



Análisis tridimensional de la estructura de las membranas corioamnióticas humanas al término de la gestación*

Rodrigo Vega Sánchez,* Marisol Castillo Castrejón,* Yolanda Hornelas Orozco,*** Nardhy Gómez López,* Jorge Beltrán Montoya,** Felipe Vadillo Ortega*

Nivel de evidencia: II-3

RESUMEN

Antecedentes: la integridad física y estructural de las membranas corioamnióticas se debe a un preciso proceso de síntesis y degradación de colágeno; durante el trabajo de parto aumenta la actividad collagenolítica a su alrededor, lo que conduce a pérdida estructural y debilitamiento de su resistencia mecánica, principal causa de su rotura en condiciones fisiológicas y patológicas. La comprensión de su estructura tridimensional es indispensable para caracterizar al trabajo de parto normal y en enfermedades específicas.

Objetivo: analizar la estructura tridimensional de las membranas corioamnióticas humanas al término de la gestación.

Material y métodos: estudio descriptivo para analizar la distribución de las colágenas tipos I, III y IV en membranas corioamnióticas humanas a término (37 a 40 semanas de gestación) sin trabajo de parto, mediante microscopias confocal y electrónica de barrido.

Resultados: se observó que en el amnios las células conforman un epitelio homogéneo aunque sin contacto intercelular estrecho (epitelio clásico) lo que contribuiría al transporte de moléculas por difusión transmembranal. También que el tejido conectivo del amnios es una red fibrilar compleja de colágeno tipo I, soportada estructuralmente por la colágena tipo IV. Por el contrario, el corion tiene gran cantidad de células en estrecho contacto, con muy pocas fibras de colágeno tipos I y III, y casi ninguna de colágeno tipo IV.

Conclusiones: el análisis tridimensional del tejido conectivo de las membranas corioamnióticas, particularmente del amnios, permite entender el papel central que desempeñan tanto la colágena tipo IV en el mantenimiento de su estructura, como las enzimas collagenolíticas en su degradación y rotura en condiciones normales y patológicas.

Palabras clave: membrana corioamniótica humana, colágeno, collagenólisis, microscopía confocal, microscopía electrónica de barrido.

ABSTRACT

Background: Physical and structural chorioamniotic membranes integrity is due to a precise process of synthesis and degradation of collagen; surrounding collagenolytic activity raises during labor, what leads to a structural loss and mechanical resistance weakening, the main cause of its rupture under physiological and pathological conditions. Understanding of its three-dimensional structure is essential to characterize normal and pathological labor.

Objective: To analyze three-dimensional structure of human chorioamniotic membranes at gestational term.

Material and methods: Descriptive study to analyze the distribution of collagens type I, II and IV in human chorioamniotic membranes at term (37 to 40 gestational weeks) without labor by means of confocal and electronic scan microscopy.

Results: Cells' amnios shapes a homogeneous epithelium without a close intercellular contact (classic epithelium) what may contribute to transmembranal diffusion molecules' transport. Amnios connective tissue is too a complex fibrilar net of type I collagen, structurally supported by type IV collagen. On the contrary, corion has a great amount of cells in close contact, with a few fibers of type I and II collagen, and almost none of type IV collagen cells.

Conclusion: Three-dimensional analysis of chorioamniotic membranes connective tissue, particularly amnios, allows to understand the main role of type IV collagen on supporting its structure, as well as collagenolytic enzymes in its degradation and rupture under normal and pathological conditions.

Key words: human chorioamniotic membrane, collagen, collagenolysis, confocal microscopy, electronic scan microscopy.

RÉSUMÉ

Antécédents : l'intégrité physique et structurelle des membranes chorioamniotiques est due à un procès précis de synthèse et dégradation de collagène, pendant le travail augmente l'activité collagène-lytique aux environs, ce qui conduit à une perte structurelle et affaiblissement de leur résistance mécanique, cause principale de leur rupture sous des conditions physiologiques et pathologiques. La compréhension de leur structure tridimensionnelle est indispensable pour caractériser le travail normal et dans des maladies spécifiques.

Objectif : faire l'analyse de la structure tridimensionnelle des membranes chorioamniotiques humaines au terme de la gestation.

Méthodologie : étude descriptive pour faire l'analyse de la distribution des collagènes des types I, III et IV dans des membranes chorioamniotiques humaines à terme (37 à 40 semaines de gestation) sans travail, au moyen de microscopies confocale et électronique à balayage.

Résultats : on a observé que dans l'amnios les cellules conforment un épithélium homogène mais sans contact intercellulaire étroit (épithélium classique) ce qui contribuerait au transport des molécules par diffusion transmembranaire. De même que le tissu connectif de l'amnios est un réseau fibrillaire complexe de collagène type I, soutenu principalement par le collagène type IV. Contrairement, le chorion a une grande quantité de cellules en contact étroit, avec très peu de fibres de collagène type I et III, et presque aucune de collagène type IV.

Conclusions : l'analyse tridimensionnelle du tissu connectif des membranes chorioamniotiques, particulièrement de l'amnios, permet de comprendre le rôle central que jouent tant le collagène type IV dans le maintien de leur structure, comme des enzymes collagène-lytiques dans leur dégradation et rupture sous des conditions normales et pathologiques.

Mots-clés : membrane chorioamniotique humaine, collagène, collagénolyse, microscopie confocale, microscopie électronique à balayage.

RESUMO

Antecedentes: A integridade física e estrutural das membranas corioamnióticas é devida a um preciso processo de sínteses e degradação de colágeno. Durante o trabalho de parto aumenta a atividade colagenolítica ao seu redor, o que conduz a perda estrutural e enfraquecimento de sua resistência mecânica, principal causa de sua quebra em condições fisiológicas e patológicas. A compreensão de sua estrutura tridimensional é indispensável para caracterizar o trabalho de parto normal e as doenças específicas.

Objetivo: Analisar a estrutura tridimensional das membranas corioamnióticas humanas em término da gestação.

Metodologia: Estudo descritivo para analisar a distribuição dos colágenos tipos I, III e IV em membranas corioamnióticas humanas em término (37 a 40 semanas de gestação) sem trabalho de parto, mediante microscópias confocal e eletrônica de varredura.

Resultados: Foi observado que em amnios as células conformam um epitélio homogêneo ainda que sem contato intercelular estreito (epitélio clássico) o que contribuiria o transporte de moléculas por difusão transmembranal. Também que o tecido que conecta os amnios é uma rede fibrilar complexa de colágeno tipo I, suportada estruturalmente pelo colágeno tipo IV. Pelo contrário, o córion tem grande quantidade de células em estreito contato, com poucas fibras de colágeno tipos I e III, e quase nenhuma de colágeno tipo IV.

Conclusões: A análise tridimensional do tecido conectivo das membranas corioamnióticas, particularmente dos amnios, permite entender o papel central que desempenham tanto o colágeno tipo IV de manutenção da estrutura, como as enzimas colagenolíticas em sua degradação e quebra em condições normais e patológicas.

Palavras-chave: membrana corioamniótica humana, colágeno, colagenólises, microscopia confocal, microscopia eletrônica de varredura.

- Este trabajo obtuvo el segundo lugar del Premio Dr. Eliseo Ramírez otorgado por la Federación Mexicana de Ginecología y Obstetricia a los trabajos de investigación básica presentados en el 58 Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia celebrado en Monterrey, NL, octubre 2007. Se realizó con apoyo del Fondo Sectorial de Salud de CONACyT (Proyecto 7036).
- * Dirección de investigación.
- ** Departamento de especialidades médicas.
Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, México, DF.
- *** Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, México, DF.

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

Este artículo debe citarse como: Vega SR, Castillo CM, Hornelas OY, Gómez LN, Beltrán MJ, Vadillo OF. Análisis tridimensional de la estructura de las membranas corioamnióticas humanas al término de la gestación. Ginecol Obstet Mex 2008;76(1):38-44. La versión completa de este artículo también está disponible en internet: www.actualizacionmedica.com.mx

Las membranas corioamnióticas humanas conforman el tejido extraembrionario que lo aísla y le provee protección ante el estrés mecánico de toda la gestación, además de tener funciones secretoras importantes. Dichas membranas están formadas por dos capas adyacentes, el corion y el amnios, que a su vez están compuestas por diversos tipos celulares. La gran resistencia mecánica que caracteriza a estas membranas se debe a una amplia estructura de tejido conectivo, constituida sobre todo por distintos tipos de colágeno.¹

Las colágenas tipo I y III principalmente forman una red fibrilar en todas las capas que componen el amnios (compacta, esponjosa y reticular); se localizan también, aunque en mucho menor medida, en la decídua cercana a los trofoblastos del corion. La colágena tipo IV es el principal componente de la membrana

basal que sostiene al epitelio amniótico y de la pseudomembrana basal del corion. Hay datos de que este tipo de colágena también forma las estructuras no fibrilares en la capa reticular del amnios, por lo que se sugiere que sirve como soporte estructural de la red fibrilar de las colágenas I y III.^{2,3}

Durante la gestación, el mantenimiento de la integridad física y estructural de las membranas corioamnióticas se logra mediante un proceso equilibrado de síntesis y degradación de colágena.⁴ Sin embargo, cuando se manifiesta el trabajo de parto, la actividad colagenolítica alrededor de ellas se incrementa, lo que conduce a la pérdida estructural y finalmente al debilitamiento de su resistencia mecánica. Este mecanismo es la principal causa de la rotura de dichas membranas tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.⁵ Por esto es indispensable la adecuada comprensión de la estructura tridimensional de las membranas en la caracterización del trabajo de parto normal y en enfermedades específicas, como la rotura prematura de membranas.

En este trabajo abordamos el análisis estructural de las membranas corioamnióticas de forma tridimensional, mediante dos metodologías distintas: las microscopias confocal y electrónica de barrido.

METODOLOGÍA

Muestras biológicas

Se utilizaron membranas corioamnióticas obtenidas en la Unidad de Tococirugía del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes. Todas provenían de mujeres que tuvieron embarazo a término (37 a 40 semanas de gestación) por cesárea sin indicios de trabajo de parto, con el fin de asegurar la integridad estructural del tejido conectivo que las conformaba. Las membranas se cortaron cerca del sitio de unión a la placenta y se transportaron en medio DMEM con 1% de antibiótico-antimicótico. Una vez en el laboratorio, se lavaron con solución salina fisiológica y se procesaron de acuerdo con la metodología específica.

Marcaje fluorescente de anticuerpos monoclonales

Se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos para colágena humana de los tipos I, III y IV (Calbio-

chem, La Jolla, EU). Estos anticuerpos se marcaron con los fluorocromos Alexa-fluor 546, Alexa-fluor 532 y Alexa-fluor 647, respectivamente, de acuerdo con el procedimiento indicado por el proveedor, con modificaciones (Molecular Probes, Eugene, EU). Para el marcaje, se mezclaron 20 µg del anticuerpo con el fluorocromo y con 2 µL de bicarbonato de sodio 1M. Esta mezcla se incubó en la oscuridad, a temperatura ambiente, durante una hora, seguido de incubación a 4°C durante toda la noche. Para purificar el anticuerpo marcado y eliminar el exceso de fluorocromo, después del marcaje se agregaron 78 µL de PBS para obtener un volumen final de 100 µL, el cual se hizo pasar por la resina de purificación y se centrifugó dos veces durante cinco minutos a 1100 rpm x g. La concentración final, así como la tasa de marcaje de cada anticuerpo, se calcularon a partir de los valores de absorbancia obtenidos por espectrofotometría.

Tinción de membranas corioamnióticas

En cada membrana corioamniótica a procesar, el corion y el amnios se separaron manualmente, y de cada uno se cortaron fragmentos de aproximadamente 1 cm².

Para la tinción de los tejidos se preparó una mezcla de los anticuerpos marcados anti colágena I (dilución 1:100), colágena III (dilución 1:100) y colágena IV (dilución 1:50) en PBS. Los tejidos se incubaron en 500 µL de esta mezcla durante toda la noche, a 4°C, en la oscuridad. Como control negativo se usaron fragmentos incubados en 500 µL de PBS.

Finalmente, los tejidos íntegros se montaron en un portaobjetos con 10 µL de medio de montaje Vectashield con DAPI (Vector). El DAPI es un colorante fluorescente que se utiliza para teñir núcleos de células. En esta parte del trabajo se incluyeron fragmentos de tres membranas distintas.

Microscopía confocal

Después del montaje, los tejidos se observaron en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta, con el empleo del programa Zeiss LSM. Se observaron tres campos distintos en cada uno de los fragmentos. Las reconstrucciones tridimensionales se generaron en el mismo programa a partir de secuencias de imágenes individuales con espesores variables.

Microscopía electrónica de barrido

Una vez lavadas las membranas corioamnióticas, se cortaron pedazos de aproximadamente 5 cm² y se fijaron de inmediato en formol neutro. Los fragmentos se deshidrataron con diluciones crecientes de etanol y finalmente se guardaron en acetona a 4°C. Despues, los tejidos se dejaron secar durante todo el día en un secador de punto crítico Technics CPA-II. Cuando estuvieron secos, los tejidos se montaron en portamuestras con ayuda de un microscopio óptico. Finalmente se recubrieron con iones de oro mediante el equipo Ion Sputter JSC 1100.

Los tejidos se observaron en el microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-6360LV, del Servicio Académico de Microscopía Electrónica de Barrido, del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

RESULTADOS

Microscopía confocal

Al analizar los fragmentos de explantes de amnios, la marca fluorescente de DAPI, correspondiente a los núcleos de las células, se observó principalmente en un extremo del explante, que corresponde al epitelio amniótico. También se observaron otros núcleos dentro de la estructura de tejido conectivo, que corresponde a la capa de fibroblastos.

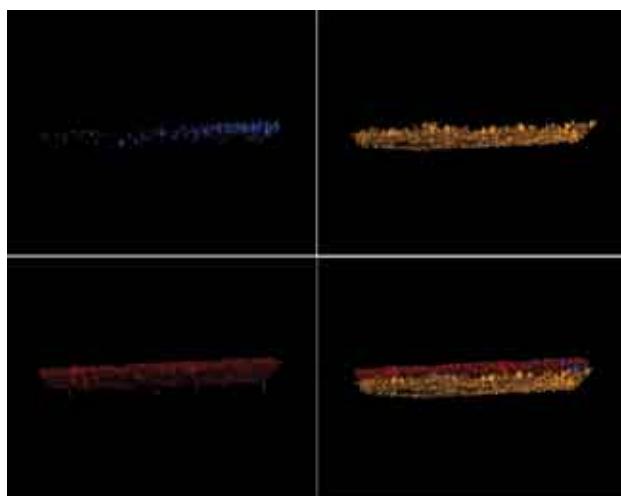


Figura 1. Reconstrucción tridimensional del amnios mediante microscopía confocal. Los colores corresponden a las señales fluorescentes de: azul, núcleos; amarillo, colágena tipo I; verde, colágena tipo III; rojo, colágena tipo IV (aumento 20X).

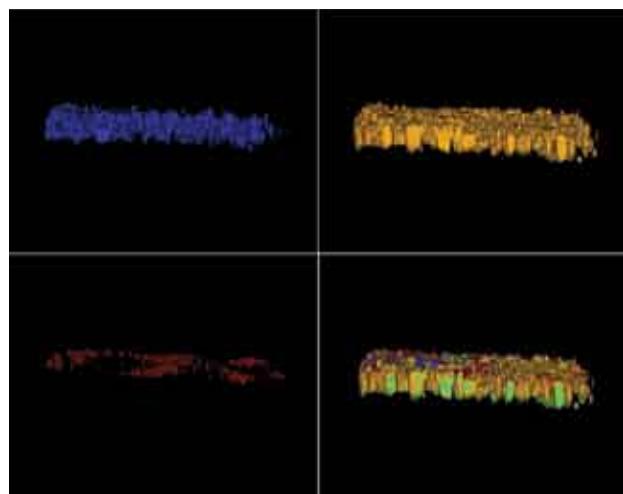


Figura 2. Reconstrucción tridimensional del corion mediante microscopía confocal. Los colores corresponden a las señales fluorescentes de: azul, núcleos; amarillo, colágena tipo I; verde, colágena tipo III; rojo, colágena tipo IV (aumento 20X).

La señal fluorescente correspondiente a la colágena tipo I se encontró distribuida de manera relativamente homogénea en las distintas capas. Prácticamente no hubo señal de colágena tipo III en el amnios.

La señal fluorescente que correspondió a la colágena tipo IV se observó inmediatamente debajo de la región de células epiteliales, que corresponde a la membrana basal. También se observó que esta marca fluorescente atravesaba ciertas regiones del amnios, con una distribución perpendicular a la señal de la colágena tipo I (figura 1).

En el corion la marca de los núcleos abarcaba todo el espesor del explante. Las señales correspondientes a las colágenas I y III colocalizaron en todo momento, y mostraron una distribución homogénea. La marca fluorescente de colágena tipo IV fue muy escasa, dispersa y limitada a la región correspondiente a la pseudomembrana basal (figura 2).

Microscopía electrónica de barrido

El análisis del amnios por medio de esta técnica reveló que los amniocitos constituyen un epitelio continuo pero relativamente laxo (figuras 4 y 5). Las células del epitelio amniótico muestran una serie de proyecciones laterales del citoplasma que permiten la conexión entre células de modo característico. Se pudo observar con gran detalle que todo el espesor del amnios se con-

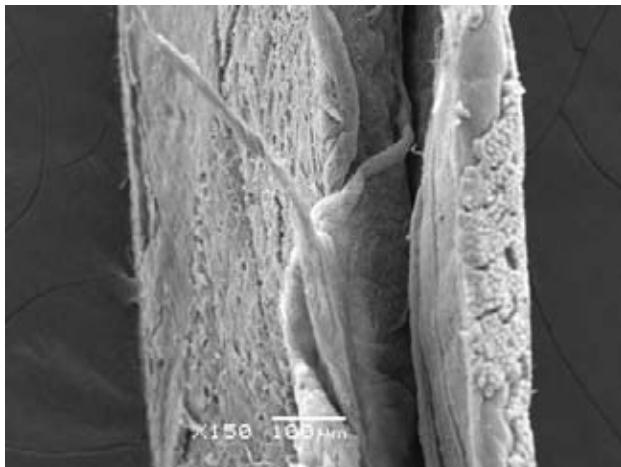


Figura 3. Vista transversal de las membranas corioamnióticas humanas. Se observa, del lado izquierdo, el corion, y del lado derecho, un poco más separado, el amnios (aumento 150x).

forma por una intrincada red de fibras que, aunque parecen ser de un diámetro similar, pueden formar estructuras más gruesas y complejas (figura 6).

En el corion se observó una gran cantidad de células de diversos tipos con estrecho contacto entre sí. Las fibras de colágena que se observaron en este tejido eran muy escasas y dispersas, y no formaban estructuras como las observadas en el amnios (figuras 7 y 8).

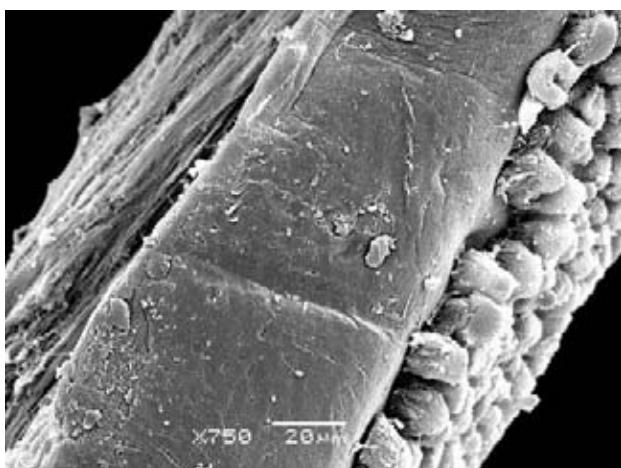


Figura 4. Vista transversal del amnios. Se observan del lado derecho los amniocitos que conforman el epitelio; en el centro, una porción de membrana basal que se ha plegado y cubre parcialmente la red de colágena que forma las distintas capas del amnios (izquierda) (aumento 750x).

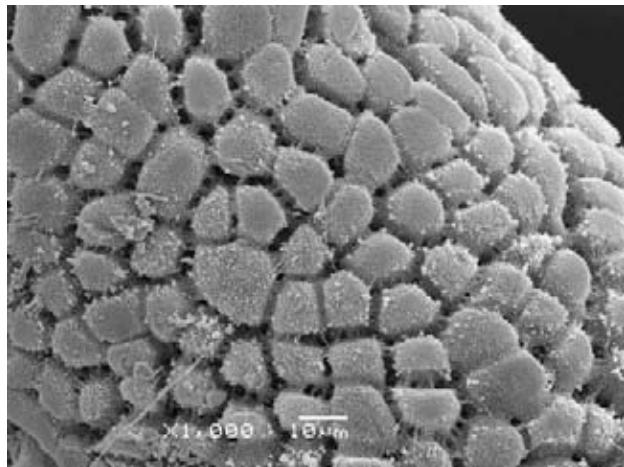


Figura 5. Vista frontal del epitelio amniótico (aumento 1,000x).

DISCUSIÓN

El propósito de este trabajo fue analizar la estructura de las membranas corioamnióticas de un modo distinto a lo descrito hasta hoy, en busca de enfoques metodológicos que permitieran observar a detalle cómo se conforma dicha estructura de manera tridimensional. De ahí que se decidiera usar la microscopía confocal para identificar simultáneamente los tres tipos de colágena más relevantes en las membranas, así como su distribución espacial; además, se usó la microscopía electrónica de barrido para observar detalladamente la organización de las poblaciones celulares, pero sobre todo la estructura de las fibras de colágena.

Con la microscopía electrónica de barrido del amnios se pudo observar que las células conforman un epitelio bastante homogéneo; sin embargo, el contacto entre los amniocitos no es tan estrecho como corresponde a un epitelio clásico, que separa compartimientos. En cambio, se observan puntos de uniones múltiples mediados por extensiones fibrilares entre las células, sin contacto directo entre las membranas celulares. Las estructuras de conexión intercelular no pudieron apreciarse en detalle y resta describir su naturaleza. No obstante, la forma en como se organiza el epitelio amniótico con una estructura cribosa permitiría el paso rápido de compuestos de gran tamaño molecular y explicar la gran capacidad del corioamnios para el transporte de moléculas por difusión transmembranal, que permite la comunicación desde y hacia la cara coriodecidua de las membranas corioamnióticas (figura

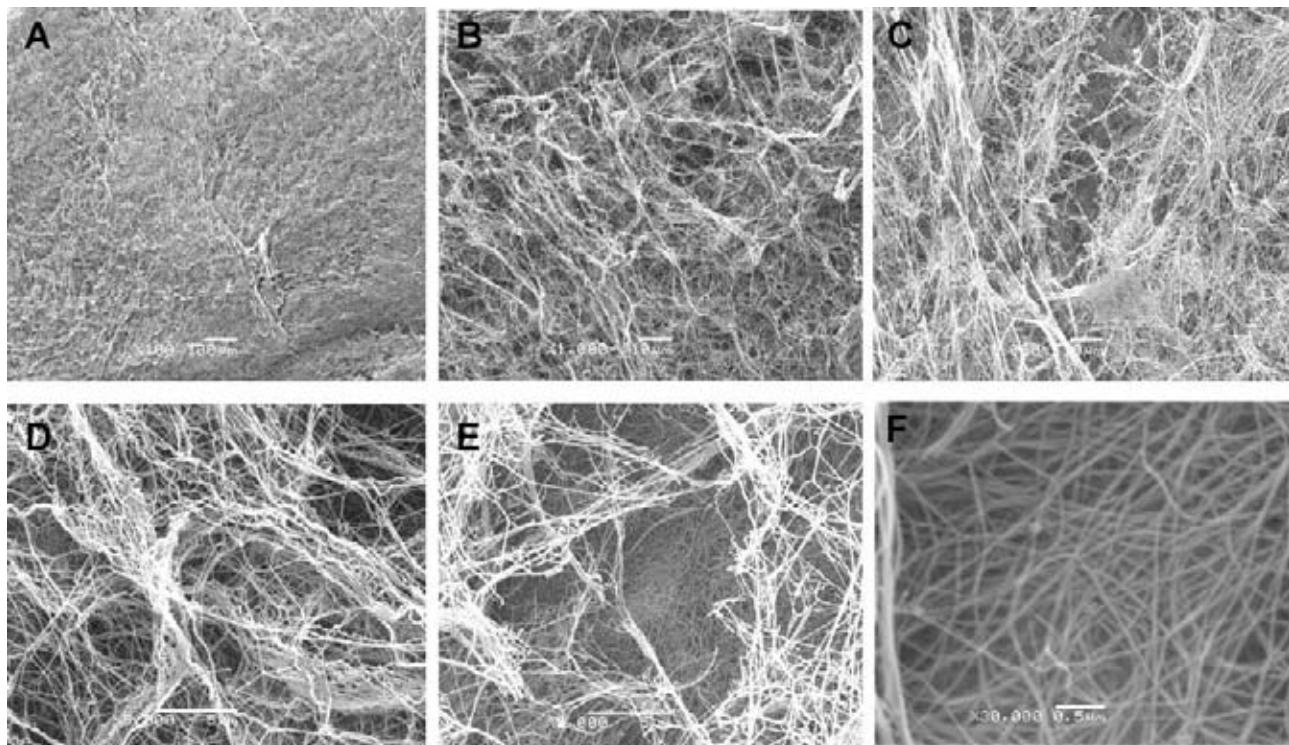


Figura 6. Amnios visto desde la cara adyacente al corion. Se puede observar la intrincada red de fibras de colágena que forman este tejido (aumentos: A, 100X; B y C, 1,000X; D y E, 5,000X; F, 30,000X).

5). Esta función explicaría propiedades funcionales que permiten el paso de macromoléculas, como las citocinas y enzimas, durante el trabajo de parto o en condiciones inflamatorias.⁶

También se observó que la mayor parte de la estructura tridimensional del amnios se conforma por una compleja red fibrilar que se extiende desde la membrana basal hasta la unión con el corion (figura 6). La microscopía confocal reveló que la mayor parte de dicha estructura se compone por colágeno tipo I, cuya distribución es bastante homogénea y abarca todas las capas del amnios (figura 1), lo que concuerda con lo reportado en la bibliografía;² sin embargo, no se observó alguna marca correspondiente a la colágena tipo III en este tejido, lo que podría explicarse porque los determinantes antigenicos de esta proteína están ocultos en la estructura tridimensional del tejido.

La señal fluorescente que corresponde a la colágena tipo IV se encontró muy cercana a la señal de los núcleos de los amniocitos, e incluso rodeando a estas estructuras (figura 1). Aunque sería necesario un análisis más detallado de las uniones intercelulares en los amnio-

citos, estas observaciones sugerirían que la colágena tipo IV, además de ser el principal constituyente de la membrana basal, podría ser la responsable de la unión entre los amniocitos y, por tanto, de mantener la integridad estructural del epitelio. Otra posibilidad sería que estas uniones intercelulares fueran similares a los llamados podocitos, proyecciones celulares que sirven normalmente como estructuras de anclaje, y que se han encontrado en la base de los amniocitos fungiendo como unión de estas células a la membrana basal.⁷

Asimismo, pudimos observar que, en algunas partes del amnios, la colágena tipo IV también se localiza dentro de la zona de colágeno tipo I, aunque su distribución parece ser perpendicular a la de esta última (figura 1). Estas observaciones parecen comprobar, como se ha propuesto, que la colágena tipo IV cumple una importante función estructural al dar soporte a la red de fibras de colágeno tipo I.^{2,8}

El análisis del corion reveló, como se esperaba, una estructura tridimensional muy distinta a la del amnios. Con la microscopía electrónica de barrido se pudo observar una gran cantidad de células de distintos tipos,

que mantienen un estrecho contacto entre sí. En este caso, no se observaron las uniones intercelulares de tipo fibrilar, como las observadas entre los amniocitos, sino que el contacto directo entre las membranas celulares parece más evidente (figuras 7 y 8).

A diferencia del amnios, la microscopía confocal del corion reveló colágena tipo I y tipo III; estas moléculas se localizaban juntas en las mismas zonas, y su distribución fue homogénea a todo lo ancho del corion. Aquí, la colágena tipo IV fue muy escasa y se limitaba a la zona de la pseudomembrana basal, sin adentrarse en el tejido (figura 2). La microscopía electrónica de barrido mostró que el corion no tiene una estructura fibrilar tridimensional como la del amnios; de hecho, son muy pocas las fibras de colágena que se observaron en el corion (figura 7).

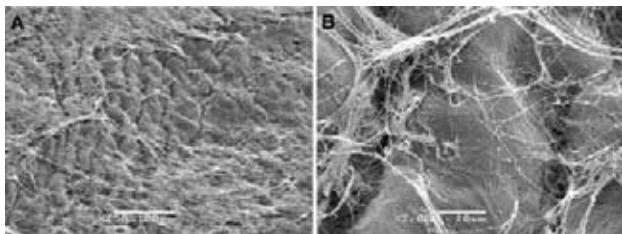


Figura 7. Corion visto desde la cara adyacente al amnios. Se observa una gran cantidad de células unidas estrechamente, mientras que las fibras de colágena son escasas (aumentos: A, 250x; B, 2,000x).

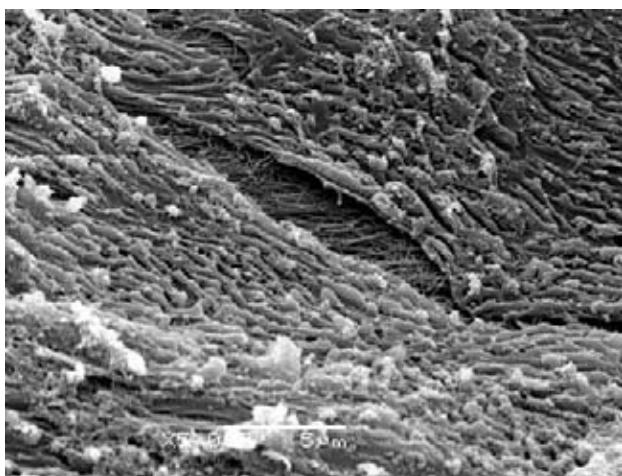


Figura 8. Vista frontal de las membranas corioamnióticas desde la cara corioidecidual. Se observa la gran cantidad de células en la corioidecida y en el centro una zona libre de células donde se distinguen fibras de colágena del amnios (aumento 5,000x).

Estas observaciones comprueban que el corion está formado principalmente por células, y no tiene una estructura importante de tejido conectivo, que pueda proveer de soporte a las membranas corioamnióticas.

La observación de la red tridimensional de tejido conectivo en las membranas, particularmente en el amnios, permite entender el papel central que desempeña la colágena tipo IV en el mantenimiento de la estructura de este tejido y su función de proveer el soporte mecánico para el feto durante la gestación. Es evidente que el principal mecanismo fisiopatológico encargado de disminuir la resistencia de las membranas y llevar a su rotura está mediado, precisamente, por enzimas colagenolíticas, particularmente la colagenasa tipo IV o MMP-9.⁹

REFERENCIAS

- Parry S, Strauss JF. Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med* 1998;338(10):663-70.
- Malak TM, Ockleford CD, Bell SC, et al. Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes. *Placenta* 1993;14(4):385-406.
- Modesti A, Scarpa S, D'Orazi G, Simonelli L, Caramia FG. Localization of type IV and V collagens in the stroma of human amnion. *Prog Clin Biol Res* 1989;296:459-63.
- Vadillo-Ortega F, Gonzalez-Avila G, Karchmer S, et al. Collagen metabolism in premature rupture of amniotic membranes. *Obstet Gynecol* 1990;75(1):84-8.
- Vadillo-Ortega F, Hernández-Miranda A, Bermejo-Martínez L, Beltrán-Montoya J, González-Ávila G. Transición de la forma enzimática latente a activa como un modelo de regulación de la degradación de matriz extracelular en el corioamnios durante el trabajo de parto humano. *Ginecol Obstet Mex* 1995;63:166-72.
- Zaga V, Estrada-Gutierrez G, Beltran-Montoya J, et al. Secretions of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha by whole fetal membranes depend on initial interactions of amnion or choriodecidua with lipopolysaccharides or group B streptococci. *Biol Reprod* 2004;71(4):1296-302.
- van Herendael BJ, Oberti C, Brosens I. Microanatomy of the human amniotic membranes. A light microscopic, transmission, and scanning electron microscopic study. *Am J Obstet Gynecol* 1978;131(8):872-80.
- Vadillo-Ortega F, Hernández-Guerrero C. Fisiopatología de la rotura prematura de membranas. En: L. Cabero Roura D, Saldivar Rodríguez E, Cabrillo Rodríguez, editores. *Obstetricia y medicina materno-fetal*. México: Médica Panamericana, 2007.
- Vadillo-Ortega F, Estrada-Gutierrez G. Role of matrix metalloproteinases in preterm labour. *BJOG* 2005;112 (Suppl 1):19-22.