

Interacción materno fetal: el líquido amniótico como modulador de procesos vinculados al inicio del trabajo de parto

Leguizamón GF, Wolfson ML, Franchi AM, Farina MG
Laboratorio de Fisiopatología de la Preñez y el Parto-CEFYBO-CONICET
CEMIC

INTRODUCCIÓN

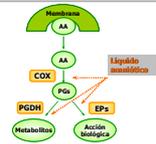
Los esfuerzos realizados para prevenir el trabajo de parto prematuro en la población general no han tenido un impacto significativo sobre la morbilidad neonatal. Estas limitaciones terapéuticas son consecuencia del desconocimiento de los mecanismos íntimos del inicio del trabajo de parto a término y pretérmino ya que los tratamientos actuales actúan sobre el músculo uterino el cual es solamente un efector de un proceso patológico no bien identificado.

Las membranas corioamnióticas (MF) son una entidad anatómica compleja y dinámica, capaz de secretar diferentes sustancias hacia el líquido amniótico en respuesta a estímulos recibidos tanto de la madre como del feto.

Durante el trabajo parto a término y pretérmino, se produce un dramático incremento en la liberación de mediadores proinflamatorios como citoquinas y prostaglandinas (PGs). Las PGs son sintetizadas a partir del ácido araquidónico por la vía de la ciclooxigenasa (COX) la cual existe en dos isoformas: COX-1 y COX-2. En particular, el amnios es la principal fuente de producción de prostaglandina E₂ (PGE₂), la cual ejerce sus efectos vía la unión a receptores de membrana acoplados a proteína G (EP). Las membranas corioamnióticas expresan 4 subtipos de EPs (EP1-4). Por unión a EP2 o EP4, PGE₂ estimula la actividad de adenilato ciclasa (AC) y promueve relajación, mientras que uniéndose a EP1 o EP3, inhibe AC con la subsiguiente disminución de los niveles de AMPc que favorecen la contracción.

Un rasgo sobresaliente de las prostaglandinas es la naturaleza transitoria de su existencia. La 15-hidroxi prostaglandina dehidrogenasa (PGDH) cataliza la oxidación del grupo 15-hidroxilo de las prostaglandinas y las convierte en metabolitos inactivos que posteriormente son excretados por la orina.

OBJETIVO



En el presente trabajo analizamos la relevancia del líquido amniótico (LA) en la modulación de las enzimas involucradas en la síntesis, acción y degradación de las prostaglandinas en las membranas corioamnióticas humanas.

Para ello, investigamos el efecto del líquido amniótico proveniente de mujeres con y sin trabajo de parto a término y pretérmino sobre la producción de PGE₂, y la expresión de COX-2, del receptor EP1, y de la enzima PGDH en las membranas corioamnióticas.

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Luego de obtener consentimiento informado, pacientes cursando un embarazo entre 24 y 41 semanas con membranas fetales (MF) íntegras, sin evidencia de infección, ni de complicaciones médicas; fueron invitadas a participar en el estudio. Diferentes muestras fueron obtenidas según la edad gestacional:

- 1) PRETERMINO (24-37 semanas) : LA de pacientes con y sin trabajo de parto.
- 2) TERMINO (37-41 semanas): se obtuvo LA de pacientes con y sin trabajo de parto y membranas fetales provenientes de pacientes con cesáreas programadas sin trabajo de parto.

TÉCNICAS

Cultivo de Explantos:

Las MF fueron lavadas exhaustivamente con solución fisiológica estéril y cortadas en discos de 8 mm de diámetro. Los explantos obtenidos se cultivaron en placas de 12 wells (Costar, USA) y se colocaron en 1 ml de medio RPMI 1640 suplementado con 5% de suero fetal bovino y antibióticos/antimicrobianos (penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 g/ml, anfotericina B 0.25 g/ml) y se incubaron por 24 h a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% CO₂ y 95% O₂ para estabilizar los tejidos. Posteriormente, el medio fue removido y los explantos fueron incubados por 24 horas más con líquido amniótico de término o de pretérmino con y sin trabajo de parto.

Para analizar la viabilidad tisular explantos de membranas fetales fueron sometidos a un estímulo (LPS, 10ug/ml). La producción de PGE₂ fue posteriormente cuantificada por RIA.

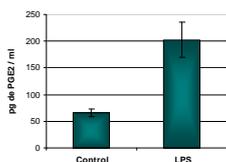
Western Blot:

En las MF se determinó por western blot la expresión de la COX-2, del receptor EP1, y de la PGDH. Para ello, las muestras fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas y posteriormente se incubaron con el primer anticuerpo: COX-2 Cayman (dil 1:500), EP1 Cayman (dil 1:250), y PGDH (D. Tsai) (dil 1:500). Posteriormente las membranas fueron incubadas durante 1 hora con anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa. Las bandas fueron obtenidas por quimioluminiscencia (ECL).

Radioinmunoanálisis:

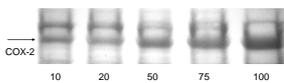
Se cuantificó la producción de PGE₂ liberada al medio de cultivo luego de la co-incubación con LA de término y pretérmino con y sin trabajo de parto.

RESULTADOS



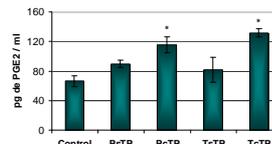
Ensayo de viabilidad

Analizamos la producción de PGE₂ a partir de explantos de membrana fetal sometidos a un estímulo de LPS (10ug/ml) durante 24hs. Observamos un incremento significativo en la síntesis de PGE₂ lo cual demuestra que los explantos son metabólicamente activos durante 48hs.



Expresión de COX-2 en membranas fetales incubadas con concentraciones crecientes de LA.

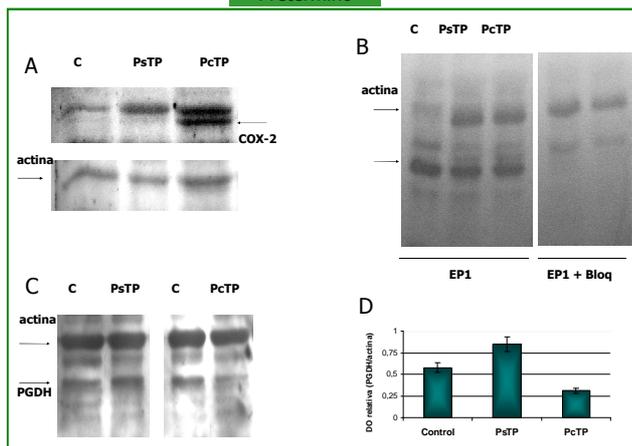
Incubamos explantos de MF con diferentes concentraciones de LA pretérmino proveniente de mujeres con trabajo de parto y observamos un incremento en los niveles proteicos de COX-2 a partir del 50% de LA.



Análisis por RIA de la producción de PGE₂ a partir de explantos de membranas fetales incubados con LA pretérmino y término, con y sin trabajo de parto.

La síntesis de PGE₂ aumentó significativamente cuando las membranas fueron incubadas con LA pretérmino y término, ambos provenientes de pacientes con trabajo de parto.

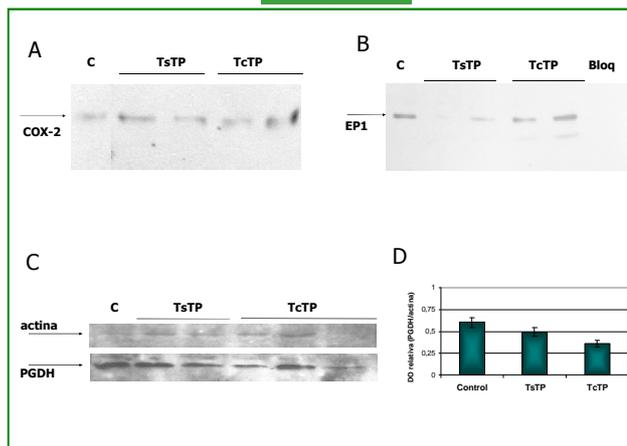
Pretérmino



Expresión proteica de COX-2 (A), EP1 (B), y PGDH (C) en membranas fetales (corioamnióticas) coincubadas con líquido amniótico obtenido a partir de pacientes pretérmino con y sin trabajo de parto. D- Cuantificación de la densidad óptica de las bandas obtenidas para PGDH

La coincubación con LA pretérmino de trabajo de parto se asocia con incremento en los niveles proteicos de COX-2 y disminución en los de PGDH mientras que la expresión del receptor EP1 permanece constante.

Término



Expresión proteica de COX-2 (A), EP1 (B), y PGDH (C) en membranas fetales (corioamnióticas) coincubadas con líquido amniótico obtenido a partir de pacientes con y sin trabajo de parto a término. D- Cuantificación de la densidad óptica de las bandas obtenidas para PGDH

Los resultados muestran que el LA de trabajo de parto incrementa los niveles proteicos de EP1 y disminuye la expresión de PGDH.

CONCLUSIONES

- El líquido amniótico modula el sistema prostanoide (COX/EPs/PGDH) diferencialmente según el trabajo de parto sea a término o pretérmino. El LA proveniente de mujeres con trabajo de parto *prematuro* induce la expresión proteica de la COX-2 y disminuye la de PGDH mientras que no modifica la expresión de EP1 en las membranas corioamnióticas. Por otro lado el LA proveniente de mujeres con trabajo de parto a *término* disminuye la expresión de PGDH e induce la del receptor EP1.
- Los elevados niveles proteicos de PGDH con LA de pacientes sin trabajo de parto es persistente tanto en término como en pretérmino y podría estar vinculado con el mantenimiento de la quiescencia uterina.