de proteínas nucleares. La cromatina empieza a condensar. Se forman los cuerpos apoptóticos que son fagocitados por los macrófagos.

Existen genes reguladores de la apoptosis pertenecientes a la familia de bcl-2. En mamíferos se conocen 15 genes pertenecientes a esta familia. Algunos son promotores de la apoptosis (bad, bak, bax, bcl-xs, bid, bik, hrk, mtd) y otros son inhibidores (A1, bcl-2, bcl-w, bcl-xl, bfl-1, brag-1, mcl-1, NR13). Existe otra familia de inhibidores conocida como inhibidores de proteínas de apoptosis (IAP) y son inhibidores directos de las caspasas ejecutoras e iniciadoras¹⁸.

En nuestro estudio queda claramente demostrado que en placentas de embarazos con RCIU la apoptosis está significativamente aumentada respecto a las normales; y las escasas publicaciones que existen al respecto confirman nuestros hallazgos³⁻⁵.

El aumento de apoptosis en el tejido placentario es el resultado de factores etiológicos que conducen a RCIU o

mecanismos compensatorios debido a un transporte defectuoso de nutrientes o de gases. Uno de los factores etiológicos es la hipoxia. La placenta reacciona al estrés hipóxico aumentando el número de células apoptóticas¹⁰. Este incremento de apoptosis también puede estar relacionado con la menor expresión de bcl-2, conocido gen antiapoptótico¹⁶.

En cualquier caso, el alto índice de apoptosis encontrado en los casos de RCIU indica que hay una disfunción placentaria que impide al feto desarrollarse normalmente obligándole a “programarse” para sobrevivir en unas condiciones tales que posteriormente afecta a funciones como el crecimiento, la función ovárica y desarrollo del llamado síndrome metabólico o síndrome X¹⁹.

Los estudios moleculares de la placenta van aportando conocimientos sobre los mecanismos que se observan en el RCIU y sus consecuencias postnatales, contribuyendo en un futuro próximo a una mejor prevención y tratamiento del mismo.

RESUMEN

Hemos estudiado la presencia de apoptosis en tejido de placenta de embarazos complicados con crecimiento intrauterino restringido (RCIU) y comparado esos resultados con los obtenidos en placentas normales. Nuestros resultados demuestran claramente un fuerte incremento de la apoptosis en placentas de niños nacidos con RCIU demostrando así una gran disfunción de la placenta. La importancia y repercusión de estos hallazgos debe ser confirmada con otros estudios ya en marcha.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57.
2. Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992;356:397-400.
3. Erel CT, Dane B, Calay Z, Kaleli S, Aydin K. Apoptosis in the placenta of pregnancies complicated with IUGR. *Int J Gynaecol Obstet.* 2001;73:229-35.
4. Smith SC, Baker PN, Symonds M. Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.* 1997;177:1395-1401.
5. Allaire A, Ballenger K, Wells S, McMahon M, Lessey B. Placental apoptosis in preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2000;96:271-6.
6. Smith SC, Baker PN, Symonds M. Placental apoptosis in normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1997;177:51-65.
7. Smith SC, Baker PN. Placental apoptosis is increased in post-term pregnancies. *Br J Obstet & Gynaecol.* 1999;106:861-2.
8. Chan CC, Lao TT, Cheung AN. Apoptotic and proliferative activities in first trimester placentae. *Placenta.* 1999;20:223-7.
9. Levy R, Nelson DM. To be, or not to be, that is the question: Apoptosis in human trophoblast. *Placenta.* 2000;21:13.
10. Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW et al. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumors. *Nature* 1996;379:88-91.
11. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear fragmentation. *J. Cell Biol* 1992;119:493-501.
12. Nelson DM. Apoptotic changes occur in syncytiotrophoblast of human placental villi where fibrin type fibrinoid is deposited in the villous trophoblast. *Placenta* 1996;24:715-23.
13. Axt R, Meyberg R, Mink D, Wasemann C, Reitauer K, Schmidt W. Immunohistochemical detection of apoptosis in the human term and post-term placenta. *Clin Exp Obst & Gyn.* 1999;26:56-9.
14. Isihara N, Matsuo H, Murakoshi H, Laoag-fernández J, Samoto T, Maruo T. Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;186:158-66.
15. Crocker IP, Coopert S, Ong SC, Baker PN. Differences in apoptotic susceptibility of cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts in normal pregnancy to those complicated with preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Am J Pathol* 2003;162:637-43.
16. Thiet MP, Suwanvanichkij V, Hasselblatt K, Yeh J. Apoptosis in human term placenta. A morphological and gene expression study. *Gynecol Obstet Invest.* 2000;50:88-91.
17. Cotter TG, Lennon SV, Glynn JG, Martin SJ. Cell death via apoptosis and its relationship to growth, development and differentiation of both tumour and normal cells. *Anticancer Res.* 1990;10:1153-9.
18. Huppertz B., Frank HG., Kauffmann P. The apoptosis cascade-morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anat Embryol.* 1999;200:1-18.
19. Barker DJP, Sluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 1993;341:938-41.