



Evaluación de un microarreglo de anticuerpos en fase sólida para el estudio de quimiocinas secretadas por la membrana corioamniótica*

Nardhy Yadira Gómez López,** Guadalupe Estrada Gutiérrez,** Jorge Beltrán Montoya,** Felipe Vadillo Ortega**

Nivel de evidencia: II-2

RESUMEN

Objetivo: en las etapas finales del embarazo comienza una red de señalización que consiste en diferentes citocinas, quimiocinas y moléculas efectoras de naturaleza proteica. Debido a que esta red es compleja y difícil de estudiar en su contexto completo, el propósito de este trabajo es analizar la utilidad de un método de análisis proteómico que se base en anticuerpos en fase sólida, el cual permita distinguir la presencia simultánea de diferentes moléculas en muestras biológicas.

Tipo de estudio: biomédico experimental.

Material y método: se obtuvieron explantes de membranas corioamnióticas de mujeres con: embarazos a término, trabajo de parto espontáneo (n = 4) y cesárea (n = 4). Los explantes se incubaron durante 24 horas en medio de cultivo; se homogeneizaron y filtraron para obtener extractos, en los cuales se detectaron, de manera simultánea, diferentes quimiocinas al utilizar un microarreglo de anticuerpos anti-quimiocinas inmovilizados en fase sólida, que comprendió: eotaxina, eotaxina 2, 1-309, IL-8, IP-10, MCP-1, MCP-2, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-1 δ y RANTES.

Resultados: en los extractos de membranas corioamnióticas se encontraron las quimiocinas incluidas y la más abundante fue la IL-8. Cuando inicia el trabajo de parto hay tendencia a encontrar todas las quimiocinas en mayor concentración, excepto para RANTES, el cual desaparece cuando inicia el proceso.

Conclusiones: este enfoque metodológico permite señalar que las membranas corioamnióticas de mujeres con embarazo a término secretan diferentes quimiocinas, con un perfil cualitativo que distingue el trabajo de parto. También, este enfoque permite la evaluación rápida de marcadores potenciales de este fenómeno biológico o patológico.

Palabras clave: membrana corioamniótica, microarreglo de anticuerpos en fase sólida, quimiocinas.

ABSTRACT

Objective: At the end of pregnancy, a complex signaling network of cytokines, chemokines and proteic effector molecules is started. Due to such complexity, this network is very difficult to analyze. The aim of the present study was to evaluate the effectiveness of an antibody-based proteomic analysis method to distinguish the simultaneous presence of different molecules in biological samples.

Material and method: Amniochorion explants were obtained from women at term with spontaneous labor (n = 4) and subjected to cesarean section without labor (n = 4). Explants were cultured for 24 h and then homogenated in their own culture media to obtain cell free extracts. Chemokines were identified in these extracts using a commercial array for chemokines that included: eotaxin, eotaxin 2, 1-309, IL-8, IP-10, MCP-1, MCP-2, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-1 δ and RANTES.

Results: All the included chemokines were found in amniochorion extracts, being IL-8 the most abundant. However, once labor is present, all chemokines tend to appear in greater concentrations than those from non-in-labor tissues, except for RANTES, which disappeared when labor began.

Conclusion: This methodological approach shows that amniochorion from term pregnancies secrete chemokines with a characteristic qualitative profile during labor. This approach would allow the fast evaluation of potential markers of this phenomenon in physiologic or pathologic conditions.

Key words: amniochorion membrane, solid phase antibody microassay, chemokines.

RÉSUMÉ

Objectif : dans les étapes finales de la grossesse commence un réseau de signalisation composé de différentes cytokines, chimiokynes et molécules effectrices de nature protéique. Du fait de la complexité de ce réseau et de la difficulté de l'étudier dans son contexte complet, le propos de ce travail est celui de faire l'étude de l'utilité d'une méthode d'analyse protéomique qui trouve sa base sur des anticorps en phase solide, laquelle permette de distinguer la présence simultanée de différentes molécules dans des échantillons biologiques.

Type d'étude : biomédical expérimental.

Patients et méthode : on a obtenu des explants de membranes chorio-amniotiques de femmes avec : grossesses à terme, accouchement spontané (n=4) et césarienne (n=4). Les explants ont été incubés pendant 24 heures dans un moyen de culture ; ils ont été homogénéisés.

sés et filtrés afin d'obtenir des extraits, dans lesquels on a détecté, de manière simultanée, différentes chimiokynes lors de l'emploi d'un micro-réglage d'anticorps antichimiokynes immobilisés en phase solide, qui a compris : eotaxine, eotaxine 2, 1-309, IL-8, IP-10, MCP-1, MCP-2, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-1 γ et RANTES.

Résultats : dans les extraits des membranes chorio-amniotiques on a trouvé les chimiokynes incluses et la plus abondante a été la IL-8. Lorsque commence l'accouchement il y a une tendance à trouver toutes les chimiokynes dans une majeure concentration, sauf pour RANTES, qui disparaît lorsque commence le procès.

Conclusions : cette mise au point méthodologique permet de signaler que les membranes chorio-amniotiques de femmes avec grossesse à terme ségrégent différentes chimiokynes, avec un profil qualitatif qui distingue l'accouchement. De même, cette mise au point permet d'évaluer rapidement les marqueurs potentiels de ce phénomène biologique ou pathologique.

Mots-clé : membrane chorio-amniotique, micro-réglage d'anticorps en phase solide, chimiokynes.

RESUMO

Objetivo: nas etapas finais da gravidez começa uma rede de sinalização que consiste em diferentes citocinas quimiocinas e moléculas efetoras de natureza proteica. Pelo complexo e difícil do estudo desta rede em seu contexto completo, o propósito deste trabalho é analisar a utilidade dum método de análise proteômico baseado em anticorpos em fase sólida que permita distinguir a presente simultânea de diferentes moléculas em mostras biológicas.

Tipo de estudo: biomédico experimental.

Pacientes e método: obtiveram-se explantes de membranas corioamnióticas de mulheres com: gravidezes a término, labor de parto espontâneo (n = 4) e cesáreas (4 = 4). Os explantes se incubaram durante 24 horas em médio de cultivo; homogeneizaram-se e filtraram-se para obter extratos nos quais se detectaram, de forma, simultânea, diferentes quimiocinas ao utilizar um micro-arranjo de anticorpos anti-quimiocinas imobilizados em fase sólida, que compreendeu: eotaxina2, 1_309, IL-8, IP-10, MCP-1, MCP-2, MIG, MIP-1 α , MIP-1 γ e RANTES.

Resultados: nos extratos de membranas corioamnióticas se encontraram as quimiocinas incluídas e a de maior abundancia foi a IL-8. Quando inicia a labor de parto há tendência a encontrar todas as quimiocinas em maior concentração exeto para RANTES, o qual desaparece quando o processo começa.

Conclusões: este enfoque metodológico permite indicar que as membranas corioamnióticas de mulheres com gravidez a término secretam diferentes quimiocinas com perfil cualitativo que distingue a labor de parto. Este enfoque, também, permite a avaliação, rápida de marcadores potenciais deste fenómeno biológico ou patológico.

Palavras chave: membrana corioamniótica, micro-arranjo de anticorpos em fase sólida, quimiocinas.

La rotura fisiológica de membranas corioamnióticas sucede durante las fases tardías del trabajo de parto normal y habitualmente coincide con la dilatación avanzada del cuello uterino y las contracciones uterinas. La rotura de las membranas, disociada del trabajo de parto, se denomina rotura prematura de membranas.¹ En la actualidad se demostró que la rotura de membranas, en condiciones fisiológicas y patológicas, es un fenómeno complejo que involucra diversos procesos bioquímicos, como: apoptosis, secreción de diversos mediadores inflamatorios y

alteración en la estructura del colágeno que les da soporte. Se sabe que en membranas de tejidos a término la actividad gelatinolítica está aumentada y, como consecuencia, el contenido de colágeno disminuye en relación con membranas pretérmino.²

La colagenolisis en las membranas fetales está controlada por la acción de un grupo de enzimas llamadas metaloproteasas de matriz extracelular (MMP), principalmente de la MMP-9, la cual es una enzima que degrada el colágeno tipo IV, que da soporte al colágeno tipo I y III. A su vez, son componentes abundantes de la matriz extracelular que le da soporte a estos tejidos.³

Diversos estudios sustentan la idea de que durante el trabajo de parto se establece una red de señales alrededor de las membranas fetales, que incluye la participación de citocinas proinflamatorias como la IL-1 β y la TNF- α , que a su vez inducen el incremento en la producción de MMP-9.⁴ Si se toma en cuenta que los mediadores de inflamación y las metaloproteasas de matriz extracelular pueden sintetizarse por muchos tipos celulares, resulta complejo establecer el origen de

* Este trabajo obtuvo el segundo lugar del Premio Dr. Eliseo Ramírez para trabajos científicos de investigación básica presentados por escrito en el 57 Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia.

** Dirección de Investigación y Departamento de Tococirugía y Urgencias del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes.

Correspondencia: Dr. Felipe Vadillo Ortega, Dirección de Investigación del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes. Montes Urales 800, colonia Lomas de Virreyes, CP 11000. Tel: 5202-9381. E-mail: fvadillo@servidor.inper.edu.mx

La versión completa de este artículo también está disponible en internet: www.revistasmedicasmexicanas.com.mx

las citocinas que actúan durante el trabajo de parto y la rotura fisiopatológica de las membranas. La mayor parte de los estudios están enfocados a que las células residentes de las membranas corioamnióticas son responsables de la producción de estos mediadores. Localmente, el amnios, el corion, los trofoblastos y las células deciduales son capaces de producir citocinas proinflamatorias y MMP-9, con productos bacterianos y en condiciones basales.^{5,6}

Además, en comparación con los primeros meses del embarazo, se conoce que en las etapas finales hay incremento en el número de leucocitos en el cuello uterino, las membranas fetales y la decidua.

Los resultados derivados de trabajos de investigación de este grupo de trabajo permiten proponer que los leucocitos infiltrados en la coriodecidua pueden participar en la rotura de las membranas corioamnióticas, y producen e inducen la producción de mediadores como la IL-1 β y la TNF- α , además de MMP-9 por las células residentes en estos tejidos.⁵ Sin embargo, a la fecha no se conocen con exactitud las señales que propician la llegada de los leucocitos a la coriodecidua.

Diversos datos indican la presencia de quimiocinas en secreciones cervicovaginales y líquido amniótico, lo que sugiere que estas moléculas pueden tener una función de importancia significativa en el reclutamiento de las células que intervienen en la remodelación de los tejidos gestacionales.⁷ Por este motivo, se propone que en las etapas finales del embarazo comienza una red de señalización que consiste en diferentes citocinas, quimiocinas y moléculas efectoras de naturaleza proteica.

Debido a que esta red es compleja y difícil de analizar en su contexto completo, el propósito de este trabajo es analizar la utilidad de un método de análisis proteómico basado en anticuerpos en fase sólida, que permita distinguir la presencia simultánea de diferentes quimiocinas en extractos de membranas corioamnióticas y otras muestras biológicas.

MATERIAL Y MÉTODO

En la Unidad de Tococirugía del Instituto Nacional de Perinatología se obtuvieron membranas corioamnióticas de mujeres con embarazo normal a término (37-40 semanas), sin ninguna enfermedad, evidencia

clínica o microbiológica de infección. Se dividieron en dos grupos:

- 1) Con trabajo de parto espontáneo, sin importar la vía de terminación.
- 2) Sin trabajo de parto y por cesárea.

Obtención de extractos de membranas corioamnióticas

En la sala de expulsión, e inmediatamente después de extraerse la placenta, se tomó una muestra para análisis microbiológico de toda la superficie de las membranas corioamnióticas para descartar una infección. Las membranas corioamnióticas se transportaron al laboratorio en medio Eagle modificado por Dulbecco con antibiótico-antimicótico al 1%. En el laboratorio, y en condiciones de esterilidad, se lavaron con solución salina fisiológica, se extendieron sobre una superficie plana y se hicieron explantes de 45 cm², los cuales se cultivaron en 45 mL de medio Eagle modificado por Dulbecco complementado con 1% de piruvato de sodio y 1% de antibiótico-antimicótico.

Después de esta incubación, los explantes se homogenizaron con un Polytron (KINEMATICA AG) en su medio condicionado. Se centrifugaron a 4,000 rpm durante 2 horas, se filtraron con una membrana de 0.22 μ (CORNING) y se conservaron a -20 °C hasta su uso.

Identificación de las quimiocinas en los extractos de las membranas corioamnióticas

Las quimiocinas se identificaron en los extractos de membranas corioamnióticas por medio de un microarreglo de anticuerpos anti quimiocinas comercial *Human Inflammation Antibody Array III* (Chemicon Internacional), que comprende 40 citocinas, entre las que se encuentran 12 quimiocinas: eotaxina, eotaxina 2, 1-309, IL-8, IP-10, MCP-1, MCP-2, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-1 δ y RANTES.

El ensayo permite detectar quimiocinas por medio de anticuerpos específicos fijados en una membrana. Una vez que las quimiocinas están unidas, se revelan con un segundo anticuerpo biotinilado, un conjugado estreptavidina-peroxidasa y la adición de un sustrato quimioluminiscente. Las diferencias en intensidad de las señales quimioluminiscentes para cada citocina permiten semicuantificar la concentración de cada una de ellas por densitometría.

RESULTADOS

Los resultados del microarreglo de anticuerpos anti-quimiocinas demostraron que en los extractos de membranas corioamnióticas, con y sin trabajo de parto, estaban las 12 quimiocinas incluidas en el ensayo, aunque con diferencias en la intensidad de la señal quimioluminiscente (figura 1).

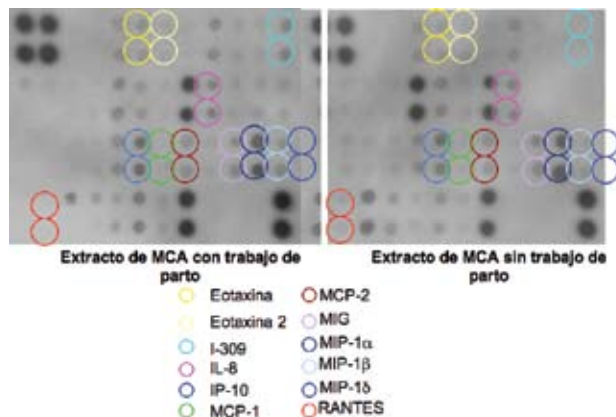


Figura 1. Microarreglo de anticuerpos anti-quimiocinas en los que se hizo reaccionar extractos de membranas corioamnióticas con y sin trabajo de parto. Las quimiocinas detectables en el microarreglo se muestran marcadas por círculos. Los extractos de membranas corioamnióticas con y sin trabajo de parto contienen todas las quimiocinas detectables en el ensayo, aunque con intensidad diferente.

Al hacer el análisis densitométrico de las señales quimioluminiscentes se observó que la IL-8 es la quimiocina más abundante. Sin embargo, existe tendencia a encontrar todas las quimiocinas en mayor concentración una vez que se ha iniciado el trabajo de parto, excepto para RANTES, que desaparece cuando se inicia el proceso (figura 2).

DISCUSIÓN

El papel de las quimiocinas en el embarazo es poco conocido. Sin embargo, diversos estudios indican que estas moléculas se encuentran en secreciones cervicovaginales y en el líquido amniótico de mujeres con embarazo a término.⁷

Como sucede con todas las redes de señalización, uno de los problemas a los que se enfrenta la investigación en el área consiste en la dificultad técnica de poder analizar todos los componentes de manera si-

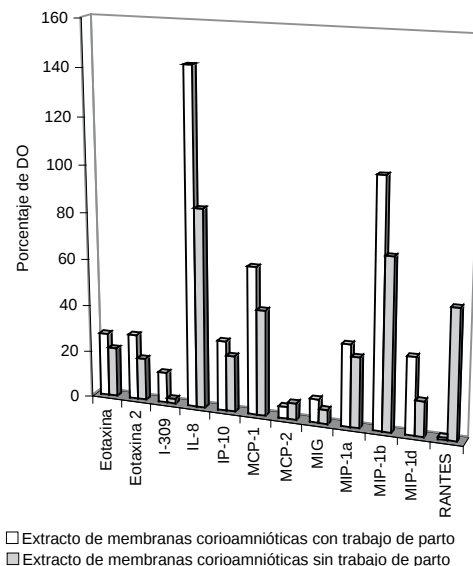


Figura 2. Semicuantificación de la concentración de quimiocinas en los extractos de membranas corioamnióticas por densitometría. El extracto de membranas corioamnióticas, con trabajo de parto, tuvo tendencia a concentración mayor de todas las quimiocinas detectables, comparado con el extracto de membranas corioamnióticas sin trabajo de parto, principalmente la IL-8. La única quimiocina que no se manifestó en el extracto de membranas corioamnióticas, con trabajo de parto, fue RANTES.

multánea y entender el grado de integración funcional de los diferentes componentes celulares y moleculares en la respuesta tisular.

Con las técnicas de la proteómica, este problema parece estar a punto de resolverse, ya que han empezado a desarrollarse técnicas que permiten un enfoque de análisis significativamente mejor al anterior. Un ejemplo de estas técnicas son los microarreglos, los cuales tienen diferentes versiones y deben ser validados para sus usos específicos.

En este trabajo se inició la distinción de la utilidad de un microarreglo de anticuerpos en fase sólida, que abarca las quimiocinas más relevantes que hasta ahora se han identificado. Este enfoque metodológico novedoso proporciona datos que indican que los tejidos gestacionales expresan quimiocinas antes y durante el trabajo de parto, lo que sugiere que pueden tener importancia significativa en el control del tráfico de células hacia los tejidos reproductivos. Los resultados de este estudio mostraron que la IL-8 fue la quimiocina más abundante en los extractos de membranas corioamnióticas; sin embargo, su intensidad tendió a ser

mayor en los extractos de membranas corioamnióticas con trabajo de parto, en comparación con los extractos sin trabajo de parto. Esto coincide con los datos que sugieren que durante el trabajo de parto hay aumento significativo en la expresión del RNAm de la IL-8 en tejidos fetales y, a su vez, este suceso se correlaciona con la aparición de infiltrado leucocitario predominantemente de neutrófilos y macrófagos.⁸

La infiltración de neutrófilos al estroma cervical y la subsiguiente liberación de proteinasas (MMP-8 y MMP-9) podrían tener un papel importante en el trabajo de parto y la rotura de membranas fetales.⁹

En contraste con la IL-8, comparado con los extractos con trabajo de parto, el RANTES fue más abundante en los extractos de membranas corioamnióticas sin trabajo de parto. Aunque esta quimiocina se ha estudiado poco en tejidos gestacionales, los resultados de este estudio coinciden con otras investigaciones. En ellas, no se le relaciona con el trabajo de parto activo, sino con el inicio del embarazo. Además, se comprobó que su concentración disminuye conforme avanza la edad gestacional.¹⁰

Los datos derivados de este trabajo indican que las membranas fetales son capaces de secretar una mezcla compleja de quimiocinas y que lo pueden hacer de manera diferencial durante el trabajo de parto. Estos resultados sustentan la posibilidad de que diferentes células circulantes, como linfocitos y polimorfonucleares, se atraigan hacia el entorno de los tejidos reproductivos, en especial de las membranas corioamnióticas.

Así, las membranas corioamnióticas catalizarían la llegada de células efectoras que podrían participar en los procesos relacionados con el trabajo de parto, como

el catabolismo del tejido conectivo que da soporte a las membranas fetales al debilitar su fuerza mecánica y provocar su rotura.

REFERENCIAS

1. Vadillo OF, Bermejo ML, Pfeffer F. Ruptura prematura de membranas: mecanismos de la enfermedad. *Perinatol Reprod Hum* 1994;8(4):180-9.
2. Vadillo OF, González AG, Furth EE, et al. 92-kd type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) activity in human amniochorion increases with labor. *Am J Pathol* 1995;146:148-56.
3. Vadillo OF, Hernández A, González AG, et al. Increased matrix metalloproteinase activity and reduced tissue inhibitor of metalloproteinases-1 levels in amniotic fluids from pregnancies complicated by premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:137-6.
4. Mitchell MD, Trautman MS, Dudley DJ. Cytokine networking I the placenta. *Placenta* 1993;14:249-75.
5. Vega SR, Estrada GG, Cévulo, VA, Beltrán MJ, Vadillo OF. Caracterización del espacio coriodecidual como un microambiente rico en células efectoras que inducen la rotura de las membranas corioamnióticas durante el trabajo de parto. *Ginecol Obstet Mex* 2004;72:593-601.
6. Young A, Thomson AJ, Ledingham MA, et al. Immunolocalization of proinflammatory cytokines in miometrium, cervix and fetal membranes during human parturition at term. *Biol Reprod* 2002;66:445-9.
7. Dudley DJ, Edwin SS, Wagoner JV, et al. Regulation of decidual cell chemokine production by group B streptococci and purified bacterial cell wall components. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:666-72.
8. Osman II, Young AI, Ledinham MI, et al. Leukocyte density and pro-inflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term. *Mol Hum Reprod* 2003;9:41-45.
9. Luo L, Ibaragi T, Maeda M, et al. Interleukin-8 levels and granulocyte counts in cervical mucus during pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2000;43(2):78-84.
10. Athayde N, Romero R, Maymon E, et al. A role for the novel cytokine RANTES in pregnancy and parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:989-94.

medigraphic.com