

EFECTOS DE LA INSUFICIENCIA CIRCULATORIA EN LA ACTIVIDAD DE LA RIBONUCLEASA PLACENTARIA

Dra. ELBA VELASCO

Instituto de la Nutrición Universidad de Columbia, New York

Recientemente se ha formulado la hipótesis (1) de que la ribonucleasa alcalina (pH 7.8), presente en el núcleo y citoplasma de la mayoría de las células de mamíferos, podría regular la cantidad de RNA dentro de la célula.

Diferentes estudios en cerebro de ratas han demostrado que la actividad de esta enzima por célula, aumenta gradualmente manteniendo una relación constante con la cantidad de RNA por célula, durante las primeras semanas de vida. Malnutrición durante el período prenatal, resultó en marcado aumento de la actividad de esta enzima expresado por miligramo de RNA en el cerebro de rata.

La ligadura de la arteria uterina en la rata ha demostrado previamente que altera el cociente RNA/DNA de la placenta (2). De ahí que se ha medido la actividad de la RNasa y se ha relacionado con cambios en el peso fetal, contenido de ácidos nucleicos y proteína, a

diferentes períodos después de ligar la arteria uterina y se trató de determinar la intensidad de estos cambios y la interrelación de estos parámetros en otro tipo de retardo de crecimiento.

MATERIALES Y METODOS

Se obtuvieron ratas albinas preñadas (Sprague Dawley). A los 16 días de gestación y bajo anestesia ligera se realizó laparotomía y se ligó la arteria uterina que suple sangre a uno de los cuernos, el otro cuerpo uterino se dejó sin tocar y sirvió de control. Se retornó el útero a la cavidad abdominal y se permitió que el embarazo continúe.

Los animales fueron sacrificados: 24, 48 y 72 horas después de la cirugía, las placentas y fetos fueron removidos, pesados y mantenidos en hielo, luego fueron homogenizados con agua destilada a 2°C. hasta obtener una concentración final del 15%, usando homogenizadores

de cristal (Kontes - Duall). Se usaron suficiente número de placentas control, para obtener muestras de aproximadamente 0.3 gr. Las placentas ligadas se dividieron en: proximal, intermedias y distales de acuerdo a la distancia de la ligadura y se usaron suficiente número de placentas para obtener muestras de aproximadamente 0.2 gr. Se removió 1ml. del homogenizado original para análisis subsecuente de ácidos nucleicos y proteína. En el resto de homogenizado se midió la actividad de la Ribonucleasa, con modificación del método de Roth (3).

La mezcla para este ensayo, estuvo compuesta de: 0.2 ml. veronalacetato bufer, 0.1 ml. de 0.01M. p-ácido cloromercúrico benceno sulfónico, 0,2ml. de substrato de RNA y 0.1ml. del homogenizado de placenta.

Las muestras se incubaron por 30 minutos a 37°C. y se terminó la reacción añadiendo 0.6 ml. acid-alcohol lantha-

num chloride frío. Después de 20 minutos de centrifugación en frío, se removió el sobrenadante de las muestras, se diluyó 1:10 con agua destilada y se leyó a 260 en el espectrofotómetro.

Las unidades de Rnasa fueron arbitrariamente definidas como: Densidad Optica x 100. Después de corregir: dilución de la muestra durante homogenización y lectura en el espectrofotómetro, los resultados fueron convertidos a unidades por gramo de tejido y por miligramo de DNA, RNA y proteínas, de acuerdo a los métodos de Fleeck and Munro (4), Hutchinson (5), y Biuret (6).

RESULTADOS

En la Tabla I, se demuestra la reducción de peso placentario después de la ligadura de la arteria uterina. La magnitud de esta reducción decrece de proximal a intermedia y a distal.

TABLA 1
PESO DE LA PLACENTA EN GRAMOS
24 HORAS

	Control	Proximal	Intermediate	Distal
Promedio	0.275	0.236	0.201	0.257
D.S.	±0.033	±0.034	±0.030	±0.044
n	9	5	5	5
p valor		<0.05	<0.02	N.S.

(SIGUE)

48 HORAS

	Control	Proximal	Intermediate	Distal
Promedio	0.344	0.218	0.317	0.342
D.S.	±0.016	±0.040	±0.026	±0.022
n	10	4	4	4
p valor		<0.001	<0.05	N.S.

72 HORAS

	Control	Proximal	Intermediate	Distal
Promedio	0.424	0.294	0.346	0.374
D.S.	±0.072	±0.057	±0.007	±0.002
n	10	5	5	5
p valor		<0.005	N.S.	N.S.

D.S.: Desviación estándar
n: Número de observaciones
p: Valores entre grupos ligados y grupos control
N.S.: No significativo

El contenido de DNA placentario no fue afectado durante las primeras 24 horas de ligadura (Tabla 2). Sin em-

bargo a las 48 horas se notó una disminución significativa en las placentas proximales que persistió a las 72 horas.

TABLA II

PARAMETROS DEL CRECIMIENTO CELULAR PLACENTARIO

24 HORAS

	DNA (mg)	RNA (mg)	Proteína (mg)	RNA DNA	Proteína DNA
Control Promedio	0.599	1.430	15.0	2.3	22.7
D.S.	±0.087	±0.200	±2.8	±0.25	±4.3
n	10	10	10	10	10

(SIGUE)

24 HORAS

	DNA (mg)	RNA (mg)	Proteína (mg)	RNA DNA	Proteína DNA
Proximal Promedio	0.688	1.046	19.2	1.54	25.8
D.S.	±0.120	±0.200	±4.2	±0.26	±7.0
n	5	5	5	5	5
p valor	N.S.	<0.005	<0.025	<0.001	N.S.

48 HORAS

Control Promedio	0.676	1.77	19.4	2.59	29.7
D.S.	±0.121	±0.27	±4.4	±0.47	±3.8
n	10	10	10	10	10
Proximal Promedio	0.500	0.924	12.0	1.82	23.2
D.S.	±0.041	±0.188	±3.1	±0.26	±4.79
n	4	4	4	4	4
p valor	<0.01	<0.001	<0.02	<0.02	<0.05

72 HORAS

Control Promedio	0.747	1.93	25.8	2.7	34.2
D.S.	±0.165	±0.32	±5.7	±0.334	±4.6
n	9	9	9	9	9
Proximal Promedio	0.538	1.23	19.0	2.3	35.8
D.S.	±0.077	±0.198	±3.8	±0.28	±6.2
n	6	6	6	6	6
p valor	<0.005	<0.001	<0.05	<0.05	N.S.

D.S.: Desviación estándar
 n: Número de observaciones
 p: Valores entre grupos ligados y grupos control
 N.S.: No significativo

El contenido de RNA y proteínas además del cociente RNA/DNA estuvo disminuido en todos los diferentes tiempos estudiados. La actividad de RNasa

total, por gramo de tejido estuvo marcadamente elevado en las placentas proximales en todos los períodos estudiados. Tabla 3.

TABLA III
ACTIVIDAD TOTAL DE LA RNASA EN PLACENTA

24 HORAS

	Unidades Organo	Unidades Gramo	Unidades mg DNA	Unidades mg RNA	Unidades mg Proteína
Control Promedio	3148	11277	5270	2254	215
D.S.	±428	±1780	±1051	±602	±47
n	10	10	10	10	10
Proximal Promedio	4016	17974	6382	4200	229
D.S.	±453	±2453	±1460	±968	±57
n	5	5	5	5	5
p valor	<0.005	<0.10	<0.001	<0.001	N.S.
Porcentaje de Control	121	186			

ACTIVIDAD TOTAL DE LA RNASA EN PLACENTA

48 HORAS

Control Promedio	4741	13781	7190	2691	248
D.S.	±1139	±3262	±2161	±484	±79
n	10	10	10	10	10

(SIGUE)

48 HORAS

	Unidades Organo	Unidades Gramo	Unidades mg DNA	Unidades mg RNA	Unidades mg Proteína
Proximal Promedio	6899	31891	13923	7592	633
D.S.	±862	±3262	±781	±668	±90
n	4	4	4	4	4
p valor	<0.01	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Porcentaje de Control			194	282	

ACTIVIDAD TOTAL DE LA RNASA EN PLACENTA

72 HORAS

Control Promedio	5927	16384	9505	3649	281
D.S.	±1959	±1837	±651	±651	±65
n	9	9	9	9	9
Proximal Promedio	7745	23598	12216	5417	442
D.S.	±1392	±2562	±3096	±1139	±198
n	5	5	5	5	5
p valor	<0.10	<0.001	<0.10	<0.005	=0.05
Porcentaje de Control			129	148	

D.S.: Desviación estándar
 n: Número de observaciones
 p: Valores entre grupos ligados y grupos control
 N.S.: No significativo

Este aumento fue menos notable en las placentas intermedias y en las placentas distales, se notó una ligera diferencia al comparar con el lado no operado. Figura 1.

ACTIVIDAD TOTAL DE LA RNASA EN PLACENTAS DE RATAS

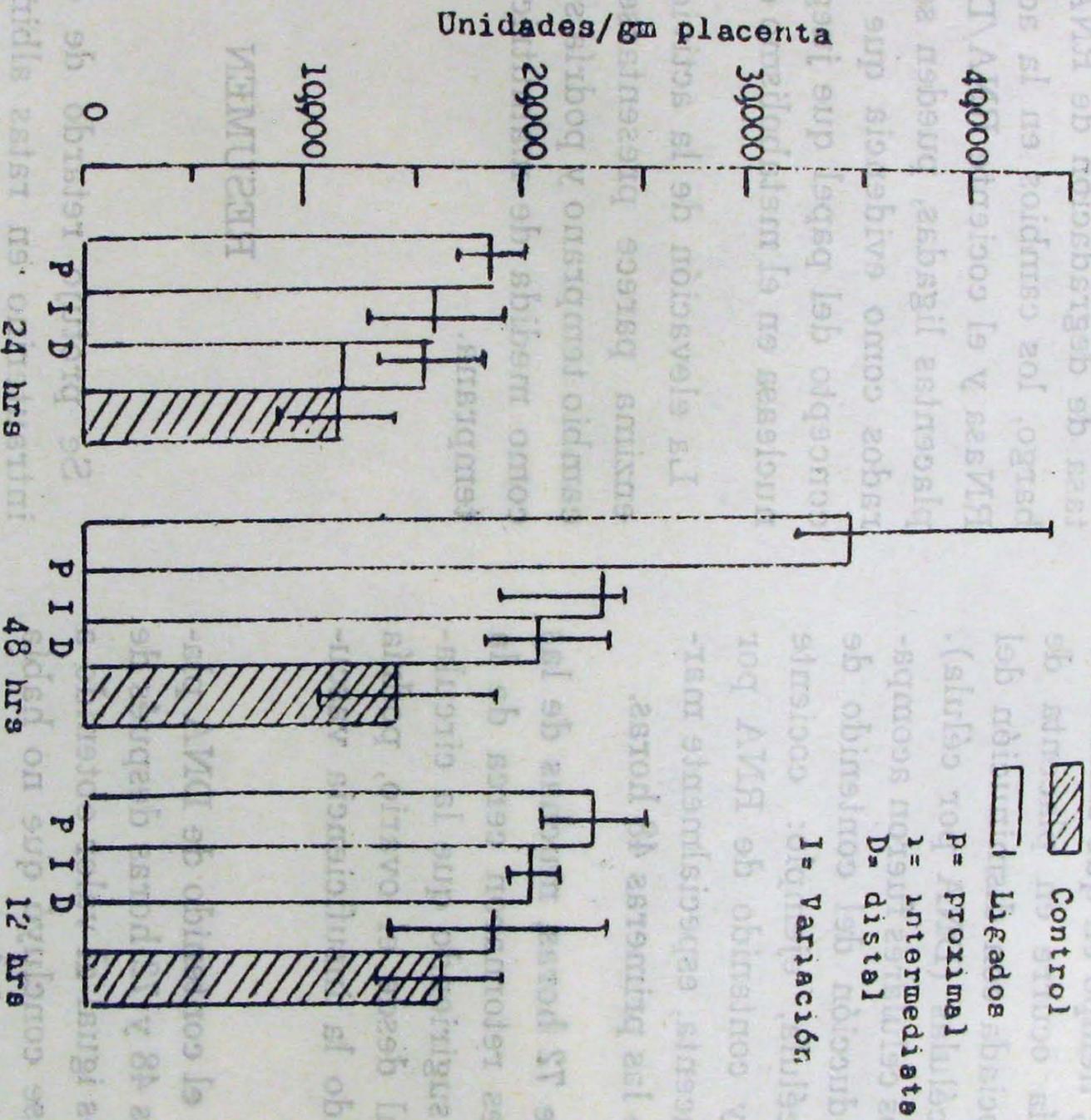


Fig. 1: Cambios en la actividad de la RNasa en placenta de rata después de 24, 48 y 72 horas de haber sido ligada la arteria uterina. Nótese que la actividad de la enzima, en aumenta inversamente con la distancia de la ligadura.

Cuando los resultados se expresaron como unidades por miligramo de proteína, elevaciones significativas fueron aparentes sólo a las 48 y 72 horas después de la ligadura, cuando se expresaron los resultados por célula o miligramos de DNA, elevaciones significa-

tivas fueron vistas sólo a las 48 horas. La elevación de la actividad ocurrió con caída del contenido de RNA por célula, de manera que la actividad de RNasa por miligramo de RNA fue más grande que el aumento de actividad de RNasa, por célula. Tabla 3.

DISCUSION

Este estudio demostró que la ligadura de la arteria uterina a los 16 días de gestación, tiempo en que síntesis de DNA todavía ocurre en placenta de rata, fue asociada con disminución del número de células (DNA por célula). Estos cambios celulares fueron acompañados de reducción del contenido de RNA por célula, ejemplo: cociente RNA/DNA y contenido de RNA por gramo de placenta, especialmente marcado durante las primeras 48 horas.

Después de 72 horas, muchas de las anormalidades retornaron cerca de la normalidad, sugiriendo que la circulación colateral desde el ovario, podría estar aliviando la insuficiencia vascular.

Desde que el contenido de DNA placentario a las 48 y 72 horas después de la ligadura es igual al valor obtenido a los 16 días, se concluyó que no había ocurrido muerte celular a consecuencia de la ligadura. Esto estuvo de acuerdo con lo reportado por Wigglesfoth (7) quien no encontró evidencia de anormalidades histológicas o destrucción celular en placentas ligadas por 5 días.

Este trabajo describe también las alteraciones que ocurrieron con la actividad de RNasa placentaria. Uno de los cambios más tempranos fue la elevación de la RNasa con concomitante disminución de RNA de los tejidos. Estos cambios en el metabolismo del Acido Ribonucleico, precedieron a cambios en el contenido total de DNA y son mu-

cho más marcados que las reducciones en peso placentario o contenido de proteínas.

En este estudio no se determinó la tasa de degradación de RNA. Sin embargo, los cambios en la actividad de RNasa y el cociente RNA/DNA en las placentas ligadas, pueden ser considerados como evidencia que soporte el concepto del papel que juega la Ribonucleasa en el metabolismo celular.

La elevación de la actividad de esta enzima parece presentarse como un cambio temprano y podría ser utilizado como medida de malnutrición celular temprana.

RESUMEN

Se produjo retardo de crecimiento intrauterino en ratas albinas, ligando la arteria uterina que supe sangre a uno de los cuernos del útero, a los 16 días de gestación. El otro cuerno uterino se dejó sin tocar y sirvió como control.

Los animales fueron sacrificados: 24, 48, 72 horas después de la ligadura y las placentas fueron divididas en: proximal, intermedia y distal del sitio de ligadura.

En todos los parámetros estudiados, el grado de anormalidad fue inversamente proporcional a la distancia de la placenta del sitio de ligadura.

Fetos y placentas fueron más pequeños en el lado ligado. La actividad de la Ribonucleasa total, fue más elevada en los fetos "ligados", expresado por gramo de tejido o miligramos de ácido ribonucléico. La elevación de la enzima se asoció con reducción del contenido total de RNA y el cociente RNA/DNA.

Estos resultados favorecen la hipótesis de que la Ribonucleasa juegue un papel importante en la regulación de los niveles de RNA. Además, sugiere la posibilidad de usar la actividad de la ribonucleasa alcalina, como marcador del retardo fetal intrauterino.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 Kraft, N. and Shortman, K. (1970). A suggested function for animal tissue ribonuclease —ribonuclease inhibitor system based on studies of isolated cells and phytohemagglutinin— transformed lymphocytes. *Biochem. Biophys. Acta*, 217: 164.
- 2 Rosso, P. Nelson, M. and Winick, M. (1971). RNase activity in normal malnourished brain. *Fed. Proc.*, 30: 459.
- 3 Winick, M. (1968). Cellular growth of the placenta as an indicator of abnormal fetal growth. In: *Diagnosis and Treatment of Fetal Disorders*. ed. K. Adamson. Springer-Verlag, New York, p. 83.
- 4 Roth, J. S. (1968). Some observations on the assay and properties of ribonucleases in normal and tumor tissues. In: *Methods in Cancer Research III*. ed. H. Busch. Academic Press. New York, p. 153.
- 5 Fleck, A. and Munro, H. N. (1962). The precision of ultraviolet absorption measurements in the Schmidt-Thannhauser procedure for nucleic acid estimation. *Biochim. Biophys. Acta*, 55: 571.
- 6 Hutchison, W. C., Downie, E. D. and Munro, H. N. (1962). Factors affecting the Schneider procedure for estimation of nucleic acids. *Biochem. Biophys. Acta*, 55: 561.
- 7 Bailey, J. L. (1962). In: *Techniques in Protein Chemistry*. Elsevier, Amsterdam, p. 294.
- 8 Wigglesworth, J. S. (1964). Experimental growth retardation in the fetal rat. *J. Path. Bact.*, 88: 1.
- 9 Girija, N. S. (1965). Effect of protein depletion on ribonucleic acid metabolism in rat liver. *Indian J. Biochem.*, 2: 85.
- 10 Quirin-Stricker, C. and Mandel, P. (1968). Etude du renouvellement du RNA des polysomes, du RNA de transfert et du RNA "messenger" dans le foie de rat soumis a un jeune protéique. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1: 50.

