



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

F. E. S. IZTACALA

EVALUACION DE METALOPROTEINASAS DE
MATRIZ 2 Y 9 E INHIBIDORES TISULARES 1 Y 2
EN EL CORIOAMNIOS A TERMINO DE RATA.

T E S I S

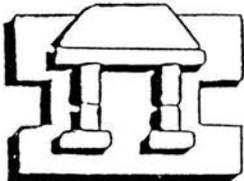
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A:

ESPEJEL NUÑEZ AURORA

DIRECTOR DE TESIS: DRA. NOEMI MERAZ CRUZ



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEX.

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA:

A MIS PADRES:

Margarita y Baltazar. Por haberme dado la vida, enseñado los valores necesarios para triunfar y por su apoyo incondicional en todo momento.

A MIS DOS CORAZONES:

LUPITA Y MARIJOSE. Porque espero que algún día se sientan orgullosas de mí, esperando con esto recompensar de alguna manera el tiempo que no les he dedicado, y principalmente porque cada uno de mis triunfos es para ustedes.

A TI **ARTURO**:

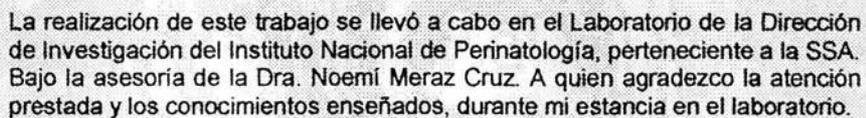
Por todos y cada uno de los momentos que has vivido conmigo y por ser el eje principal en mi vida.
Te amo.

A MIS HERMANAS:

Silvia y Marisol. Por todo su apoyo a lo largo de mi vida.

A MIS COMPAÑEROS:

Ana, Erica, Ara, Rebeca, Jose Luis, Israel, César, Adriana y Liliana. Por todos los momentos que vivimos juntos y por haberme enseñado el valor de tener amigos.



La realización de este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de la Dirección de Investigación del Instituto Nacional de Perinatología, perteneciente a la SSA. Bajo la asesoría de la Dra. Noemí Meraz Cruz. A quien agradezco la atención prestada y los conocimientos enseñados, durante mi estancia en el laboratorio.

Agradeciendo al Dr. Felipe Vadillo, director de la Torre de Investigación del Instituto, por las facilidades otorgadas para la realización de la tesis.

INDICE GENERAL.

INTRODUCCION.	IZT.	3
ANTECEDENTES		3
-MEMBRANAS FETALES		4
-METALOPROTEINASAS DE MATRIZ EXTRACELULAR		5
-INHIBIDORES TISULARES DE METALOPROTEINASAS DE MATRIZ		7
OBJETIVO		8
METODOLOGIA		9
RESULTADOS		13
DISCUSION		15
BIBLIOGRAFIA		18

Abreviaturas.

APMA: 4 acetato aminofenil mercurico

EDTA: Ácido etilendiamino tetra acético.

EMF: Extracto membrana fetal.

LA: líquido amniótico.

MCA: Membrana corioamniótica.

MEC: Matriz extra celular.

MMP: Metaloproteinasa de matriz extra celular.

MT-MMP: Metaloproteinasa de matriz tipo membrana.

Periparto: etapa cercana al trabajo de parto. (P)

TIMP: Inhibidor tisular de metaloproteinasas de matriz.

TP: Trabajo de parto.

21M: Día 21 de gestación en la mañana, (aprox. 12 horas antes TP)

21N: Día 21 de gestación durante el TP.

RESUMEN

Se ha propuesto la participación de diferentes metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) y sus inhibidores (TIMP) en la ruptura de las membranas fetales (MF) durante el trabajo de parto. En este estudio se analizó la expresión de MMPs en las MF de la rata en la etapa final de la gestación y durante el trabajo de parto. Se utilizaron ratas Wistar que fueron sacrificadas en el día 20 y 21 de la gestación. Se colectó líquido amniótico (LA) y MF, que fueron analizados para actividad proteolítica, zimografía, western blot y northern blot. Se identificó la presencia de MMP-2 y MMP-9 en la etapa final de la gestación, surgiendo la segunda metaloproteinasa 12 horas antes de trabajo de parto. La expresión de los ARNm de ambas enzimas fueron coincidentes con los resultados de actividad enzimática y western blot. Al momento del parto el TIMP-1 disminuyó y el TIMP-2 no presentó cambios.

INTRODUCCION.

Las membranas fetales, compuestas por el amnios y el corion, son las encargadas de proteger y proporcionar al feto el ambiente propicio durante su etapa de desarrollo intrauterino. Los diversos componentes de la matriz extracelular, principalmente colágena, le confieren características de soporte ante el aumento de movimientos fetales, presiones intraamnióticas, elasticidad, y las mantiene íntegras y funcionales a lo largo del período gestacional. Durante los últimos años el evento de ruptura de membranas ha sido tema de diversas investigaciones, ya que marca el inicio del parto, encontrándose que existe una alta tasa de degradación de los componentes de la matriz extracelular, evento que se ha relacionado con una familia de enzimas, denominada metaloproteinasas de matriz (MMPs), que degradan de manera específica componentes del tejido conectivo. La actividad de estas enzimas es inhibida de manera específica por inhibidores tisulares de metaloproteinasas de matriz (TIMPs). El balance entre estas enzimas con sus inhibidores es indispensable para la remodelación de las membranas fetales, por lo que se hace necesario analizar al final de la gestación la presencia de dos metaloproteinasas: MMP-2 y MMP9, encargadas de remodelar el tejido durante la gestación, así como de sus inhibidores específicos: TIMP-2 y TIMP-1, respectivamente; permitiendo encontrar una respuesta posible al proceso de ruptura de las membranas fetales.

ANTECEDENTES.

Membranas fetales.

Durante el desarrollo embrionario, todos los vertebrados, desde los ovíparos hasta los vivíparos, cuentan con un tejido extra-embionario en el que se desarrolla el feto, este tejido recibe el nombre de membrana fetal (MF) y lleva a cabo diversas funciones durante la gestación, como aislar al feto del ambiente uterino materno y protegerlo de daños físicos al amortiguar los golpes. Dichas membranas tienen un tiempo de vida corto al sólo existir desde el inicio del desarrollo embrionario del feto, hasta el momento en que el producto está listo para su desarrollo individual. También llevan a cabo otras funciones, como la secreción de hormonas, neuropéptidos, citocinas, y la síntesis de líquido amniótico. Actúan como mediadores de la intolerancia inmunológica al producto, constituyendo de esta manera una interfase altamente especializada entre la madre y el feto. Consisten de un amnios, formado por el epitelio amniótico, la membrana basal, los fibroblastos y por la capa esponjosa, siendo el epitelio quien se encuentra en contacto directo con el líquido amniótico; este amnios se encuentra fuertemente adherido al corion, que se compone por fibras de corion, células de citotrofoblastos, vellosidades coriónicas degeneradas y células deciduales en la superficie externa, formando de esta manera un sistema multilaminar (Figura 1). Dentro de los diferentes tipos celulares que integran a las membranas fetales encontramos a las células epiteliales, a las células mesenquimales y las células citotrofoblásticas¹.

El conjunto celular que conforma a estas membranas se encuentra embebido en una red que le proporciona soporte y facilita la comunicación intracelular, denominada matriz extracelular (MEC). De entre las funciones principales de la MEC podemos mencionar que mantiene la integridad estructural de los tejidos y además coordina la síntesis y degradación para el mantenimiento y preservación de los compartimentos celulares y los límites tisulares². Durante el período gestacional la MEC se encuentra en constante remodelación, manteniéndose íntegra y funcional hasta el momento del parto, conservando sin cambios a lo largo de este lapso, sus concentraciones de laminina, proteoglicanos, fibronectina, elastina y la de su mayor componente, la colágena (Figura 1). Esta proteína se encuentra distribuida en las diferentes capas (Figura 1) y de entre los grupos que se han reportado están la colágena tipo I, III, IV, V, VI y VII; la colágena tipo IV es la más ampliamente distribuida en las capas de las MF, aunque generalmente se

Estructura de las membranas fetales.

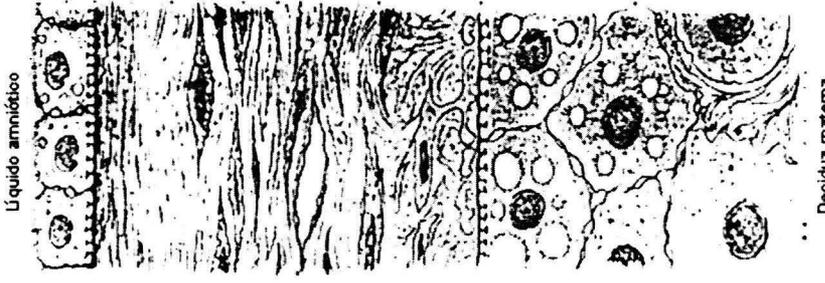
Capa	Composición de la Matriz Extracelular	MMPs producidas
		
Epitelio	Amnios	MMP-1, MMP-2, MMP-9
Membrana basal	Colágena tipos I, IV, laminina, fibronectina, nidógenos.	
Capa compacta	Colágenas tipos I, III, V, VI, fibronectina.	
Capa de fibroblastos	Colágenas tipos I, III, VI, nidógenos, laminina, fibronectina.	MMP-1, MMP-9, TIMP-1
Capa esponjosa	Colágenas tipos I, III, IV, proteoglicanos	
Corion		
Capa reticular	Colágenas tipos I, III, IV, V, VI, proteoglicanos.	
Membrana basal	Colágenas tipos IV, fibronectina, laminina.	
trofoblastos		MMP-9

Figura 1. Representación esquemática de la estructura de las membranas fetales. Fuente: Bell SC, 1997.

asocia a la membrana basal. La colágena provee el soporte estructural y fuerza tensil del tejido³, características especiales indispensables para soportar la presión intraamniótica y el aumento de los movimientos fetales; al final de la gestación estas membranas pierden dichas características, haciendo más débiles a las MF lo que lleva hacia la ruptura, marcando con ello el inicio del parto⁴. Actualmente se acepta que algunos integrantes de la familia de las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) están asociadas a la ruptura de las MF⁵, durante el parto o en el evento fisiopatológico de la ruptura prematura de membranas (RPM); dichas enzimas son capaces de degradar todos los componentes de la MEC, incluyendo la colágena, por lo que juegan un papel importante en la remodelación y degradación de la matriz de la MF.

Metaloproteinasas de matriz extracelular.

Las (MMPs), forman una familia de endopeptidasas denominadas "metaloenzimas" por presentar en su estructura un átomo de zinc, son secretadas por varios tipos celulares, y potencialmente pueden degradar todos las proteínas y proteoglicanos que componen la MEC. Para que una enzima sea clasificada como MMP debe cumplir con los siguientes criterios: (1) contener en su sitio activo al ión zinc²⁺ y requerir del Ca²⁺ como cofactor, (2) tener una actividad enzimática óptima en el intervalo de pH fisiológico, (3) tener una estructura terciaria dada por la unión de dos o más secuencias comunes, denominadas dominios (Figura 2); (4) ser secretada hacia el espacio extracelular en forma latente (proenzima); (5) requerir para su activación la separación del propéptido amino terminal y por último, (6) ser inhibida por inhibidores tisulares específicos (TIMPs)^{6,7}.

CLASIFICACIÓN:

La familia consta de más de 20 MMPs, que han sido divididas en cinco grandes clases, de acuerdo a su especificidad hacia substratos y por sus homologías internas. Así tenemos a las **colagenasas**, las **estromelisin**as, las **gelatinasas**, las **metaloproteinasas tipo membrana** (MT-MMPs) y el último grupo denominado **otras metaloproteinasas**⁸, los genes de todas ellas ya han sido clonados⁶.

El grupo de las colagenasas lo integran 4 miembros: la colagenasa intersticial (MMP-1), colagenasa de neutrófilos (MMP-8), colagenasa 3 (MMP-13) y la colagenasa 4 (MMP-4), todas ellas juegan un papel importante en el inicio de la remodelación ya que son las

Dominios presentes en MMPs.

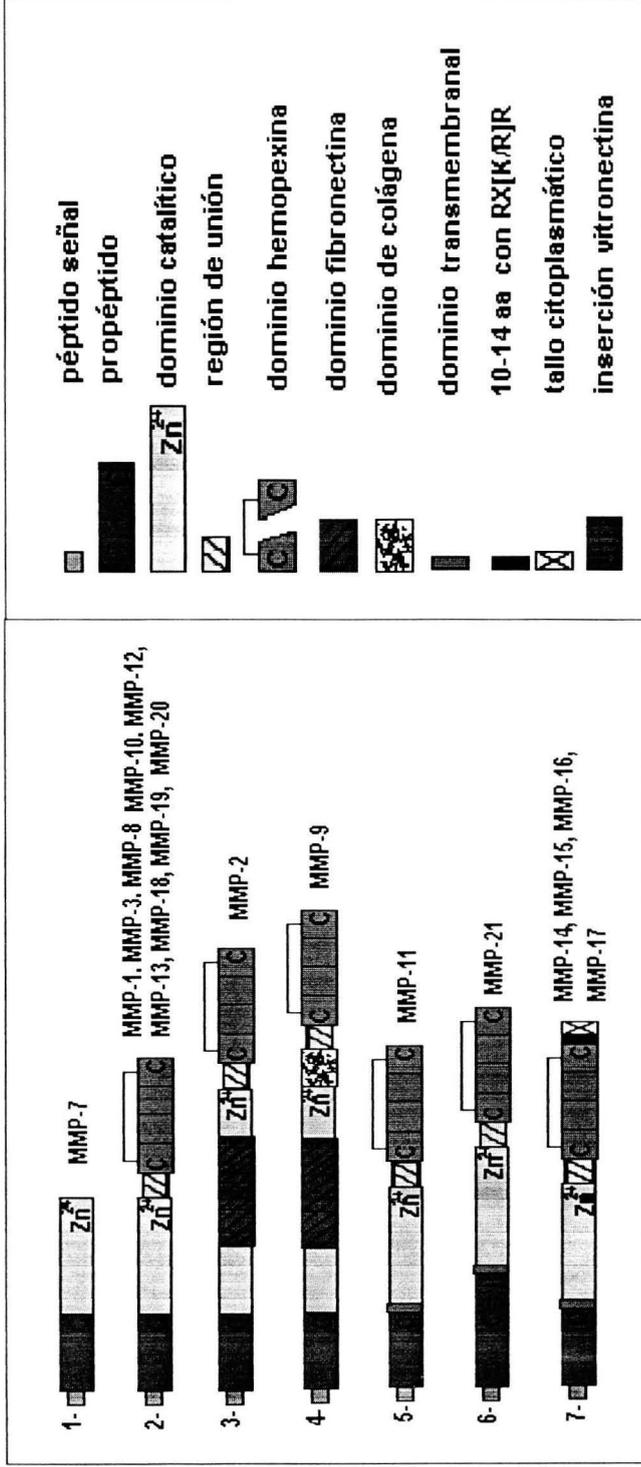


Figura 2. Estructura esquemática de las MMPs por la unión de los diferentes dominios. Se puede observar que la estructura más sencilla es la de la matrilisina (MMP-7). Las MMPs más complejas son las gelatinasas A y B (MMP-2 y MMP-9). Fuente: Woessner *et al.*, 2000.

únicas capaces de degradar la triple hélice de la colágena fibrilar tipos I, II y III, dando productos de digestión que son solubles y susceptibles para la degradación por gelatinasas y estromelisininas. El grupo de las **estromelisininas** lo integran 3 miembros: estromelisinina-1 (MMP-3), estromelisinina-2 (MMP-10) y estromelisinina-3 (MMP-11) que tienen como sustratos a la fibronectina, laminina, elastina y proteoglicanos. Dentro de las **gelatinasas** encontramos a la colagenasa tipo IV de 72 kDa también llamada gelatinasa-A (MMP-2) y a la gelatinasa-B de 92 kDa (MMP-9); estas enzimas actúan en cooperación con las colagenasas para llevar a cabo la degradación completa de la colágena intersticial; las gelatinasas son capaces de degradar elastina, fibronectina, colágena tipo IV, V y VII, además de la gelatina. Las **metaloproteinasas de matriz tipo membrana (MT-MMPs)** es el grupo más recientemente caracterizado de los 5 grupos, lo integran 6 miembros llamados MT1-MMP (MMP-14), MT2-MMP (MMP-15), MT3-MMP (MMP-16), MT4-MMP (MMP-17), MT5-MMP (MMP-24) y MT6-MMP (MMP-25). La característica de este grupo es que presentan un dominio transmembranal en su extremo carboxilo y muestran gran diversidad de sustratos como son gelatina, fibronectina, vitronectina, proteoglicanos y colágena nativa tipo I, II y III. El último grupo denominado "**otras metaloproteinasas**" lo incluyen el resto de MMPs de reciente caracterización y que no pueden ser agrupadas en los grupos anteriores⁹.

El peso molecular de estas enzimas está dado por la cantidad de dominios presentes en su estructura (Figura 2). Observándose también que para cada MMP hay distintos valores de peso molecular dependiendo al estado en el cual se encuentre la enzima (latente o activa)¹⁰.

Existen diferentes mecanismos de activación *in vitro* e *in vivo*, para las MMPs¹¹.

- a) Activación *in vitro*: Se lleva a cabo por agentes químicos tales como: proteasas de serina (tripsina, quimotripsina, catepsina G, plasmina), organomercuriales (4-aminofenilmercurico acetato, HgCl₂); detergentes (SDS); agentes caotrópicos (urea); estos agentes activan a las MMPs a través de la interacción con el switch de cisteína^{12, 13}
- b) Activación *in vivo*: se ha propuesto la existencia de cuatro mecanismos: (1) Activación extracelular de MMP por proteínas diferentes a MMPs; (2) Activación extracelular de MMPs por miembros de la misma familia; (3) Activación intracelular de MT-MMP y estromelisinina-3 por furina, y (4) Activación de MMP-2 por MT-MMP¹⁴.

Las MMPs en su forma activa son inhibidas por diferentes agentes: 1.- Quelantes: ácido etilendiamino tetra acético (EDTA), 1-10 ortofenantrolina, ditriotreitol, ditizona, D-penicilamina, acetil-cisteína; 2.- Antibióticos: (tetraciclinas, eritromicinas), 3.- macroglobulinas: $\alpha 2$ macroglobulina ($\alpha 2M$), $\alpha 1$ macroglobulina ($\alpha 1M$), ovomacroglobulinas (ovostastina) 4.- inhibidores sintéticos: componentes de tiol, péptidos de cisteína, hidroxamatos, entre muchos otros; y 5.- Inhibidores específicos para metaloproteinasas (TIMPs), moléculas de unión no covalente a la estructura de MMPs que forman complejos enzima-inhibidor⁷.

Inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs).

En la MEC, la actividad de MMP es controlada por inhibidores específicos, conocidos como inhibidores tisulares de MMPs. Los TIMPs son proteínas multifuncionales pequeñas (21-28 kDa). La inhibición de las MMPs por los TIMPs se lleva a cabo de forma estequiométrica en relación 1:1. A la fecha la familia de los TIMPs consta de cuatro integrantes, denominados TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, y TIMP-4, mismos que han sido identificados en vertebrados¹⁵; las características principales de esta familia son: presentar 12 residuos de cisteína que forman 6 bandas unidas por puentes disulfuro en una región altamente conservada; un dominio NH₂-terminal con secuencia consenso: VIRAK, importante para la actividad inhibitoria hacia MMP, por último su secuencia líder que consta de 29 aminoácidos, la cuál no se encuentra en la proteína madura¹⁶.

La estructura de los TIMPs esta dada por la unión de sólo dos dominios denominados N-terminal y C-terminal; su secuencia consta alrededor de 200 a 210 aminoácidos. Su secuencia líder termina justo antes del primer residuo de cisteína. Cada uno de los dominios presenta 3 asas formadas por la unión de los residuos de cisteína por puentes disulfuro (Figura 3); los dominios se encuentran separados por dos residuos de aminoácidos, dejando al primer residuo de cisteína del dominio C-terminal en posición 127. Los pesos moleculares de estas cuatro proteínas son relativamente más bajos que los de las MMPs y se encuentran alrededor de los 20 kDa (Tabla 1).

Estructura primaria de TIMP-1 y TIMP-2.

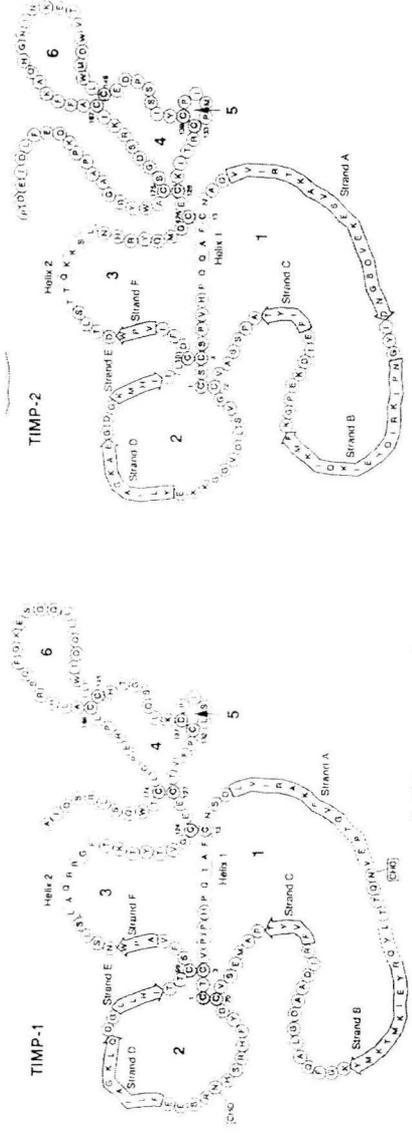


Figura 3. Estructura primaria de TIMP-1 y TIMP-2. Se pueden observar los puentes disulfuro entre los residuos de cisteína. Fuente Murphy, 1995.

Tabla 1. Propiedades de los Inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs).

Propiedades	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3	TIMP-4
Peso molecular	20.6kDa	21.5kDa	21.6kDa	22.3kDa
Peso mol. glicosilados	28.5kDa	-	27kDa	-
Localización en tejido	Ovario, hueso	Riñón, placenta	Bazo, ovario	Corazón, pulmón
Formación de complejos proMMP	MMP-9	MMP-2	-	MMP-2
Estado de la proteína	Soluble	Soluble	No soluble	Soluble

INTERACCIÓN TIMPs/MMPs.

Se ha demostrado que para llevar a cabo la actividad inhibitoria de MMPs por los TIMPs es indispensable la interacción del dominio N-terminal del inhibidor con el dominio catalítico de las MMPs activas¹⁷, que daría como resultado que todos los TIMPs pueden inhibir a todas las MMPs (Tabla 2), con valores de K_i que van desde 0.1 a 2.8 nM¹⁸. Sin embargo, se han detectado fuertes interacciones específicas de las gelatinasas hacia el TIMP-1 y el TIMP-2. Olson *et al*¹⁹, en un análisis cinético de la unión de MMP-2 y MMP-9 con TIMP-1 y TIMP-2 reportó diferencias en la capacidad de inhibición hacia las gelatinasas; los valores de K_i encontrados en TIMP-1 fueron de 9.7 nM para MMP-2 y 8.5 nM para MMP-9; para el caso de TIMP-2 los valores reportados de K_i fueron de 7.2 y 43.4 nM, para MMP-2 y MMP-9 respectivamente. Otro dato importante reportado en éste trabajo, fue que el extremo carboxilo terminal de las enzimas es importante para la unión de los inhibidores con las gelatinasas (Figura 4). Así mismo dichos inhibidores también pueden unirse a las progelatinasas, formando complejos proenzima/inhibidor, que en el caso de proMMP-2, es indispensable para la activación de la enzima vía MT-MMP²⁰. Los complejos MMP/TIMPs pueden ser disociados por pH ácido o por la acción del EDTA al mismo pH.

La presencia de esta familia de inhibidores ha sido reportada en diferentes especies de vertebrados¹⁵ así como en humano²¹. Además de su principal actividad que es la inhibición a metaloproteinasas, se ha reportado que pueden llevar a cabo otras funciones, como la de factor crecimiento en diferentes tipos celulares; participan en la esteroidogénesis y actúan como moduladores de la morfología celular¹⁶.

- MMPs/TIMPs EN MEMBRANAS FETALES.

El equilibrio en la remodelación de los componentes de la matriz extracelular mantiene la fuerza tensil de las membranas fetales. Se ha propuesto que la existencia de cambios estructurales en las membranas²², que incluyen disminución en el contenido de colágena, alteración de la estructura de dicha proteína e incremento de la actividad colagenolítica; eventos que se asocian con la ruptura de membranas con gestación a término o pretérmino²³

Tabla 2. Inhibición de metaloproteinasas de matriz extracelular por los Inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs).

No. TIMP	MMPs inhibidas
TIMP-1	MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-16.
TIMP-2	MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-16 Y MMP-19.
TIMP-3	MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-13, MMP-14, MMP-15.
TIMP-4	MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9.

Tipos de unión MMP/TIMP existentes.

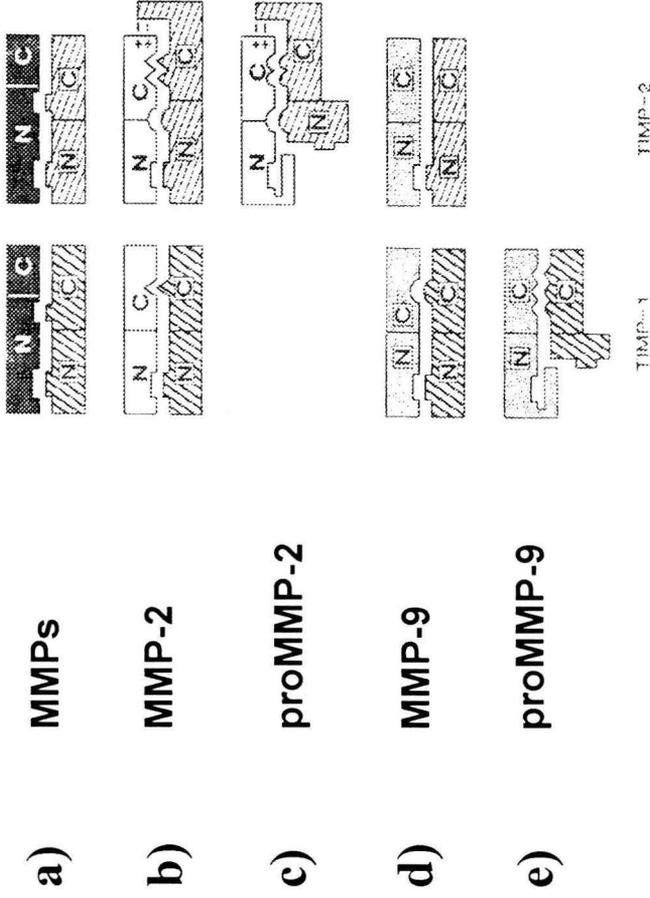


Figura 4. Representación esquemática según Murphy y col, 1995; (a) muestra las formas de unión de TIMP-1 y TIMP-2 hacia las diferentes MMPs; (b y d) con las formas activas de MMP-2 y MMP-9; y (c y e) formando complejos con los zimógenos de dichas MMPs.

Estudios previos han reportado la expresión de MMPs y TIMPs en membranas fetales de diferentes especies, incluyendo al humano^{16, 21, 24}, y se ha demostrado que la gelatinasa B o MMP-9 es una enzima que se expresa hacia el final de la gestación^{25, 26}. Sin embargo no se han realizado estudios en donde se compare los niveles de las gelatinasas contra los de sus inhibidores específicos, en busca de posibles desajustes en la relación enzima inhibidor que permitan entender el proceso de degradación de la matriz extracelular durante el trabajo de parto, y que posiblemente lleve hacia la ruptura normal o patológica de la MF.

OBJETIVO.

Evaluar la presencia de MMP-2 y MMP-9 así como de sus respectivos inhibidores tisulares TIMP-2 y TIMP-1, en membranas fetales de rata en la fase final de la gestación.

Objetivos específicos.

. Evaluar la actividad proteolítica en el líquido amniótico (LA) y membrana (MF) de rata, al final de la gestación.

. Analizar por zimografía la actividad de MMP-2 y -9, en muestras de LA y MF de rata en la fase final de la gestación.

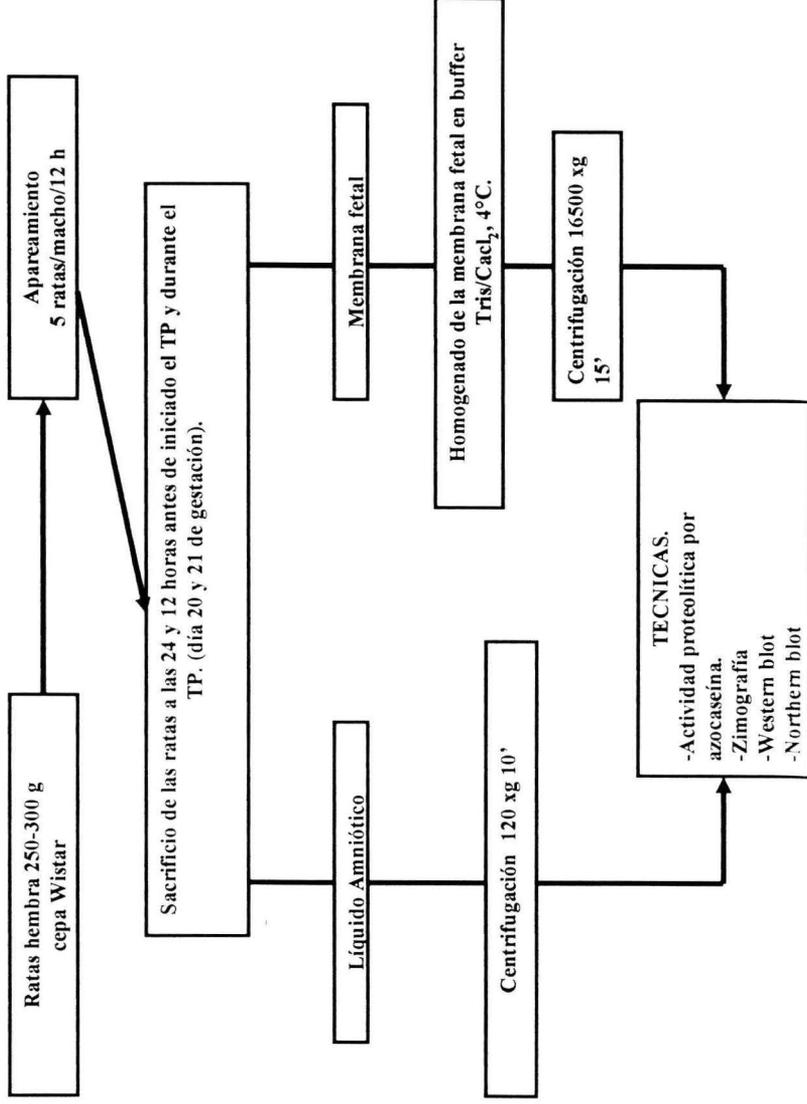
. Analizar por Western-blot la presencia de ambas MMPs y TIMPs en LA y MF de rata al final de la gestación.

IZT.

. Analizar la expresión de MMP-2 y MMP-9 así como TIMP-1 y TIMP-2 en LA y MF de rata al final de la gestación.



Representación esquemática de la metodología.



METODOLOGÍA

El trabajo se realizó en el Instituto Nacional de Perinatología perteneciente a la Secretaría de Salud (SSA); manteniendo a las ratas en estudio en el bioterio de la Torre de Investigación del mismo Instituto. El procesamiento de las muestras, por las distintas técnicas, se realizó en el laboratorio de la Dirección de Investigación.

COLECTA DE MUESTRAS

En el presente proyecto se utilizaron ratas hembra de 250-300gr de la cepa Wistar que fueron sincronizadas con ciclos de luz y oscuridad 12/12 horas, lo que permitió tener animales con 21 días de gestación. Se formaron grupos de 5 ratas hembra con un macho durante 12 horas para la fecundación; al día siguiente se retiraron los machos, y a las hembras se les realizó citología vaginal para comprobar la presencia de esperma, el resultado positivo marcó el día uno de gestación. Para estudiar los acontecimientos que se dan en la fase final de la gestación, nuestro estudio se enfocó a los dos días últimos del evento. Sacrificando a las ratas en los días 20 y 21 de la gestación, este último dividiéndolo a dos tiempos: 12 horas antes del trabajo de parto (TP), y durante el TP el cual se tomó como el momento de expulsión de la primer cría; para referencia de estas dos últimas etapas se les denominó 21M (12 h antes TP) y 21N (durante TP) 21N). En cada etapa se colectó LA y MF. (Esquema 1)

MANEJO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.

Una vez sacrificada la rata, se abrió el útero y con jeringa se extrajo el mayor volumen posible de LA, al término de lo anterior se tomaron muestras de MF, colocándolas individualmente en microtubos (Eppendorf, USA). Una vez obtenidas las muestras se guardaron a -70°C , hasta su uso.

PROCESAMIENTO DEL LIQUIDO AMNIOTICO.

Los líquidos amnióticos, se centrifugaron durante 10 minutos a 1700 rpm, con el fin de evitar la presencia de contaminantes. Recuperándose el sobrenadante para el posterior análisis.

EXTRACTO DE MEMBRANA FETAL (EMF).

A las membranas se les realizaron lavados con solución fisiológica hasta retirar el exceso de sangre contaminante de las muestras. Se realizaron homogenados de las membranas fetales, triturando de forma manual al tejido a 4°C en buffer Tris 50 mM, pH 7.4, NaCl 0.15 M, CaCl₂ 0.05M, y azida de sodio 0.02%; este homogenado se centrifugó a 10,000 rpm a 4°C durante 15 minutos, de donde se obtuvo un sobrenadante y un precipitado, recuperándose el sobrenadante para su procesamiento por las técnicas descritas a continuación.

CUANTIFICACION DE PROTEINA.

Tanto a las muestras de LA, como EMF, se les realizó cuantificación de proteína total de acuerdo al método de Bradford²⁷, utilizando albúmina bovina como estándar de referencia.

ACTIVIDAD ENZIMATICA.

La actividad proteolítica presente en EMF y LA se determinó usando como sustrato azocaseína (Sigma Chemical Co., St. Louis MO), siguiendo el método descrito por Segers *et al*²⁸. Se incubaron 500 µg de azocaseína con 10 µg de proteína de cada muestra y se llevó a 1.0 ml, con amortiguador Tris 0.1 M pH 7.8. La mezcla se incubó durante 24 horas a 37°C con agitación constante. La azocaseína no digerida fue precipitada agregando 200 µl de ácido tricloroacético en frío; después de 30 minutos se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 minutos. Los valores de absorbancia de los sobrenadantes fueron leídos a 336 nm en espectrofotómetro (DU-65, Beckman, USA). Todos los ensayos fueron valorados por triplicado y la actividad caseinolítica fue expresada como µg de azocaseína degradada/mg de proteína incubada durante 24 horas a la temperatura citada. Las actividades enzimáticas fueron expresadas como promedios ± desviación estándar. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de ANOVA y valores de P<0.05 fueron considerados con significancia.

ZIMOGRAFIA.

Para la identificación cualitativa de las posibles proteasas presentes en las muestras obtenidas, se procesaron alícuotas tanto de LA como de EMF mediante la técnica de geles/sustrato²⁹, que consistió en separar electroforéticamente la muestra en un gel de poliacrilamida con SDS al 8%, al cual se incorporó gelatina de bovino al 1% como sustrato enzimático. La concentración de proteína de muestra cargada en cada carril fue de 10 µg, los cuales se corrieron a 10mA/gel durante 2 horas utilizando un formato de mini-gel (Bio-Rad, Richmond CA). Al final de la electroforesis el SDS se eliminó de los geles con dos lavados de 15 minutos en Triton X-100 al 2.5%, y se incubaron durante 18 horas a 37°C en solución Tris 50 mM, pH 7.4, NaCl 0.15 M, CaCl₂ 0.05 M. Al final de la incubación los geles se tiñeron con azul brillante de Comassie R-250 y se destiñeron con solución 5% ácido acético y 5% metanol. La presencia de zonas claras contra un fondo en color azul indicaron bandas con actividad enzimática. Como control positivo de actividad, en cada uno de los geles se incluyeron alícuotas del sobrenadante obtenido de la línea celular U937³⁰, con patrón de migración ya conocido, mismo que presenta dos bandas de lisis correspondientes a proMMP-2 y pro MMP-9. Para referencia del peso molecular de las bandas, se utilizaron alícuotas de marcadores de peso molecular preteñidos con rango de 14 a 200 kDa (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD). Las bandas obtenidas en esta técnica, fueron semicuantificadas por densitometría en un equipo analizador de imágenes (Stratagene, CA).

WESTERN BLOT.

Alícuotas del LA y del EMF se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS al 8%. Las proteínas contenidas en el gel se transfirieron a membranas de Inmobilon P (Millipore, Medford, USA), de acuerdo con el método utilizado por Towbin et al³¹. Para el reconocimiento de las metaloproteinasas se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos para MMP-2 (No. Cat. IM33L) y MMP-9 (No. Cat. IM09L), ambos de la marca Calbiochem, La Jolla, CA. Estos anticuerpos reconocen la forma latente y/o activa de la enzima, dependiendo de las condiciones reductoras o no, con que se trate a la muestra. Para proMMP-9 se redujo la muestra. Para los inhibidores tisulares se utilizaron anticuerpos contra TIMP-1 (Ab-2) y TIMP-2 (Ab-4), de la misma marca. El reconocimiento con anticuerpo secundario y el complejo avidina peroxidasa se utilizaron los incluidos en el kit Universal Vectastain ABC (Vector, CA). Al final el revelado se hizo con

diaminobenzidina 0.3% diluido en TTBS. Como controles se utilizaron enzimas puras recombinantes para cada una de las MMP o TIMP (Calbiochem, La Jolla, CA), colocando 0.1 µg de proteína. Las bandas obtenidas se analizaron y se cualificaron por métodos densitométricos (obtención del área bajo la curva para cada banda), usando un analizador de imágenes (Stratagene, CA), y los resultados se expresaron en unidades arbitrarias;. Para referencia del peso molecular de las proteínas reveladas se incluyó un carril con marcador de peso molecular alto (Gibco BRL).

NORTHERN BLOT.

Se extrajo el RNA total de las MF con el reactivo trizol (Gibco, BRL, USA). Posteriormente fue corrido en geles de agarosa y transferido a membrana Inmobilon –N (Millipore, Medford, USA). Las membranas fueron hibridadas con sondas específicas para β-actina, MMP-2 y MMP-9 marcadas por el método de *random primers* con [³²P]-CTP bajo condiciones ya descritas³². Las autorradiografías fueron evaluadas por densitometría con el analizador de imágenes Eagle Eye (Stratagene, La Jolla, Ca). La expresión relativa de los RNAm de las enzimas fue normalizada con el RNAm para β-actina. Las sondas para MMP-2³³ y MMP-9³⁴, fueron donadas por Tryggvason K. (Finlandia). Asimismo, la sonda para TIMP-1³⁵ fue donada por el grupo de Skup D. (Canadá).

RESULTADOS.

Actividad proteolítica en extractos de tejido y líquido amniótico.

La actividad proteolítica medida para LA y EMF, utilizando azocaseína como sustrato soluble, mostró los siguientes valores, expresados como µg de sustrato degradado/mg de proteína incubada.

	20	21M	31N
LA	100 ± 20	210 ± 50	60 ± 15
EMF	40 ± 15	90 ± 30	100 ± 20

Actividad proteolítica en LA y EMF

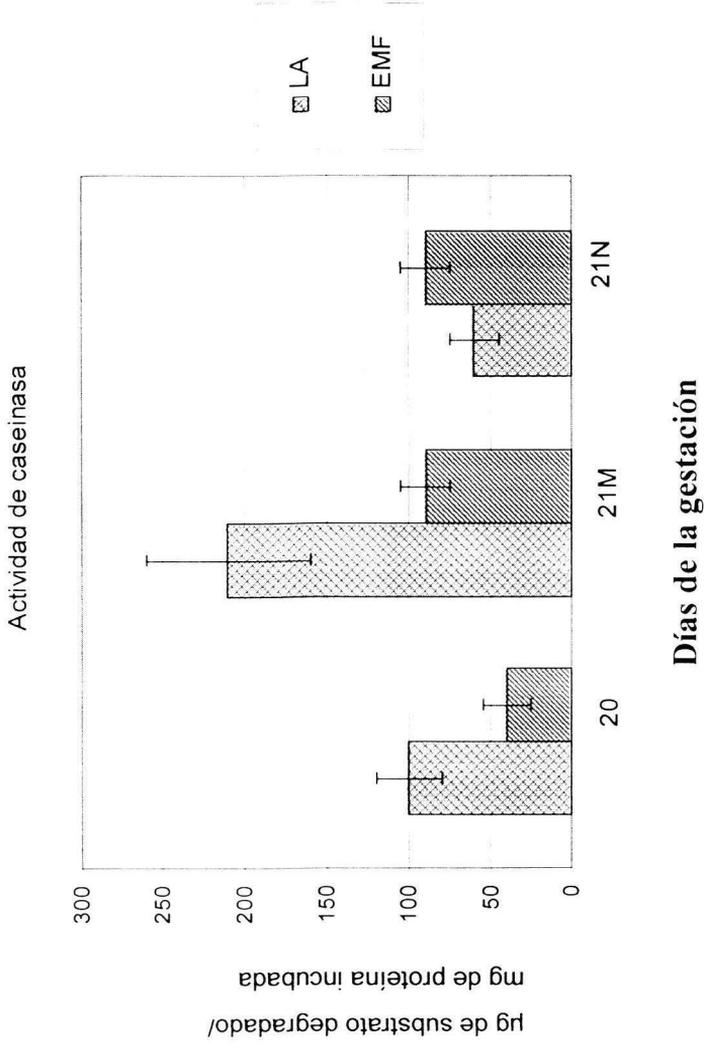


Figura 5. Actividad de proteasas medida por azocaseína en muestras de LA y EMF. 20 y 21: día de gestación, M y N: muestras tomadas 12 h antes de TP y durante TP respectivamente.

Observándose en el LA un comportamiento de ascenso y descenso en sus valores de actividad siendo mayor en 21M quien mostró diferencia significativa al compararse contra los otros dos tiempos ($p < 0.001$). Como podemos observar para ET existe un ascenso en la actividad enzimática entre el día 20 y 21M mostrando diferencias significativas ($p < 0.001$), éste último comparado con 21N no mostró diferencias significativas (Figura 5).

Actividad gelatinolítica obtenida por zimograma.

El patrón de bandas obtenido para LA y ET con la técnica geles/sustrato mostró que desde el día 20 de la gestación existen dos bandas de lisis con peso molecular estimado de 72 kDa y 65 kDa, que de acuerdo al patrón de migración de la línea celular U937 corresponden a proMMP-2 (72 kDa) y MMP-2 (65kDa). En las muestras 21M y 21N se apreció una nueva banda de lisis en ambos compartimentos, además de las ya mencionadas, y que corresponde a proMMP-9 cuyo peso molecular es de 92kDa (Figura 6A y 7A). Cabe mencionar que en la muestra de LA -21N se observaron otras bandas de alto peso molecular (Figura 6A).

Como se observa en las figuras 6-A y 7-A, la aparición de proMMP-9 se dio a partir de 12 horas antes del trabajo de parto presentándose también durante el trabajo de parto en ambos compartimentos. En muestras de LA (Figura 6-B), los valores obtenidos por densitometría para proMMP-9 (presentados como unidades relativas [UR]), mostró diferencias significativas entre 21M (6950 ± 950) y 21N (15200 ± 1100), donde se apreció que aumenta al doble de intensidad durante el trabajo de parto. En este mismo compartimento, del total de actividad gelatinasa, evaluada por etapa, proMMP-9 representó el 27% de la actividad observada doce horas antes del TP, y durante el trabajo de parto representó el 47% de la actividad presente en esta etapa. La intensidad de las bandas de proMMP-2 y MMP-2, presentó cambios significativos en 21M de acuerdo a los valores obtenidos por densitometría, observándose que su actividad incrementa en las 12 horas antes de ocurrir el trabajo de parto (19718 ± 1500), para decaer al final de la gestación (Figura 6 A y B).

El comportamiento de proMMP-9 en el tejido (Figura 7 A), fue similar al observado en el LA; su actividad se visualizó a partir de doce horas antes del trabajo de parto y estuvo

Actividad de gelatinasa en LA por zimografía.

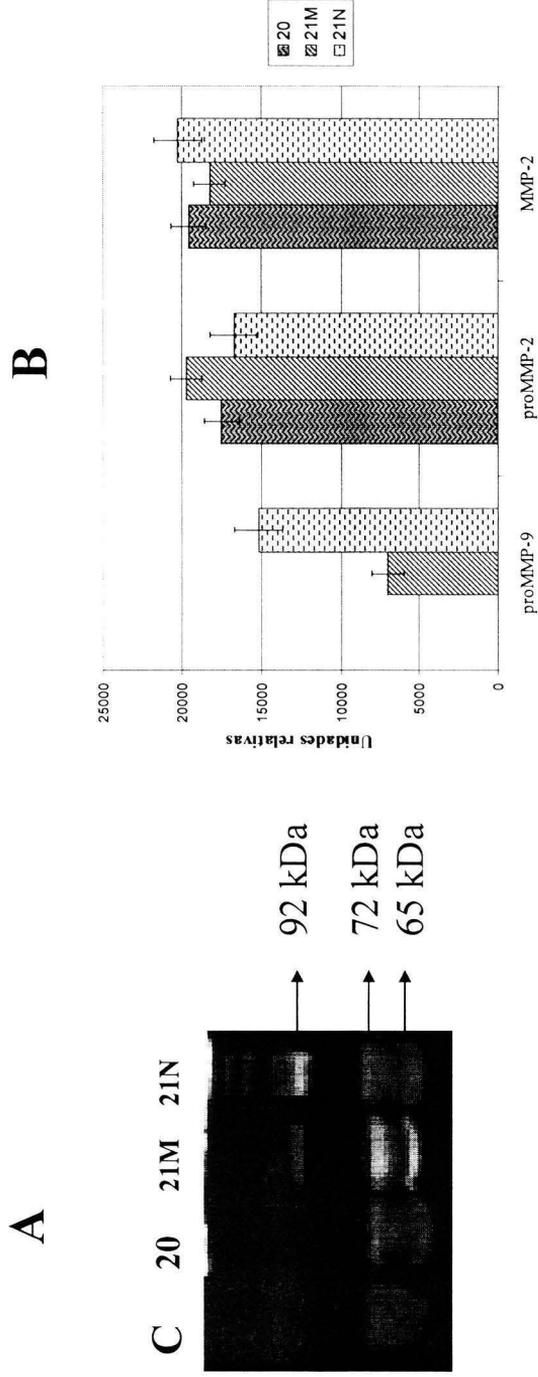


Figura 6. Actividad gelatinolítica en LA. A) Gel. C: sobrenadante de la línea celular U937; 20, 21M y 21N, muestras de los diferentes tiempos; la cantidad de muestra por carril fue 10µg. B) Representación gráfica de los valores de cada una de las bandas obtenidos por densitometría, expresados como media \pm DE, n=4 para cada tiempo.

Actividad de galatinasa en EMF por zimografía.

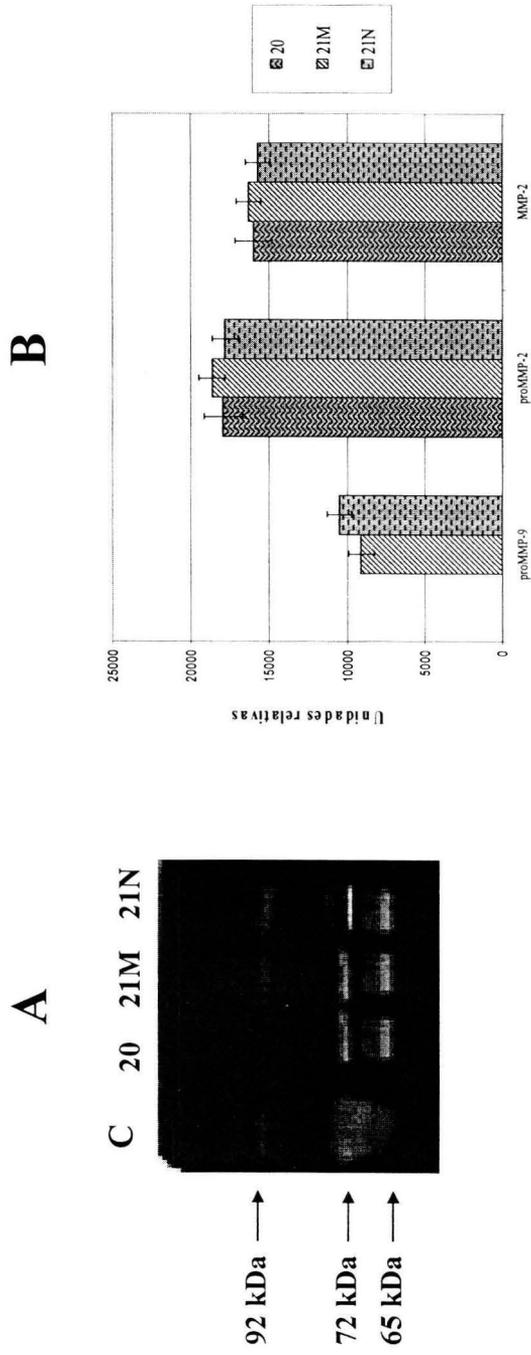


Figura 7. Actividad gelatinolítica presente en MF. A) Gel de zimograma; C: sobrenadante de la línea celular U937, 20, 21M y 21N tiempos de la toma de muestras. B) Representación gráfica de los valores obtenidos por densitometría para cada una de las bandas, el valor se expresó como media \pm DE, $n=4$ para cada tiempo.

presente durante el TP. Pero en este compartimento, no mostró diferencias significantes con respecto a los valores obtenidos por densitometría en ambas etapas (9099 ± 850 UR para 21M y 10489 ± 1000 UR para 21N). Asimismo representó sólo el 35% de la actividad total obtenida en cada etapa. La proMMP-2 y MMP-2 no mostraron diferencias en relación con las etapas manteniéndose en el rango de 15000 a 16500 unidades relativas (Figura 7 B).

Identificación de proteínas con anticuerpos específicos.

De acuerdo a los resultados obtenidos por zimografía tanto en LA como EMF se procedió a verificar la presencia de estas metaloproteinasas por la técnica de Western blot encontrando respuesta inmunoreactiva para MMP-2 y MMP-9. Asimismo se pudo identificar a los inhibidores titulares de estas enzimas, TIMP-2 y TIMP-1, respectivamente, los cuales se encuentran presentes en ambos compartimentos (Figura 8).

La utilización de anticuerpo específico contra MMP-9, bajo condiciones reductoras para la muestra, permitió detectar la presencia de proMMP-9 en ambos compartimentos, a partir del día 20 de la gestación hasta el TP; la presencia de dicha proteína en el día 20 de la gestación, no se detectó por zimografía. La cantidad de proteína inmunoreactiva para esta metaloproteinasa fue aumentando conforme se acercaba el trabajo de parto. Observándose que en LA, la respuesta aparece 24 horas antes de iniciado el TP (4800 ± 540 UR) y que esa respuesta aumenta al doble a las 12 horas (8700 ± 450 UR), manteniéndose constante hasta el TP. A diferencia del tejido, donde se observa que la respuesta aparece a partir del día 20, y se valores semejantes 12 horas antes del TP (1100 ± 300 UR), pero llegado el momento del trabajo de parto (2900 ± 370 UR), mostrando que el incremento en la cantidad de proteína inmunoreactiva es dos veces más al obtenido en el día 20 (momento de su aparición).

Los resultados obtenidos para TIMP-1 muestran una respuesta antagónica a la encontrada para proMMP-9. Quien en el trabajo de parto muestra disminución de 3 veces respecto al día anterior (3200 ± 830 para el día 20 y 1050 ± 474 para 21N). Este dato es

Identificación de proteínas por Western blot.

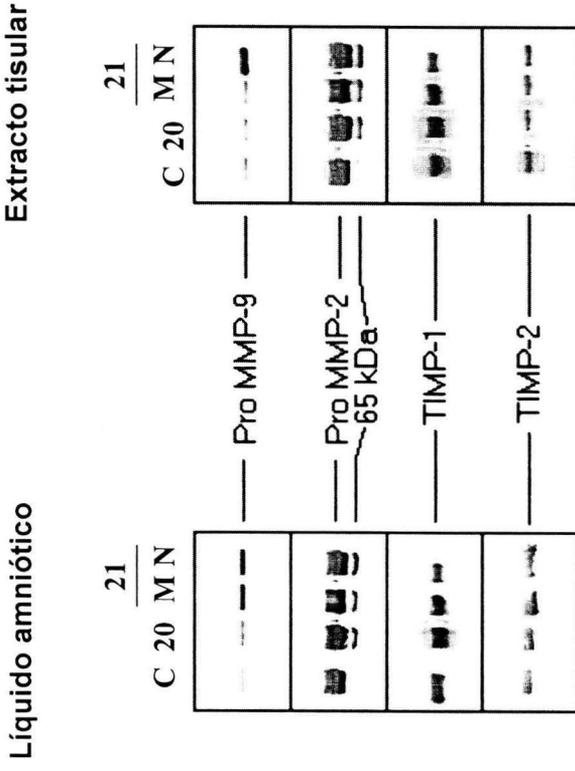


Figura 8. Western blot. Detección de proteína inmunoreactiva en muestras de LA y ET en la etapa final de la gestación. Se colocaron 10mg de proteína total por carril. C: proteína recombinante; 20 y 21: días de gestación.

semejante en ambos compartimentos. La respuesta para MMP-2 y TIMP-2 fue similar en ambos compartimentos, no se encontraron cambios en los días estudiados (el rango de UR para MMP-2 fue 8500 ± 1200 , y para TIMP-2 de 1450 ± 570).

Expresión de genes por northern blot,

Para expresar de forma semicuantitativa los datos densitométricos del northern blot, se utilizó el mismo principio que para el western blot y las unidades densitométricas (UD) se normalizaron en cada membrana, utilizando la intensidad de la banda del mRNA de la β -actina (control). La respuesta del gene para MMP-2 no mostró cambios en su expresión desde el día 20 hasta el final de la gestación. La expresión del gene para MMP-9 fue detectada desde el día 20 y hasta el final de la gestación, encontrando aumento de 6 veces más en el trabajo de parto con respecto a las 24 horas antes. Para TIMP-1 se obtuvo decremento de 3 veces menor en TP respecto a 21M, cabe aclarar que con el inhibidor nunca se encontró la señal tan intensa como la obtenida para MMP-9 (Figura 9).

DISCUSIÓN.

La composición de la matriz extracelular es importante en las membranas fetales para que pueda soportar cambios de presión y movimientos fetales sin sufrir rompimiento hasta el momento preciso del parto, momento en el cual se lleva a cabo una serie de cambios estructurales que conducen a la pérdida de sus características, marcando el inicio del evento con la ruptura de dichas membranas. Algunos de estos cambios han sido documentados previamente por diversos autores ^{4, 22, 23}. En el presente trabajo se analizaron cambios en la expresión y actividad de las gelatinasas en la fase final de la gestación, enzimas indispensables para la degradación de la colágena tipo IV, V y VII, principales componentes de las MF. La presencia en ambos compartimentos, de actividad proteolítica aumentada al final de la gestación en el modelo de la rata, coincidió con lo reportado en diferentes trabajos que muestran aumento de la actividad enzimática previa al trabajo de parto en humano ^{23, 25}. Nuestros resultados mostraron que el incremento fue mayor en el líquido amniótico 12 horas antes del TP, a diferencia de lo observado en EMF; llamando la atención que durante el TP esta relación se invirtió a favor del tejido. Este hallazgo fue novedoso, ya que en los trabajos anteriormente citados no trabajaron ambos compartimentos al mismo tiempo, y sólo reportan el aumento ya sea en LA o MF.

Análisis de la expresión de genes por Northern blot.

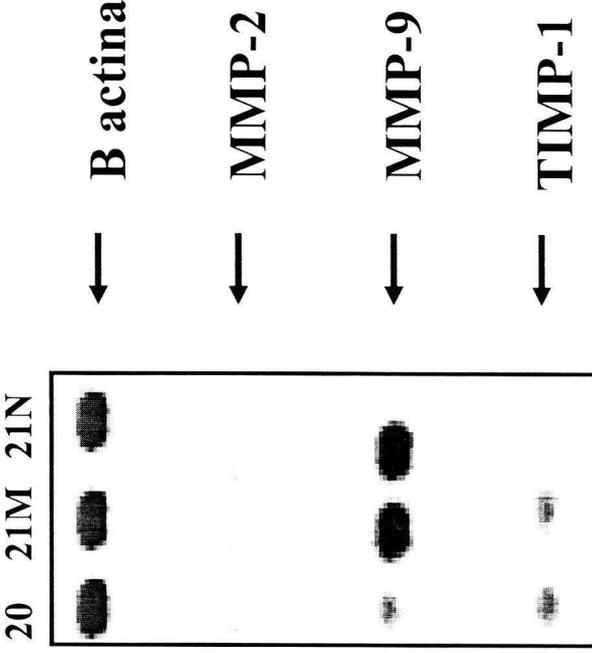


Figura 9. Northern blot. Se muestra la hibridación del RNA mensajero extraído de las membranas fetales en los diferentes tiempos con sondas específicas para MMP-2, MMP-9 y TIMP-1.

Estos resultados nos llevaron a sugerir que en la membrana hay un reclutamiento de enzimas en el momento en que se va a dar la ruptura del tejido.

Una vez registrado el aumento de actividad proteolítica en el modelo, el siguiente paso fue verificar en las muestras la presencia de las enzimas objetivo del estudio, para lo que se utilizó uno de los sustratos sobre los que ejercen su actividad estas enzimas. Una de las ventajas en la utilización de la técnica de zimografía, es la visualización en un mismo gel, tanto de las formas activas como los zimógenos, separados por la diferencia de peso molecular. Esto se debe a que durante la electroforesis, la proteína se somete a condiciones desnaturizantes por la acción del SDS³⁶; este detergente actúa sobre el zimógeno activándolo al generar cambios estructurales en la proteína, sin modificar su peso molecular. Al final, estos zimógenos se revelan como bandas con mayor peso molecular y que presentan actividad enzimática.

La caracterización cualitativa de las bandas obtenidas por zimograma llevó a la identificación de proMMP-2, MMP-2 y proMMP-9 presentes en líquido amniótico y en el extracto de membrana fetal. Como se observó en la figura 5A, la actividad enzimática total de MMP-2 registró un ligero aumento a las 12 horas antes de TP en el LA para disminuir posteriormente, hecho que difiere con lo reportado por el grupo de Maynon *et al*³⁷ quienes reportan que no existe variabilidad para esta enzima, al analizar muestras de LA con y sin TP, así como con RPM. Esta diferencia podría deberse a las técnicas utilizadas para el análisis de la muestra, ya que en nuestro trabajo sólo se analizaron las muestras por técnicas cualitativas, y ellos utilizaron inmunoensayo ELISA, donde se obtienen resultados cuantitativos de la cantidad de proteína presente en la muestra. Con relación a la presencia de la forma activa de MMP-2 en los tiempos de estudio diferimos con lo reportado por McLaren³⁸, quienes no observan la presencia de la forma activa en muestras sin TP, y solo la reportan en muestras posteriores a la labor. Sin embargo nuestros resultados obtenidos para el EMF donde no se registraron cambios para esta enzima, coincide con datos obtenidos en el laboratorio, en donde se monitoreó la presencia de esta enzima en los días 15-18 no reportaron cambios en la presencia de esta MMP, lo cual reafirma la teoría de la participación de la MMP-2 en la remodelación de la matriz extracelular de diferentes tejidos por lo que, en el recambio que sufren las MF durante la gestación no es de sorprendernos su presencia, sin embargo el

comportamiento que tiene esta MMP en el LA nos hace suponer un posible papel activador para proMMP-9 en el trabajo de parto, ya que mientras su actividad se ve disminuida, proMMP-9 aumenta y posiblemente en este momento deje su estado de latencia para pasar a su estado activo, desencadenando la degradación del tejido y por ende su ruptura. Este posible papel para la MMP-2 como activador de proMMP-9 fue reportado por Fridman³⁹ en 1995, cuando al realizar incubaciones de MMP-2 recombinante con proMMP-9 obtuvo bandas con peso molecular de 86 kDa y 82 kDa, en un proceso de corte similar al realizado por la estromelisin-1 cuando activa a la proMMP-9.

Los datos obtenidos por Western-blot reafirmaron la presencia de MMP-2 y proMMP-9 actuando al término de la gestación, lo que permite sugerir la teoría de que MMP-9 en conjunto con MMP-2 son las enzimas responsables de las alteraciones que sufren las membranas fetales previas a su ruptura.

Es importante señalar que la forma activa de MMP-9 no se detectó en ninguno de los compartimentos estudiados, dato que se ha observado mucho en la literatura donde al hablar de su participación de esta enzima en la gestación siempre la muestran con peso molecular de 92 kDa^{23, 25, 26}, hecho que no es posible ya que no se puede pensar en la enzima en su estado de zimógeno actuando en la degradación del tejido. Por lo que se pensó en la posibilidad de que esta metaloproteinasa estuviera en asociación con su inhibidor (TIMP-1) horas antes del TP, formando el complejo enzima/inhibidor, tal suposición fue desechada al encontrar que niveles de proteína inmunoreactiva específica para TIMP-1 iban disminuyendo conforme se acercaba el TP. Mas es notable el incremento que tiene proMMP-9 y el que aparezca cercano al momento de la degradación enfatiza que la degradación del tejido se da en torno a la activación de esta enzima.

Con respecto a la producción de TIMP-2, quien tiene afinidad selectiva por la proMMP-2, se encontró que sus valores no fueron modificados en la etapa final de la gestación, lo que concuerda con datos encontrados en el humano. El hecho de que esta enzima y su inhibidor se mantengan presentes y sin modificación sugiere que el eje principal de ruptura se ejerce sobre MMP-9.

La expresión del gen de MMP-2 mostró al igual que los resultados por Western blot que esta MMP no presentó cambios, dato que coincide con lo reportado por Fortunato²⁴, quien indica que el gen de MMP-2 es un gen que se expresa constitutivamente en las membranas fetales. Sin embargo el resultado fue diferente para MMP-9 y su inhibidor. La expresión de esta enzima se vio aumentada a partir de 12 horas antes del trabajo de parto corroborando los resultados obtenidos por inmunorreactividad y zimografía. Estos datos concuerdan con los obtenidos por otros autores donde reportan aumento en la expresión del gen hacia el final de la gestación^{23, 25}. La relación inversa enzima-inhibidor evidente para MMP-9/TIMP-1 por northern blot, donde el aumento en la expresión de la enzima es contrario a lo observado para TIMP-1 confirma que el balance entre proteasa e inhibidor se inclina a favor de la proteólisis del tejido en el momento del trabajo de parto.

El balance entre la producción de MMPs y sus TIMPs es un punto crítico para el mantenimiento de la homeostasis de la MEC. Como se observó, si los componentes de las membranas fetales se inclinan hacia la producción de MMPs causarán la degradación de éstos, produciendo la ruptura del tejido. El estudio en las membranas de rata permitió documentar la relación existente entre la enzima (MMP-9) y su inhibidor (TIMP-1) justo a momento del trabajo de parto, y al parecer MMP2 - TIMP2, como complejo no influyen en el evento.

Señalando que en el periodo comprendido entre las 24 horas antes de TP y hasta el momento del parto debe existir un mecanismo de activación para proMMP-9 que involucre posiblemente a MMP-2 o a otras proteasas que participen en la activación de la enzima *in vivo*. Sería interesante encontrar el momento idóneo de dicha activación, el continuar trabajando con membranas de rata posibilita encontrar las respuestas a estas preguntas, ya que es un modelo reproducible, económico y que facilita la obtención de muestras a tiempos definidos por el investigador.

IZT.

CONCLUSIONES.

Nuestros resultados permiten concluir que en las membranas fetales el mecanismo regulador del proceso de remodelación durante la gestación, se da basado en la interacción MMP-2/TIMP-2, ya que fueron quienes estaban presentes tiempo antes del inicio del trabajo de parto y no presentaron cambios a nivel de gen o proteína, al final de la gestación. Esto mismo, permitió visualizar que en el mecanismo de la ruptura de las



membranas fetales durante el parto, existe un desajuste en la interacción enzima inhibidor relacionado con la aparición de MMP-9 en esta última fase de la gestación, resultado inverso para TIMP-1, hecho que propone esta interacción como posible blanco de estudios posteriores para contrarrestar el problema fisiopatológico de la RPM.

BIBLIOGRAFIA.

- ¹ Bryant-Greenwood GD. The Extracellular Matrix of the Human Fetal Membranes: Structure and Function. *Placenta*. 1998. 19:1-11.
- ² Bell SC, Malak TM. Structural and cellular biology of the fetal membranes. In: Elder, MG, Romero R, Lamont RF. (eds). *Preterm Labor*. New York, Churchill Livingstone; 1997. P. 401-428.
- ³ Malak TM, Ockleford CD, Bell SC, Dalgleidish R, Bright N, Macvicar J. Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI their ultrastructural organization in term human fetal membranes.. *Placenta*. 1993. 14(4):385-406.
- ⁴ LarMen J, Malak TM, Bell SC. Structural characteristics of term human fetal membranes prior to labour: identification of an area of altered morphology overlying the cervix. *Hum Reprod*. 1999. 14:237-241.
- ⁵ Parry S, Strauss III JF. Premature Rupture of the Fetal Membranes. *N En J Med*. 1998. 338 (10):663-670.
- ⁶ Nagase H, Woessner JF. Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1999. 274(31):21491-94.
- ⁷ Woessner JF, Nagase H. *Matrix Metalloproteinases and TIMPs*. OXFORD University. New York. 2000.
- ⁸ Overall CM. Molecular Determinants of Metalloproteinase Substrate Specificity. *Mol Biotech*. 2002. 22:51-87.

-
- ⁹ Thiennu HV, Zena W. Matrix metalloproteinases effectors of development and normal physiology. *Genes & Develop.* 2000. 14:2123-2133.
- ¹⁰ Bode W, Fernandez-Catalan C, Tschesche H, Grams F, Nagase H, Maskos K. Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cell Mol Life Sci.* 1999. 55(4):639-52.
- ¹¹ Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem.* 1997. 378:151-160.
- ¹² Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1990. 87:5578-5582.
- ¹³ Nagase H, Enghild JJ, Susuki K, Salvesen G. Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) by proteinases and (4-aminophenyl mercuric acetate). *Biochem.* 1990. 29:5783-5789.
- ¹⁴ Corcoran ML, Hewitt RE, Kleiner DE, Stetler-Stevenson W. MMP-2: Expression, Activation and Inhibition. *Enz Prot.* 1996. 49:7-19.
- ¹⁵ Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta.* 2000. 1477:267-283.
- ¹⁶ Gómez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol.* 1997. 74: 111-122.
- ¹⁷ Bode W, Fernandez-Catalan C, Grams F, Gomis-Ruth FX, Nagase H, Tschesche H, Maskos K. Insights into MMP-TIMP interactions. *Ann N Y Acad Sci.* 1999. 878:73-91.
- ¹⁸ Murphy G, Willenbrock F. Tissue inhibitors of metalloendopeptidases. *Methods Enzymol.* 1995. 248:496-510.

-
- ¹⁹ Olson MW, Gervasi DC, Mobashery S, Fridman R. Kinetic Analysis of the Binding of Human Matrix Metalloproteinase-2 and -9 to Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2. *J Biol Chem.* 1997. 272(47):29775-29983.
- ²⁰ Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Golberg GI. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem.* 1995. 270:5331-5338.
- ²¹ Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Presence of four tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP-1, -2, -3, -4) in human fetal membranes. *Am J Reprod Immunol.* 1998. 40(6):395-400.
- ²² Malak TM, Bell SC. Structural characteristics of term human fetal membranes: a novel zone of extreme morphological alteration within the rupture site. *Br J Obstet Gynecol.* 1994. 101(5):375-86.
- ²³ Vadillo-Ortega F, González-Avila G, Furth E, Lei H, Muschel RJ, William G, Stetler-Stevenson, Strauss III JF. 92 kD Type IV Collagenase (Matrix Metalloproteinase-9) Activity in Human Amniochorion Increases with Labor. *Am J Pathology.* 1995. 146(1):148-156.
- ²⁴ Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. 1997. Collagenolytic enzymes (gelatinases) and their inhibitor in human amniochorionic membrane. *Am J Obstet Gynecol.* 177(4):731-741.
- ²⁵ Lei H, Vadillo-Ortega F, Paavola LG, Strauss JF. 92 kDa Gelatinase (matrix metalloproteinase-9) is induced in rat amnion immediately prior in parturition. *Biol Reprod.* 1995. 53:339-44.
- ²⁶ McLaren J, Taylor DJ, Bell SC. Increased concentration of pro-matrix metalloproteinase 9 in term fetal membranes overlying the cervix before labor: Implications for membrane remodeling and rupture. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182:409-16.
- ²⁷ Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* 1976. 72: 248-254.

-
- ²⁸ Segers R, Butt TM, Kerry BR, Peberdy JF. 1994. The nematophagous fungus *Verticillium chamydosporium* produces a chymoelastase-like protease which hydrolyses host nematode proteins *in situ*. *Microbiol.* 140:2715-2723.
- ²⁹ Fisher S, Cui T, Zhang L, Hartman L, Grahi K, Guo-Yang Z, Tarpey J, Damsky C. Adhesive and degradative properties of human placental cytotrophoblast cells in vitro. *J Cell Biol.* 1989. 109: 891-7.
- ³⁰ Watanabe H, Nakanishi I, Yamashita K, Hayakawa T, Okada Y. Matrix metalloproteinase-9 (92 kDa gelatinase/Type IV collagenase) from U937 monoblastoid cells: correlation with cellular invasion. *J Cell Sci.* 1993. 104:991-9.
- ³¹ Towbin H., et al. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:4350-54.
- ³² Sanbrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor, NY. Laboratory Press. 1989, p.7.26-7.29.
- ³³ Reponen P, Sahlberg C, Huhtala P, Hurskainen T, Thesleff I, Tryggvason K. Molecular Cloning of Murine 72-kDa Type IV Collagenase and Its Expression during Mouse Development. *J Biol Chem.* 1882 267(25):7856-7862.
- ³⁴ Huhtala P, Tuuttila A, Chow LT, Lohi J, Keski-Oju J, Tryggvason K. Complete Estructure of the Human Gene for 92-kDa Type IV Collagenase. *J Biol Chem.* 1991. 266(25):16485-16490.
- ³⁵ Coulombe B, Skup D. In Vitro Synthesis of the Active Tissue Inhibitor of Metalloproteinases Encoded by a Complementary DNA from Virus-Infected Murine Fibroblasts. *J Biol Chem.* 1988. 263(3):1439-1443.
- ³⁶ Birkedal-Hansen H, Taylor RE. Detergent-Activation of latent collagenase and resolution of its component molecules. *Biochem Bioph Res Com.* 1982. 107(4):1173-1178.

³⁷ Maynon E, Romero R, Pacora P, Gomez R, Mazor M, Edwin S, Chaiworapongsa T, Kim JC, Yoon BH, Menon R, Fortunato S, Berry SM. Arole for the 72 kDa gelatinase (MMP-2) and its inhibitor (TIMP-2) in human parturition, premature rupture of membranes an intraamniotic infection. *J Perinat Med.* 2001. 29(4):308-316.

³⁸ McLaren J, Taylor DJ, Bell SC. Increased concentration of pro-matrix metalloproteinase 9 in term fetal membranes overlying the cervix before labor: Implications for membrane remodeling and rupture. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182:409-16.

³⁹ Fridman R, Toth M, Pena D, Mobashery S. Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2) *Cancer Res.* 1995. 55(12): 2548-55.