

Desarrollo de un modelo experimental para la caracterización de la respuesta funcional del corioamnios humano

CLAUDIA VERÓNICA ZAGA-CLAVELLINA,^a ROSARIO LÓPEZ-VANCELL,^b
ROLANDO MAIDA-CLAROS,^c JORGE BELTRÁN-MONTOYA,^d FELIPE VADILLO-ORTEGA^a

RESUMEN

Objetivo: Este estudio fue diseñado para validar y caracterizar un modelo de cultivo de membranas corioamnióticas (MC) humanas que permita mantenerlas íntegras, viables y reproducir su capacidad de respuesta como tejido, que separa al compartimiento materno-fetal ante diversos estímulos asociados al proceso infeccioso.

Material y métodos: Se utilizaron MC de mujeres con 37-40 semanas de gestación, sin trabajo de parto activo, ni señales clínicas y/o microbiológicas de infección cervicovaginal. Las MC fueron sujetadas a una placa de cultivo tipo transwell, que permitió la formación de dos compartimentos independientes delimitados por la membranas que se mantuvieron en cultivo 96 h, se evaluó la integridad estructural mediante resistencia eléctrica transeptelial y análisis histológico. La funcionalidad se midió estimulando de manera independiente o conjunta amnios y/o corion con 500 ng/mL de lipopolisacárido o 5 ng/mL de IL-1 β y cuantificando la secreción de TNF α por ELISA y de Metaloproteasa-9 (MMP-9) por zimografía, respectivamente.

Resultados: Las diferentes poblaciones celulares de las MC se mantuvieron metabólicamente viables en el cultivo; los parámetros de integridad indicaron que no presentan cambios morfo-estructurales significativos. El estímulo con IL-1 β induce secreción diferencial de MMP-9, que en corion alcanzó su máximo a la 4 h y en amnios a las 24 h. La estimulación selectiva con lipopolisacárido indujo la síntesis diferencial de TNF α , siendo el corion el principal productor con aproximadamente 60%.

Conclusiones: El sistema de cultivo de MC propuesto, permite estudiar cuantitativa y cualitativamente la contribución de las distintas poblaciones celulares del corioamnios en la respuesta ante el estímulo diferencial con agentes inmunológico-infecciosos.

PALABRAS GUÍA: Membranas fetales, corion, amnios, infección intrauterina, IL-1 β , TNF α .

^a Dirección de Investigación, del Instituto Nacional de Perinatología (INPer).

^b Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

^c Departamento de Neonatología del INPer.

^d Departamento de Ginecología y Obstetricia, del INPer Instituto Nacional de Perinatología, México, México, D.F.

Correspondencia:

Dr. Felipe Vadillo Ortega

Instituto Nacional de Perinatología, Montes Urales 800, Lomas de Virreyes, México, D.F. 11000 Tel. y fax 5520-0034. Correo electrónico: felipe.vadillo@uia.mx Este proyecto fue financiado por CONACYT Salud 2002 C01-7036

Recibido: 25 de mayo de 2004.

Aceptado: 22 de junio de 2004.

INTRODUCCIÓN

El embrión humano desarrolla durante el embarazo tejidos extraembrionarios accesorios que incluyen a la placenta y a las membranas corioamnióticas (MC), que en conjunto proveen al producto de diferentes mecanismos de intercambio, protección y control de las relaciones con su medio ambiente. Las MC delimitan la cavidad amniótica y están constituidas por dos capas histológicas adosadas, denominadas amnios y corion, cada una de las cuales está formada por diferentes tipos celulares embebidos en una prominente matriz extracelular, cuyo principal componente es la colágena, de la cual derivan su fuerza y elasticidad.¹

Las MC son una identidad anatómica sumamente compleja y dinámica que secretan diferentes sustancias hacia el líquido amniótico y son capaces de responder a diferentes señales bioquímicas provenientes tanto del producto como de la madre.²

Uno de los eventos que caracteriza a las etapas tardías del trabajo de parto normal es la ruptura de las MC, que junto con las contracciones uterinas y la dilatación del cuello del cérvix, preceden a la expulsión del producto. En la mayoría de los partos, las membranas permanecen íntegras hasta que el cuello uterino desarrolla dilatación avanzada, sin embargo, en algunas mujeres la ruptura de estas estructuras se presenta en ausencia de todos los demás eventos que caracterizan el trabajo de parto, situación que se denomina ruptura prematura de membranas (RPM). Esta patología obstétrica se presenta en pacientes con más de 20 semanas de embarazo y complica entre 5 y 10% del total de los embarazos en todo el mundo.^{2,3}

Tanto el mecanismo normal que condiciona la ruptura de las MC, como el que promueve la RPM son aún poco entendidos; sin embargo, a lo largo de los últimos años se ha conformado un panorama explicativo más extenso que permite entender que la RPM tiene un origen multifactorial.⁴⁻⁷

Dentro de los factores que se han asociado de manera más directa con el desarrollo de la RPM, destaca la presencia de una infección cervico-

vaginal o intrauterina, que puede explicar hasta la tercera parte del total de los embarazos complicados con RPM.⁸ Existen suficientes evidencias de que los microorganismos patogénicos existentes en cérvix y vagina pueden ascender hacia la región coriodescidual y eventualmente penetrar a la cavidad amniótica. En cada uno de estos puntos de contacto se disparan una red de señales que coordinan la defensa contra la infección, pero desafortunadamente, también producen daño colateral a las MC que podría terminar en RPM.⁹ Parte de estas señales incluyen la secreción de citocinas, tales como: IL-1 β , TNF α , IL-8 e IL-6 las cuales a su vez inducen la producción de factores uterotónicos como prostaglandinas E2 (PGE2) y F_{2 α} (PGE_{2 α})^{10,11} y de metaloproteasas de matriz extracelular (MMP, por sus siglas en inglés) como la colagenasa tipo IV de 92 kDa o MMP-9 y la colagenasa IV de 72 kDa o MMP-2. A estos últimos mediadores se les considera como los efectores del daño a las MC, ya que su actividad alterada resulta en la degradación de la matriz extracelular que mantiene la arquitectura del corioamnios.^{12,13} Sin embargo, y a pesar del avance en el entendimiento de la fisiopatología de la RPM, no es claro aún cómo, cuándo y en qué magnitud contribuyen, cada una de las poblaciones celulares de las MC, en la producción de los diferentes mediadores funcionales que median las respuestas que al final se manifiestan en RPM. Por lo anterior, decidimos diseñar, validar y estandarizar un sistema de cultivo de MC que permita mantenerlas íntegras, viables y funcionales, de modo que corion y amnios puedan ser estimulados con componentes del proceso infeccioso e inflamatorio en forma simultánea, independiente y selectiva, y poder así analizar la respuesta funcional de ambas regiones.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cultivo de membranas corioamnióticas humanas.

Se utilizaron membranas corioamnióticas de mujeres con indicación de cesárea, con edades gestacionales entre 37 y 40 semanas, sin evidencia de trabajo de parto activo ni



antecedentes o características clínicas y/o microbiológicas de infección cervicovaginal, coriodesidual y/o intraamniótica. Este proyecto fue evaluado y aprobado por los Comités de Investigación y Ética del Instituto Nacional de Perinatología (Código 212250-06101).

Las membranas fueron transportadas al laboratorio en Medio de Tagle modificado por Dulbecco (DMEM) estéril (Gibco BRL, Bethesda, USA), en condiciones de esterilidad. Fueron lavadas en solución Hanks 1X (Gibco BRL, Bethesda, USA) para remover los coágulos adheridos; posteriormente fueron cortadas manualmente en discos de 18 mm de diámetro y colocadas sobre una pieza de Transwell® (Costar, Acton, USA) de 12 mm de diámetro, en donde fueron sujetadas con una liga de silicón estéril. Con este sistema se formaron dos cámaras independientes, en donde el corion quedó hacia la cara superior y el amnios hacia la cara inferior, lo que permitió estimular y analizar en forma selectiva la respuesta en ambos lados de la membrana.

En cada una de las dos cámaras se puso 1 mL de medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1 mM de piruvato de sodio, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycinina y 10 µg/mL de anfotericina B/Gibco, BRL, Bethesda, USA).

Los explantes se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂; el medio suplementado con SFB se recambió cada 24 h, por un periodo de 48 h. De 20 a 24 h antes de los experimentos, los explantes fueron cultivados en DMEM suplementado, con 0.2% de hidrolizado de lactoalbúmina (LAH), 1 mM de piruvato de sodio, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycinina y 10 µg/mL de anfotericina B (Gibco, BRL, Bethesda, USA).

2. Pruebas de validación del modelo.

a) Viabilidad

Fue determinada con una prueba colorimétrica, la técnica está basada en la transformación mediante una deshidro-

genasa mitocondrial del compuesto azul de tetrazolio (XTT) en una sal de formazán, esta conversión sólo puede ser hecha por células metabólicamente activas¹⁴ (Boehring, Mannheim Germany). Brevemente: 200 µL de una mezcla del reactivo (acoplador de electrones – sal XTT 1:50) fueron agregados al medio de cultivo, en el que se encontraban las membranas, por un periodo de 1 h a 37 °C. La conversión metabólica fue evidenciada por el cambio de color en el medio, el cual fue cuantificado espectrofotométricamente a 475 nm. La prueba se hizo en ambas caras de las membranas montadas en el *transwell*.

b) Integridad

Para medir la integridad física y permeabilidad de las membranas en cultivo se calculó la resistencia eléctrica trans-epitelial/RET).¹⁵ En esta técnica se utilizó como soporte un filtro de nitrocelulosa de 13 mm de diámetro, sobre el que se colocó el explante entre dos cámaras de Lucita® (llenas de medio DMEM) de una cámara de Ussing (UNAM, México); una vez montada la membrana y mediante dos electrodos de plata, se aplicó un pulso de 20 µAmp en la cara del corion y la deflexión del voltaje fue medida en la cara amniótica. La RET fue medida cada 24 h, por un periodo de cuatro días de cultivo. Los cálculos se hicieron con base en la Ley de Ohm y la contribución del filtro y del medio fueron restadas.

$$R = \Delta V (14.135) \Omega [\text{cm}^2]$$

Donde:

R = Resistencia

ΔV = Voltaje final (Vf) – Voltaje inicial (Vi)

14.135 = Constante resultado de la relación entre el área total sometida a la corriente (0.02827 cm²) y el amperaje (20x10⁻⁶ amp).

c) Funcionalidad

Para determinar la capacidad de las MC para responder a estímulos funcionales, fueron estimuladas selectivamente con 5

ng/mL de IL-1 β (R&D Systems, Minneapolis, USA) en corion y amnios, para poder cuantificar el efecto de esta citocina sobre la secreción al medio y actividad de la MMP-9, la cual se midió a través de un curso temporal a las 2, 4, 8, 12 y 24 h después del estímulo inicial mediante zimograma (ver detalle de la técnica más adelante).

3. Microscopía

La integridad anatómica del tejido fue analizada a lo largo de la 96 h que duró el periodo de cultivo. Las mismas membranas utilizadas para medir la RET fueron fijadas en *buffer* de Karnovsky, pH 7.3 (cacodilato de sodio 0.1M, glutaraldehído al 2.5%) y posteriormente incluidas en EPON; se hicieron cortes semifinos de 1 μ m, que fueron analizados mediante microscopía de luz.

4. Estimulación de las membranas en cultivo con lipopolisacárico (LPS)

Con el fin de estabilizar el tejido después de la manipulación y antes de la estimulación, los explantes fueron preincubados por 48 h con DMEM-SFB. Después de este tiempo fueron estimulados con 500 ng/mL de LPS de *Escherichia coli* 055:B5 (Sigma, St. Louis, USA).

Cada experimento montado en el sistema de *Transwell* incluyó las siguientes modalidades de estimulación por triplicado: *Basales*: Membranas control las cuales tanto corion como amnios fueron tratados únicamente con 100 μ l de solución salina (vehículo); *Ambos*: El LPS fue añadido simultáneamente a ambos compartimientos, *Corion*: El LPS fue añadido únicamente a la cara del corion y, *Amnios*: El LPS fue añadido únicamente al compartimento en contacto con el amnios.

Los medios de ambas cámaras fueron colectados 24 h después y se guardaron a -70 °C hasta su uso. La concentración de proteínas en todas las muestras fue calculada con el método de Bradford.

5. ELISA

La concentración de TNF α en el medio de cultivo fue cuantificada mediante ELISA tipo sandwich en microplacas de 96 pozos (Nunc Maxisorp, Denmark). La citosina se inmovilizó con 500 ng/pozo de anticuerpo monoclonal anti TNF α humana (R&D Systems, Minneapolis, USA), las placas fueron incubadas a 4 °C toda la noche. El anticuerpo que no se unió fue removido lavando la placa con *buffer* de fosfatos a pH 7.4 con 0.05% de Tween 20 (PBS-Tween). La microplaca fue bloqueada con 300 μ l por pozo de PBS con 1% de BSA, 5% de sacarosa y 0.05% de NaN₃ por 3 h a temperatura ambiente (TA). Se hizo una curva estándar usando TNF α recombinante humana (R&D Systems, Minneapolis, U.S.A.); la sensibilidad de la curva fue de 3.91 pg/mL en un intervalo lineal de 5.0 a 500 pg/mL. 100 μ L de cada estándar o muestra fueron incubados toda la noche a 4 °C, las microplacas se lavaron nuevamente tres veces y se incubaron con 25 ng/pozo del anticuerpo policlonal-biotinilado correspondiente (R&D Systems, Minneapolis, USA), por 2 h a TA, después de lavar tres veces la microplata, ésta fue incubada con 9.0 ng/pozo de conjugado streptavidina/fosfatasa alcalina (Gibco BRL, Bethesda, U.S.A.) por 1.5 h a 37 °C; para generar la reacción colorimétrica que fue leída a 450 nm en un lector de microplacas (DYNATECH MR 500), se agregaron a cada pozo 100 μ g de p-nitrofenilfosfato como substrato (Sigma, St. Louis, USA).

6. Zimografía

La presencia y actividad de la MMP-9 se hizo mediante un ensayo de zimografía. Los geles de poliacrilamida al 8% se copolimerizaron con gelatina a una concentración de 1 mg/mL. La electroforesis se corrió a un amperaje constante de 10 mA por gel, en condiciones no desnaturalizantes; se usaron 0.5 μ g de proteína por muestra en cada experimento. Fue incluido en cada gel un estándar de actividad para MMP-2 y MMP-9 obteniendo de una línea celular



U937 de promielocitos (ATCC, Tockville, MD, U.S.A.). Los geles se lavaron en una solución al 2.5% de tritón X-100 por 30 minutos y posteriormente se incubaron durante 18 h a 37 °C en *buffer* de actividad a pH 7.4 (50 mM Tris base, 0.15 M NaCl, 20 mM CaCl₂ y 0.02% de azida de sodio). Los geles se tiñeron con azul de coomasie R-250.

Para cuantificar la actividad gelatinolítica de la MMP-9, a cada gel se le hizo un análisis de densitometría con el software NIH-Image v1.6 8 (NIH, Bethesda, USA). La actividad lítica es estimada como el área de cada banda.

7. Análisis estadístico

La comparación entre los diferentes grupos se hizo mediante prueba de Kruskal-Wallis en las que una $p \leq 0.05$ fue considerada significativa, todos los experimentos se hicieron por quintuplicado.

RESULTADOS

Al utilizar el sistema de cultivo de las membranas corioamnióticas sobre la unidad de Transwell permitió la formación de dos compartimentos independientes (Figura 1). De esta forma se pudieron hacer las diferentes pruebas de validación y la estimulación con LPS, logrando, así, analizar el comportamiento del corion y del amnios por separado.

La prueba de viabilidad mostró que las poblaciones celulares, tanto del corion como del amnios, se mantuvieron viables y metabólicamente activas durante las 96 h que duró el periodo de cultivo (Figura 2).

La prueba que permitió evaluar la integridad de las membranas demostró que a lo largo de los cuatro días, las membranas no presentaron diferencias significativas en los valores de RET (Figura 3).

Las mismas membranas que fueron utilizadas para la prueba de RET fueron procesadas mediante técnicas histológicas estándar y permitieron comprobar que las diferentes regiones que las conforman, mantuvieron la arquitectura estructural típica de un corio-amnios íntegro (Figura 4).

Figura 1
Sistema de cultivo de membranas corioamnióticas humanas en el que se forman dos compartimentos independientes: el corion queda hacia la cara interna de la unidad de *transwell* y el amnios hacia la cara externa. Este sistema permite reproducir diferentes puntos de contacto entre distintos estímulos y las diferentes poblaciones celulares de las membranas, así como el análisis de las respuestas en forma separada e individual

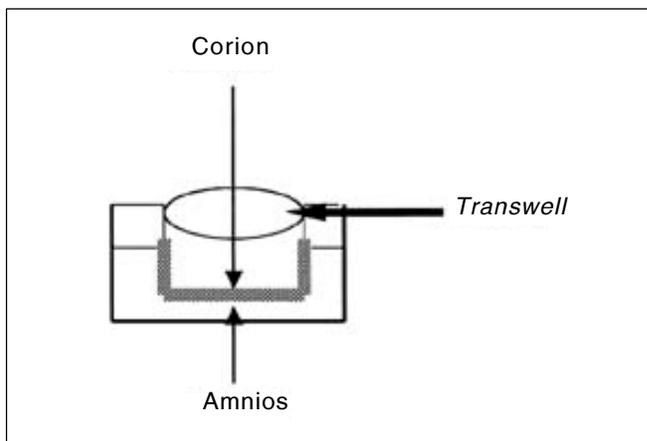


Figura 2
Viabilidad de las membranas corioamnióticas en cultivo. La prueba colorimétrica se realizó cada 24 h durante los cuatro días. La viabilidad se midió en forma independiente, pero simultánea en corion y en amnios (n = 5; * $p \leq 0.05$)

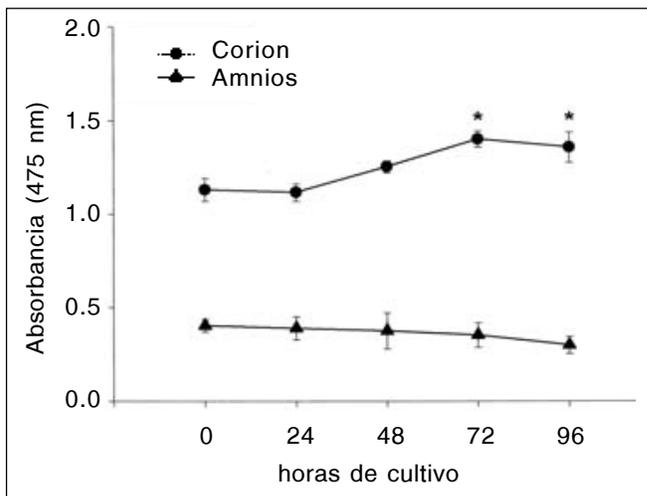


Figura 3

Integridad física y permeabilidad de las membranas corioamnióticas, medida mediante la resistencia eléctrica transepitelial (RET) durante las 96 horas de cultivo (n = 5; *p ≤ 0.05)

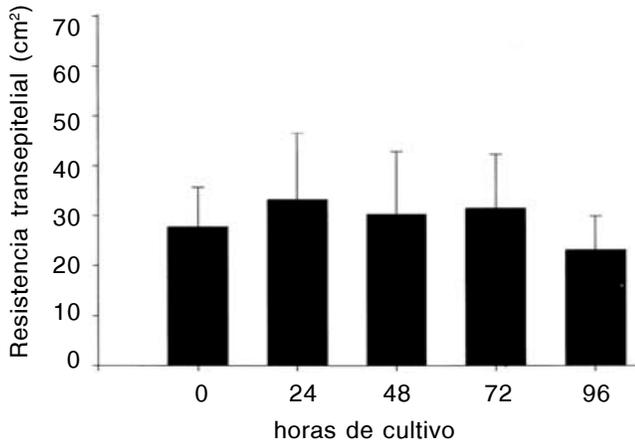
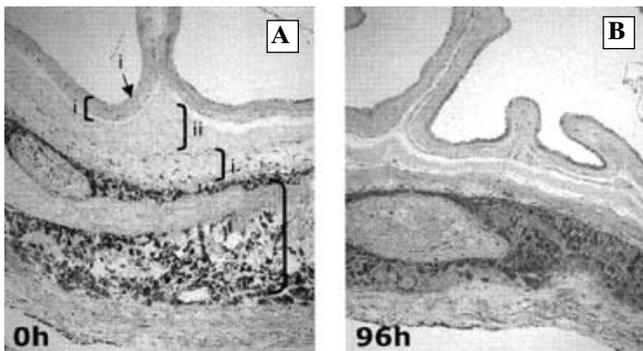


Figura 4

Integridad anatómica de las membranas. Análisis por microscopía de luz de cortes histológicos semifinos de explantes, con 0h y 96h en cultivos teñidos con azul de toluidina al 0.1%. i) Epitelio amniótico; ii), iii) Capa compacta del amnios, constituida principalmente por colágenas tipo I, III; IV, V, VI y fibronectina, organizadas en una red tridimensional sobre la que descansa la fuerza y capacidad tensil de las membranas; iv) Zona de células mesenquimatosas y fibroblastos que secretan las colágenas intersticiales de la capa compacta o intermedia, la cual permite que el amnios se deslice sobre el corion; v) Población de trofoblastos del corion



El corion secretó MMP-9 en respuesta al estímulo con IL-1β (Figura 5A). El análisis densitométrico de la zimografía indicó que, comparado con las condiciones control (0 h), el corion incrementó al doble la cantidad de enzima secretada después de 4 h, concentración que se mantuvo sin cambio hasta las 24 h.

El amnios respondió en forma proporcional al tiempo del estímulo, presentando el máximo hasta las 24 h, tiempo en el que secretó hasta siete veces más enzima, comparado con el control (0 h) (Figura 5B).

Figura 5

Respuesta funcional de las membranas ante el estímulo selectivo con 5 ng/mL de IL-1β, medida en función de la producción de MMP9 en corion (A) y amnios (B), a lo largo de distintos periodos de incubación. Cada barra corresponde al análisis densitométrico de las bandas líticas generadas en el zimograma, en la figura se muestra un gel representativo (n = 5; *p ≤ 0.05)

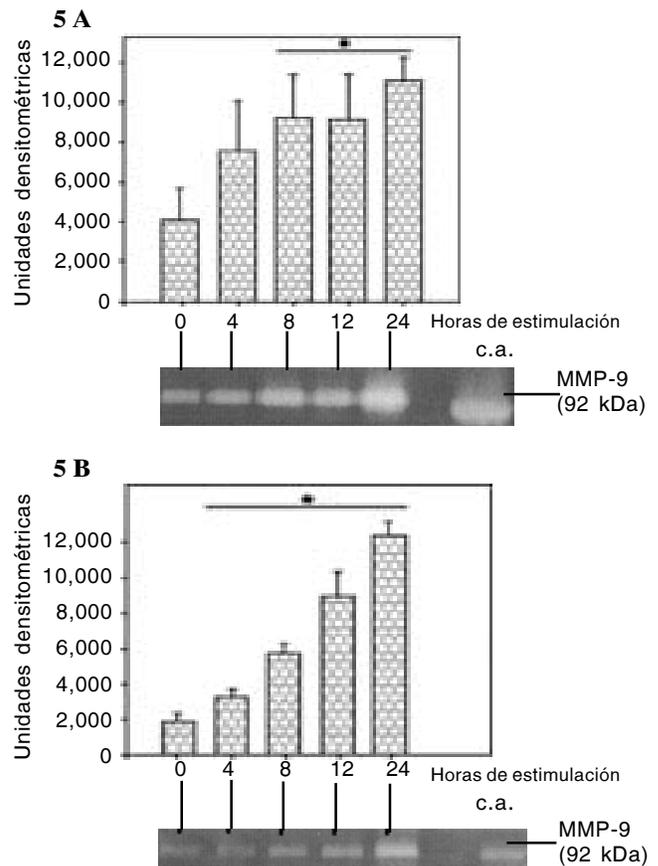
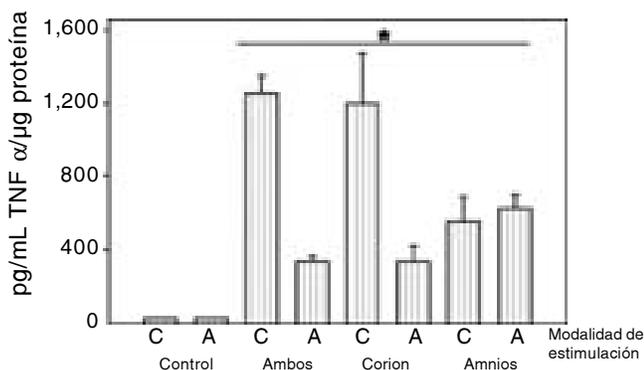


Figura 6.

Producción *in vitro* de TNF- α por las diferentes regiones de las membranas corioamnióticas, después de la estimulación selectiva con 500 ng/mL de LPS. Las cuatro modalidades de estimulación fueron: i) control de corion (C) y amnios (A); ii) ambos: en la cual C y A fueron estimulados simultáneamente; iii) corion: sólo C fue estimulado; y, iv) amnios: sólo A fue estimulado. (n = 5, *p \leq 0.05)



Comparado con los controles, la estimulación de las membranas con LPS indujo producción significativa de TNF α en ambos compartimentos; sin embargo, el LPS indujo en el corion una respuesta de hasta dos veces mayor que la que presentó la región del amnios (Figura 6).

DISCUSIÓN

Existe suficiente evidencia en la literatura para establecer la relación causal entre la respuesta a un proceso infeccioso en el tracto genital femenino y el desarrollo de RPM.^{8,9} A este respecto, la respuesta de los diferentes componentes del corioamnios, a productos bacterianos y estímulos inmunológicos o infecciosos, ha sido demostrada en distintos estudios, los cuales se han enfocado a preparaciones celulares de corion y amnios¹⁶ o membranas enteras,¹⁷ en donde no se han preservado las relaciones e integridad anatómica de las mismas. En estos estudios, células aisladas del corion, estimuladas con IL-1, TNF α o LPS, respondieron produciendo

IL-816 y citocina (que también es secretada como respuesta a la estimulación directa con estreptoco del grupo B).¹⁸

En un estudio similar, preparaciones celulares de amnios tratadas con IL-1 β , TNF α o LPS, producen IL-6;¹⁶ también se ha demostrado que el contacto directo con *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Bacillus fragilis*, *Mycoplasma hominis* o *Streptococcus aureus*, induce a estas células a biosintetizar IL-6 e IL-8, pero no otras citocinas proinflamatorias como TNF α o IL-1 β .¹⁹

Otros reportes han mostrado que membranas enteras pueden expresar diferentes citocinas en respuesta a la estimulación con LPS, en donde, a nivel de la transcripción se favorece la expresión del ARNm de IL-1 β , exclusivamente del lado del corion; sin embargo, la proteína se logra inmunolocalizar en ambas caras de la membrana.¹⁷

Es en este punto en el que es clara la ventaja de contar con un modelo experimental *in vitro*, en el cual las membranas en cultivo se mantengan íntegras y viables para mantener las distintas vías de señalización intramembranas, así como la arquitectura estructural que existen *in vivo*. De esta forma, se puede analizar, cualitativa y cuantitativamente la contribución específica de las diferentes poblaciones de las membranas fetales a una red de respuestas que se entablan ante un ambiente inflamatorio.

Existen antecedentes que demuestran que las posibilidades de análisis de las diferentes respuestas son más amplias y completas en modelos en los que las MC se mantienen íntegras. Por ejemplo, de esta forma se pudo demostrar que diversas citocinas pueden atravesar las MC de un extremo a otro^{20,21} y que, el estímulo con distintos productos bacterianos en un lado de la membrana se traduce en la síntesis de prostaglandinas en la cara opuesta.²²

El modelo que presentamos en este artículo preserva íntegras, viables y funcionales a las membranas; al mismo tiempo que mantiene la disposición anatómica y espacial que las identifica, como una barrera física entre el útero materno y el producto. Una consideración importante para la evaluación de este modelo es la conservación de la

estructura mecánica durante el periodo de cultivo, lo que fue evaluado de dos maneras: la primera, siguiendo cambios en la conductancia del tejido con RET y que de existir pérdida de la continuidad estructural, debería reflejarse como disminución súbita de la resistencia al paso de la corriente; y la segunda, mediante la verificación de manera directa la permanencia de la estructura histológica.

Tal y como se demostró, la resistencia al paso de la corriente eléctrica de las membranas no se modificó durante el periodo de observación, lo anterior correlacionó con el aspecto histológico, que aunque mostró algunos cambios en la celularidad, no mostró modificaciones compatibles con la formación de espacios de pérdida de solución.

Todo lo anterior implica que en este sistema de cultivo, tanto corion como amnios forman compartimentos separados e independientes, tal y como sucede *in vivo*. Este modelo permite entonces, estimular selectivamente una o ambas caras de la membrana y analizar la respuesta simultánea o independiente de todas las poblaciones celulares que la conforman. Por otro lado, la evidencia de que las membranas reducen activamente al compuesto XTT, confirma que éstas mantienen su viabilidad durante el periodo experimental, lo que también se refuerza con la demostración de que son capaces de responder al estímulo con LPS, sintetizando TNF α .

Las membranas responden al estímulo con LPS, secretando cantidades variables de TNF α en ambas regiones de la membrana, secreción que aparentemente depende del sitio inicial que fue estimulado con la endotoxina. La secreción de TNF α es dirigida mayoritariamente por el corion, sin embargo, el amnios reveló tener una capacidad intrínseca para secretar este factor proinflamatorio, lo que contradice otros estudios en los que no se ha

logrado caracterizar al amnios, como un tejido capaz de producir esta citocina.¹⁹ En nuestro estudio no evaluamos directamente la expresión de los ARNm de TNF α , por lo que no es posible concluir si la síntesis de la citosina se puede atribuir a un solo tejido o explicar la aparición de la proteína en ambos lados de la membrana, como una consecuencia del tráfico transmembranal de la misma

Por otro lado, las membranas responden a IL-1 β secretando MMP-9 al medio, y con ello se pone en evidencia un mecanismo mediante el cual un miembro elemental de la red de citocinas, sintetizadas en respuesta a un estímulo infeccioso, favorece la síntesis y secreción de un mediador de la degradación del tejido conectivo del corioamnios, y de este modo, entender la progresión hacia la ruptura de las membranas.^{1,2,13} Un hecho que es necesario destacar es que durante las condiciones del ensayo realizado nunca fue posible detectar la forma activa de la MMP-9 y los cambios encontrados deben ser referidos a la forma de proenzima de la MMP-9 (proMMP-9). Sin duda, el mecanismo de activación de esta enzima es un proceso más complejo que no ha sido caracterizado aún.

Este modelo experimental permite también hacer una correlación entre los diferentes marcadores funcionales y las distintas estructuras celulares que conforman el corioamnios, permitiendo potencialmente caracterizar la respuesta secuencial de los diferentes tipos celulares ante estímulos selectivos en ambas caras de la membrana, y aunque este modelo fue originalmente diseñado para estudiar al corioamnios en un ambiente que reproduce la respuesta inflamatoria, el potencial de uso es muy amplio, ya que permite evaluar estímulos de distinta naturaleza y analizar claramente cuál es la respuesta específica de las distintas regiones de las membranas fetales.



ABSTRACT

Objective: This study was designed to validate and characterize a culture model of human chorionic membranes (HCM) that keeps their viability, integrity and capacity to reproduce a response to several stimulus associated to an infectious process, as the tissue that separates the fetal and maternal compartment.

Material and methods: We use HCM obtained after delivery by elective cesarean section. Women with 37-40 weeks of gestation without evidence of active labor or presence of clinical or microbiological signs of intrauterine/vaginal infection. The membranes were mounted in transwell devices, allowing testing two independent compartments (chorion and amnion) by physically separating the upper and lower chambers. 500 ng/mL of lipopolysaccharide was added to amniotic or chorionic surface and secretions of TNF α was measured in both compartments by specific enzyme-linked immunosorbent assays and Metalloproteinase-9 (MMP-9) secretions after stimulation with 5 ng/mL of IL-1 β .

Results: The viability test showed that the different cellular populations of the HCM keep their metabolic viability along 96 h of culture. The integrity parameters showed that the stay without morphologic and structural changes. Functional markers showed that membranes responded differentially to IL-1 β stimulus; production of MMP-9 in chorion reached its maximum value at 4 h, while amnion reached it at 24 h. The selective stimulation of chorioamnion with lipopolysaccharide induced a differential synthesis of TNF α ; the chorion was the principal producer with approximately 60% of total TNF α .

Conclusions: The experimental model allows to study qualitatively and quantitatively the contribution of different cellular regions of the HCM, and its response to differential stimulation with immunologic agents.

KEY WORDS: *Fetal membranes, chorion, amnion, intrauterine infection, IL-1 β , TNF α .*

REFERENCIAS

1. Parry S, Strauss JF. Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med* 1998; 338: 663-8.
2. Bryant-Greenwood Gd. The extracellular matrix of the human fetal membranes: Structure and function. *Placenta* 1998; 19: 1-11.
3. Narcio-Reyes ML, Polo E, Tejero E, López S, Casanueva E. Etiología y sintomatología de la infección cervicovaginal en pacientes embarazadas y su relación con la incidencia de la ruptura prematura de membranas. *Perinatol Reprod Hum* 1994; 8: 207-11.
4. Shubert PJ, Diss E, Iams JD. Etiology of preterm premature rupture of membranes. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1992; 19: 251-63.
5. Keelan JA, Coleman M, Mitchel MD. The molecular mechanisms of term and preterm labor: recent progress and clinical implications. *Clin Obstet Gynecol* 1997; 40: 460-78.
6. Mercer BM. Preterm premature rupture of the membranes: etiology and implications for treatment. *Prenat Neonat Med* 1998; 3: 91-7.
7. Woods JR. Reactive oxygen species and preterm premature rupture of membranes. A Review. *Placenta* 2001; 15(Suppl A): S38-S34.
8. Asrat T. Intra-amniotic infection in patients with preterm prelabor rupture of membranes. Pathophysiology, detection, and management. *Clinic Perinatol* 2001; 28: 735-51.
9. Romero R, Mazor M, Wu YK, Sirtori M, Oyarzun E, Mitchell MD, Hobbins JC.

- Infection in the pathogenesis of preterm labor. *Sem Perinatol* 1988; 12: 262-79.
10. Mitchel MD, Branch DW, Lundin-Schiller S, Romero RJ, Dynes RA, Dudley DJ. Immunologic aspects of preterm labor. *Sem Perinat* 1991; 15: 210-24.
 11. Goldenberg RL, Andrews WW, Hauth JC. Markers of preterm birth. *Prenat Neonat Med* 1998; 3: 43-6.
 12. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Collagenolytic enzymes (gelatinases) and their inhibitors in human amniochorionic membrane. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177: 731-41.
 13. Maymon E, Romero R, Pacora P, Gervasi MT, Gomez R, Edwin SS, Yoon BH. Evidence of in vivo differential bioavailability of the active forms of matrix metalloproteinases 9 and 2 in parturition, spontaneous rupture of membranes, and intra-amniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: 887-94.
 14. Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods* 1986; 94: 57-63.
 15. López-Vancell R, Montfort I, Pérez-Tamayo R. Galactose-specific adhesin and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica*. *Parasito Res* 2000; 86: 226-31.
 16. Mitchell DM, Trautman MS, Dudley DJ. Cytokine networking in the placenta. *Placenta* 1993; 14: 249-75.
 17. Menon R, Swan KF, Lyden TW, Rote NS, Fortunato SJ. Expression of inflammatory cytokines (interleukin-1 β and interleukin-6) in amniochorionic membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172: 493-500.
 18. Dudley DJ, Edwin SS, Dangerfield A, Van Waggoner J, Mitchell MD. Regulation of cultured human chorion cell chemokine production by group B streptococci and purified bacterial products. *Am J Reprod Immunol* 1996; 36: 264-8.
 19. Reisenberger K, Egarter C, Knöfler M, Schiebel I, Gregor H, Hirschl AM, Heinza G, Husslein P. Cytokine and prostaglandin production by amnion cells in response to the addition of different bacteria. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178: 50-3.
 20. Kent ASH, Sullivan MHF, Elder MG. Transfer of cytokines through human fetal membranes. *J Reprod Fertil* 1994; 110: 81-4.
 21. Steimer B, Elder MG, Visón S, Opri F, Weitzel HK, Sullivan MHF. Transfer of interleukin-8 through human fetal membranes in vitro. *Med Sci Res* 1998; 26: 63-6.
 22. Rajasingam D, Bennett R, Alvi SA, Elder MG, Sullivan MHF. Stimulation of prostaglandin production from intact human fetal membranes by bacteria and bacterial products. *Placenta* 1998; 19: 301-6.

