

11281

---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

RESPUESTA FUNCIONAL DEL CORIOAMNIO HUMANO ANTE  
BACTERIAS CAUSANTES DE INFECCIONES  
CERVICOVAGINALES

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. CLAUDIA VERÓNICA ZAGA CLAVELLINA

DIRECTOR DE TESIS: DR. FELIPE VADILLO ORTEGA

MÉXICO D.F.

2004

---



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.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

Autorizo a la Biblioteca General de Bibliotecas de la UNAM a publicar en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.  
NOMBRE: Claudia Verónica Zaga Clavellina  
FECHA: 09 NOV 04  
FIRMA: 

## MIEMBROS DEL JURADO

**PRESIDENTE: DR. RUY PÉREZ TAMAYO**

**SECRETARIO: DR. FELIPE VADILLO ORTEGA**

**VOCAL: DR. HORACIO MERCHANT LARIOS**

**VOCAL: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA**

**VOCAL: DR. RICARDO LASCURAIN LEDESMA**

**SUPLENTE: DR. ENRIQUE ANTONIO PEDERNERA ASTEGIANO**

**SUPLENTE: DR. EDUARDO GARCÍA ZEPEDA**

Con agradecimiento especial:

A cada uno de los miembros del jurado, quienes enriquecieron esta tesis con sus comentarios y observaciones.

Al Dr. Horacio Merchant Larios quien siempre mostró interés en mi trabajo, el cual, fue enriquecido por cada uno de sus comentarios; agradezco sobre todo, el ofrecerme siempre la oportunidad de encontrar una solución a cada problema.

Al Dr. Federico Martínez Montes por el interés y disposición mostrado en el proyecto de investigación dentro y fuera de las evaluaciones.

Al Dr. Ruy Pérez Tamayo quien me dio la oportunidad y facilidades para desarrollar diversos experimentos en las instalaciones del Laboratorio de Medicina Experimental del Hospital General de México.

A la Dra. Rosario López Vancell por su valiosa ayuda en las pruebas de validación del modelo experimental.

Mi reconocimiento y agradecimiento a los Sres. José Guadalupe Baltazar García y Pedro Balderas Flores por su invaluable ayuda en el procesamiento histológico de los tejidos y a Magdalena Beltrán Zúñiga por su colaboración en el manejo de los cultivos bacterianos requeridos a lo largo de todo el procedimiento experimental.

Agradezco a los médicos Rolando Maida Claros y Jorge Beltrán Montoya con quienes fue posible una coordinación oportuna y eficiente en la toma de muestras dentro del área tocoquirúrgica del INPer.

Mi sincero agradecimiento a la QFB Guadalupe García López quien con su enorme empeño y trabajo enriqueció substancialmente este trabajo

Todo mi reconocimiento y agradecimiento al Dr. Felipe Vadillo Ortega quien me ha permitido formar parte de su grupo de trabajo y me ha otorgado, adicionalmente, el enorme privilegio de crecer académica y profesionalmente a su lado.

Gracias por todo

**"Si he conseguido ver más lejos, es porque me he  
aupado en hombros de gigantes"**  
Isaac Newton

*Dedico este trabajo*

*A Arturo, amor de mi vida, por su fe y apoyo incondicional, por toda la felicidad y compañía, por los desencuentros y coincidencias y por que cada minuto dedicado a este trabajo fue y es un minuto dedicado a él.*

*Por que "juntos somos mucho más que dos" ... ..gracias.*

*A mi Marielita, ilusión y deseo hecho realidad, por ser una fuente incommensurable de amor, ternura y esperanza y la principal razón para creer en el futuro.*



*A mis padres Juan Manuel y Yolanda para los que solo tengo amor, agradecimiento, admiración y respeto; por todas y cada una de sus palabras de aliento, por su confianza y por siempre procurar lo mejor para mí.*

*Gracias pá; gracias má.*

*A mi hermano Antonio, luz hermosa y brillante que alumbró mi camino, porque en infinidad de momentos me ha enseñado que ninguna distancia es suficiente para separarnos.*

*A mi hermana Ruth, por el inmenso regalo de su cariño y amistad y por que juntas hemos entendido que más allá del final hay un nuevo comienzo.*

*A Yanira, quien se ha convertido en parte esencial de un círculo de amistad, cariño y confianza que rodea y protege mis más preciados tesoros.*

*A mi entrañable amiga Rosario LV, ejemplo de vida; por ser tan grande y por compartirme su sencillez, entereza y determinación.*

*A Ana Elena Lemus Bravo, piedra angular en mi formación profesional y una guía respetuosa y sabia. Mi eterna gratitud y respeto.*

*A Yolanda Herrera y Antonio Linares por su apoyo y confianza,  
pero sobre todo, por su cariño.*

*A Adolfo, Isaac, Paola, Daniela, Gerardo y Antonio con todo mi  
amor.*

*A mi familia y a Dios, por permitirme entender lo afortunada que  
soy.*

**“La ignorancia afirma o niega rotundamente; la Ciencia duda”**

Francois Marie Arouet Voltaire

El trabajo de investigación de esta tesis se realizó en el laboratorio de la Dirección de Investigación del Instituto Nacional de Perinatología como parte de mis estudios de posgrado en el Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Mis estudios de Doctorado fueron posibles gracias al apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca No. 118259 y por la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) de la Universidad Nacional Autónoma de México a través de la matrícula 98812756.

## INDICE

<b>1. RESUMEN</b>	1
<b>2. ABSTRACT</b>	4
<b>3. INTRODUCCIÓN</b>	7
3.1 Membranas corioamnióticas humanas (MCH)	9
3.2 Ruptura prematura de membranas (RPM)	12
3.3 Metaloproteasas de matriz extracelular (MMP's) y RPM	16
3.3.1 MMP's	16
3.3.2 Inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMP's)	20
3.3.3 Papel fisiopatogénico de las MMP's	21
<b>4. ANTECEDENTES</b>	24
4.1 Teoría ascendente	26
4.2 Relación entre inflamación y RPM	27
4.2.1 Cérvix	28
4.2.2 Decidua	28
4.2.3 Líquido amniótico	29
4.2.4 Coriodecidua	30
4.2.5 Membranas fetales	31
4.2.5.1 Preparaciones celulares	31
4.2.5.2 Explantes	
4.3 Lipopolisacárido	34
4.4 <i>Streptococcus agalactiae</i>	34
4.5 Relación entre inflamación y la expresión de MMP's/TIMP's en la RPM	35
<b>5. JUSTIFICACIÓN</b>	37
<b>6. HIPÓTESIS DE TRABAJO</b>	38
<b>7. OBJETIVO GENERAL</b>	39
<b>8. OBJETIVOS PARTICULARES</b>	40
<b>9. MATERIALES</b>	42
9.1 Material Biológico	42
9.2 Anticuerpos y proteínas recombinantes	42

<b>10. MÉTODOS</b>	<b>43</b>
10.1 Procesos experimentales	43
10.1.1 Colecta de muestras y control microbiológico	43
10.1.2 Cultivo de las membranas corioamnióticas humana (Modelo Experimental)	43
10.1.3 Validación del modelo	46
10.1.3.1 Viabilidad de los explantes	46
10.1.3.2 Integridad de los explantes	46
10.1.3.2.1 Resistencia eléctrica transmembranal (RET)	47
10.1.3.2.2. Difusión transmembranal de <sup>3</sup> H-Prolina	48
10.1.3.3 Análisis histológico de los explantes	49
10.1.4 Cultivo independiente de coriodecidua y amnios	50
10.1.5 Estimulación de las membranas corioamnióticas humanas en cultivo	50
10.1.5.1 Modalidades de estimulación	50
10.1.5.2 Estimulación con lipopolisacarido	51
10.1.5.3 Estimulación con <i>Streptococcus agalactiae</i>	51
10.1.5.4 Análisis de integridad post-tratamiento	52
10.1.6 ELISA de IL-1 $\beta$	52
10.1.7 ELISA de TNF $\alpha$	53
10.1.8 Zimografía	54
10.1.9 Determinación cuantitativa de la MMP2 y la MMP-9 activa	54
10.1.10 ELISA de TIMP1 y TIMP2	55
10.1.11 Análisis estadístico	56
<b>11. RESULTADOS</b>	<b>57</b>
11.1 Validación del modelo experimental	57
11.2 Estimulación con lipopolisacarido	61
11.1.1 Secreción de IL-1 $\beta$ y TNF $\alpha$	61
11.1.2 Secreción y actividad gelatinolítica de la forma proenzimática y activa de la MMP-2 y MMP-9	64
11.1.3 Secreción de TIMP1 y TIMP2	67
11.1.4 Análisis histológico	68
11.3 Estimulación con <i>Streptococcus agalactiae</i>	72
11.3.1 Secreción de IL-1 $\beta$ y TNF $\alpha$	
11.3.2 Secreción y actividad gelatinolítica de las forma proenzimática y activa de la MMP-2 y MMP-9	75
11.3.3 Secreción de TIMP1 y TIMP2	78
11.3.4 Análisis histológico	79
11.4 RET después de los tratamientos	82

<b>12. DISCUSIÓN</b>	83
<b>13. CONCLUSIONES</b>	100
<b>14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	102
<b>15. ABREVIATURAS</b>	121
15.1 Abreviaturas en español	121
15.2 Abreviaturas en inglés	121
<b>16. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS DEL TRABAJO EXPERIMENTAL</b>	122



## 1. RESUMEN

La infección intrauterina es el principal factor de riesgo asociado al desarrollo de ruptura prematura de membranas (RPM), patología que complica el 10% del total de los embarazos y hasta el 40% de los partos pretérmino. Existen evidencias clínicas y epidemiológicas que permiten suponer que el establecimiento y desarrollo de un proceso infeccioso a nivel cervicovaginal es una explicación plausible para el desarrollo de una infección intrauterina.

El ascenso de microorganismos patógenos desde la región cervicovaginal hasta la coriodecidea y región intramniótica, dispara una red de señales que coordinan la defensa, sin embargo, también producen daño selectivo e irreversible a las membranas corioamnióticas humanas (MCH); parte de estas señales incluyen la síntesis y secreción de moduladores proinflamatorios y la degradación selectiva de distintos elementos de la matriz extracelular (MEC) que mantienen la estructura y fuerza tensil que caracteriza a las MCH.

A pesar de la asociación entre infección y RPM, no está claro cómo y en que magnitud contribuyen cada una de las poblaciones celulares que constituyen al corioamnios en la respuesta ante un proceso infeccioso de esta naturaleza.

El objetivo de este proyecto fue evaluar la respuesta funcional de MCH viables y funcionales ante el estímulo con Lipopolisacárido (LPS) y *Streptococcus agalactiae* usando un modelo experimental que reproduce *in vitro*, mediante un sistema de dos compartimentos independientes, la relación y contacto entre los elementos infecciosos y las diferentes poblaciones celulares.

Se utilizaron MCH con 37-41 semanas de gestación, sin trabajo de parto activo ni antecedentes clínicos o microbiológicos de infección intrauterina; las membranas fueron montadas en un Transwell®, el cual permitió la formación de un sistema de cultivo con dos cámaras. Las membranas se estimularon selectivamente en una o ambas caras durante 24 h con 500 ng/mL de LPS ó  $1 \times 10^6$  UFC de *Streptococcus agalactiae*. Los marcadores proinflamatorios medidos fueron la IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  mediante ELISA; la secreción y actividad gelatinolítica de las formas proenzimática y activa de las metaloproteasas de matriz extracelular (MMP's) MMP-2 y MMP-9 por zimografía y ELISA y la concentración de los inhibidores tisulares TIMP1 y TIMP2 por inmunoanálisis específicos. La estructura de las membranas fue evaluada histológicamente.

El principal modulador proinflamatorio que secretaron las MCH después del estímulo selectivo con LPS fue el TNF $\alpha$ , el cual fue sintetizado principalmente por la región coriodecidual como resultado del estímulo directo y en respuesta a una señal estimuladora proveniente del amnios.

El estímulo con LPS tanto en la coriodecidual como en el amnios se tradujo en el incremento significativo de la secreción *in vitro* de proMMP-2 y proMMP-9 principalmente por la cara materna de las membranas. El análisis histológico mostró que 24 h después del tratamiento con el LPS, la capa compacta de las MCH desarrolló extensa degradación.

La coincubación con el *Streptococcus agalactiae* favoreció la secreción de la IL-1 $\beta$  exclusivamente del lado de la coriodecidual, región que también sintetiza la mayor cantidad de proMMP-2 y proMMP-9.

Los patrones de secreción de TIMP1 y TIMP2 no tuvieron cambios significativos en ninguna de las modalidades de estimulación con el LPS ni con el *Streptococcus agalactiae*.

Los resultados indican que independientemente de la zona inicial de contacto, la coriodecidua agrupa y coordina las señales proinflamatorias y prodegradativas que se generan después del estímulo con LPS o *Streptococcus agalactiae*. El amnios tiene la capacidad intrínseca para transducir señales de activación hacia la coriodecidua que favorecen una respuesta coordinada y que permite a las MCH reaccionar diferencialmente al arribo de microorganismos patógenos, dependiendo de la ruta primaria de contacto (amnios o coriodecidua) o de la naturaleza del estímulo (microorganismo completo o producto soluble).

Nuestros resultados suponen la existencia de una vía de transporte y señalización intermembranosa que permite entablar una activación coordinada, cooperativa y bidireccional entre las distintas poblaciones celulares que constituyen al corioamnios humano.

## 2. ABSTRACT

Intrauterine infection is the main factor associated to the development of Premature Rupture of Membranes (PROM) which complicates at least 10% of all pregnancies and it is associated to 40% of preterm deliveries. There are clinical and epidemiological evidences supporting that the presence of an infection process located in the cervicovaginal region is a plausible explanation to the following ascending intrauterine infection. The presence of pathogenic microorganisms in these areas induces a proinflammatory network of signals that coordinates the defense; however, all this also result in a selective collateral damage to the chorioamniotic membranes (CM). Part of these signals includes the synthesis and secretion of proinflammatory factors and extracellular matrix-degrading enzymes. The specific reaction and contributions of the amniochorion to the infectious event is not fully understood.

The aim of this study was focused in the characterization of the initial response of full thickness human CM to selective stimulation with lipopolysaccharide (LPS) or with Group B Streptococci (GBS) such a *Streptococcus agalactiae*. We used a two-compartment experimental model that reproduces the potential relationships between the infectious agents and the cell populations of amniochorion.

Full thickness membranes were obtained after delivery by elective cesarean section from women at 37-40 weeks of gestation without evidence of active labor or intrauterine infection. The membranes were mounted in a Transwell™ device, physically separating the upper and lower chambers. The LPS (500ng/ml) or *Streptococcus agalactiae* ( $1 \times 10^6$  colony-forming units /ml) were added to either

amniotic or choriodecidual surface for 24 h. The accumulation of IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  was measured in both compartments using a specific ELISA; measurement of the secretion and collagenolytic activity of proenzyme and active forms of MMP-2 and MMP-9 was done by ELISA and zymography; the concentration of both human tissue inhibitor of metalloproteinases TIMP-1 and TIMP-2 was calculated by specific immunoassays.

TNF $\alpha$  was the main proinflammatory modulator secreted by the CM after selective stimulation with LPS, this cytokine was preferentially secreted by the choriodecidual, which responded to the direct stimulation or even when the amnion side was stimulated. The endotoxin stimulus induced an increment of the in vitro secretion of proMMP-2 and proMMP-9; however, this was significant only in the choriodecidual zone. An extensive degradation of the connective tissue in the compact layer of amnion was demonstrated 24 h after stimulation, independently of the LPS primary zone of contact.

Stimulation with *Streptococcus agalactiae* induced a greater synthesis of IL-1 $\beta$  only in the choriodecidual region, which was also the principal source of pro-MMP-9 and pro-MMP-2. On the other hand, the secretion profile of TIMP-1 and TIMP-2 was not changed with any stimulus.

Taken together these results indicate that the choriodecidual tissue is the key tissue for response to LPS or *Streptococcus agalactiae*, including the secretion of proinflammatory cytokines and extracellular matrix degradative enzymes. The amnion plays an active role in recognizing of LPS or *Streptococcus agalactiae*, and it has the capacity to transducer signals to the choriodecidual.

We may conclude that cooperative and bidirectional communication occur between amnion and choriondecidua in response to an infectious insult, which include intermembranous cytokine traffic and signaling between tissues.

### 3. INTRODUCCIÓN

El inicio del trabajo de parto está caracterizado por la conjunción de factores mecánicos, endocrinológicos (autócrinos/parácrinos) e inmunológicos producidos en el útero, placenta y membranas corioamnióticas, los cuales se coordinan con señales de origen fetal.

El estudio del encendido y progresión de este evento en diversas especies animales, ha permitido comprender cómo cada uno de estos elementos se activan y participan en el trabajo de parto en el humano (Keelan, y cols., 1997).

En forma general se acepta que el incremento significativo en el número de uniones Gap en el miometrio, indispensables para la instalación de contracciones uterinas sincrónicas; el aumento en la expresión en útero de los receptores para oxitocina y el concomitante incremento en la sensibilidad miometrial a ésta; la disminución de los niveles de la subunidad  $G_{\alpha s}$  resultado de la vía de señalización de proteínas G por agonistas  $\beta$  adrenérgicos asociados a la relajación y quiescencia miometrial, son sólo algunos de los eventos que caracterizan el microambiente que favorece el trabajo de parto (Casey y MacDonald 1988; Chalis y Smiths, 2001).

Por otra parte, la producción de especies reactivas de oxígeno, prostaglandinas (PGs), citocinas proinflamatorias y proteasas con afinidad por distintos elementos de la matriz extracelular (MEC) de las membranas corioamnióticas humanas (MCH) y otros tejidos uterinos han sido implicadas en el desarrollo y progresión del trabajo de parto normal y pretérmino (Lappas y cols., 2003).

Si bien los eventos endocrinológicos que coordinan la progresión del trabajo de parto en el humano aún no han sido completamente caracterizados, el empleo de modelos como el de la borrega, han permitido comprender que el incremento en la concentración de cortisol, producido por la adrenal fetal, se traduce en el aumento en la producción de PG's en las MCH y la decidua materna a través de una regulación positiva en la síntesis de la PG sintetasa (Challis y Smith y cols., 2001; Gibb y Challis 2002).

Otra condición característica e indispensable en el trabajo de parto, es la dilatación del cérvix, la cual, mas allá de ser un evento físico-anatómico, es el resultado de una reacción de tipo inflamatoria en el que diversas señales inmunológicas se coordinan con elementos vaso activos como la  $PGE_2$  y  $PGF_{2\alpha}$  y factores quimiotácticos como la Interleucina-8 (IL-8), que juega un papel clave en la quimiotaxis, activación y degranulación de granulocitos neutrofilicos en el estroma cervical y miometrio (Elliot y cols., 2000; Kelly y cols., 2002; Meadows y cols., 2003; Winkler, 2003).

De principio a fin, el embarazo es considerado un proceso inmunológico, a este respecto se ha demostrado que diversas citocinas están involucradas en el control de los procesos de implantación y desarrollo placentario; sin embargo, también existe evidencia de que las citocinas juegan un papel clave en la red de señales que regulan las etapas medias y finales de la gestación y que operan en la unidad materno-placentaria durante el proceso de gestación normal, formando parte integral de una red funcional de comunicaciones (Mitchell y cols., 1991; Bowen y cols., 2002; Gibb y Challis, 2002).



El inicio del trabajo de parto se ha asociado al incremento en la expresión, síntesis y secreción de diversas citocinas proinflamatorias como el Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) y las Interleucinas-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), -6 (IL-6) e IL-8 en tejidos gestacionales tanto maternos como fetales; por ejemplo, esta etapa del trabajo de parto se ha caracterizado por el aumento significativo en los niveles de ARNm de IL-1 $\beta$ , IL-6 y del factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) en cérvix y miometrio (Sennstrom y cols., 2000; Kemp, y cols.2002); de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 en la coriodecdua (Osman y cols., 2003;Turner y cols., 2002.), y de IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  en el líquido amniótico (Romero y cols., 1988; Elliot, y cols., 2000). Simultáneamente, estas citocinas actúan como reguladores de la expresión de otros mediadores que favorecen el trabajo de parto, entre los que se encuentra la ciclo-oxigenasa -2 (COX-2) que modula la síntesis de PG's en las etapas intermedias y finales del embarazo principalmente en la coriodecdua (Ludin-Schiller y Mitchell 1991; Yan y cols., 2002; Bowen y cols.,2002).

### **3.1 MEMBRANAS CORIOAMNIÓTICAS HUMANAS (MHC)**

El embrión humano desarrolla tejidos extraembrionarios accesorios, los cuales incluyen a la placenta y a las membranas corioamnióticas que en conjunto proveen al producto de diferentes mecanismos de intercambio, protección y control de las relaciones con su medio.

Las membranas fetales que delimitan la cavidad amniótica, están constituidas por dos capas histológicas adosadas: el amnios y el corion; cada una de las cuales

está formada por diferentes tipos celulares embebidos en una prominente MEC cuyo principal componente es la colágena (Bryant-Greenwood, 1998 a)

Las MCH derivan su fuerza de la colágena y ésta a su vez de su estructura y variedad, al menos 5 de los 12 tipos de colágena están en el corioamnios y se distribuyen en él de acuerdo a la función estructural que cumplen en las distintas capas del mismo (Malak y cols., 1993; 1994).

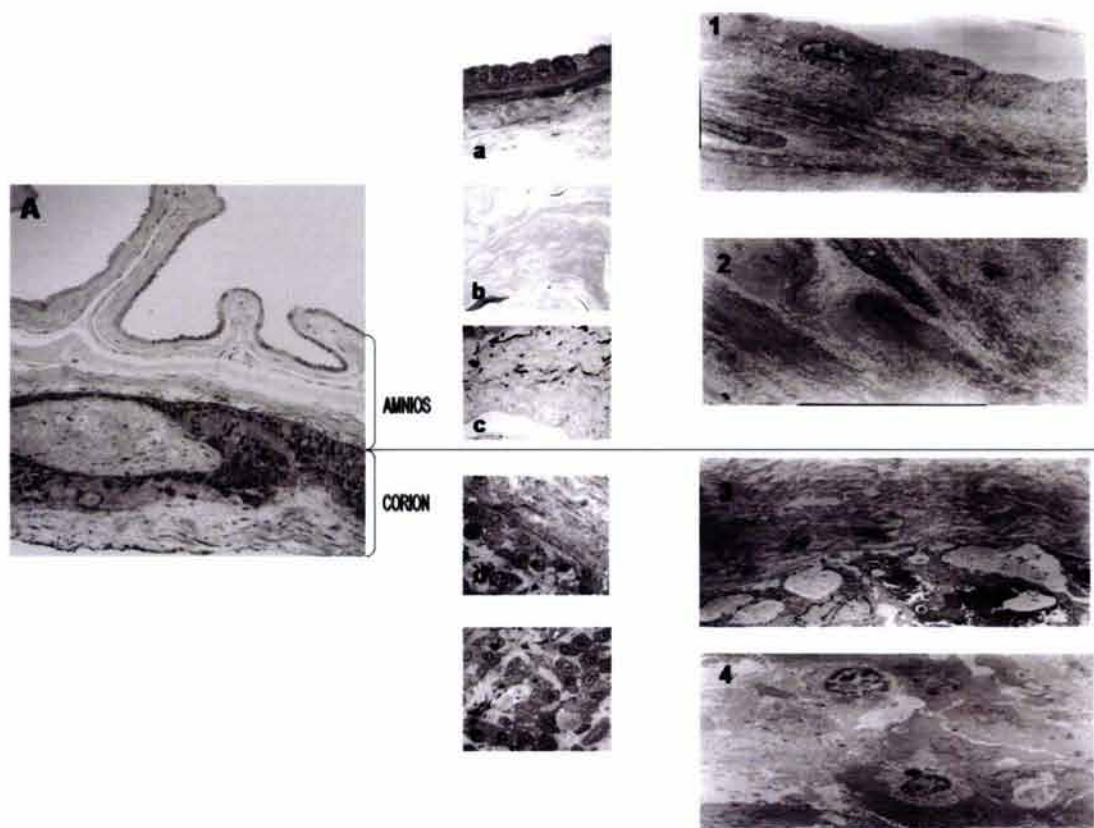
Las MCH en conjunto, son una identidad anatómica sumamente compleja y dinámica que secreta diferentes sustancias hacia el líquido amniótico y es capaz de responder a diferentes señales bioquímicas provenientes tanto del producto como de la madre (Parry y Strauss 1998; Bryant-Greenwood, 1998b).

El amnios humano carece de vasos sanguíneos y de inervación, los nutrimentos que requiere provienen del líquido amniótico; la capa más interna y cercana al producto es el epitelio amniótico constituido por células cuboideas ciliadas, las cuales secretan colágena tipo III y IV y glicoproteínas como laminina, nidógeno y fibronectina, las cuales constituyen y enriquecen a la membrana basal; adyacente a ésta, se encuentra la capa compacta, constituida por tejido conectivo que forma un tipo de esqueleto fibroso constituido principalmente por colágena tipo I, III, IV y VI, y fibronectina; todos estos componentes, en conjunto, tienen como función mantener la integridad mecánica y funcional del amnios. La siguiente capa está formada por fibroblastos, células mesenquimatosas (las cuales secretan las colágenas intersticiales I y III de la capa compacta) y macrófagos, estos últimos rodeados de una MEC constituida básicamente por colágenas I, III y VI que forman una red con

gránulos de glicoproteínas (Kanayama y cols., 1985; Malak y cols, 1993; 1994; Casey y McDonald, 1996).

La capa esponjosa o intermedia se localiza entre el amnios y el corion, tiene un abundante contenido de proteoglicanos y colágena no fibrilar. Esta es la región que permite que el amnios se deslice sobre el corion absorbiendo el estrés mecánico asociado a los movimientos fetales.

El corion es la zona histológica más gruesa de las membranas fetales y tiene mayor celularidad que el amnios. La porción coriónica en contacto con la capa esponjosa del amnios, es una estructura tipo membrana basal que delimita la capa de trofoblastos y que, a diferencia de la placenta, no conforman un sincicio, pero sí establecen una barrera celular continua. Además de esta estirpe celular, es posible encontrar cantidades variables de células con marcadores de leucocitos, que en su mayoría son macrófagos, así como fibroblastos, todos embebidos en una matriz extracelular laxa con colágenas tipo I, III, IV, V, VI y proteoglicanos. La porción final del corion se interdigita con la decidua uterina (Figura 1) (Fortunato y cols., 1997; Malak y cols., 1993; Parry y Strauss, 1998; Bryant-Greenwood, 1998 a)



**Figura 1.** Corte seminifino ( $1\mu\text{m}$ ) de una membrana corioamniótica humana de 40 semanas de gestación obtenida mediante cesárea programada incluida en EPON y teñida con azul de toluidina al 0.5%. A. Corte transversal (20X) en la que se distinguen las dos regiones adosadas que la constituyen: AMNIOS Y CORION. El amnios está constituido de un epitelio amniótico ciliado que descansa sobre una membrana basal (a 40X); la capa compacta está formada de colágena tipo I, III IV y VI y fibronectina; inmersos en esta región están fibroblastos, células mesenquimales y macrófagos (b 40X); la capa esponjosa está constituida de proteoglicanos y colágena no fibrilar (c y d 40X). El corion está conformado por una zona epitelial delimitada por una membrana basal rica en colágena tipo IV (d 40X), los trofoblastos están en estrecho contacto con la decidua materna formada de células epiteliales especializadas (e 40X). Las fotografías 1-4 (2500X) muestra detalles de las distintas regiones. 1. Epitelio cuboideo ciliado del amnios, su membrana basal y parte de la matriz extracelular de la capa compacta. 2. Se aprecian fibroblastos embebidos entre las fibras de colágena que forman una densa y fuerte red; 3 y 4 muestran poblaciones de trofoblastos, principal población celular del corion.

### 3.2 RUPTURA PREMATURA DE MEMBRANAS (RPM)

Uno de los eventos que caracteriza a las etapas tardías del trabajo de parto normal es la ruptura de las MCH, la cual junto con contracciones uterinas y dilatación del cuello del cérvix, preceden a la expulsión del producto. En la mayoría de los

casos, las membranas permanecen íntegras hasta que el cuello uterino desarrolla dilatación avanzada; sin embargo, en algunas mujeres, la ruptura de estas estructuras se presenta en ausencia de todos los demás eventos que caracterizan el trabajo de parto, lo que ha permitido identificar y caracterizar la existencia de la patología obstétrica denominada Ruptura Prematura de Membranas (RPM) que se presenta en el 10% del total de los embarazos (Narcio-Reyes y cols., 1994; Bryant-Greenwood y cols., 1998b).

Por otro lado, la RPM pretérmino describe un proceso en el que la ruptura se presenta antes de la semana 37 de gestación y está asociada hasta con el 40 % de todos los nacimientos pretérmino; en ambos casos, las consecuencias para el producto son siempre adversas y riesgosas, por lo que estas patologías están asociadas a una elevada tasa de mortalidad y morbilidad materna e infantil (Narcio-Reyes y cols., 1994; Bryant-Greenwood y cols., 1998b).

El mecanismo normal que condiciona la ruptura normal de las MCH, así como el que promueve la ruptura prematura son aún poco entendidos; sin embargo, a lo largo de los últimos años se ha desarrollado un panorama más extenso que ha permitido entender que la RPM tiene un origen multifactorial (Shubert y cols., 1992; Keelan y cols., 1997; Mercer 1998; Woods, 2001).

Factores dietéticos como concentraciones deficientes de vitamina C (Pfeffer y cols., 1998; Casanueva y cols., 1998), la cual está involucrada en el metabolismo de la colágena y la expresión de las enzimas capaces de degradarla, así como la disminución en la concentración de  $\text{Cu}^{2+}$  en suero materno y en cordón umbilical (Artal y cols., 1979) han sido relacionados con el desarrollo de RPM.

Alteraciones genéticas asociadas a desórdenes en el tejido conectivo como el síndrome de Ehlers-Danlos causado por varios defectos en la síntesis y/o estructura de la colágena, han sido relacionadas con el debilitamiento anormal de las membranas fetales y el incremento en el riesgo de desarrollar RPM (Barabas, 1966, Parry y Strauss, 1998).

El hábito de fumar (Williamns y cols., 1992), los sangrados en el segundo trimestre del embarazo (Ekwo y cols., 1993) y el uso de cocaína (Zimmermar y cols., 1994) son también considerados factores de riesgo.

En gran parte de las ocasiones, la ruptura de las membranas se asocia a aumento en la presión intrauterina (Al-Zaid y cols., 1980; Skinner y cols., 1981; Parry y Strauss 1998); sin embargo, aunque el factor mecánico juega un papel importante, existen evidencias que indican que las membranas que desarrollan ruptura prematura son intrínsecamente “defectuosas” ya que las áreas cercanas al sitio de ruptura han sido descritas como morfológicamente alteradas debido a que la relación entre el grosor y la masa celular de la interfase coriodecidual es anormal, lo que puede traducirse en cambios degenerativos (Vadillo-Ortega y cols, 1994; 1996; Malak y cols., 1994; Parry y Strauss., 1998).

En un esfuerzo por determinar si un defecto biomecánico en el corioamnios explica la ocurrencia de RPM, diversos investigadores han estudiado la fuerza y capacidad de resistir tensión y extensión de las MCH; los primeros reportes sugirieron que las membranas fetales crecen activamente y sintetizan colágena nueva sólo hasta la mitad de la gestación, punto a partir del cual las membranas

únicamente se estiran y acomodan conforme el crecimiento fetal avanza (Parry-Jones y Priya, 1976).

Estudios posteriores modificaron este concepto, ya que cultivos de células de epitelio amniótico obtenidos de MCH durante las intervenciones por cesárea, indicaron que en la etapa final del embarazo estas células biosintetizan y secretan activamente colágena (Aplin y cols. 1986).

En 1976 Artal y colaboradores midieron el grosor y resistencia de membranas a término que se rompieron prematuramente y de membranas cuya ruptura coincidió con el trabajo de parto; sus observaciones sugirieron que las MCH de ambos grupos se adelgazaron cerca del sitio de ruptura sobre la placenta; sin embargo, aquellas que desarrollaron ruptura prematura fueron mas delgadas y menos fuertes (Artal y cols., 1976).

Aunque existe consenso en aceptar que hay factores mecánicos involucrados en la RPM, hay controversia en lo relacionado a la posible asociación con la disminución en el contenido de colágena; lo anterior se basa en el hecho de que el metabolismo de la colágena juega un papel determinante en la patogénesis de este padecimiento (Vettraino y cols., 1996).

En los primeros estudios se observó que en las membranas que se rompen prematuramente, existe un bajo contenido de colágena comparado con las membranas normales (Skinner y cols., 1981); investigaciones posteriores han corroborado estas observaciones solamente en aquellas membranas con periodos de gestación menores a las treinta semanas (Kanayama y cols., 1985).

Aunque otros estudios no pudieron demostrar la existencia de diferencias significativas en el contenido de colágena entre las membranas normales y con RPM; si fue posible correlacionar directamente este parámetro con el tiempo que transcurre entre la ruptura y el nacimiento. Además, el incremento en la actividad colagenolítica y la elevada cantidad de colágena soluble, junto con la disminución en la tasa de síntesis de la misma, son características de las membranas que se han roto prematuramente (Vadillo-Ortega y cols., 1990).

A pesar de la publicación de datos aparentemente contradictorios, existen suficientes elementos para afirmar que en virtud de que la colágena es el principal soporte estructural de las membranas corioamnióticas y de que la fuerza tensil de éstas involucra el equilibrio entre la síntesis y la degradación de los diferentes componentes de la MEC, la disminución en la cantidad y/o calidad de colágena, junto con el incremento en la actividad colagenolítica, son factores asociados a la RPM (Winkler y cols., 1999; Kanayama y cols., 1985; Paavola y cols., 1995).

### **3.3 METALOPROTEASAS DE MATRIZ EXTRACELULAR (MMP's) Y RPM**

#### **3.3.1 MMP's**

La degradación de la colágena está mediada por una familia de endopeptidasas llamadas metaloproteasas de matriz extracelular (MMP's). Estas enzimas tienen características funcionales muy semejantes, todas ellas actúan en condiciones fisiológicas y usan mecanismos catalíticos dependientes de  $Zn^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ . Con excepción de la MMP-11, todos los miembros de esta familia son secretados como



proenzimas, las cuales son activadas en el espacio extracelular por otros miembros de la familia o por diferentes proteasas extracelulares (Woessner y Nagase, 2000).

Las MMP's hidrolizan al menos un componente de la MEC y en la mayoría de los casos el catabolismo de los diferentes componentes de ésta, es el resultado de una acción concertada entre varias enzimas (Salamonsen, 1996; Nagase y Woessner, 1999; Fortunato y cols., 2000a).

Los dominios característicos de estas enzimas son: el péptido señal, localizado en la región N-terminal y cuya función es dirigir la proteína hacia el lumen del retículo endoplásmico para que pueda ser exportada por la célula; el propéptido, de aproximadamente 100 residuos de largo que se caracteriza por la presencia de un segmento conservado de 8 a.a. (PRCG [C/N] PD) que puede ser cortado durante el proceso de activación; el dominio catalítico que contiene el sitio activo cuya secuencia consenso HEXGHXXGXXHS permite la unión con un ión de  $Zn^{2+}$  a través de los tres residuos de histidina y una molécula de agua (Woessner y Nagase, 2000) (Figura 2).

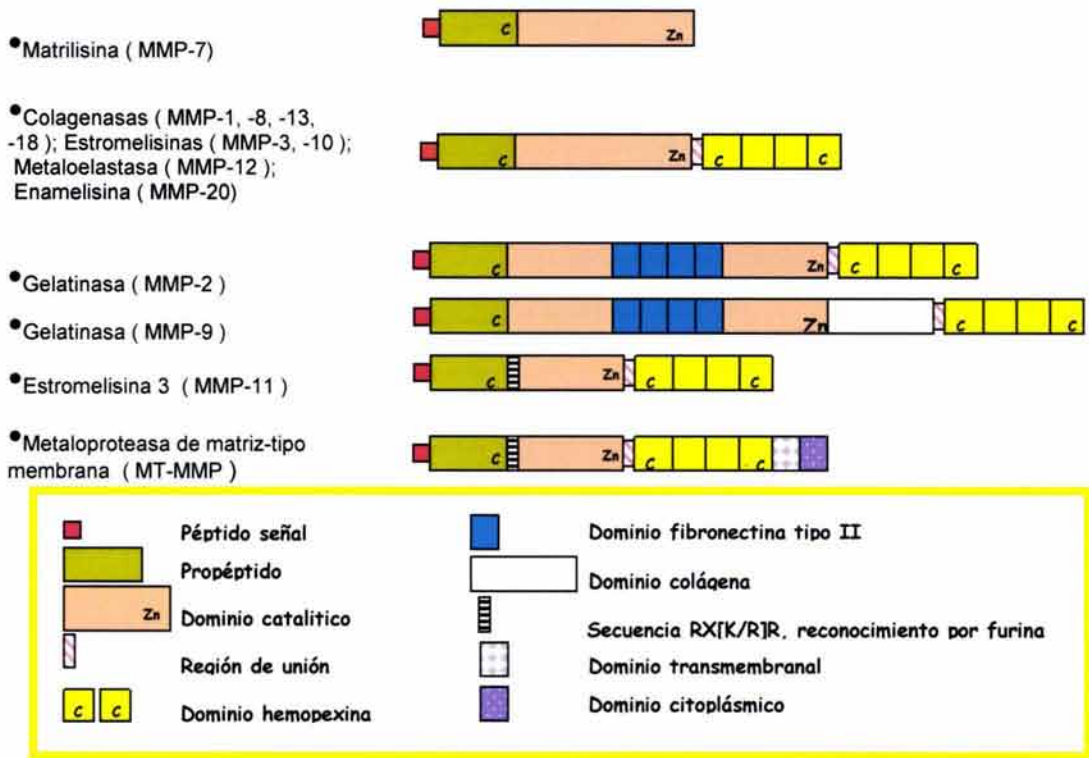


Figura 2. Estructura y dominios de algunos miembros de la familia de las MMPs.

De acuerdo al sustrato por el que presentan mayor afinidad, las MMP's han sido divididas en cinco grupos: 1) colagenasas intersticiales 1,2, 3 y 4 (MMP-1 y MMP-8, MMP-13 y MMP-18 respectivamente), cortan la triple hélice de las colágenas I, III, IX y XI; 2) gelatinasas A y B (MMP-2 y MMP-9 respectivamente), degradan la colágena desnaturalizada (gelatina) y tienen una alta afinidad por las colágenas tipo IV, V, VII y X, elastina, fibronectina y proteoglicanos; estas enzimas tienen en su región catalítica una secuencia tipo fibronectina repetida en triplete que les confiere una elevada especificidad por los diferentes sustratos; 3) estromelisinias 1, 2 y 3 (MMP-3, MMP-10 y MMP-11 respectivamente) degradan específicamente proteoglicanos y fibronectinas; 4)matrilisina o MMP-7 que degrada fibronectina, laminina, gelatina y elastina y es la más pequeña de las MMPs conocidas.

Los miembros más recientemente descritos y caracterizados dentro de la familia de MMPs son 5) MMPs tipo membrana (MT-MMP) en cuya región C-terminal tienen un dominio transmembranal que impide sean secretadas al medio extracelular. Se han identificado al menos cinco miembros en esta familia; sin embargo, MMP-MT 1 (MMP-14), MMP-MT 2 (MMP-15) y MMP-MT 3 (MMP-16) son las enzimas cuyo mecanismo catalítico ha sido más estudiado, lo que ha permitido caracterizar la existencia de una región con afinidad por furinas cercana al dominio catalítico, la cual, les permite involucrarse en los procesos de maduración de otras proteínas entre las que se encuentra la MMP-2, en cuyo mecanismo de activación parece estar también involucrada la acción de la MMP-MT5 (MMP-24) (Murphy y Docherty, 1992; Senior y Shapiro, 1992; Salomonsen, 1996).

La MMP-19, MMP-20 y MMP-21 fueron originalmente descritas en *Xenopus*, sin embargo, no se han caracterizado claramente sus capacidades catalíticas y perfiles de actividad que permitan ubicarlas en algún grupo conocido.

FAMILIA	METALOPROTEASAS DE MATRIZ (MMP 's)	SUBSTRATO
COLAGENASAS INTERSTICIALES.	COLAGENASA 1 (MMP-1)	Colágena fibrilar I, II Y III, VII, X, gelatina, proteoglicanos pro-MMP-2, -9.
	COLAGENASA 2 (MMP- 8) (Colagenasa de neutrófilos)	Colágena I, II, III, gelatina, proteoglicanos.
	COLAGENASA 3 (MMP-13) COLAGENASA 4 (MMP-18)	Colágena I, II, III, IX, gelatina; proteoglicanos, fibronectina, tenascina.
	GELATINASAS	GELATINASA A (MMP-2)
	GELATINASA B (MMP-9)	Colágenas tipo IV, I, VII, gelatina, elastina, fibronectina.
ESTROMELISINAS	ESTROMELISINA 1 (MMP-3)	Colágenas II, III, IV, IX, X, XI, gelatina, proteoglicanos, elastina, fibronectina.
	ESTROMELISINA 2 (MMP-10)	Colagenas, III, IV, IV; gelatina, elastina, fibronectina.
	ESTROMELISINA 3 (MMP-11)	Laminina, fibronectina
MATRILISINAS	MATRILISINA ( MMP -7)	Fibronectina, laminina, gelatinay elastina.
ELASTASAS	ELASTASA DE MACROFAGOS (MMP-12)	Elastina
ENAMELISINA	MMP-20	Amelogenina
TIPO MEMBRANA	MT1-MMP (MMP-14)	Colagena I, II, III, gelatina; proteoglicanos, elastina, fibronectina, vitronectin, tenascina, pro-MMP-2, -13
	MT2-MMP (MMP-15)	Gelatina, fibronectina, tencsina, pro-MMP-2
	MT3-MMP (MMP-16)	Colagena III, fibronectina, pro-MMP2
	MT4-MMP (MMP-17)	No determinado.
	MT5-MMP (MMP-24)	Pro-MMP-2

Figura 3. Miembros de las distintas familias de metaloproteasas y los sustratos por los que presentan mayor afinidad.

### 3.3.2. INHIBIDORES TISULARES DE METALOPROTEASAS (TIMP's)

La actividad de las MMP's es modulada por los inhibidores tisulares (TIMP's), con los cuales forman un complejo estequiométrico (1:1) que impide su actividad proteolítica mediante la unión al dominio catalítico de las enzimas.

Se han identificado al menos cuatro miembros en esta familia (TIMP1-TIMP4). TIMP1 y TIMP2 presentan un patrón de expresión inducible, mientras que TIMP3

exhibe un patrón constitutivo. El mecanismo de regulación de la expresión de TIMP 4 es poco claro.

TIMP1 regula directamente la actividad de MMP-9, MMP-1 y MMP-8, mientras que TIMP 2 la de MMP-2. La actividad y función de TIMP 3 y TIMP 4 son similares a las que despliega TIMP1 (Gómez y cols., 1997; Woessner y Nagase, 2000). Entre los factores que regulan la expresión de los inhibidores tisulares destacan el factor de crecimiento de linfocitos T ( $TGF\beta$ ), IL-1 $\beta$ , IL-11 (Salamonsen, 1996; Polette y Birembaut, 1998).

Las membranas fetales son un excelente ejemplo de la actividad coordinada de las MMP's y sus inhibidores, la cual es esencial para un proceso de remodelación de la abundante MEC que las caracteriza (Polette y Birembaut, 1998).

### **3.3.3. PAPEL FISIOPATOGÉNICO DE LAS MMP's**

Diversos reportes han relacionado consistentemente la degradación de los diferentes elementos de la MEC en el proceso que induce la ruptura de las MCH y que afecta directamente la fuerza tensil de éstas (Vadillo-Ortega y cols., 1990; 1996, Fortunato y cols., 2000a)

Se ha demostrado que comparadas con MCH normales, la actividad proteolítica en membranas con ruptura prematura se incrementa un promedio de 15 veces, esta actividad ha sido atribuida en gran parte a la MMP-2 y MMP-9, que adicionalmente a la gelatina, son capaces de degradar las colágenas VII, XI, V y IV, siendo esta última, el principal componente de las membranas basales de las MCH, sobre la que

descansa la arquitectura estructural que protege a la membrana de la ruptura (Draper y cols., 1995).

Dependiendo del tejido, la MMP-2 puede ser expresada constitutivamente o bien tener un patrón de expresión regulado, por ejemplo, en células neoplásicas se ha caracterizado el incremento en su expresión y secreción, además de que ha sido implicada en procesos de metástasis, agregación plaquetaria, migración endotelial durante la angiogenesis y migración de células T (Curran y Murray 1999 ; Werb y cols., 1998). Con respecto a su papel fisiológico en las MCH, existe controversia, debido a que algunos autores la consideran una enzima constitutiva y con un patrón de distribución ubicua en este tejido (Hulboy y cols., 1997). Otros reportes indican que su expresión puede ser regulada negativamente por factores como el ácido ascórbico (Pfeffer y cols., 1998); o bien, ser susceptible a una regulación positiva en procesos patológicos como RPM e infección intramniótica (Fortunato y cols., 2000a).

El trabajo de parto, es otro proceso en el que el papel de la MMP-2 no ha sido claramente establecido; estudios hechos en la década pasada, no lograron caracterizar cambios en la concentración y actividad enzimática de esta gelatinasa en líquido amniótico ni en MCH con trabajo de parto (Vadillo-Ortega y cols., 1995; Maymon y cols, 2001); sin embargo, en reportes más recientes, la MMP-2 fue asociada y caracterizada como parte de la maquinaria enzimática responsable de la regulación y ejecución de la RPM (Fortunato y cols, 1999a; 2000a; 2000b), a este respecto se ha demostrado que el incremento en los niveles de MMP-2 activa (libre de su inhibidor) y la disminución significativa de los niveles de TIMP2 son característicos del líquido amniótico de mujeres con RPM pretérmino (Fortunato y

cols., 1999a; 2000a). Adicionalmente, la concentración de este inhibidor tisular ha sido caracterizada en el líquido amniótico de mujeres con diagnóstico de infección intramniótica (Maymon y cols., 2001).

A diferencia de la MMP-2, el papel de la MMP-9, en diversos procesos fisiológicos y patológicos asociados al embarazo, está claramente establecido. Cada vez existen más pruebas que demuestran cambios dramáticos en la actividad e inmuno-reactividad de la MMP-9 en MCH durante los procesos de parto e infección intrauterina (Vadillo-Ortega y cols., 1995; Athayde y cols., 1998, Fortunato y cols., 1997; Vadillo-Ortega y cols., 2002).

Estudios experimentales indican, que en pacientes con RPM, la concentración, síntesis y actividad de la MMP-9 incrementa significativamente en MCH, líquido amniótico y suero fetal (Athayde, y cols. 1998; Romero y cols., 2002). Se ha propuesto también, que el incremento en la actividad de MMP-9 está acompañado de la disminución en la actividad del TIMP1 (Vadillo-Ortega y cols., 1996).

#### 4. ANTECEDENTES

La demostración a mediados del siglo pasado, que la estimulación con endotoxinas bacterianas en ratones producía hemorragia vaginal acompañada de muerte y pérdida fetal (Zahl y Bjerknes; 1943), permitió sentar las primeras bases para asociar la presencia de una infección a nivel del tracto genital con el desarrollo de patologías como el parto pretérmino y la RPM en el humano (Knox y Hoerner, 1950).

A lo largo de las décadas en que siguieron a estas primeras observaciones, se diseñaron varios modelos animales en los que se ha estudiado el efecto sobre el curso normal del embarazo de diferentes microorganismos patógenos asociados a infecciones cérvicovaginales (Romero y cols., 1988; Cox y cols., 1988). Estos estudios permitieron entender que la pérdida fetal, asociada a un evento infeccioso de esta naturaleza, es el resultado de compleja respuesta inmunológico-inflamatoria.

En el ratón se ha demostrado, que el trabajo de parto pretérmino que se enciende después de estimulación con endotoxina bacteriana (Dudley y cols., 1993), está precedido del incremento en la síntesis de IL-1 $\beta$  en la región decidual, así como por la secreción de enzimas que regulan la biosíntesis de factores uterotónicos como PGE<sub>2</sub> (Silver y cols., 1995; Silver y cols., 1997; Sato y cols., 2001); y el aumento en los niveles circulantes de TNF- $\alpha$  e IL-10 (Barsig y cols., 1995).

Existen reportes que indican que los efectos observados en el modelo murino se reproducen casi en forma idéntica en conejas preñadas infectadas en cérvix y vagina con *E. coli*, bacteria que indujo el encendido prematuro del trabajo de parto, acompañado por la pérdida del producto, el cual presentó evidencia histológica y microbiológica de infección en menos de 48h (Leslie y cols., 2000). Eventos similares



se han observado en ovejas, las cuales después de la infusión subcrónica de endotoxina bacteriana en el líquido amniótico, desarrollaron un proceso inflamatorio en varios tejidos intrauterinos y daño pulmonar grave en el producto (Moss y cols., 2003).

Con el uso de modelos de infección genital en ratas, se demostró que la infección vaginal con *Mycoplasma pulmonis*, un microorganismo asociado a infecciones de neonatos, se traduce en un proceso infeccioso a nivel fetal acompañado de daño en distintas regiones del cerebro (Brown y cols., 2001). Este daño, también ha sido reconocido y caracterizado en crías de ratas tratadas con LPS; en este caso, las regiones dañadas incrementaron también la síntesis y secreción de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (Cai y cols., 2000).

Utilizando modelos experimentales más sofisticados en hembras de monos rhesus, se pudo demostrar que después de la inoculación de Estreptococo del grupo B (EGB) en la cavidad amniótica, es posible caracterizar el incremento de la concentración en líquido amniótico de IL- $\beta$  e IL-6, el cual precedió al de PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . La conjunción de estos eventos explicó el inicio prematuro del trabajo de parto, sepsis del producto y las evidencias histológicas tanto en tejidos maternos como fetales de infección e inflamación aguda (Gravett y cols., 1994, McGregor y cols., 1992).

Un estudio posterior en este mismo modelo demostró que la estimulación con *Streptococcus agalactiae* y con IL-1 $\beta$  induce el incremento progresivo de la concentración en líquido amniótico de la MMP-9, enzima directamente asociada con el encendido del trabajo de parto, tanto pretérmino como a término y principal regulador de la degradación de la MEC de las MCH en este tipo de eventos (Vadillo-Ortega y cols., 2002).

## 4.1 TEORÍA ASCENDENTE

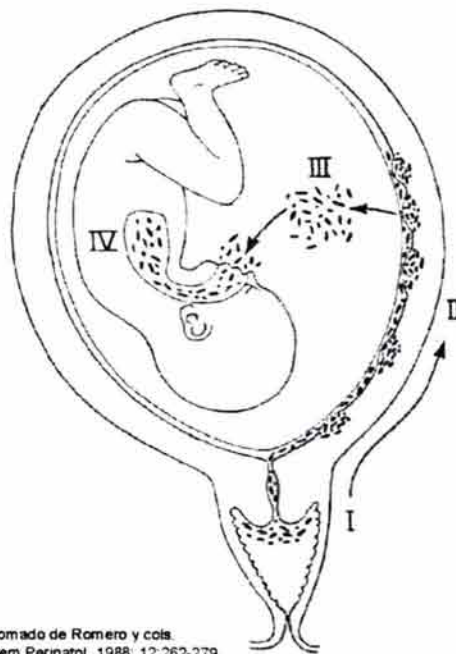
A lo largo de los últimos 50 años se ha reunido gran cantidad de elementos experimentales, clínicos y epidemiológicos que permiten suponer la existencia de una especificidad, consistencia y temporalidad de asociación entre un proceso infeccioso a nivel intrauterino y el desarrollo de RPM y parto pretérmino (Romero y cols., 1988; Greig 1998; Asrat, 2001), sin embargo y a pesar de las evidencias, existe aún controversia sobre el mecanismo fisiopatogénico que las asocia (Stroup, 1962; Minkoff, 1983; Newton, 1993; Goldenberg y cols., 1998; Eschenbach, 1998).

Las teorías actuales que vinculan la infección intrauterina con la RPM o el parto pretérmino, proponen tres posibilidades: que las manifestaciones clínicas sean: a) efecto directo de los productos bacterianos, b) que sean consecuencia de la respuesta inmune o bien, c) una mezcla de ambos (Shoonmaker y cols., 1989).

A este respecto, han sido varios los microorganismos asociados como agentes causales de cuadros infecciosos a nivel cervicovaginal. Se ha demostrado una asociación entre el incremento en el riesgo de RPM y la colonización del tracto genital por *Estreptococo del grupo B (EGB)*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Ureaplasma urealyticum* y los microorganismos asociados a vaginosis bacteriana como *Gardnerella vaginalis*, micoplasmas genitales y *Mobiluncus sp* (Parry y Strauss, 1998, McGregor y French, 2000).

Se ha propuesto un modelo general que pretende explicar cómo una infección cervicovaginal puede predisponer a una mujer a desarrollar RPM y /o parto pretérmino (Figura 4). La primera etapa (Etapa I) se desarrolla y favorece en un ambiente con

vaginosis bacteriana caracterizada básicamente por una disminución de lactobacilos y el establecimiento de anaerobios facultativos en vagina; posteriormente (Etapa II), algunos microorganismos acceden a la cavidad intrauterina y se establecen en la decidua, en donde inducen una reacción inflamatoria localizada (corioidesiduitis). Inmediatamente después (Etapa III), los microorganismos pueden invadir las venas fetales y/o proceder a través del amnios para invadir la cavidad amniótica; en la última etapa (IV), la bacteria accede al feto por aspiración de líquido amniótico (Creatsas y cols., 1981; Romero y cols., 1988; Heddleston y cols., 1993).



*Figura 4. Esquema de la vía de ascenso e infección de los microorganismos asociados a infecciones cervicovaginales hasta las regiones superiores del útero, decidua y MCH.*

#### 4.2 RELACIÓN ENTRE INFLAMACIÓN Y RPM.

La cavidad intrauterina que desarrolla un proceso infeccioso, despliega una respuesta inmunológica que incluye la producción de diversos mediadores

proinflamatorios entre los que destacan la IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$ , los cuales son producidos por células profesionales del sistema inmune como macrófagos y neutrófilos polimorfonucleares así como por células epiteliales y deciduales en respuesta a una gran variedad de bacterias y productos bacterianos (Romero y cols., 1989b; 1989c; 1989d; Mitchell y cols., 1991a; 1991b; Hersh y cols., 1998; So y cols., 1992; Gómez y cols., 1997b; Svanborg y cols., 1999).

Diversos esfuerzos experimentales se han hecho para analizar cómo y en qué magnitud responden los distintos tejidos gestacionales a diversos retos infecciosos e inmunológicos. A continuación se resume la respuesta de los tejidos implicados; sin embargo, cabe aclarar que la contribución de cada uno de ellos es mucho más compleja de lo que se describe, debido entre otras razones, a los efectos de tipo pleiotropico que cada uno de los factores inmunológicos secretados, ejerce mediante vías de regulación autócrina y parácrina (Steiborn y cols., 1996).

#### **4.2.1. CERVIX**

El tejido cervical sintetiza en forma constitutiva IL-8 (Barclay y cols., 1993), sin embargo, se ha demostrado que esta citocina, al igual que IL- $\beta$  y TNF $\alpha$ , se incrementan significativamente después de que células cervicales en cultivo son tratadas con LPS (Watari y cols., 2000).

#### **4.2.2. DECIDUA**

Se ha demostrado que las células deciduales en cultivo tiene la capacidad de responder a distintos estímulos inmunológico-infecciosos. Por ejemplo, el tratamiento

con IL-1 $\beta$  y/o TNF $\alpha$  induce a éstas a producir IL-6 (Romero y cols., 1990; Dudley y cols., 1992a); en cambio, al ser tratadas con diferentes componentes de pared celular bacteriana como LPS, Lípido A y ácido lipoteicoico, sintetizan cantidades significativas de dos quimiotácticos IL-8 y la proteína inflamatoria de macrófagos 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), así como la citocina con efectos antiinflamatorios IL-10, (Dudley y cols., 1997b y 1997a).

#### **4.2.3. LIQUIDO AMNIÓTICO**

La cavidad amniótica es un compartimento inmunológicamente privilegiado que se ha constituido como un sitio clave para el estudio de la respuesta inmune del producto y del epitelio amniótico; se ha demostrado que en el líquido amniótico de mujeres con infección intramniótica, cuyo embarazo concluyó prematuramente, la concentración de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y PGE<sub>2</sub> se encuentran incrementadas con respecto a las mujeres con cesárea a término y sin ninguna complicación (Romero y cols., 1990; Menon y cols., 1995; Reisenberger y cols., 1997; Yoon y cols., 1998; Hsu y cols., 1998).

IL-16, IL-18 y RANTES (Regulated on activation normal T cell expressed and secreted), tres citocinas recientemente caracterizadas y a las que se les atribuyen efectos proinflamatorios, han sido incluidas en el grupo de citocinas cuya concentración y bioactividad se incrementa en líquido amniótico de mujeres con diagnóstico de corioamnionitis (Athayde y cols., 1999; Pacora y cols., 2000a; Athayde y cols., 2000). Adicionalmente, la infección intramniótica se encuentra asociada con el incremento significativo en líquido amniótico de IL-4 (Dudley y cols., 1996c) y de lactoferrina, esta última capaz de desplegar propiedades antimicrobianas (Pacora y cols., 2000b).

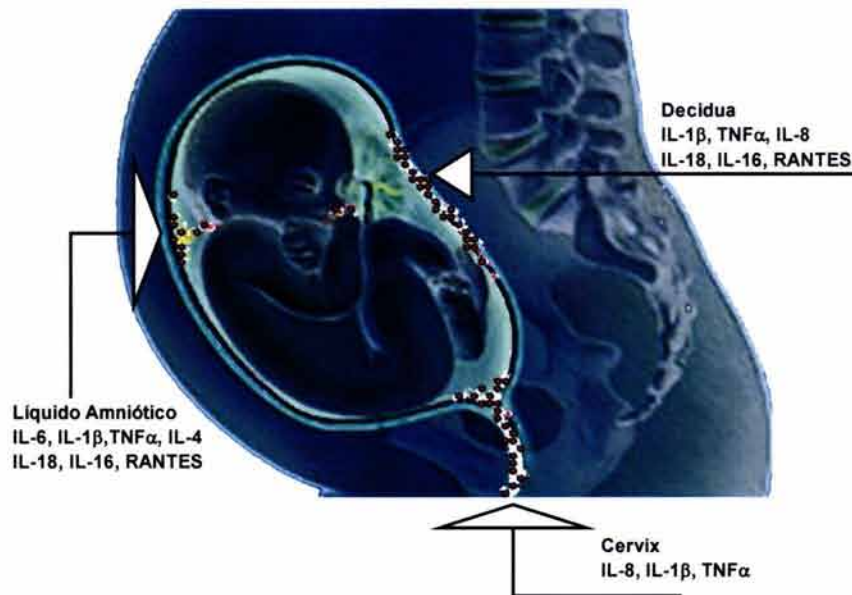


Figura 5. Citocinas sintetizadas y secretadas por distintos tejidos gestacionales en respuesta a diversos estímulos infecciosos.

#### 4.2.4. CORIODECIDUA

De los tejidos intrauterinos, la coriodecidua destaca porque en ella se han caracterizado redes de señalización muy complejas que se encienden y activan en respuesta a distintos estímulos, hecho que se ha atribuido a que es precisamente esta zona donde cohabitan poblaciones celulares de origen materno y fetal (Mitchell y cols., 1993)

La estimulación experimental de estas células con IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  o LPS da como resultado, entre otros eventos, el incremento significativo en la síntesis de novo del ARNm y de la forma proteica de IL-8 (Kelly y cols., 1992, Dudley y cols., 1993);

quimiocina que activa y recluta leucocitos que se infiltran, activan y degranulan en éste y otros tejidos contiguos (Dudley cols., 1997b), eventos que coinciden con lo observado en embarazos con corioamnionitis clínica (Laham y cols., 1999).

El tratamiento con LPS de células coriodeciduals induce un rápido incremento en la producción de  $TNF\alpha$  (4h), citocina que regula la síntesis y secreción de una segunda oleada de factores, entre los que se encuentran la  $IL-1\beta$  (12h),  $PGE_2$  (24h) e  $IL-10$  (8h); la inmunoneutralización de  $IL-10$  se tradujo en el incremento significativo de la secreción de  $TNF-\alpha$  e  $IL-1\beta$ , pero no el de  $PGE_2$ , lo que sienta las bases para caracterizar la existencia de ejes de autorregulación positivos y negativos que modulan la respuesta inflamatoria a agentes infecciosos en este tejido (Barsig y cols., 1995; Sato y cols., 2003) (Figura 6).

#### **4.2.5. MEMBRANAS FETALES**

El análisis de la respuesta de las MCH ante diversos estímulos infecciosos ha sido abordado de diversas formas que van desde el empleo de preparaciones celulares, hasta el cultivo de MCH íntegras en la que no se han preservado las relaciones espaciales y estructurales de las mismas, lo que ha resultado en interpretaciones divergentes y limitadas.

##### **4.2.5.1 PREPARACIONES CELULARES**

Células de corion en cultivo estimuladas con  $IL-1\beta$ ,  $TNF\alpha$  y LPS han mostrado la capacidad de incrementar la biosíntesis de  $IL-6$  e  $IL-8$  (Dudley y cols., 1992b, 1993; 1996a); mientras que el tratamiento con lípido A y ácido lipoteicoico incrementa

significativamente la secreción de IL-10, MIP-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y PGE<sub>2</sub> (Dudley y cols., 1997a; 1997b).

Células de epitelio amniótico en cultivo, procedentes de MCH de cesárea a término, producen IL-8 y PGE<sub>2</sub> en respuesta a concentraciones fisiopatogénicas de IL-1 $\beta$  (10ng/mL) y TNF- $\alpha$  (100ng/mL) (Trautman y cols., 1992; Casey y cols., 1996). La estimulación con *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Bacillus fragilis*, *Micoplasma hominis* y *Streptococcus aureus* se tradujo en la síntesis de IL-6 e IL-8 pero no de otras citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , y TNF- $\alpha$  (Reisenberger y cols., 1998) (Figura 6).

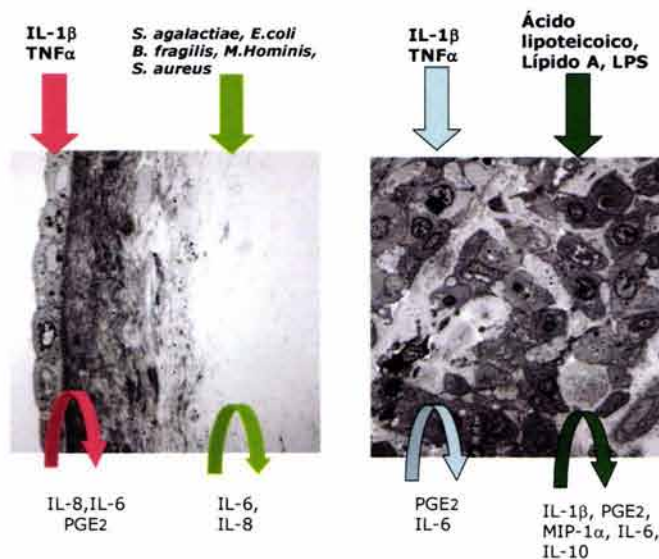


Figura 6. Secreción in vitro de factores proinflamatorios y uterotónicos por células amnióticas y coriodeciduals. Las flechas superiores muestran los diferentes tipos de estímulos y las inferiores los factores sintetizados como respuesta.



#### **4.2.5.2 EXPLANTES**

Estudios con MCH completas en cultivo, tratadas con bacterias o productos bacterianos como LPS, responden incrementando la secreción de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 (Schoonmarker y cols., 1989; Reisenberger y cols., 1998; Tashima y cols., 1999); sin embargo, y dado que este tipo de modelos no permiten la estimulación selectiva, ni la separación cuantitativa y cualitativa de la contribución de las diferentes regiones y poblaciones celulares que constituyen a las MCH, la interpretación de los resultados tiene varias limitaciones.

Actualmente, se ha comenzado a dilucidar una respuesta diferencial en el corioamnios después de la exposición a diversos estímulos inmunológicos e infecciosos; por ejemplo, Menon y colaboradores (1995) demostraron que la exposición generalizada a LPS induce el incremento de IL-1 $\beta$  tanto en amnios como en coriodecidual, sin embargo, el ARNm de esta citocina sólo pudo ser detectado en la cara materna de las membranas. A diferencia de lo observado con IL-1 $\beta$ , tanto el mensajero como la proteína de IL-6 fueron localizados en ambas regiones después del tratamiento con la endotoxina (Menon y cols., 1995).

En condiciones basales, tanto corion como amnios tienen la capacidad de sintetizar TNF $\alpha$  a nivel de su ARNm, sin embargo, la forma proteica sólo pudo ser inmunolocalizada en el amnios; este patrón de expresión cambió después del tratamiento con LPS, el cual permitió comprobar que tanto TNF $\alpha$  como IL-6 son secretadas en ambas regiones de las MCH (Fortunato y cols., 1994).

### 4.3 LIPOPOLISACÁRIDO

El LPS es el principal componente de la pared celular de diversas bacterias gram negativas, el cual ha sido ampliamente utilizado para reproducir los efectos tóxicos de una infección producida por este tipo de bacterias.

En monocitos y macrófagos son los Toll-Like receptors (TLRs) los encargados de inducir el proceso de activación, la cual para ser efectiva, requiere de la interacción inicial del LPS con su proteína de unión LBP (lipopolysaccharide binding protein), este complejo interacciona con el receptor glicoproteico de superficie CD14 asociado a TLR4 (Modliny cols., 1999); este evento se traduce en la activación y translocación al núcleo del factor de transcripción NF $\kappa$ B, el cual regula la expresión de moduladores inflamatorios como IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL-6 y diversas moléculas coestimuladoras que activan células B y T las cuales inician una respuesta inmune adaptativa.

### 4.4. *Streptococcus agalactiae*

Esta bacteria gram positiva es aislada del 20% del total de las mujeres diagnosticadas con corioamnionitis (Bogges y cols., 1996; Moyo y cols., 1996). El principal componente antigénico de estas bacterias es el ácido lipoteicoico (Goldschmidt y Panos, 1984; Herbert y cols., 2004), el cual modula la respuesta inmune innata mediante la activación de monocitos y macrófagos a través del receptor glicoproteico de superficie CD36 que ha sido identificado como una proteína que modula la vías de transducción inducidas por TLR2 .

La secreción de diversos factores proinflamatorios por los macrófagos y/o monocitos activados por esta vía es controlada también por NF $\kappa$ B (Beutler, 2004).

#### **4.5 RELACIÓN ENTRE INFLAMACIÓN Y LA EXPRESIÓN DE MMP's/TIMP's EN LA RPM**

Existen elementos que permiten afirmar que las citocinas son el eje rector de una primera oleada de marcadores funcionales que se sintetizan en respuesta a un estímulo infeccioso, éstas regulan y coordinan la expresión y actividad de factores efectores como las MMP's que alteran la arquitectura y estructura de las MCH (Katsura y cols., 1989; So y cols., 1992; Cheong-Rae y cols., 2000).

La adición de LPS a MCH en cultivo, induce el incremento significativo a nivel de la transcripción y síntesis de las MMP-2 y MMP-9, tanto en la cara fetal como materna; estos eventos se presentan en forma simultánea con la disminución en la síntesis del inhibidor TIMP2 que regula la actividad de ambas enzimas; lo cual se traduce en la alteración del equilibrio estequiométrico que existe entre las gelatinasas y sus inhibidores, el cual cambia de 1:1 a 3.2:1 (Fortunato y cols., 1997; 2000 a).

Datos experimentales han indicado que la infección intramniótica está asociada con el incremento en la concentración de MMP-9 en el líquido amniótico (Locksmith y cols., 1999), el cual correlaciona con el aumento en la concentración de IL-6 en el mismo compartimento (Harirah y cols., 2002).

La MMP-8 (Angus y cols., 2001) y la MMP-1 (Maymon y cols., 2000) son enzimas cuya síntesis y secreción también se incrementa en el líquido amniótico que ha desarrollado un proceso infeccioso.

Ha sido posible observar experimentalmente, que diversos estímulos infecciosos pueden generar el incremento en líquido amniótico de la concentración de enzimas como el de las estromelisin 1 y 3 (Fortunato y cols., 1999b) y de catepsina S (Watari y cols., 2000); perfil que también se ha reconocido en pacientes con diagnóstico de

RPM complicada con infección intramniótica (Fortunato y cols., 1999b; Locksmith y cols., 1999).

Las proteasas de origen bacteriano, producidas por distintos microorganismos causantes de infecciones cervicovaginales, son capaces de degradar la MEC, provocando reducción en la fuerza y elasticidad de las membranas (McGregor y cols., 1986; Schoonmarker y cols., 1989; Katsura y cols., 1989; 1989; Draper y cols., 1995).

En forma general, el incremento en la actividad de distintas MMP's que pueden actuar directamente sobre la MEC y la membrana basal de las MCH, junto con el efecto uterotónico inducido por las PG's, pueden explicar la disminución de la fuerza tensil de las mismas.

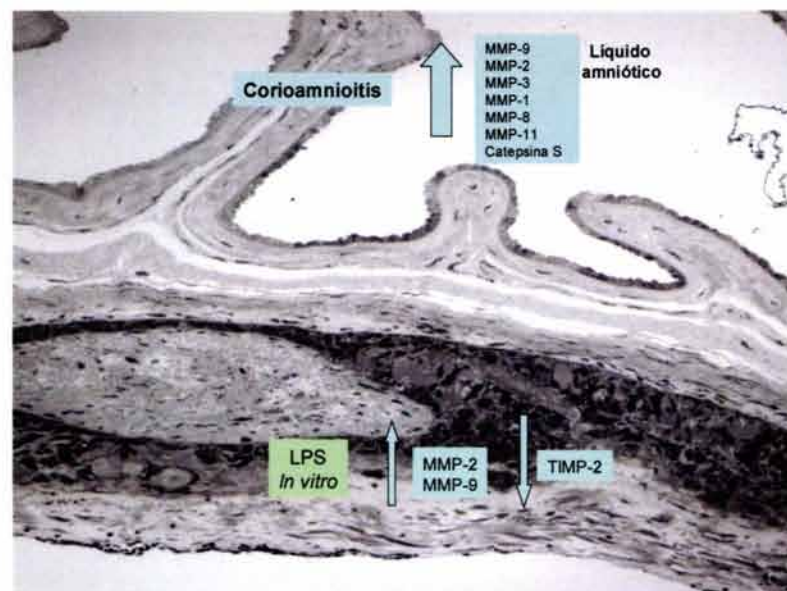


Figura 7. Metaloproteasas de matriz extracelular presentes en los diferentes compartimentos (amnios y coriodecidua) durante un evento patológico como corioamnionitis y/o después de la estimulación *in vitro* con endotoxina bacteriana.

## 5. JUSTIFICACION

Durante el embarazo, la colonización ascendente de microorganismos patógenos desde la región cervicovaginal, es una posible explicación para la presencia y desarrollo de una infección coriodecidual, la cual clínicamente puede ser una condición crónica y casi siempre controlable sin complicaciones futuras graves; sin embargo, cuando la infección se establece y mantiene a nivel intramniótico el proceso normal del embarazo se ve severamente comprometido, debido a que la red de señalizaciones que coordina la defensa del hospedero ante la infección, también puede producir un daño selectivo e irreversible en las MCH.

Diversos trabajos encaminados a caracterizar la respuesta del corioamnios a estímulos infecciosos se han enfocado en células aisladas o membranas enteras en las cuales no se ha preservado su integridad anatómica y estructural. Por lo tanto es importante caracterizar el tipo y la magnitud de la respuesta de las MCH, cuya función las convierte en la última barrera entre el agente patógeno y el producto.

Esto hace indispensable diseñar y validar un modelo experimental que permita esclarecer los mecanismos específicos que operan durante la interacción entre los microorganismos causales de infección y/o colonización del tracto genital femenino durante el embarazo y las diferentes poblaciones celulares de la coriodecidual y el amnios y que explicarían el desarrollo de la RPM.

## **6. HIPÓTESIS DE TRABAJO**

La secreción en membranas corioamnióticas humanas de moduladores inmunológicos proinflamatorios como IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$ , así como de factores reguladores de la degradación de MEC como proMMP-2, pro MMP-9, TIMP1 y TIMP2, es polar y diferencial dependiendo de la región de contacto primario y de la naturaleza del estímulo infeccioso.

## 7. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta funcional de las membranas corioamnióticas humanas íntegras ante el estímulo con Lipopolisacarido (LPS) y *Streptococcus agalactiae* mediante el desarrollo de un modelo experimental que permita estudiar la respuesta del amnios y de la coriodecidua en forma individual y simultánea.

## 8. OBJETIVOS PARTICULARES

- 7.1 Diseñar, estandarizar y validar un sistema de cultivo de membranas corioamnióticas humanas que permita mantenerlas íntegras, viables y funcionales de modo que el amnios y la coriodecidual puedan ser estimulados de manera simultánea, independiente y selectiva.
- 7.2 Medir la concentración *in vitro* de las citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  en la región amniótica y coriodecidual después del estímulo selectivo con LPS.
- 7.3 Medir la concentración y actividad *in vitro* de las enzimas MMP-2 y MMP-9 en el amnios y la coriodecidual después del estímulo selectivo con LPS.
- 7.4 Medir la concentración *in vitro* de los inhibidores tisulares TIMP1 y TIMP2 en el amnios y la coriodecidual después del estímulo selectivo con LPS.
- 7.5 Medir la concentración *in vitro* de las citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  en la región amniótica y coriodecidual después del estímulo selectivo con *Streptococcus agalactiae*.



7.6 Medir la concentración y actividad *in vitro* de las enzimas MMP-2 y MMP-9 en el amnios y la coriodecidua después del estímulo selectivo con *Streptococcus agalactiae*.

7.7 Medir la concentración *in vitro* de los inhibidores tisulares TIMP1 y TIMP2 en el amnios y la coriodecidua después del estímulo selectivo con *Streptococcus agalactiae*.

## **9. MATERIALES**

### **9.1 MATERIAL BIOLÓGICO**

Se utilizaron membranas corioamnióticas de mujeres entre 20 y 40 años de edad que fueron pacientes regulares del Instituto Nacional de Perinatología (INPer); después de haberlas enterado del objetivo del estudio y de firmar una carta de consentimiento informado, aceptaron donar las membranas. Todas las mujeres fueron intervenidas por cesárea electiva y los periodos de gestación oscilaron entre 37 a 40 semanas y no presentaron ninguna señal clínica de trabajo de parto activo ni tenían antecedentes de infección vaginal y/o intrauterina.

Este proyecto de investigación fue aprobado por el Comité Interno de Investigación y Ética del INPer (Código 212250-06101).

### **9.2 ANTICUERPOS Y PROTEÍNAS RECOMBINANTES.**

Los anticuerpos monoclonales y policlonales biotinilados anti TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , así como las proteínas recombinantes correspondientes, fueron adquiridos en R&D Systems. Todos los reactivos y soluciones usados en los procesos experimentales fueron grado analítico.

## **10. MÉTODOS**

### **10.1 PROCESOS EXPERIMENTALES**

#### **10.1.1 COLECTA DE MUESTRAS Y CONTROL MICROBIOLÓGICO.**

En la unidad tocoquirúrgica y momentos después del nacimiento, las membranas fueron separadas de la placenta, colocadas en medio Dulbecco Modified Eagle Medium estéril (DMEM, Gibco, BRL, Bethesda, E.U.A.) y transportadas al laboratorio.

Al momento de la toma la muestra se hizo un frotis en las diferentes regiones de la placenta y las membranas para hacer un análisis bacteriológico cuyo espectro abarcó tanto anaerobios como aerobios asociados a infecciones cervicovaginales, incluidos *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* y *Gardnerella vaginalis*.

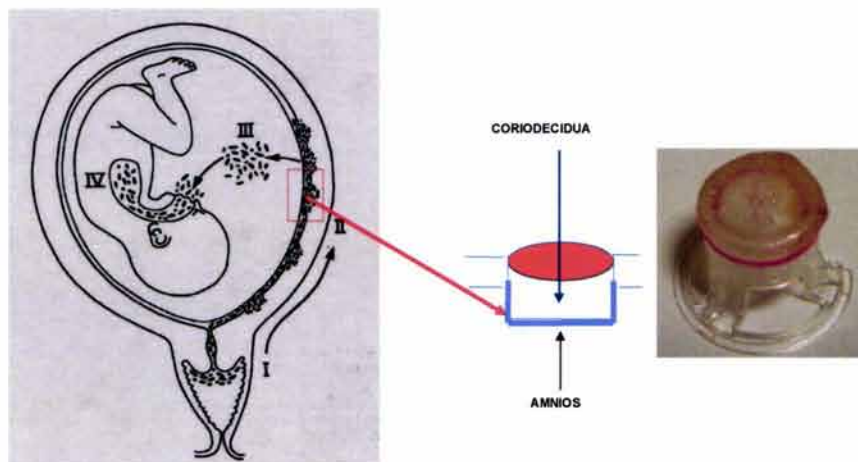
Las membranas cuya prueba bacteriológica resultó positiva fueron desechadas y sólo se utilizaron aquellas membranas con esterilidad comprobada.

#### **10.1.2 CULTIVO DE MEMBRANAS CORIOAMNIÓTICAS ÍNTEGRAS (MODELO EXPERIMENTAL)**

En condiciones de esterilidad, las membranas se lavaron con solución Hanks 1X para remover los coágulos adheridos, posteriormente, se cortaron manualmente en discos de 18 mm de diámetro que se colocaron sobre una pieza de Transwell® (Costar, Acton, E.U.A.) de 12 mm de diámetro, en donde fueron sujetadas con una liga de silicón estéril; con este sistema se formaron dos cámaras independientes en donde la coriodecidua quedó hacia la cara interna y el amnios hacia la cara externa,

lo que permitió estimular y analizar en forma selectiva la respuesta en ambos lados de la membrana (Figura 8).

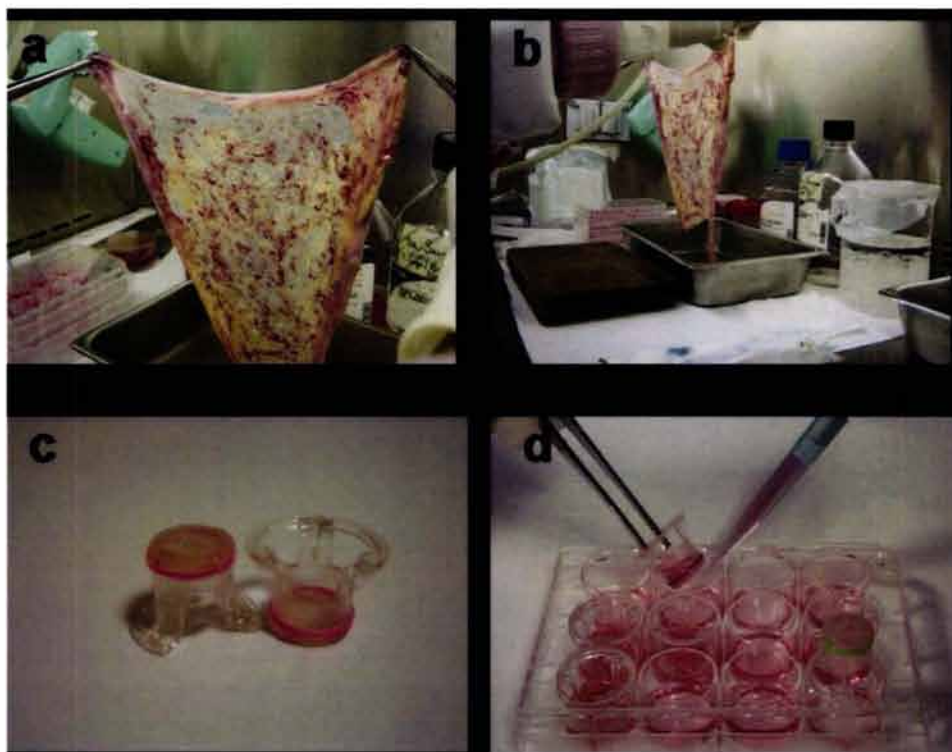
En cada una de las dos cámaras se puso 1 mL de medio DMEM suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), piruvato de sodio 1mM, 100 U/mL de penicilina, 100ug/mL de estreptomicina y 0.25ug/mL de anfotericina B (Gibco, BRL, Bethesda, U.S.A).



*Figura 8. Modelo experimental de cultivo de membranas corioamnióticas humanas. El sistema mantiene dos compartimentos independientes, limitados uno por la coriodecidua y otro por el amnios.*

Los explantes se incubaron con medio suplementado con SFB (el cual se sustituyó cada 24 h durante 2 días), a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

Al tercer día de cultivo y momentos antes de la estimulación, los explantes fueron lavados con solución salina para eliminar los restos de SFB e inmediatamente después, fueron cultivados en DMEM suplementado con hidrolizado de lactoalbumina (HLA) al 2%, piruvato de sodio 1mM, 100 U/mL de penicilina, 100ug/mL de estreptomicina y 0.25ug/mL de anfotericina B.



*Figura 9. Condiciones de manejo y cultivo de las membranas corioamnióticas humanas; a,b. membrana obtenida en el quirófano y en proceso de lavado; c. membrana montada en el Transwell; d. sistema de cultivo en caja de 12 pozos.*

### **10.1.3 VALIDACIÓN DEL MODELO**

Con el objetivo de validar el sistema de cultivo de las MCH en el Transwell, se realizaron diferentes pruebas de viabilidad e integridad.

#### **10.1.3.1 VIABILIDAD DE LOS EXPLANTES**

La viabilidad de los explantes se determinó por una prueba colorimétrica basada en la oxidación de la sal amarilla de tetrazolio XTT (sodio 3'-[1-(fenilamina-carbonil) 3,4 tetrazolium ]-bis (4-metoxi-6-nitro) benzeno hidrato ácido sulfónico) a una sal de formazán de color naranja, mediante una reacción catalizada por una deshidrogenasa mitocondrial; esta conversión solo puede ser hecha por células activas metabólicamente (Boehringer, Manheim Germany)(Gerlier y cols., 1986). 200 µL de una mezcla del reactivo (atrapador de electrones – sal XTT 1:50) fueron agregados al medio de cultivo por un periodo de 1 h, el cambio de color fue cuantificado espectrofotométricamente a 475 nm; las pruebas se hicieron en ambas caras de las membranas (coriodescudia y amnios) montadas en el Transwell con periodos 0, 24, 48, 72 y 96 h de cultivo.

#### **10.1.3.2 INTEGRIDAD DE LOS EXPLANTES**

Para medir la integridad física y permeabilidad de las membranas en cultivo se midieron los siguientes parámetros:

#### 10.1.3.2.1 RESISTENCIA ELÉCTRICA TRANSMEMBRANAL (RET)

La RET se midió con la ayuda de una cámara de Ussing (UNAM). Utilizando como soporte un filtro de nitrocelulosa de 13 mm de diámetro, el explante se montó entre dos cámaras de Lucita<sup>®</sup> (llenas de medio DMEM) de la cámara de Ussing; una vez montada la membrana se le aplicó un pulso eléctrico de 20  $\mu$ Amp en la cara coriódica y la deflexión del voltaje fue medida en la vecindad del explante (cara amniótica) (Figura 10). La resistencia eléctrica fue medida cada 24 h a lo largo de 4 días de cultivo, los cálculos se hicieron con base a la ley de Ohm, la contribución del filtro y del medio fueron restadas (López-Vancell y cols., 2000).



*Figura 10. Membranas montadas en la cámara de Ussing.*

La formula empleada para el cálculo de los valores de RET fue:

$$R = \frac{\Delta V (1 \times 10^{-3} \text{ volts}) \times \text{área} (0.2827 \text{ cm}^2)}{20 \times 10^{-6} \text{ amp}}$$

$$R = \frac{\Delta V (14.135) \Omega \text{ cm}^2}{20 \times 10^{-6} \text{ amp}}$$

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

Donde:

R= Resistencia

$\Delta V$ = Voltaje final ( $V_f$ ) – Voltaje inicial ( $V_i$ )

14.135= Constante resultado de la relación entre el área sometida a la corriente y el amperaje.

#### 10.1.3.2.2. DIFUSIÓN TRANSMEMBRANAL DE $^3\text{H}$ -PROLINA

Con el objetivo de demostrar la existencia de continuidad en la estructura de los epitelios de ambas caras de la MCH en cultivo, se implementaron varios experimentos en los cuales, membranas montadas en el Transwell con 48 h de cultivo previo, se expusieron y coincubaron durante diferentes periodos de tiempo (1,2,5,10 minutos y 1,2,4, 24 h) con lo equivalente a 37,000 cuentas por minuto (cpm) de  $^3\text{H}$ -prolina (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido) con una actividad específica de 15–40 Ci/mmol (1mCi/mL).

A cada una de las regiones de la membrana, le fue aplicado en forma independiente un sólo pulso inicial de marca y el paso transmembranal se midió cuantificando la cantidad de radiactividad ( $^3\text{H}$ ) que difundió al lado opuesto de la



membrana. La cuantificación se hizo utilizando un espectrómetro de centelleo líquido Packard Tri-Carb (Packard Downers Grove, IL; E.U.A.).

### **10.1.3.3. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LOS EXPLANTES**

Para analizar estructuralmente a las membranas a lo largo de 96 h de cultivo, se fijaron e incluyeron fragmentos de MCH con tiempos de cultivo de 0, 24, 48, 72 y 96 h. Debido a que se analizarían por microscopía de luz y electrónica, los cortes se incluyeron en EPON (Pelco Internacional, CA, E.U.A.). Fragmentos de aproximadamente 0.2 cm<sup>2</sup> se fijaron en buffer de Karnovsky pH 7.3 (0.1M de cacodilato de sodio y, glutaraldehído al 2.5%) por un periodo mínimo de 2 h a temperatura ambiente, posteriormente las muestras se mantuvieron en buffer de cacodilato de sodio 0.1M a 4°C hasta su uso.

Las membranas se prefijaron en tetraóxido de osmio al 1% por 1 h a temperatura ambiente, posteriormente se lavaron 3 veces con H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, y se deshidrataron mediante los siguientes pasos: alcohol al 80%, 90%, 95% por 10 minutos en cada uno, seguido de 20 minutos en alcohol absoluto y finalmente óxido de propileno por 20 minutos más.

El proceso de impregnación se hizo con una solución de EPON:Óxido de propileno (1:1) por 1 h, seguido de otra solución con los mismos componentes pero con proporción 2:1 por 2 h, finalizando en EPON puro por 24 h a 60°C. Una vez terminada la impregnación, la muestra se incluyó en EPON puro, el cual fue solidificado mediante una mezcla catalizadora a 60°C por 24h.

De estas muestras se hicieron cortes semifinos de aproximadamente 1µm para análisis en microscopia de luz y cortes finos de 60-80nm para microscopía electrónica.

#### **10.1.4 CULTIVO INDEPENDIENTE DE CORIODECIDUA Y AMNIOS.**

En forma paralela al cultivo en Transwell se hizo otro, en el que el amnios y la coriodecidua fueron separados manualmente y se cultivaron en forma independiente. Explantes de 12 mm de diámetro de cada una de las regiones fueron mantenidos en las mismas condiciones de cultivo (medios de cultivo, periodos y tratamientos) que las membranas íntegras.

#### **10.1.5 ESTIMULACIÓN DE LAS MEMBRANAS EN CULTIVO**

Con el fin de estabilizar el tejido después de la manipulación y antes de la estimulación, los explantes se preincubaron por 48 h con DMEM-SFB, al tercer día, el medio se cambió a DMEM-LAH y se procedió a la estimulación.

##### **10.1.5.1 MODALIDADES DE ESTIMULACIÓN**

Cada experimento montado en el sistema de Transwell incluyo las siguientes modalidades de estimulación por triplicado: Basales: membranas control en las que coriodecidua y amnios fueron tratadas unicamente con 100uL de solución salina (vehículo del LPS y del *Streptococcus agalactiae*); Ambos: la estimulación se realizó simultáneamente en ambos compartimentos; Coriodecidua: el estímulo fue añadido unicamente a la cara coriodecidual; Amnios: el estímulo fue añadido unicamente al compartimento en contacto con el amnios.

En el sistema en que coriodecidua y amnios fueron separados e incubados independientemente, las estimulaciones se hicieron con las mismas concentraciones y solo se tuvieron estimulados y controles para cada una de las regiones.

Los medios de ambas cámaras se colectaron y guardaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso; la concentración de proteínas en todas las muestras fue determinada con el metodo de Bradford (Bradford, 1976)

#### **10.1.5.2 ESTIMULACIÓN CON LIPOPOLISACARIDO**

Los explantes fueron estimulados con 500 ng /mL de LPS de *Escherichia coli* 055:B5 (Sigma, St Louis, E.U.A.) por un período de 24 h en las modalidades de estimulación descritas con anterioridad, tanto en las membranas intactas como en las que la coriodecidua y el amnios se cultivaron en forma independiente.

Los medios de cultivo de ambos compartimentos se colectaron despues de 24 h de incubación y se guardáron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta ser utilizados.

#### **10.1.5.3 ESTIMULACIÓN CON *Streptococcus agalactiae*.**

Transcurridas las 48 h de preincubación con DMEM-SFB, las membranas se infectaron con  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias (UFC)/mL de *Streptococcus agalactiae*, serotipo III aislado de exudado vaginal (código INPer 9710860) en las modalidades de infección descritas con anterioridad, tanto en las membranas intactas como en los cultivos independientes.

Para la infección fueron utilizados cultivos bacterianos de 24 h de crecimiento en placas de agar-sangre de camero al 5%.

#### **10.1.5.4. ANALISIS DE INTEGRIDAD POST-TRATAMIENTO.**

Una vez concluidos los tratamientos, las membranas se desmontaron de los Transwells, la mitad de las muestras se incluyó en parafina y se procesaron por técnicas estándar para ser analizadas mediante microscopía de luz; el resto de las muestras se utilizó para medir la RET.

#### **10.1.6 ELISA DE IL-1 $\beta$**

La concentración de IL-1 $\beta$  se cuantificó mediante inmunoanálisis de ELISA tipo sándwich, en microplacas de 96 pozos (Nunc Maxisorp, Dinamarca) que fueron recubiertas con 250 ng/pozo de anticuerpo monoclonal anti-IL-1 $\beta$  humana (R&D Systems, Minneapolis, E.U.A.) mediante una incubación a 4°C por 18 h; la fracción no unida de anticuerpo se removió mediante lavados con buffer de fosfatos pH 7.4 con 0.05% de Tween 20 (PBS-Tween); posteriormente, la microplaca se bloqueó con 300  $\mu$ L por pozo de PBS con BSA al 1%, sacarosa al 5% y NaN<sub>3</sub> por al 1.15% (PBS-BSA) durante 3 h a temperatura ambiente.

Después de lavadas las placas con PBS-Tween se hizo una curva estándar con IL-1 $\beta$  recombinante humana (R&D Systems, Minneapolis, E..U.A.) cuya sensibilidad fue de 15.6 pg/mL en un rango lineal de 20.0 a 1000 pg /mL. Un volumen de 100  $\mu$ l de cada estándar o muestra se incubó toda la noche a 4°C, inmediatamente después, las microplacas se incubaron con 25 ng/pozo de

anticuerpo policlonal biotinilado anti IL-1 $\beta$ (R&D Systems, Minneapolis, E.U.A.) por 2 h a temperatura ambiente.

Después de lavar tres veces más la microplaca, ésta se incubó con 9.0 ng/pozo de conjugado streptavidina fosfatasa alcalina (Gibco BRL, Bethesda E.U.A.), posteriormente y después de 3 lavados adicionales, cada pozo se incubó 100 $\mu$ g de p-nitrofenilfosfato como sustrato (SIGMA, St Louis, E.U.A.), el color resultado de la reacción se leyó a 450 nm en un lector de microplacas (Dynatech MR 500).

#### **10.1. 7 ELISA DE TNF $\alpha$**

La concentración de TNF $\alpha$  se calculó mediante inmunoanálisis de ELISA tipo sándwich en microplacas de 96 pozos, las cuales fueron recubiertas con 500 ng/pozo de anticuerpo monoclonal anti TNF $\alpha$  humana (R&D Systems, Minneapolis, E.U.A.) mediante una incubación a 4°C, toda la noche; la fracción no unida se removió mediante lavados con buffer de fosfatos pH 7.4 con 0.05% de PBS-Tween. La microplaca se bloqueó con 300  $\mu$ l por pozo del buffer PBS-BSA.

Se hizo una curva estándar con TNF $\alpha$  recombinante humana (R&D Systems, Minneapolis, E.U.A.) cuya sensibilidad fue de 3.91 pg/mL en un rango lineal de 5.0 a 500 pg /mL; 100  $\mu$ l de volumen de cada estándar o muestra se incubó toda la noche a 4°C, posteriormente y después de lavar la microplacas se incubaron con 25 ng/pozo de anticuerpo policlonal biotinilado anti-TNF $\alpha$  (R&D Systems, Minneapolis, E.U.A.), por un periodo mínimo de 3 h a temperatura ambiente. Después de tres lavados adicionales, la placa se incubó con 9.0 ng/pozo de conjugado streptavidina

fosfatasa alcalina (Gibco BRL, Bethesda,U.S.A.) cuyo sustrato (p-nitrofenilfosfato) (Sigma, St Louis, E.U.A.) fue incorporado a la reacción en una concentración de 100ug/pozo. El color obtenido producto de la reacción se leyó a 450 nm en un lector de microplacas (Dynatech MR 500).

### **10.1.8 ZIMOGRAFIA**

La determinación de la presencia y actividad de la forma proenzimática y activa de la MMP-2 y MMP-9 se hizo mediante zimogramas. Geles de acrilamida al 8% se copolimerizaron con gelatina porcina a concentración de 1 mg/mL, la electroforesis se corrió a 10 mA por gel en condiciones no desnaturizantes; se usaron 0.5 µg de proteína por muestra en cada experimento. En cada gel se incluyó un estándar de actividad para MMP-2 y MMP-9 obtenido de la línea celular U-937 de promielocitos (ATCC, Rockville, MD.U.S.A). Los geles se lavaron con una solución al 2.5% de tritón X-100 por 30 minutos y se incubaron durante 18 h a 37°C en buffer de actividad pH 7.4 (50 mM Tris base, 0.15 M NaCl, 20mM CaCl<sub>2</sub> y 0.02% de NaN<sub>3</sub>). Los geles se tiñeron con azul de Coomasie R-250 (Boehringer Mannheim, IN, E.U.A.).

Para cuantificar la actividad gelatinolítica de cada una de las muestras, a cada gel se le practicó un análisis de densitometría con el software NIH-Image v1.6 (NIH, Bethesda, E.U.A.), la actividad lítica se estimó como el área de cada banda.

### **10.1.9 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA MMP-2 Y MMP-9 ACTIVA**

Para la cuantificación de la forma activa de las MMP-2 y MMP-9 se hizo utilizando un estuche comercial específico (Amersham Biosciences, Buckinghamshire,

Reino Unido). Esta prueba está diseñada para la cuantificación de la forma activa de cada enzima. Adicionalmente, se pudo cuantificar la cantidad total de enzima en el medio mediante la activación artificial de la proMMP-2 o pro MMP-9 por un evento autocatalítico inducido por el acetato p-aminofenilmercurico (APMA); la proporción de enzima latente en cada muestra fue el resultado de restar la cantidad de enzima activa de la total.

La curva estándar para MMP-2 se hizo con un rango de 0.75-12 ng/mL con un límite de sensibilidad de 0.5 ng/mL; la de MMP-9 fue de 0.5-16 ng/mL con sensibilidad de 0.5 ng/mL. La reacción colorimétrica se leyó a 410 nm.

#### **10.1.10 ELISA DE TIMP1 Y TIMP2**

Se utilizaron estuches comerciales (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido) para la cuantificación de los dos inhibidores tisulares. El principio de estas pruebas está basado en una ELISA tipo sándwich en el que un anticuerpo secundario Fab' marcado con peroxidasa (Fab'-HRP) se mezcla con las diferentes muestras y estándares, esta mezcla es adicionada a una microplaca de 96 pozos precubierta con un anticuerpo de captura anti-TIMP1 o anti-TIMP2; el conjugado de TIMP1- ó TIMP2-Fab'-HRP libre se lavó y retiró mediante lavados consecutivos. La cantidad de peroxidasa en cada pozo se determinó por la adición de 3-3',5-5'-tetrametilbenzidina como sustrato, lo cual generó una reacción cuyo color fue leído a 450 nm.

Para TIMP1 se utilizó una curva estándar con un rango de 3.13-50 ng/mL y con un límite de sensibilidad de 1.25 ng/mL, mientras que para TIMP2 fue de 28-18 ng/mL con sensibilidad de 3 ng/mL

### **10.1.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

La comparación entre los diferentes grupos se hizo mediante una prueba no paramétrica de ANOVA de Kruskal-Wallis en las que una  $P \leq 0.05$  se consideró. Cada ensayo fue hecho por triplicado. La expresión gráfica y tabular de los resultados muestra los promedios  $\pm$  su desviación estándar.



## 11. RESULTADOS

### 11.1 VALIDACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL

Con el objetivo de garantizar que las MCH no experimentaron cambios significativos en la viabilidad e integridad celular y tisular derivados de la manipulación y el cultivo, que pudieran alterar cuantitativa o cualitativamente la respuesta a los diferentes estímulos, se realizaron distintas pruebas de validación del modelo experimental.

El modelo de cultivo permitió analizar en forma independiente la viabilidad celular en los dos compartimentos; la prueba demostró, que en comparación con el tiempo 0, las dos principales poblaciones celulares que conforman a las MCH (coriodecidua y amnios) montadas en el Transwell, no experimentaron disminución estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) en la viabilidad durante las 96 h de cultivo (Figura 11).

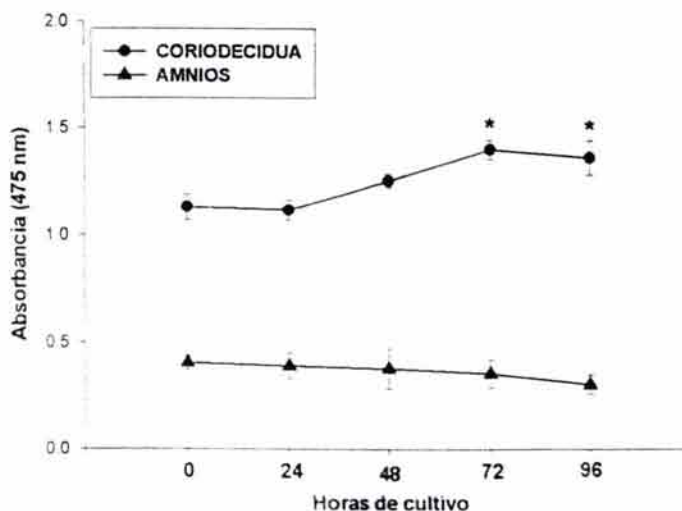


Figura 11. Viabilidad celular de las membranas corioamnióticas humanas durante las 96h de cultivo (n=10; \*P≤0.05)

La comprobación de la existencia de un sistema de “dos cámaras” en el cual el corioamnios actúa como una barrera selectiva real, sin ningún tipo de interrupción de la continuidad e integridad celular y tisular se evaluó mediante la RET, la cual demostró que las MCH en el Transwell permanecieron sin cambios significativos ( $P<0.05$ ) en su integridad, bajo las condiciones de cultivo hasta las 96 h (Figura 12).

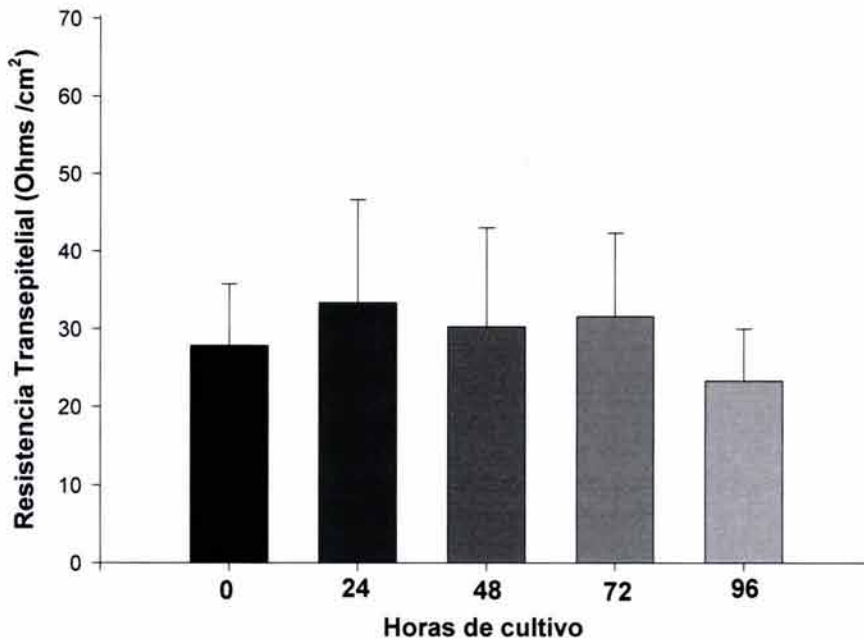
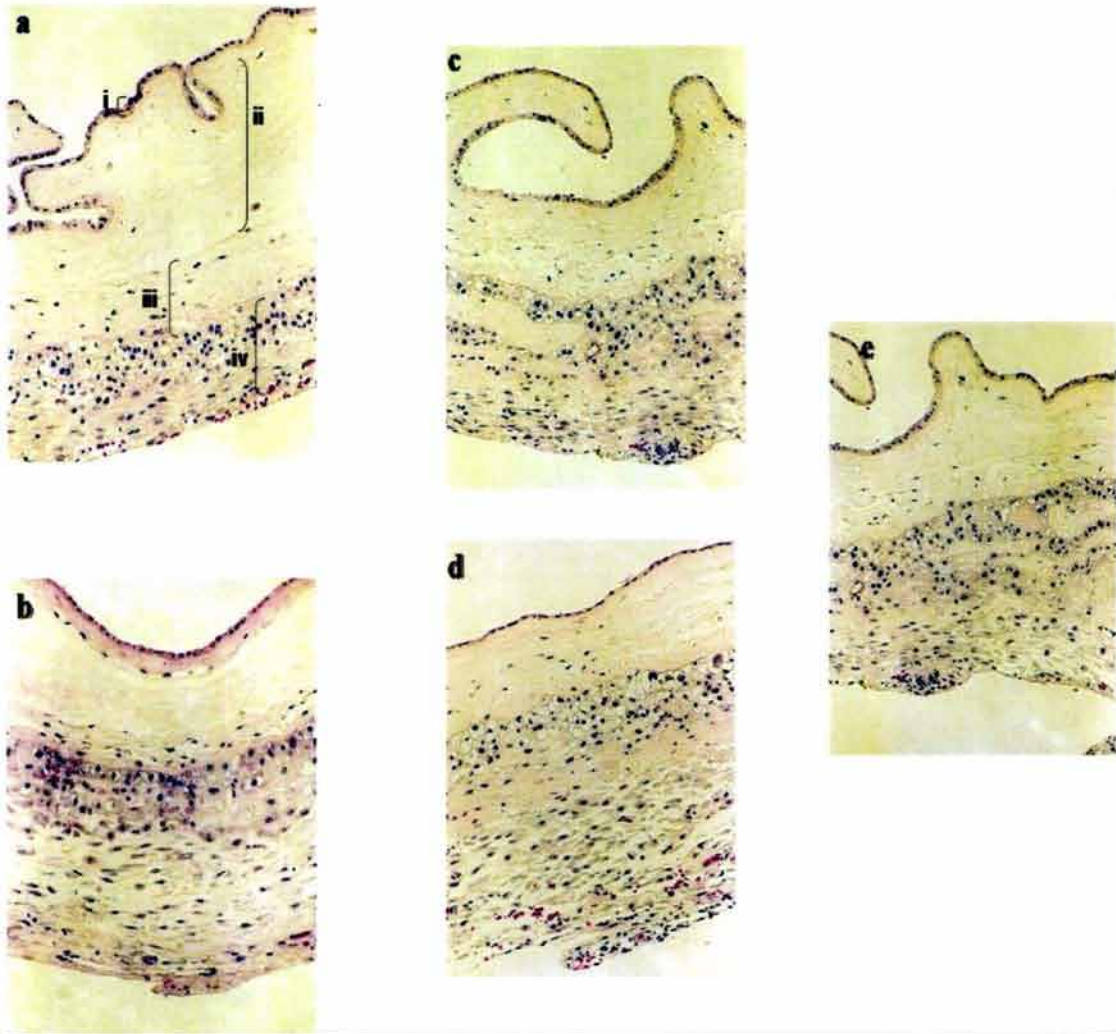


Figura 12. Prueba de RET hecha en las membranas corioamnióticas humanas a lo largo de 96 h de cultivo (n=15; \*P≤0.05).

Las mismas membranas que fueron utilizadas para la prueba de RET fueron procesadas mediante técnicas histológicas estándar, mismas que permitieron comprobar que las diferentes regiones (coriodecidua y amnios) mantuvieron una arquitectura estructural típica de un corioamnios íntegro (Figura 13).



*Figura 13. Integridad anatómica de las membranas corioamnióticas humanas. Análisis por microscopía de luz de cortes histológicos de explantes incluidos en parafina con 0 (a), 24 (b), 48 (c), 72 (d) y 96 h(e) de cultivo. Tinción con H&E. i. Epitelio amniótico; ii. Capa compacta del amnios ; iii. Capa esponjosa del amnios; iv. Región de células trofoblásticas y deciduales.*

La prueba en la que se midió la difusión transmembranal de la prolina marcada a través la MCH en el Transwell, demostró que ésta fue de tipo pasivo, característico de una membrana sin alteraciones estructurales, que eventualmente explicarían el paso descontrolado y/o el equilibrio de la marca en ambos compartimentos en un corto tiempo. La MCH en el Transwell actuó como una

barrera íntegra que 24 horas después del pulso inicial, permitió la difusión solamente de un tercio del total de la marca radiactiva ( $P < 0.05$ ); este comportamiento fue similar independientemente de la cara de la membrana en la que se puso el pulso inicial (Figura 14).

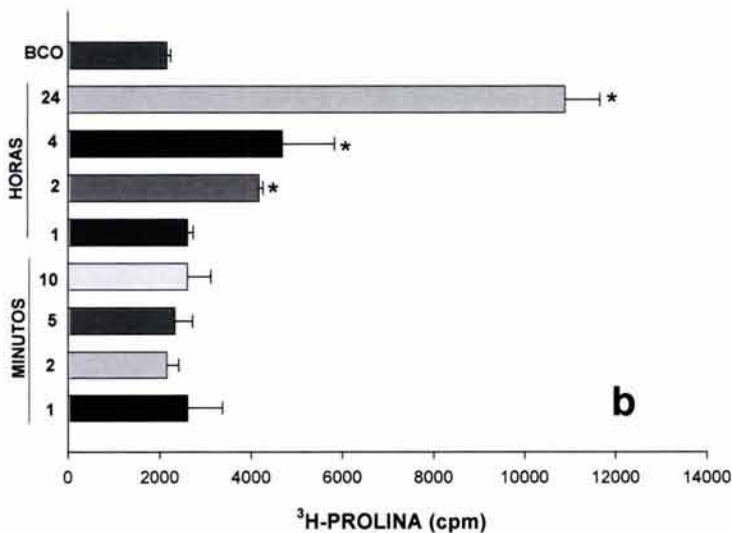
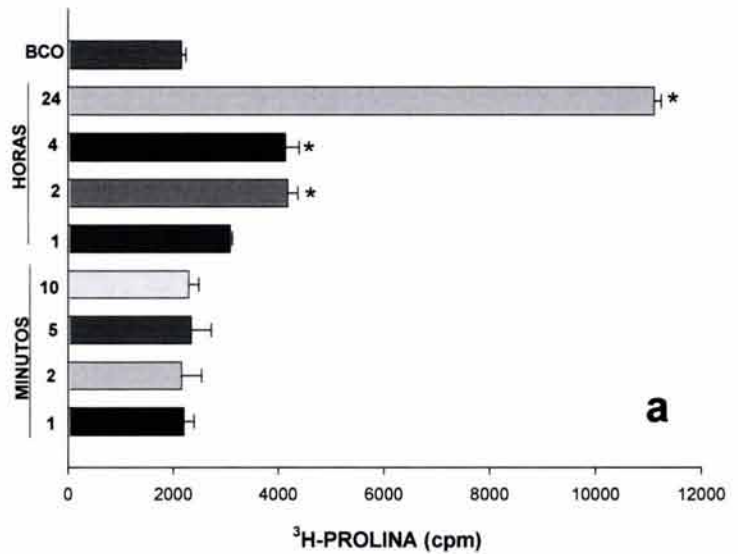


Figura 14. Difusión de  $^3\text{H}$ -Prolina a través de la membranas corioamnióticas en cultivo en el sistema del Transwell. a.) Radiactividad detectada en el compartimento del amnios después de un pulso inicial (tiempo 0) en la región coriodescidual. b.) Radiactividad en la coriodescuidua después de incubar el amnios con la marca durante cada uno de los tiempos indicados ( $n=5$ ;  $*P \leq 0.05$ )

Una vez demostrado que a aún a las 96 h de cultivo, las membranas mantenían parámetros de viabilidad, integridad y estructura sin cambios significativos, se procedió a estimular diferencialmente a las MCH.

## **11.2. ESTIMULACIÓN CON LIPOPOLISACÁRIDO.**

### **11.2.1 Secreción de IL-1 $\beta$ Y TNF $\alpha$ .**

En el medio de cultivo de ambos compartimentos, se cuantificó la concentración de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  después de la estimulación diferencial con 500 ng/mL de LPS por 24 h. Como muestra la figura 15, la endotoxina bacteriana indujo en promedio el incremento de hasta 25 veces en la concentración de IL-1 $\beta$  en ambos compartimentos, comparado con sus correspondientes controles ( $P < 0.001$ ); sin embargo, comparado con el amnios, la producción de esta citocina fue de casi el doble en el compartimento coriodecidual, tanto cuando el estímulo se hizo exclusivamente en esta cara de las membranas, como cuando se hizo en forma simultánea en ambas regiones.

Cuando la coriodecidual y el amnios se cultivaron y estimularon independientemente con la misma dosis de endotoxina, únicamente la coriodecidual secretó cantidades significativas ( $P < 0.01$ ) de IL-1 $\beta$  (Tabla 1).

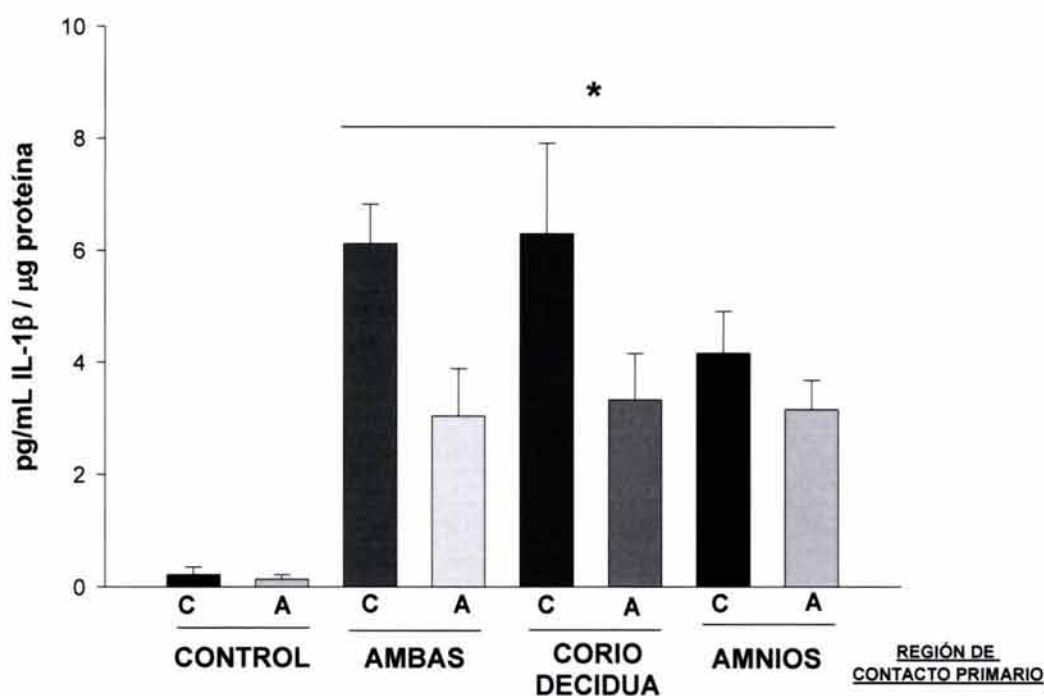


Figura 15. Secreción *in vitro* de IL-1 $\beta$  después de la estimulación diferencial con 500 ng/mL de LPS por 24 h. C. Coriodecidua y A. Amnios. (n=5; \*P< 0.001).

Resultados similares fueron obtenidos para la secreción de TNF $\alpha$  después de la estimulación con LPS, ambas regiones respondieron sintetizando cantidades significativas de esta citocina (P<0.001), sin embargo, la coriodecidua respondió mucho más potentemente después de un estímulo directo con la endotoxina, ya que sintetizó casi 70 veces más citocina en comparación con el basal (P<0.001), lo que resultó ser el doble del incremento presentado por el amnios bajo las mismas condiciones de estimulación (Figura 16).

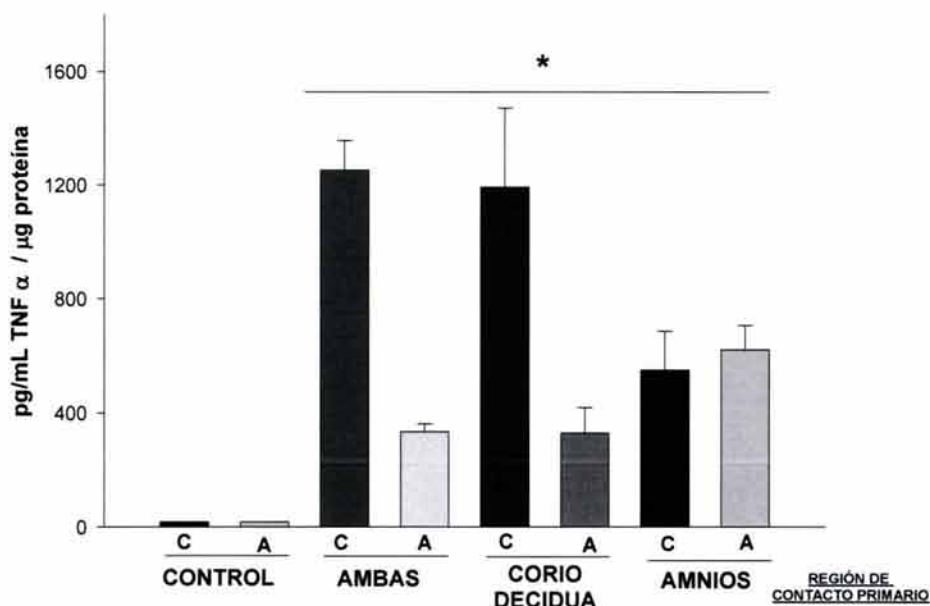


Figura 16. Secreción *in vitro* de  $TNF\alpha$  después de la estimulación diferencial con 500 ng/mL de LPS por 24 h. C. Coriodecidua y A. Amnios. (n=5; \*P< 0.001).

Cuando coriodecidua y amnios fueron separados y cultivados en forma independiente, ambos secretaron al medio de cultivo cantidades significativas (P<0.01) de  $TNF-\alpha$ ; sin embargo, la coriodecidua secretó cuatro veces más citocina que el amnios (Tabla 1).

**Secreción *in vitro* de  $IL-1\beta$  y  $TNF\alpha$  en coriodecidua y amnios cultivados y estimulados en forma independiente con 500ng/mL de LPS**

TABLA 1	Estimulación con LPS			
	CORIO-DECIDUA CONTROL	CORIO-DECIDUA TRATADA	AMNIOS CONTROL	AMNIOS TRATADO
<b>IL-1<math>\beta</math></b> (pg/μg proteína)	0.05 (±0.06)	3.59* (±1.7)	0.061 (±0.09)	0.093 (±0.1)
<b>TNF-<math>\alpha</math></b> (pg/μg proteína)	17.5 (±3.53)	959.1* (±471.3)	25.41 (±14.8)	235* (±119.9)

n=5; \*P≤0.01

### 11.2.2 Secreción y actividad gelatinolítica de la forma proenzimática y activa de la MMP-2 y la MMP-9.

Como marcadores de degradación de MEC se analizaron, mediante zimografía, los patrones de secreción y actividad gelatinolítica de la forma proenzimática y activa de la MMP-9 y la MMP-2 (Figura 17).

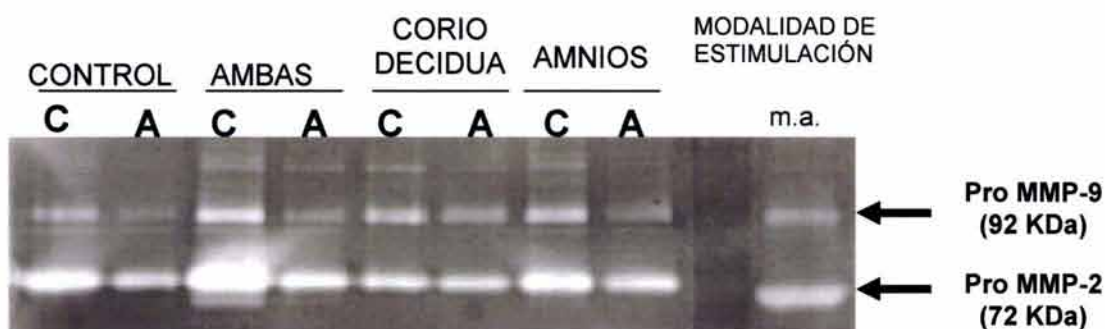


Figura 17. Zimograma representativo que muestra el patrón de secreción y actividad gelatinolítica de las MMP-2 y MMP-9 después del tratamiento diferencial con LPS. C. Coriodecidua; A. Amnios; m.a. marcador de actividad (U947). (n=5)

El análisis densitométrico de los diferentes zimogramas mostró que en las tres modalidades de estimulación con LPS, la coriodecidua fue la única región que secretó cantidades significativas ( $P < 0.05$ ) de ambas gelatinasas (Figura 18).



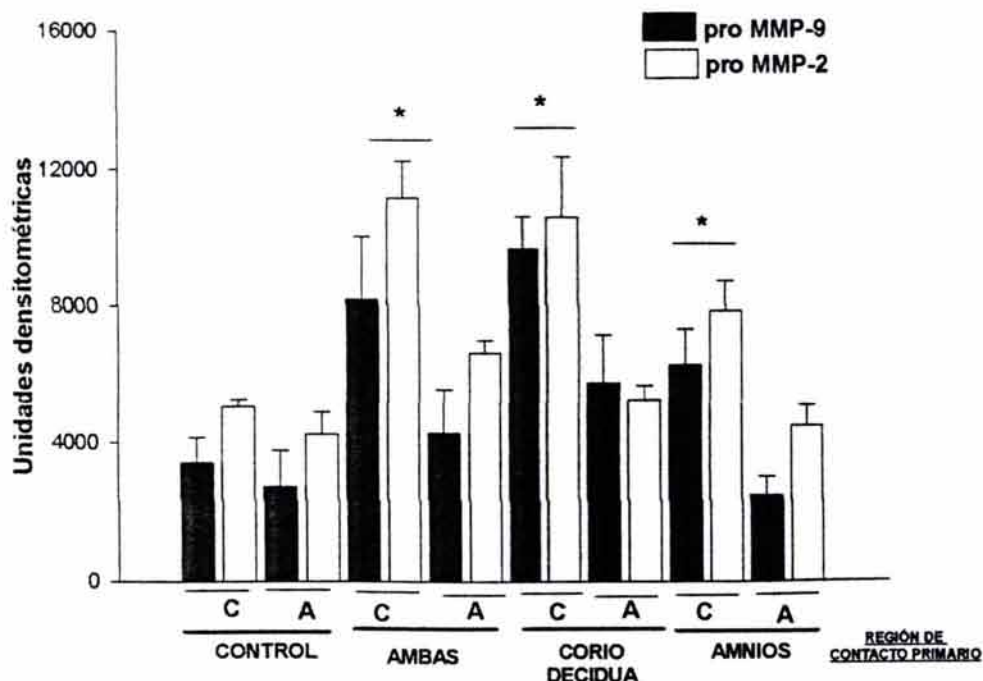


Figura 18. Análisis densitométrico de las bandas de degradación inducidas por la pro-MMP2 y proMMP-9 secretadas al medio de cultivo por las diferentes regiones de las membranas después del tratamiento con LPS. C. coriodecidua, A. Amnios (n=5; \* P<0.05).

La determinación cuantitativa de las formas latente y activa de la MMP-2 y la MMP-9 mostró que efectivamente, después del tratamiento con LPS, la secreción de la forma latente de la gelatinasa A (MMP-2) se incrementó hasta tres veces en la coriodecidua en comparación con la síntesis basal de esta misma región ( $P<0.05$ ), éste fue independiente del sitio de contacto inicial con la endotoxina. El amnios no presentó diferencias significativas en los niveles de proMMP-2 secretados al medio (Figura 19).

En comparación con los niveles presentados tanto en coriodecidua como en amnios bajo condiciones basales, ninguna de las modalidades de estimulación se tradujo en un cambio significativo en los niveles de la forma activa de la MMP-2 (Figura 19).

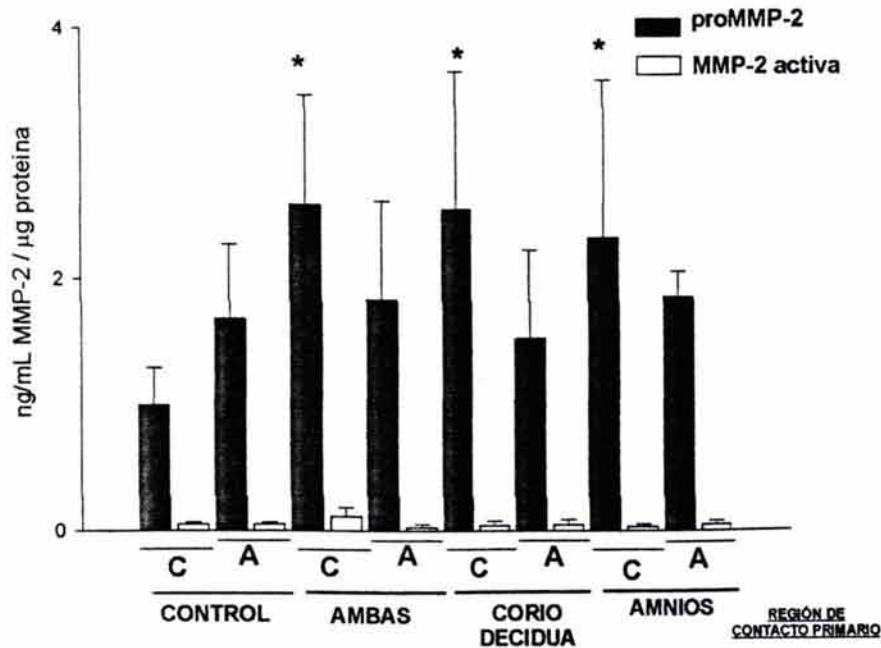


Figura 19. Secreción de la forma latente y activa de la MMP-2 después del tratamiento diferencial con 500ng/mL de LPS. C. Coriodecidua; A. Amnios; n=5, \*P<0.05.

Si bien la proMMP-2 presentó un claro incremento en la coriodecidua después del tratamiento con LPS, la proMMP-9 desplegó un patrón de secreción un tanto distinto, ya que aunque el estímulo directo en cara materna se tradujo en el aumento en la concentración de proMMP-9 de hasta 5.4 veces comparado con el control ( $P < 0.05$ ), el amnios también sintetizó 1.9 veces más proenzima ( $P < 0.05$ ) después de que la membrana fuera sometida a el estímulo simultaneo de ambas regiones.

La concentración de la forma activa de la MMP-9 no se modificó en forma significativa ( $P < 0.05$ ) (Figura 20).

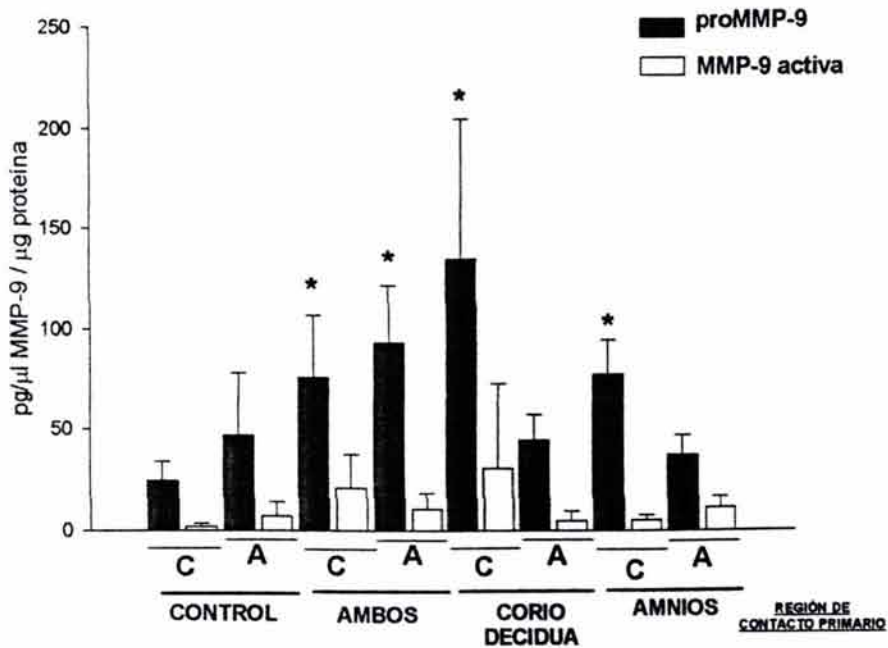


Figura 20. Secreción de la forma latente y activa de la MMP-9 después del tratamiento diferencial con 500ng/mL de LPS. C. Coriodecdua, A. Amnios n=5, \*P<0.05.

### 11.2.2 Secreción de TIMP1 Y TIMP2

La cuantificación en el medio de cultivo de los inhibidores tisulares TIMP1 y TIMP2 demostró que no hubo cambio alguno en el patrón de secreción de ninguno de estos dos factores en ninguna de las regiones de las membranas (Tabla 2).

**Secreción in vitro de TIMP1 y TIMP2 después del tratamiento con 500ng/mL de LPS**

**TABLA 2**

	<b>Estimulación con LPS</b>							
	<b>CONTROL</b>		<b>ESTÍMULO EN AMBAS REGIONES</b>		<b>ESTIMULO EN CORIODECIDUA</b>		<b>ESTIMULO EN AMNIOS</b>	
	<b>CORIO DECIDUA</b>	<b>AMNIOS</b>	<b>CORIO DECIDUA</b>	<b>AMNIOS</b>	<b>CORIO DECIDUA</b>	<b>AMNIOS</b>	<b>CORIO DECIDUA</b>	<b>AMNIOS</b>
<b>TIMP1 (ng/mL/<math>\mu</math>g proteína)</b>	<b>72.21 (<math>\pm</math>58.5)</b>	<b>43.3 (<math>\pm</math>9.64)</b>	82.7 ( $\pm$ 35.5)	48.1 ( $\pm$ 13.44)	82.2 ( $\pm$ 63.11)	41.5 ( $\pm$ 25.19)	55.75 ( $\pm$ 43.26)	49.25 ( $\pm$ 40.99)
<b>TIMP2 (ng/mL/<math>\mu</math>g proteína)</b>	<b>974.4 (<math>\pm</math>846.5)</b>	<b>1290.27 (<math>\pm</math>1328.4)</b>	1424.22 ( $\pm$ 1628.9)	1680.4 ( $\pm$ 1220.3)	936.8 ( $\pm$ 1029.9)	1402.0 ( $\pm$ 1232.3)	1372.6 ( $\pm$ 1176.36)	1740.8 ( $\pm$ 1676.4)

n=5; \*P<0.05

#### 11.2.4. Análisis histológico

Una vez concluidos los tratamientos, las membranas estimuladas con LPS fueron procesadas para su análisis histológico, el cual reveló que en comparación con una membrana en condiciones basales con el mismo tiempo de cultivo (72 h) (Figura 21), la MEC de las membranas estimuladas con la endotoxina fue extensivamente degradada, la zona compacta del amnios fue la más afectada tanto cuando el estímulo se hizo en la cara del corion (Figura 22) como en la del amnios (Figura 23).

Mediante el análisis por microscopía electrónica de las zonas de la membrana que desarrollaron alteraciones, se pudo comprobar la degradación y desarreglo de la MEC, estos resultados no son mostrados.

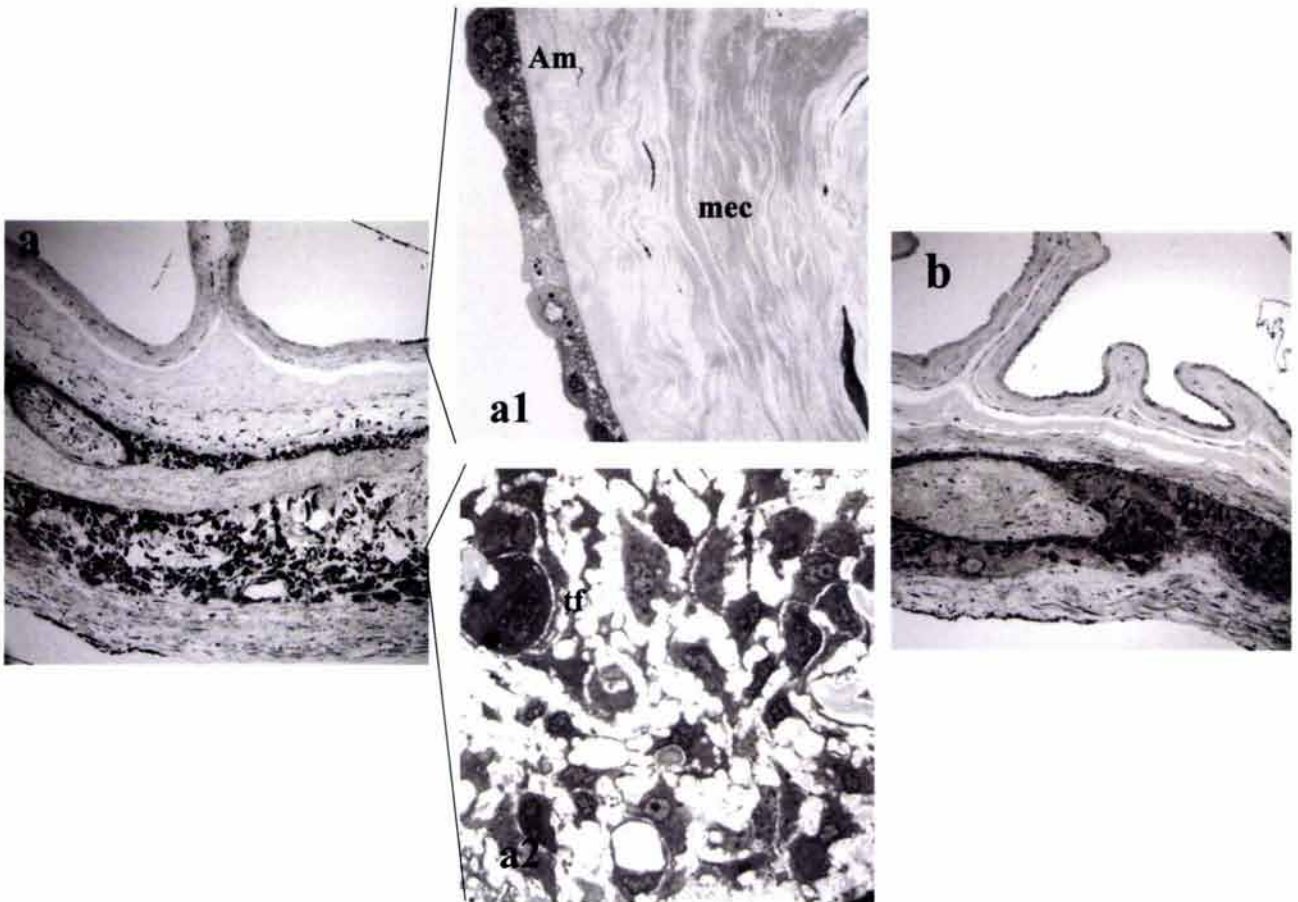


Figura 21. a.) Corte semifino ( $1\mu\text{m}$ ) de una membrana corioamniótica humana (10X) en condiciones basales del tiempo 0 h de cultivo incluida en EPON y teñida con azul de toluidina al 0.5%. a1.) Epitelio amniótico (40X), a2.) trofoblastos del corion (40X,. b.) Membrana con 72h de cultivo (10X).

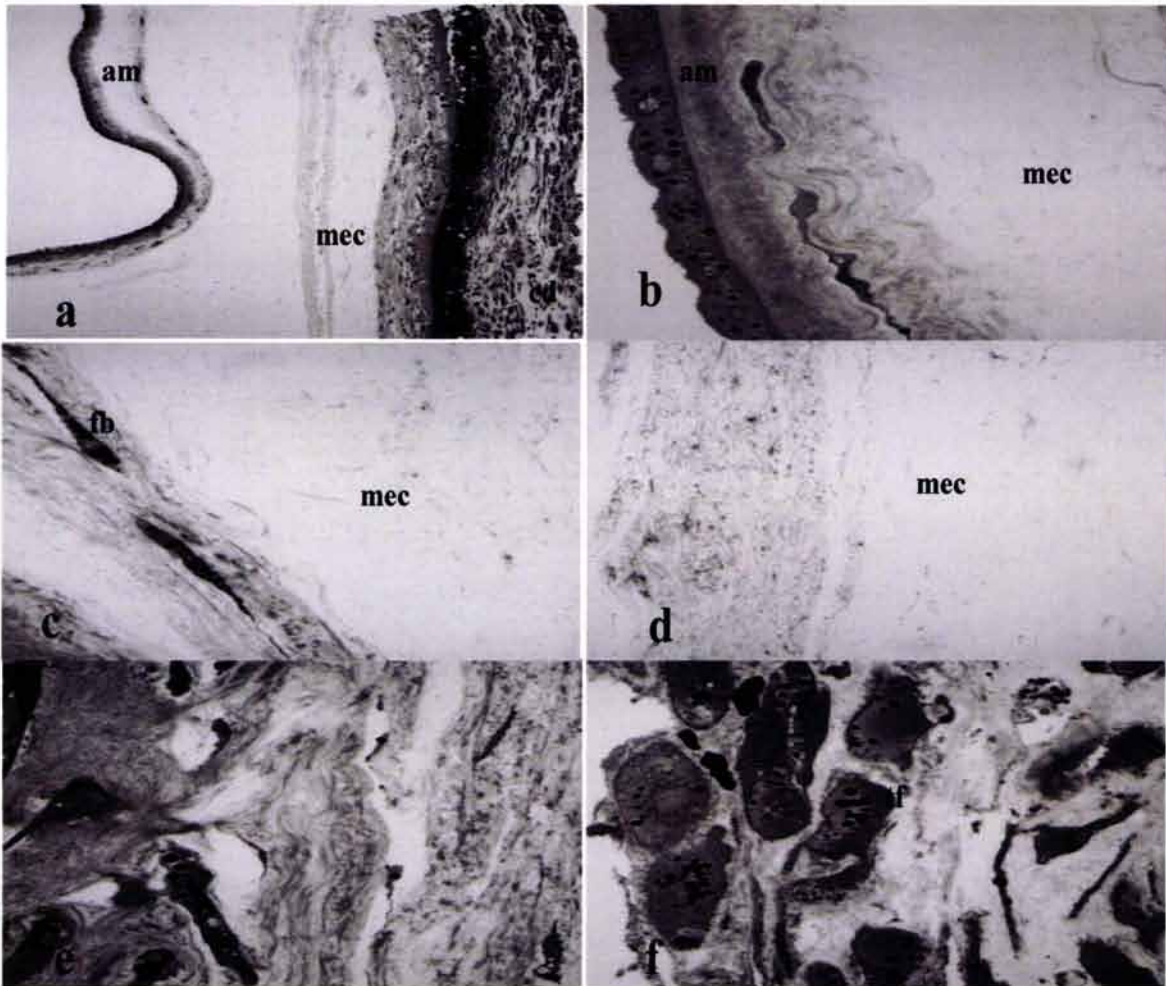


Figura 22. Corte seminifino ( $1\mu\text{m}$ ) de una membrana corioamniótica humana estimulada por el lado coriodecidual con  $500\text{ ng/mL}$  de LPS, incluida en EPON y teñida con azul de toluidina al 0.5%. a.) Efectos sobre las distintas zonas de la matriz extracelular (mec) y la pérdida de continuidad entre el amnios (am) y la coriodecidual (cd) por el proceso degradativo (10X); b.) Región del amnios (40X); c,d.) Zona compacta donde se muestra el desarreglo de la mec (40X); e.) Zona reticular y parte de la capa intermedia (40X), f.) Población de trofoblastos del corion (40X).

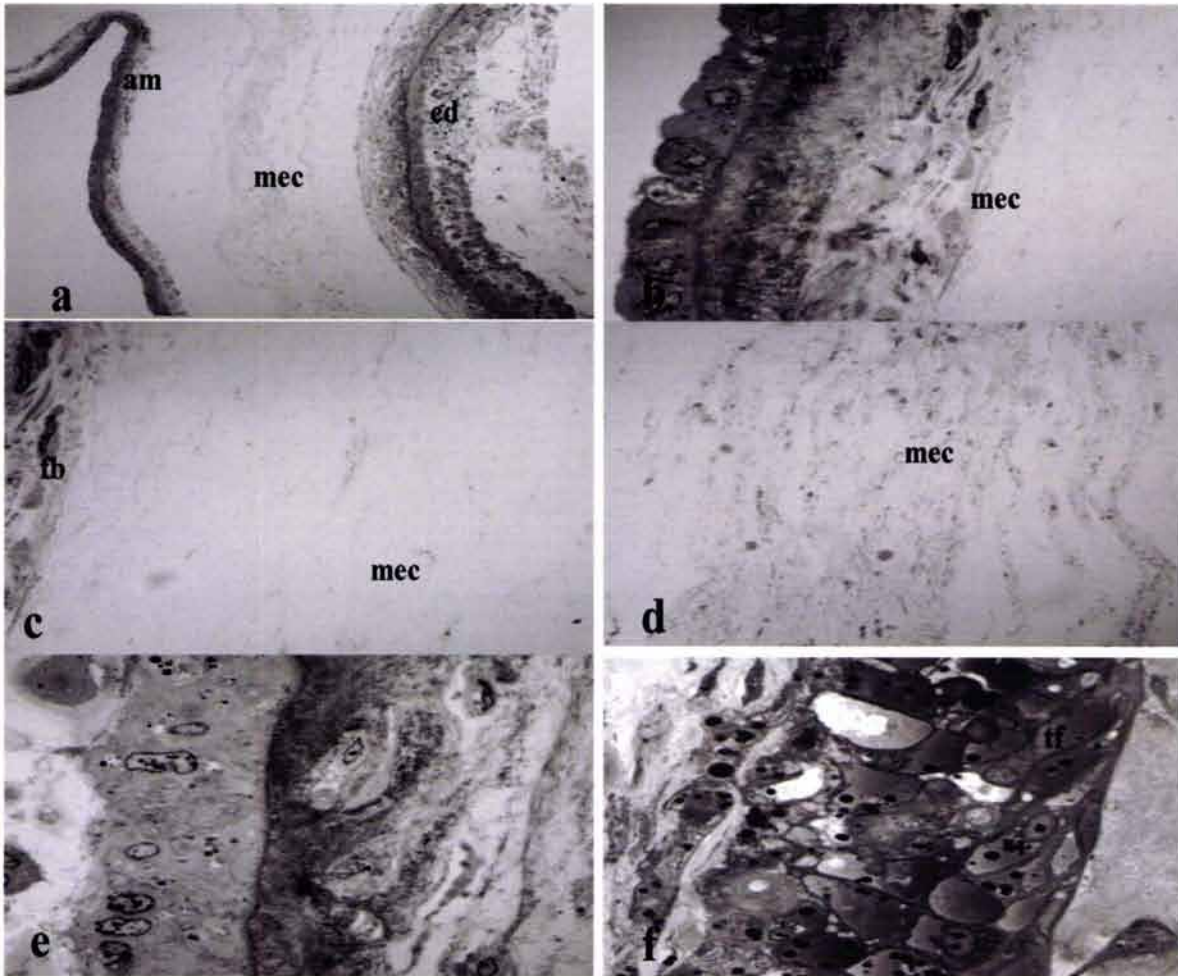


Figura 23. Corte semifino ( $1\mu\text{m}$ ) de una membrana corioamniótica humana estimulada por el lado del amnios con  $500\text{ ng/mL}$  de LPS incluida en EPON y teñida con azul de toluidina al 0.5%. a.) Efectos sobre las distintas zonas de la matriz extracelular (mec) y la pérdida de continuidad entre el amnios (am) y la coriodecidual (cd) por un extenso proceso degradativo (10X); b.) Región del amnios (40X); c,d.) Zona compacta donde se muestra el desarreglo de la mec (40X); e.) Zona reticular y parte de la capa intermedia (40X), f.) Población de trofoblastos del corion (40X).

### 11.3 ESTIMULACIÓN CON *Streptococcus agalactiae*

#### 11.3.1 Secreción de IL-1 $\beta$ y TNF $\alpha$

Cuando las membranas fueron estimuladas con  $1 \times 10^6$  UFC de *Streptococcus agalactiae*, la concentración de IL-1 $\beta$  en la coriodecidua aumentó aproximadamente 17 veces en comparación con la concentración basal ( $P < 0.05$ ) y únicamente cuando la bacteria fue puesta en contacto directo con esta zona de la membrana. La adición simultánea de *Streptococcus agalactiae* en ambas regiones resultó en el incremento significativo de la secreción de IL-1 $\beta$  en el compartimento coriodecidual ( $P < 0.05$ ), el cual, no alcanzó a ser tan potente al que presentó la misma región cuando el estímulo se hizo exclusivamente en esta cara de la membrana (Figura 24).

En los experimentos en que amnios y coriodecidua fueron separados, cultivados y estimulados individualmente, únicamente la coriodecidua fue capaz de secretar IL-1 $\beta$  en una concentración que comparada con la basal, incrementó aproximadamente 8 veces ( $P < 0.05$ ) (Tabla 3).



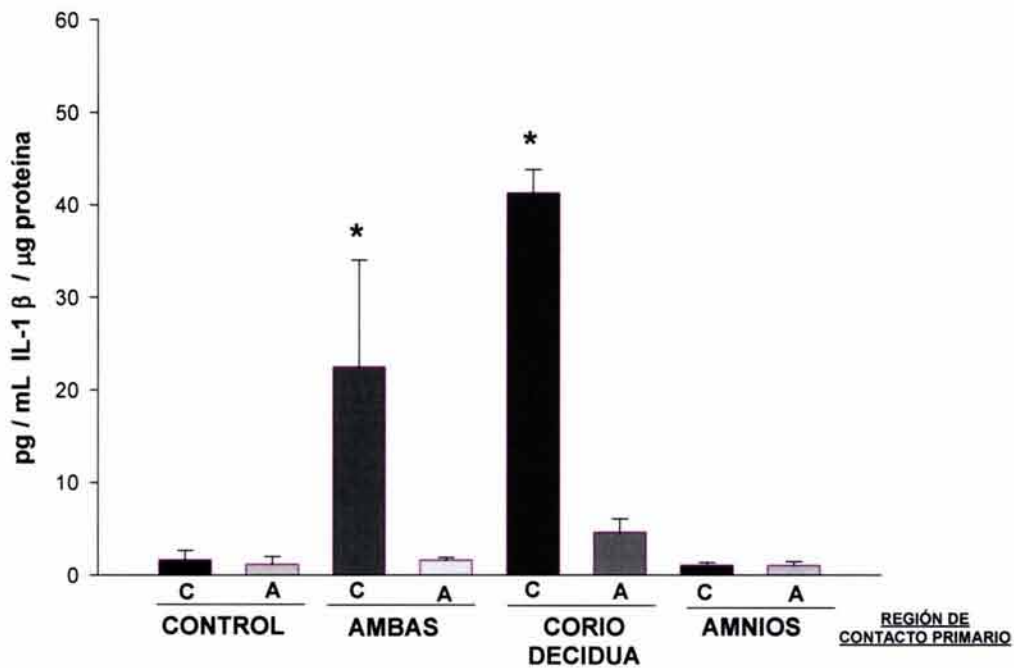


Figura 24. Secreción *in vitro* de IL-1 $\beta$  después de la estimulación diferencial con  $1 \times 10^6$  UFC de *Streptococcus agalactiae* por 24 h. C. Coriodecidua; A. Amnios. (n=5; \*P< 0.001).

Los resultados muestran que la estimulación con *Streptococcus agalactiae* indujo una importante secreción de TNF $\alpha$  (P<0.01); esta citocina fue secretada por la coriodecidua en respuesta a una estimulación directa con la bacteria (Figura 25).

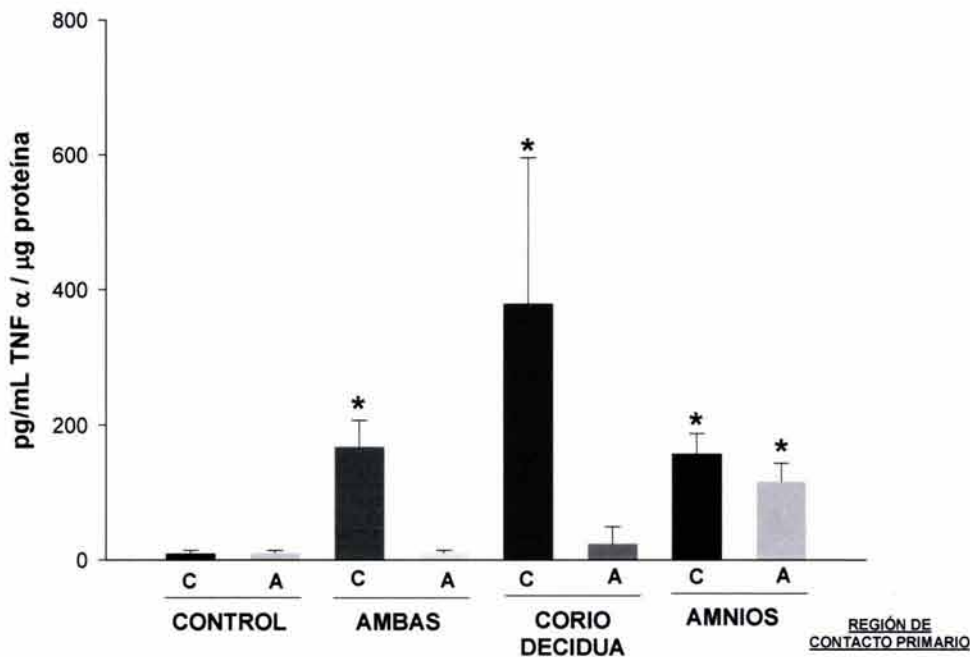


Figura 24. Secreción *in vitro* de TNF $\alpha$  después de la estimulación diferencial con  $1 \times 10^6$  UFC de *Streptococcus agalactiae* por 24 h. C. Coriodecidua; A. Amnios. (n=5;  $P < 0.001$ ).

Cuando corion o amnios fueron cultivados en forma independiente y estimulados con *Streptococcus agalactiae*, la producción de TNF- $\alpha$  fue significativamente alta en el amnios ( $P < 0.05$ ), el cual produjo 2.3 veces más citocina que el corion bajo las mismas condiciones de estimulación (Tabla 3).

**Secreción *in vitro* de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  en coriodecidua y amnios cultivados y estimulados en forma independiente con  $1 \times 10^6$  UFC de *Streptococcus agalactiae* por 24 h.**

**.ABLA 3**

	Estimulación con <i>S. agalactiae</i>			
	CORIO DECIDUA CONTROL	CORIO DECIDUA TRATADA	AMNIOS CONTROL	AMNIOS TRATADO
<b>IL-1<math>\beta</math></b> (pg/ $\mu$ g proteína)	1.39 ( $\pm 1.22$ )	11.44* ( $\pm 7.7$ )	0.12 ( $\pm 0.05$ )	0.22 ( $\pm 0.16$ )
<b>TNF-<math>\alpha</math></b> (pg/ $\mu$ g proteína)	15.5 ( $\pm 3.53$ )	94.31* ( $\pm 25.29$ )	13.2 ( $\pm 2.53$ )	224.0* ( $\pm 74.47$ )

n=5; \* $P \leq 0.05$

### 11.3.2. Secreción y actividad gelatinolítica de la forma proenzimática y activa de la MMP-2 y la MMP-9.

Los patrones de secreción y actividad gelatinolítica de la forma proenzimática y activa de la MMP-2 y MMP-9 fueron analizados mediante zimogramas, los cuales mostraron que como resultado de la estimulación diferencial de las membranas con *Streptococcus agalactiae*, se incrementó la secreción al medio de las formas proenzimáticas de ambas proteínas en la región del coriodecidual (Figura 26)



Figura 26. Zimograma representativo que muestra el patrón de secreción y actividad gelatinolítica de las MMP-2 y MMP-9 después del tratamiento diferencial con *Streptococcus agalactiae*. C. Coriodecidual; A. Amnios; m.a. marcador de actividad (U947). (n=5)

El análisis densitométrico de las distintas bandas de lisis observadas en los geles, permitió corroborar el incremento significativo ( $P < 0.05$ ) en la secreción de las formas proenzimáticas de ambas gelatinasas en la región de la coriodecidual, además del aumento de la MMP-9 en la cara amniótica después de la estimulación individual en esta región (Figura 27).

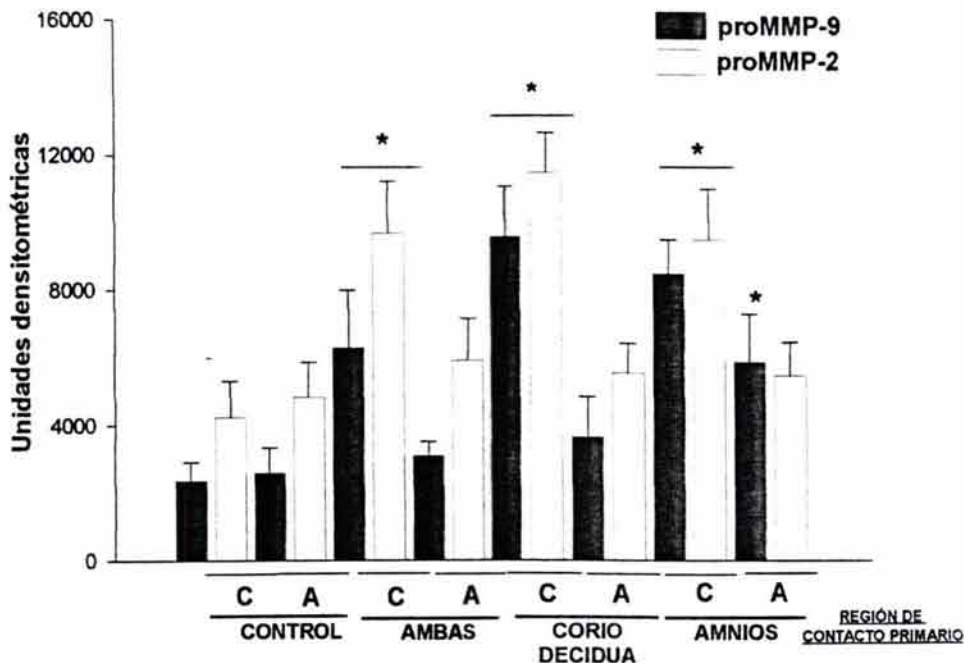


Figura 27. Análisis densitométrico de las bandas de degradación inducidas por las pro-MMP2 y la proMMP-9 secretadas al medio de cultivo por las diferentes regiones de las membranas después del tratamiento con *Streptococcus agalactiae*. C. Coriodecdua; A. Amnios (n=5; \*P<0.05)

La determinación cuantitativa de las formas proenzimáticas y activa de ambas gelatinasas demostró que los cambios significativos en el patrón de secreción de la proMMP-2 se dieron únicamente en la región de la coriodecdua; la cual, independientemente de la zona inicial de estimulación, respondió secretando un promedio de 5 veces más proMMP-2 con respecto al control ( $P < 0.05$ ). Sin embargo, a pesar de los cambios en las concentraciones de pro-MMP2, la forma activa de esta gelatinasa no se modificó significativamente en ninguna de las dos regiones de la membrana ni en ninguna de las modalidades de estimulación (Figura 28).

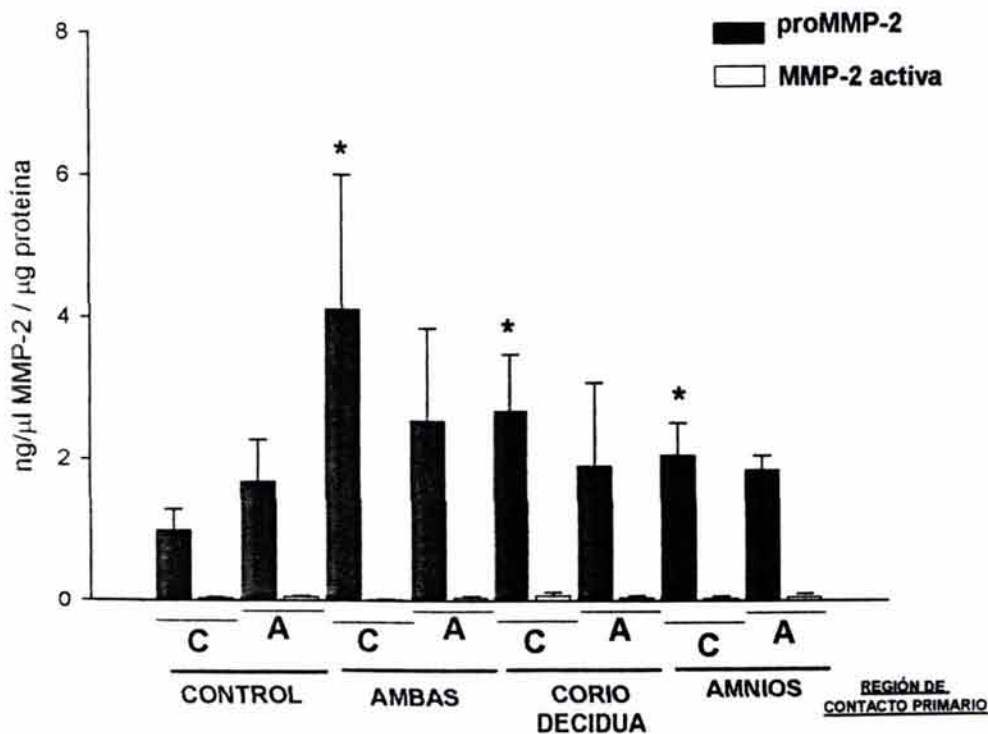


Figura 28. Secreción de la forma latente y activa de la MMP-2 después del tratamiento diferencial con  $1 \times 10^6$  UFC de *Streptococcus agalactiae* por 24 h. C. Coriodecidual, A. Amnios ( $n=5$ , \*  $P<0.05$ )

El tratamiento simultáneo con *Streptococcus agalactiae* en ambas regiones de las membranas indujo en la zona coriodecidual el aumento de 3.5 veces en la concentración de la proMMP-2 y de un promedio de 2.3 veces en la misma región cuando la coincubación con la bacteria fue en uno solo de los compartimentos ( $P<0.05$ ), el amnios no respondió significativamente en ninguna modalidad de estimulación (Figura 29).

Con respecto a las condiciones basales, las MCH tratadas con la bacteria no experimentaron cambios significativos en la secreción de MMP-2 activa.

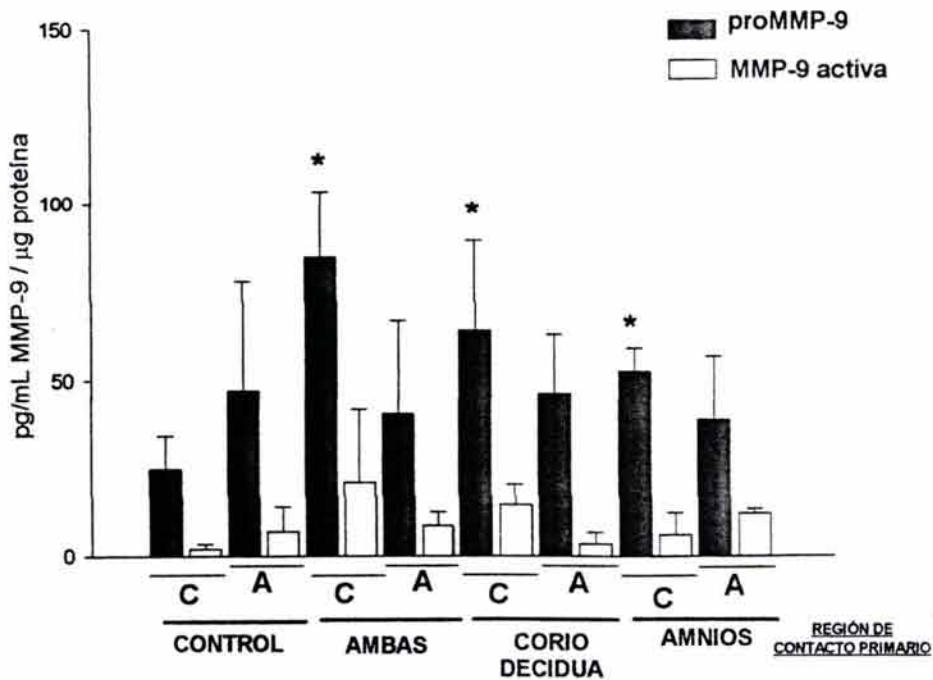


Figura 29. Secreción de la forma latente y activa de la MMP-9 después del tratamiento diferencial con  $1 \times 10^6$  UFC de *Streptococcus agalactiae*. C. Corio decidua; A. Amnios.  $n=5$ , \*  $P < 0.05$ .

### 11.3.3 Secreción de TIMP1 y TIMP2

Los niveles de secreción de TIMP1 y TIMP2 no presentaron cambios significativos después del tratamiento con *Streptococcus agalactiae* en ninguna de las regiones de las membranas, ni bajo ninguna modalidad de estimulación (Tabla 4).

**Secreción in vitro de TIMP1 y TIMP2 después del tratamiento con  $1 \times 10^6$  UFC de *Streptococcus agalactiae***

**TABLA 4**                      **Estimulación con *Streptococcus agalactiae***

	CONTROL		ESTÍMULO EN AMBAS REGIONES		ESTÍMULO EN CORION		ESTÍMULO EN AMNIOS	
	CORION	AMNIOS	CORION	AMNIOS	CORION	AMNIOS	CORION	AMNIOS
	<b>TIMP1</b> (ng/mL/ $\mu$ g proteína)	<b>93.0</b> ( $\pm$ 75.6)	<b>46.0</b> ( $\pm$ 9.14)	64.5 ( $\pm$ 28.0)	45.83 ( $\pm$ 15.3)	76.5 ( $\pm$ 61.93)	64.6 ( $\pm$ 27.83)	61.4 ( $\pm$ 28.75)
<b>TIMP2</b> (ng/mL/ $\mu$ g proteína)	<b>1111.75</b> ( $\pm$ 774.5)	<b>2124.2</b> ( $\pm$ 1451.2)	1465.8 ( $\pm$ 912.2)	1605.0 ( $\pm$ 1010.1)	1827.75 ( $\pm$ 1576.6)	1447.2 ( $\pm$ 612.2)	1784.5 ( $\pm$ 1862.0)	1957.8 ( $\pm$ 1179.3)

n=5 \*P $\leq$ 0.05

#### 11.3.4. Análisis Histológico

Una vez concluidos los tratamientos, las membranas estimuladas con *Streptococcus agalactiae* fueron procesadas para su análisis histológico, el cual reveló que en comparación con una membrana en condiciones basales con el mismo tiempo de incubación (Figura 21) la MEC de las membranas tratadas fue extensivamente degradada, siendo la zona compacta resultó ser la más afectada tanto cuando el estímulo se hizo en la cara coriodecidual (Figura 30) como en la del amnios (Figura 31).

El daño en el arreglo e integridad de la MEC de las membranas fue corroborado mediante microscopía electrónica (datos no mostrados)

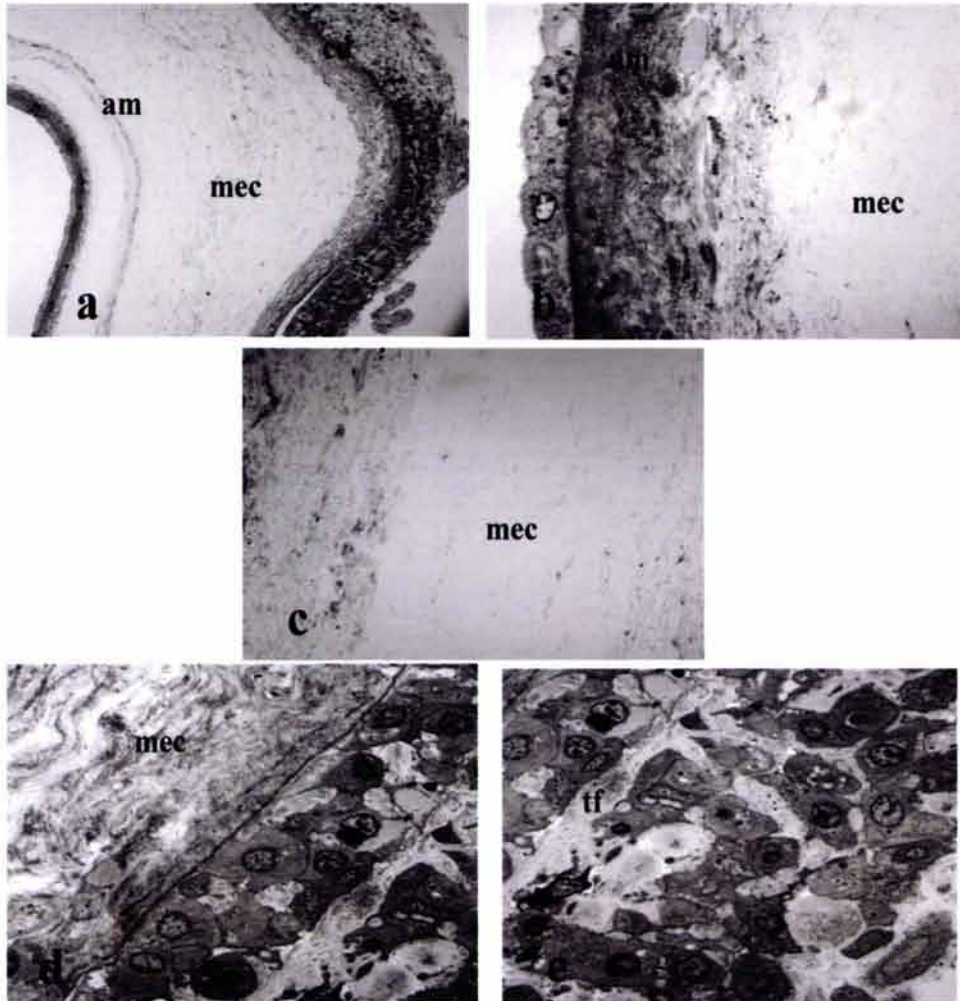


Figura 30. Corte semifino ( $1\mu\text{m}$ ) de una membrana corioamniótica humana estimulada con  $1 \times 10^6$  UFC de *Streptococcus agalactiae* incluida en EPON y teñida con azul de toluidina al 0.5%. a.) Efectos sobre las distintas zonas de la matriz extracelular (mec) y la pérdida de continuidad entre el amnios (am) y la coriodecidua (cd) por un extenso proceso degradativo (10X); b.) Región del amnios (40X); c.) Zona compacta donde se muestra el desarreglo de los distintos elementos de la mec (40X) d.) Zona reticular y parte de la capa intermedia (40X), e.) Población de trofoblastos que constituyen al corion (40X).



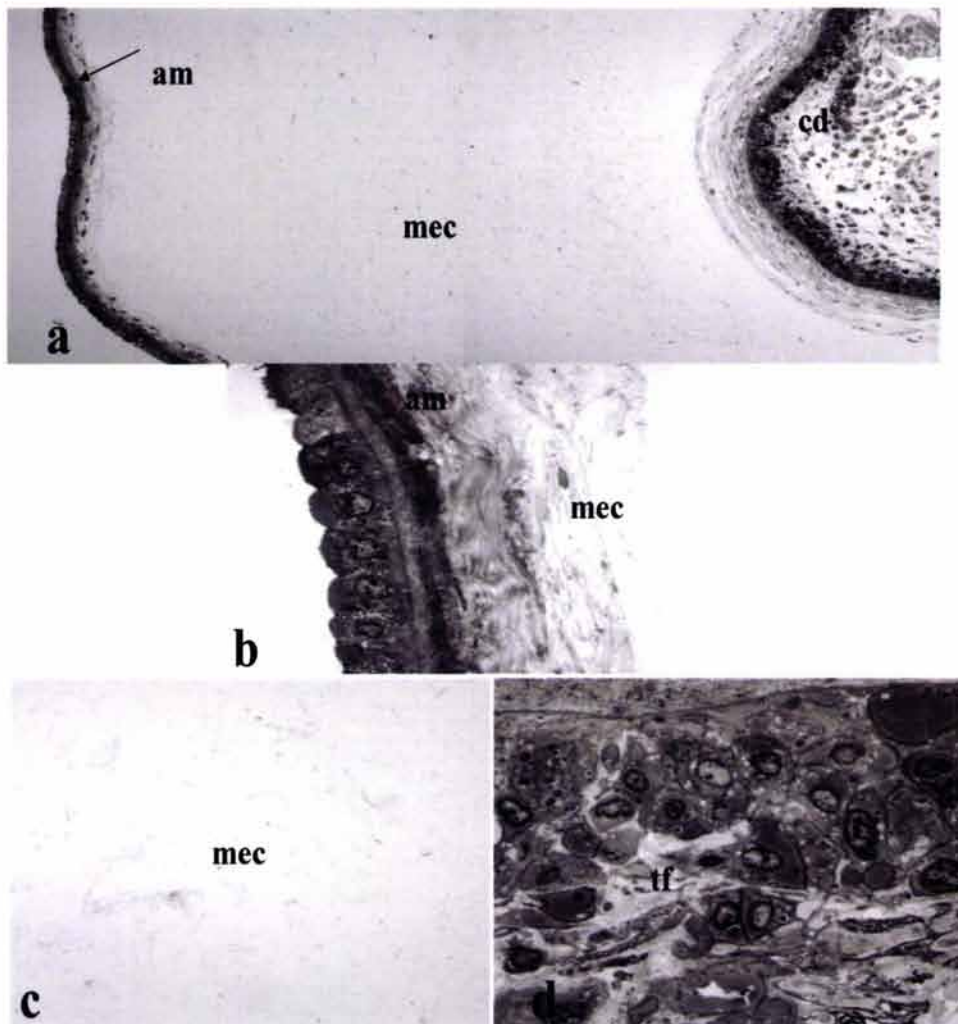


Figura 31. Corte seminifino de una membrana corioamniótica humana estimulada con  $1 \times 10^8$  UFC de *Streptococcus agalactiae* incluida en EPON y teñida con azul de toluidina al 0.5%. a.) Efectos sobre las distintas zonas de la matriz extracelular (mec) y la pérdida de continuidad entre el amnios (am) y la coriodescidua (cd) por un extenso proceso degradativo y de hidratación (10X); b.) Región del amnios (40X); c.) Zona compacta donde se muestra el desarreglo de los distintos elementos de la mec (40X) d.) población de trofoblastos que constituyen al corion (40X).

#### 11.4 RET DESPUÉS DE LOS TRATAMIENTOS.

Una vez concluidos los tratamientos, a un grupo (n=15) de membranas les fue medida la RET con el objetivo de garantizar que la integridad celular de las mismas se mantenía y que los distintos marcadores fueron secretados y contenidos por una membrana que no tenía lesiones.

Los valores de RET mostraron que antes ( $47.53 \pm 7.0 \Omega/\text{cm}^2$ ) y después del tratamiento con el LPS ( $53.38 \pm 13.56 \Omega/\text{cm}^2$ ) ó con *Streptococcus agalactiae* ( $48.59 \pm 10.0 \Omega/\text{cm}^2$ ) la resistencia de las membranas al paso de la corriente eléctrica no tuvo cambios significativos. Estas pruebas se hicieron solamente en las membranas que fueron tratadas simultáneamente en coriodecidua y amnios, esto por considerarse que de haber daño, éste sería mayor en una membrana tratada de esta forma que si solo se estimulara por uno de los lados.

## 12. DISCUSIÓN

La RPM es una patología cuya prevalencia no ha cambiado en los últimos 50 años; a este respecto, los datos epidemiológicos demuestran que del total de embarazos que desarrollan esta complicación el 40% está asociado con la presencia de un proceso infeccioso a nivel intrauterino (Parry y Strauss; 1998; Asrat y cols., 2001).

Existen una serie de datos clínicos y experimentales que soportan la hipótesis de que una infección que comienza en el área cervicovaginal, puede ganar acceso hasta la cavidad amniótica mediante una invasión ascendente y progresiva del cérvix, decidua y membranas corioamnióticas (Romero y cols., 1988)

Con el objetivo de poder analizar la respuesta integral de las membranas fetales humanas ante diversos estímulos infecciosos, diseñamos y validamos un modelo experimental que reproduce la interacción entre microorganismos asociados a infecciones cervicovaginales como el *Streptococcus agalactiae* y derivados de la pared bacteriana como el LPS, con las distintas poblaciones celulares de las membranas, las cuales separan dos compartimentos independientes, reproduciendo de esta forma la función que desempeñan *in vivo*.

Adicionalmente y bajo condiciones experimentales equivalentes, se analizó la respuesta individual de la coriodecidua y del amnios cultivados y estimulados en forma independiente.

Las pruebas de RET, difusión transmembranal y el análisis histológico, permitieron comprobar que efectivamente trabajamos con un sistema de “dos cámaras”, en el cual, las MCH actúan como una barrera selectiva real sin ningún tipo de alteración de la continuidad e integridad celular y/o tisular que pudiera disminuir su viabilidad y/o funcionalidad.

Se evaluaron dos tipos de marcadores funcionales: la secreción de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  como moduladores de la respuesta inflamatoria y la secreción y actividad de las proMMP-2, proMMP-9, TIMP2 y TIMP1 como reguladores de la degradación de la MEC. Cada uno de estos marcadores han sido involucrados en reportes previos como factores secretados por el corioamnios en respuesta a un proceso infeccioso; sin embargo, la mayoría de estos estudios se han hecho en preparaciones de células aisladas (Dudley y cols., 1996a; 1997b) o bien, en MCH completas en las que no se preservan las relaciones espaciales ni estructurales que existen *in vivo*, que permitan al amnios y la coriodecidua actuar como una barrera que separa los compartimentos fetal y materno (Menon y cols., 1995; Arechavaleta y cols., 2002a).

Existen publicados hasta el momento, sólo dos estudios en los cuales las membranas se estudiaron en un sistema experimental similar al nuestro, en el cual se demostró que pueden sintetizar PG's en la cara amniótica después de un estímulo en el lado coriodecidual (Tayson y cols., 1985; Rajasingam y cols., 1998).

Nuestro estudio revela que tanto el tejido amniótico como el coriodecidual presentan patrones de secreción selectivos de los marcadores funcionales que

fueron cuantificados después del estímulo con LPS y *Streptococcus agalactiae* , algunos de ellos, parecen ser el resultado de una respuesta tejido-específica; sin embargo, otros sólo pueden ser explicados por la interacción cooperativa entre ambos tejidos.

La estimulación con LPS resultó en la acumulación de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  en ambos compartimentos, independientemente de que la endotoxina haya sido añadida al amnios o la coriodecidua. La secreción de IL-1 $\beta$  en el compartimento amniótico pudo ser demostrable únicamente cuando la coriodecidua y el amnios estuvieron juntos; en cambio, los experimentos en los cuales ambos tejidos fueron mecánicamente separados y estimulados, la coriodecidua fue la única capaz de sintetizar y secretar esta citocina.

Estos resultados concuerdan con lo reportado previamente por Menon y colaboradores (1995), quienes demostraron que el ARNm de la IL-1 $\beta$  es expresado exclusivamente en las células de la coriodecidua; por lo tanto, la presencia de IL-1 $\beta$  en el compartimento amniótico en nuestros experimentos, puede ser explicada únicamente por la difusión de esta citocina a través de las membranas fetales desde la coriodecidua, posibilidad que ya ha sido confirmada en estudios que demuestran la difusión transmembranal de estos compuestos (Kent y cols., 1994; Stierner y cols., 1998).

Aunque poco se conoce acerca del transporte de citocinas a través de los tejidos, existen evidencias de que estas señales pueden modificar el transporte paracelular; fenómeno que ha sido explorado en varios tejidos epiteliales y que

puede explicar la extensiva difusión de la citocinas en nuestro modelo (Nusrat y cols., 2000).

Por otra parte, el incremento de la secreción de IL-1 $\beta$  por la coriodecidua después de estimular el amnios con LPS, implica que esta molécula puede atravesar el amnios y alcanzar la coriodecidua; o bien, que en el amnios ocurre un reconocimiento inicial seguido de un evento de transducción de señales hacia la coriodecidua.

La naturaleza química del LPS impide su difusión a través del amniocorion y aunque en este trabajo no se evaluó esta posibilidad, existen algunos reportes que indican que efectivamente este compuesto no atraviesa las MCH (Romero y cols., 1985; Rajansigam y cols., 1988); por lo tanto, el único mecanismo que explica la secreción coriodecidual de IL-1 $\beta$  dependiente del amnios, es la existencia de una vía de señalización intramembranosa que inicia en la cara fetal de las membranas y que necesariamente involucra un mecanismo de transducción de señales similar al caracterizado en monocitos y macrófagos.

En estas células inmunológicas la vía de transducción que se enciende después de la estimulación con LPS es mediada por CD14 y TLR4, la activación efectiva de éste último se traduce en la activación y translocación al núcleo del NF $\kappa$ B, el cual regula la expresión de diversos genes que codifican para moduladores inflamatorios como IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL-6, así como para diversas moléculas coestimuladoras que activan células B y T y que permiten el inicio de la respuesta inmune adaptativa (Modliny cols., 1999),

Casos de parto pretérmino, complicado con infección intramniótica, han sido asociados con el incremento en líquido amniótico de CD14 soluble, el cual puede activar y sensibilizar células epiteliales al contacto con LPS (Pugin y cols., 1993), lo que convierte a esta zona de las membranas, en una fuente directa del incremento en la concentración de diversas citocinas en el compartimento amniótico que ha sido reportado consistentemente en la literatura (Gardella y cols., 2001).

Aun cuando actualmente no hay reportes de la expresión de TLRs en membranas corioamnióticas, se ha demostrado la presencia de TLR2 y TLR4 en placentas humanas de embarazos normales a término (Halmlund y cols., 2002), inclusive, se ha caracterizado el incremento en la expresión de TLR4 en células de vellosidades de Hofbauer de placentas pretérmino y en líquido amniótico con corioamnioititis; escenario en el que este receptor ha sido asociado con el reconocimiento inicial de bacterias gram negativas (Kumazaki y cols. 2004).

La liberación de grandes cantidades de  $TNF\alpha$  después de la estimulación con LPS es el resultado de la suma de lo producido por ambos tejidos, ya que tanto la coriodecidua como el amnios mostraron tener la capacidad intrínseca de sintetizar y secretar esta citocina, lo que fue corroborado en los experimentos en que ambas regiones fueron separadas y cultivadas en forma independiente.

El compartimento coriodecidual acumula más  $TNF\alpha$  que el compartimento amniótico, sin embargo, la presencia de  $TNF\alpha$  en la coriodecidua después de la estimulación amniótica puede también explicarse por la difusión de esta citocina o

activación de la secreción coriodecidual de  $\text{TNF}\alpha$  por una vía de señalización intramembranosa no definida.

Es importante señalar que el estímulo con LPS induce un patrón de secreción diferencial de  $\text{IL-1}\beta$  y  $\text{TNF}\alpha$  en el que las distintas poblaciones celulares que constituyen al corioamnios, cooperan cuantitativamente en forma diferente y en el que  $\text{TNF}\alpha$  se constituye como la principal citocina sintetizada en respuesta al estímulo con este derivado soluble de origen bacteriano.

La forma en que está organizada esta respuesta inflamatoria, hace que el efecto final sea amplificado de manera similar a un mecanismo en cascada que alcanza incluso al compartimento fetal; evidencia de ello es, que en líquido amniótico de mujeres con infección intramniótica y parto pretérmino las concentraciones de  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{IL-8}$  se encuentran incrementadas muy por arriba del valor basal durante el embarazo normal (Romero y cols., 1990; 1992; Hillier y cols., 1990; Fortunato y cols., 1996; Reisenberger y cols., 1997; Yoon y cols., 1998; Hsu y cols., 1998).

Diversas pruebas experimentales han demostrado que moduladores proinflamatorios como  $\text{IL-1}\beta$  y  $\text{TNF}\alpha$  regulan en las MCH y en otros tejidos gestacionales el incremento en la síntesis de varias MMP's, incluidas la MMP-2 y la MMP-9 (Huang y cols., 1998; Cheong-Rae y cols., 2000; Vadillo-Ortega y cols., 2002, Estrada y cols., 2002). Estas enzimas junto con otros factores como PGs y TIMP's despliegan capacidades efectoras que explican el debilitamiento de las MCH; lo que ha permitido correlacionar un proceso infeccioso con el incremento



en el riesgo de desarrollo de RPM (*Streptococcus agalactiae* Ito y cols., 1990; Singer y cols., 1999; Vadillo-Ortega y cols., 2002).

La MMP-9 y la MMP-2, enzimas cuyo papel efector explica el extenso proceso degradativo de los distintos elementos de la MEC que caracteriza a las MCH en las etapas intermedias y finales del trabajo de parto normal y en aquellas que se rompen prematuramente (Vadillo-Ortega y cols., 1990; 1996; Riley y cols., 1999), también han sido asociadas con el debilitamiento y disminución de la elasticidad en MCH infectadas (Fortunato y cols., 2000a; Vadillo-Ortega y cols., 2002).

Nuestros resultados indican que la estimulación con LPS induce en amnios y coriodecidua el incremento en la síntesis y secreción de MMP-9, enzima con especificidad sobre colágena tipo IV, gelatina y proteoglicanos y cuya relevancia fisiológica y fisiopatogénica en el mecanismo de RPM, radica básicamente en la degradación de la colágena tipo IV, que se encuentra distribuida en forma de una red tridimensional en las distintas capas histológicas de las membranas en las que actúa como un soporte de las fibras de colágenas tipo I y III que, aunque más abundantes, dependen de la integridad de dicha estructura reticular (Halaburt y cols., 1989; Parry y Strauss, 1998; Vadillo-Ortega y cols., 1995)

A pesar de ser la gelatinasa con mayor concentración en líquido amniótico durante el proceso normal del embarazo (Riley y cols., 1999), la MMP-2 desempeña un papel poco claro y muy controversial tanto en condiciones normales como patológicas. Diversos autores reconocen a esta gelatinasa como una enzima constitutiva de las MCH tanto en la gestación normal (Hulboy y cols.,

1997; Maymon y cols., 2000) como en casos de corioamnionitis clínica (Maimon y cols., 2001); situación que ha sido confirmada en modelos de infección intrauterina aguda en primates (Vadillo-Ortega y cols., 2002).

A este respecto, existen datos en la literatura que indican que en membranas corioalantoideas de rata, la expresión del gen de la MMP-2 presenta un patrón constitutivo a lo largo de toda la gestación y durante el trabajo de parto; sin embargo, los patrones de secreción y activación de esta enzima se incrementan significativamente 24 horas antes del inicio del trabajo de parto normal tanto en las membranas fetales como en el líquido amniótico (Meráz-Cruz y cols., 2003).

No obstante la complejidad de estos resultados, existen pruebas que documentan el incremento en la secreción y actividad de la MMP-2 en MCH estimuladas con endotoxina bacteriana (Fortunato y cols., 1997; 2000a), nuestros resultados concuerdan con estas observaciones, ya que después de la estimulación directa con LPS, la coriodecidua incrementa la secreción de proMMP-2 en forma significativa; sin embargo, y aunque el amnios nuevamente no presenta un cambio estadísticamente significativo bajo ninguna de las modalidades de estimulación, sí desempeña un papel activo en la transducción de la señal hacia la coriodecidua. Nuestros resultados muestran que después de una estimulación selectiva con LPS, la proMMP-2 es la principal gelatinasa secretada por las MCH.

En forma similar a lo observado con las citocinas proinflamatorias, la región coriodecidual fue la zona de las MCH con mayor capacidad para sintetizar y

secretar proMMP-2 y proMMP-9 y aunque el amnios tiene una menor capacidad de respuesta al estímulo con LPS, los resultados indican claramente que esta zona de la membrana puede transducir dicho estímulo hacia la coriodecidua, con la que coopera y se coordina para secretar al espacio extracelular proMMP-2 y proMMP-9, las cuales ejercen su capacidad proteolítica sobre los distintos elementos de la MEC.

A este respecto, el análisis histológico muestra que las membranas estimuladas con LPS desarrollaron un extenso patrón de degradación en la zona compacta, región de la cual derivan su fuerza y elasticidad. Cabe señalar que después de la estimulación, las membranas presentaron un claro hinchamiento, resultado probablemente, de la exposición e hidratación de los proteoglicanos abundantes en esta zona (Draper y cols., 1995).

Durante el proceso normal del embarazo existe un fino balance entre las MMP's y los TIMP's, lo que permite el remodelado coordinado y equilibrado de las MHC durante el crecimiento fetal. Sin embargo, en procesos como trabajo de parto, RPM e infección intrauterina, el balance entre metabolismo y degradación de MEC se rompe favoreciendo la proteólisis, la cual explica fenómenos como el borrado del cérvix y la ruptura de las membranas (Vadillo-Ortega y cols., 1996; Fortunato y cols., 2000b).

Estudios pioneros del mecanismo molecular que regula la RPM indican que el incremento en la actividad de la MMP-9 en líquido amniótico se presenta tanto en mujeres con embarazo normal como en aquellas que desarrollaron RPM, sin embargo, en estas últimas, se encuentra acompañado de la disminución en la

secreción y actividad de TIMP-1, lo que supone la inclinación de la balanza del metabolismo de colágena hacia su degradación aumentada (Vadillo-Ortega y cols., 1996).

Se ha demostrado, que cuando las MCH en cultivo se ponen en contacto con LPS, se induce en éstas el incremento significativo a nivel de la transcripción y síntesis de la proMMP-2 y proMMP-9, tanto en corion como en amnios, incremento asociado a la disminución en la síntesis de TIMP2 que regula la actividad de ambas enzimas; la conjunción de estos factores se traduce en la alteración del equilibrio estequiométrico que existe entre las gelatinasas y sus inhibidores, cambiando la relación 1:1 de las condiciones basales a 3.2:1 (Fortunato y cols., 1997; 2000a).

La prueba para determinar la concentración de TIMP1 y TIMP2 en las dos caras de la membrana, indicó que ninguno de los dos inhibidores presentó cambios significativos después del estímulo con la endotoxina, una posible interpretación es que la agudeza del estímulo no permitió caracterizar posibles cambios en el patrón de secreción.

Como se ha explicado anteriormente, la extensa degradación de la MEC de las membranas tratadas con LPS indican que la actividad colagenolítica y gelatinolítica se incrementó significativamente, lo que necesariamente y apegados a un sentido biológico es el resultado del aumento en la actividad enzimática de la MMP-2 y la MMP-9; sin embargo, las pruebas de ELISA no detectaron cambios estadísticamente significativos en la concentración de la forma activa de ambas enzimas 24h después del estímulo inicial.

La aparente incongruencia de estos resultados, puede explicarse en parte a que la vida media de las formas activas es menor que la de los zimógenos, por lo que probablemente el momento en el que se hicieron las determinaciones (24h) y en el que el efecto sobre la membrana estaba ya ampliamente extendido, no fue el más adecuado para poder caracterizar un cambio en el patrón de actividad.

En contraste a los efectos del LPS, la estimulación de las MCH con *Streptococcus agalactiae* deriva en la secreción de IL-1 $\beta$  únicamente por la coriodecidua, estos resultados apoyan la idea de que la coriodecidua es la única fuente de síntesis de IL-1 $\beta$  y que esta región contiene los elementos de reconocimiento de *Streptococcus agalactiae*; sin embargo, como explicamos previamente, la IL-1 $\beta$  puede alcanzar eventualmente el compartimento amniótico por una vía de tráfico intramembranosa (Menon y cols., 1995; Rajasingam y cols., 1998).

En condiciones *in vivo* el *Streptococcus agalactiae* enciende la vía inmune innata mediante la activación de macrófagos/monocitos a través de la interacción del ácido lipoteicoico con CD36/TLR2, lo que se traduce en la síntesis de diversas citocinas que activan a su vez la respuesta adaptativa (Beutler, 2004). Sin embargo, el mecanismo mediante el cual esta bacteria se adhiere e infecta células inmunológicamente no profesionales e induce en éstas la síntesis y secreción de factores proinflamatorios, es aún escasamente entendido (Newton y Clark, 1988; Winram y cols., 1998). Existen algunas evidencias que indican que el ácido lipoteicoico, el lipopolisacárido capsular, así como diversas proteínas de adhesión

están involucradas en la invasión de estas bacterias en distintos tipos celulares (Gibson y cols., 1993; Herbert y cols., 2004).

Diversos estudios demuestran que el *Streptococcus agalactiae* es capaz de adherirse a las MCH (Galask y cols., 1984; Shoonmaker y cols., 1989), principalmente a las células de la región coriodecidual, las cuales internalizan a las bacterias mediante un mecanismo regulado por un proceso de polimerización de actina. Por otra parte, se ha demostrado que el amnios parece ser más resistente a la permeación e infección de *Streptococcus agalactiae*, lo que la identifica como una barrera eficiente que protege a la cavidad amniótica de este microorganismo (Winram y cols., 1998). Estas observaciones pueden explicar en parte la aparente incapacidad de las células epiteliales del amnios para sintetizar IL-1 $\beta$  en respuesta al contacto con el *Streptococcus agalactiae*.

En nuestro estudio, tanto la coriodecidual como el amnios mostraron una capacidad intrínseca para sintetizar TNF $\alpha$  como resultado del estímulo con *Streptococcus agalactiae*; sin embargo, la región coriodecidual fue la principal fuente de secreción de esta citocina, tanto cuando el estímulo se hizo inicial y directamente en esta región, como cuando el amnios recibió el estímulo primario, esto refuerza la hipótesis de la existencia de una vía de señalización intramembranosa.

Una inquietud surge cuando la membrana es estimulada simultáneamente en ambas caras, se observó una muy baja respuesta del corion y una nula respuesta del amnios en función de la secreción de ambas citocinas, es posible que una señal contrarregulatoria fuera intercambiada entre los tejidos, resultando

en un estado de pseudoenergía a *Streptococcus agalactiae*. La posibilidad de que esta situación ocurra *in vivo* es altamente improbable, pero indudablemente se requiere de mayor investigación.

Ahora bien, la estimulación con la bacteria viva en las MCH permitió caracterizar el papel activo que juegan ambas regiones en la síntesis y secreción de proMMP-2 y proMMP-9, enzimas que si bien fueron secretadas tanto por la cara fetal como materna, fue en esta última la que desplegó el mayor incremento, ya que respondió tanto al estímulo directo como a las señales enviadas por el amnios cuando éste fue estimulado.

Los ensayos de ELISA no permitieron identificar la existencia de cambios significativos en la cantidad de enzima activa en el medio de cultivo, ni en los niveles secretados al medio de TIMP-1 y TIMP-2. A este respecto, un elemento clave para interpretar integralmente los resultados, se encuentra en la comprensión de los mecanismos de transporte y regulación de las vías de activación intramembranales de la proMMP-2 y proMMP-9; lo que tal vez nos permitiría entender el por qué a pesar de no poder caracterizar el incremento significativo en la forma activa de ambas enzimas, ni la disminución en los niveles de los TIMP's, sí podemos demostrar la existencia de un extenso proceso catabólico de los distintos elementos de la MEC en las MCH después de la estimulación tanto con la endotoxina como con el *Streptococcus agalactiae*.

A pesar de que en numerosos trabajos se demuestran cambios en los niveles de secreción de estos marcadores, prácticamente ninguno estudia la forma activa de las enzimas, ni las vías de activación de las mismas. Actualmente, en

nuestro laboratorio se han comenzado a desarrollar algunos métodos que permitan analizar y responder este tipo de interrogantes.

Es importante mencionar que en el presente estudio, se analizó el efecto de la infección con *Streptococcus agalactiae* sobre la secreción y actividad de las dos enzimas cuya actividad gelatinasa ha sido asociada con eventos de RPM complicados con infección intramniótica; sin embargo, existen antecedentes que indican que metaloproteasas como MMP-3, MMP-11 (So y cols., 1992; Fortunato y cols., 1999), MMP-8 (Angus y cols., 2001) y la MMP-1 (Bryant-Greenwood y Yamamoto 1995) juegan también un papel importante en el establecimiento y progresión de un proceso degradativo en las membranas fetales.

Actualmente hay pruebas documentales que sostienen que ciertos microorganismos asociados a infecciones cervicovaginales, secretan proteasas capaces de degradar elementos de la matriz extracelular, provocando de manera directa, reducción en la fuerza y elasticidad de las membranas (McGregor y cols., 1987; Schoonmaker y cols., 1989; Katura y cols., 1989; Draper y cols., 1995); sin embargo, es poco probable que la actividad proteolítica derivada de bacterias cuente con proteínas con especificidad por los elementos de la MEC; que bajo condiciones fisiológicas son bastante resistentes a la actividad de proteasas diferentes a las MMPs, que solamente son producidas por células eucariontes.

Sabemos que parte del debilitamiento de la estructura de las MCH después de los estímulos infecciosos puede ser explicado por la disminución en la celularidad de las mismas, consecuencia de la muerte celular por apoptosis, mediada y acelerada en gran parte por los diferentes mediadores proinflamatorios



que son producidos en respuesta a la infección. Datos en la literatura indican que el epitelio amniótico, que en nuestro estudio mostró tener la capacidad intrínseca para sintetizar  $TNF\alpha$ , uno de los principales factores proapoptóticos que se han caracterizado, es la región de las MCH que presenta un claro patrón de muerte por apoptosis en casos de RPM complicados con corioamnioitis (Lei y cols., 1996; Espinoza y cols., 2002; Fortunato y cols., 2000b, 2002; Arechavaleta y cols., 2002b).

Los resultados de este proyecto de investigación aportan información adicional que permite una mejor comprensión sobre el origen celular de factores proinflamatorios y prodegradativos cuyo incremento en líquido amniótico y tejidos gestacionales es bien conocido en mujeres con infección intramniótica (Romero y cols., 1988; Asrat, 2001)

El hecho de que la coriodecidual sea la región que sintetiza más activamente  $IL-1\beta$  y  $TNF\alpha$ , puede explicar las cantidades significativas de proMMP-2 y proMMP-9 que son secretadas por esta zona de las MCH y consolida a la región coriodecidual como la que coordina la respuesta ante estímulos inmunológico-infecciosos que favorece el microambiente inmunológico que dicta la continuidad o no del embarazo.

La complejidad en los patrones de secreción de  $IL-1\beta$  y  $TNF\alpha$  y el hecho de que la coriodecidual sea una región con la capacidad de responder a señales autócrinas y a señales procedentes del extremo opuesto de la membrana, pueden ser explicadas en parte a la sensibilidad que otorga la expresión de receptores de membrana como  $TNF\alpha R$  p55 (TNF-RI),  $TNF\alpha$  p75 (TNF-RII), IL-1R (Beargen y

cols., 1994; Steinbom y cols., 1998 a, 1998b), que se expresan en poblaciones de corion y decidua y que pueden revelar parte de la enormemente compleja red de señalizaciones e interacciones autócrinas y parácrinas que existen en las distintas poblaciones celulares de las membranas fetales.

Adicionalmente, nos permite reconocer las limitadas capacidades de secreción del amnios, situación que en parte puede ser explicada por la sensibilidad de las células del epitelio amniótico a factores proinflamatorios para los que sólo expresa el TNF-RI (Steibom y cols., 1998 a), lo que acota sensiblemente su capacidad de respuesta. Sin embargo, nuestros resultados permiten caracterizar en esta región, la capacidad de transducir señales hacia la coriodecidua, permitiendo de esta forma una respuesta oportuna y coordinada del corioamnios.

Evidencia reciente de un mediador derivado de amnios capaz de activar al corion bajo condiciones relacionadas con la infección, ha sido descrito por Ognjanovic y Bryant-Greenwood (2002), ellos han demostrado que el "B-cell colony-enhancing factor", es una citocina que es expresada constitutivamente por las MCH durante el embarazo pero que se incrementa en procesos de corioamnioititis.

La carga genética que regula la respuesta inflamatoria, puede explicar la respuesta variable de las membranas a la infección; como se ha demostrado recientemente, algunas MCH acarrean un polimorfismo genético que explica la presencia de genes hiper-responsivos de IL-1 $\beta$  y/o TNF $\alpha$ , que sintetizan grandes cantidades de citocinas en condiciones basales y en respuesta a estímulos

inmunológico-infecciosos (Roberts y cols., 1999; Hernández-Guerrero y cols., 2003). Aunque nosotros no evaluamos esta parámetro, creemos que las variaciones en las concentraciones basales de estas citocinas en las MCH en cultivo, puede ser explicado desde el punto de vista genético.

En este estudio, obtuvimos elementos de prueba que nos permiten afirmar que las MCH pueden reaccionar diferencialmente al arribo de microorganismos, dependiendo de la ruta primaria de contacto (amnios o coriodecidual) o de la naturaleza del estímulo (organismo completo o producto soluble).

Adicionalmente podemos sugerir la existencia de al menos dos mecanismos de activación: uno dependiente de la interacción de productos solubles como LPS y un segundo mecanismo que puede ser explicado en parte por el reconocimiento de EGB por células inmunes localizadas en la cara de la coriodecidual y que permiten iniciar una respuesta inflamatoria.

Todo lo anteriormente expuesto, supone la existencia de una vía de transporte y señalización intermembranosa no caracterizada que permite entablar una activación coordinada, cooperativa y bidireccional entre las distintas poblaciones celulares que constituyen al corioamnios humano.

### 13. CONCLUSIONES

- ◆ EL  $TNF\alpha$  ES EL PRINCIPAL MODULADOR INFLAMATORIO SINTETIZADO POR LAS MEMBRANAS CORIOAMNIÓTICAS HUMANAS DESPUÉS DE LA ESTIMULACIÓN SELECTIVA CON LIPOPOLISACÁRIDO BACTERIANO.
- ◆ LA  $IL-1\beta$  ES LA CITOCINA SINTETIZADA EN MAYOR CANTIDAD POR LAS MEMBRANAS CORIOAMNIÓTICAS HUMANAS COMO RESULTADO DE LA ESTIMULACIÓN SELECTIVA CON *Streptococcus agalactiae* .
- ◆ EL ESTÍMULO SELECTIVO CON LIPOPOLISACÁRIDO O *Streptococcus agalactiae*, INDUCE EL INCREMENTO SIGNIFICATIVO DE LA SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE LAS ENZIMAS MMP-2 Y MMP-9 QUE DEGRADAN DISTINTOS ELEMENTOS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR DEL CORIOAMNIO HUMANO.
- ◆ LA MMP-2 Y LA MMP-9 SON PARTE DE LA MAQUINARIA ENZIMÁTICA RESPONSABLE DEL DEBILITAMIENTO ESTRUCTURAL DE LAS MEMBRANAS CORIOAMNIÓTICAS HUMANAS ESTIMULADAS CON LIPOPOLISACARIDO O *Streptococcus agalactiae* .

- ◆ LOS PATRONES DE SECRECIÓN DE TIMP-1 Y TIMP-2 PERMANECEN SIN CAMBIOS SIGNIFICATIVOS DESPUES DE LA ESTIMULACIÓN CON LIPOPOLISACÁRIDO O *Streptococcus agalactiae*.
  
- ◆ INDEPENDIENTEMENTE DE LA ZONA INICIAL DE CONTACTO, LA CORIODECIDUA ES LA PRINCIPAL REGIÓN DE LAS MEMBRANAS CORIOAMNIÓTICAS HUMANAS CAPAZ DE SINTETIZAR IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , proMMP-2 Y proMMP-9 EN RESPUESTA AL ESTÍMULO CON LIPOPOLISACÁRIDO O *Streptococcus agalactiae*.
  
- ◆ LAS MEMBRANAS CORIOAMNIÓTICAS HUMANAS PUEDEN REACCIONAR DIFERENCIALMENTE AL ARRIBO DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS, DEPENDIENDO DE LA RUTA PRIMARIA DE CONTACTO (AMNIOS O CORIODECIDUA) O DE LA NATURALEZA DEL ESTÍMULO (MICROORGANISMO COMPLETO O PRODUCTO SOLUBLE).
  
- ◆ EXISTE UNA VÍA DE TRANSPORTE Y SEÑALIZACIÓN INTERMEMBRANOSA NO CARACTERIZADA QUE PERMITE ENTABLAR UNA ACTIVACIÓN COORDINADA, COOPERATIVA Y BIDIRECCIONAL ENTRE LAS DISTINTAS POBLACIONES CELULARES QUE CONSTITUYEN AL CORIOAMNIOS HUMANO.

#### 14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Angus SR, Segel SY, Hsu CD, Locksmith GJ, Clark P, Samuel MD, Macones GA, Struss III JF, Parry S. **Amniotic fluid matrix metalloproteinase-8 indicates intra-amniotic infection.** Am J Obstet Gynecol 2001; 185: 1232-1238.
- Aplin JD, Campbell S, Donnai P, Bard JBL, Allen TD. **Importance of vitamin C in maintenance of the normal amnion: an experimental study.** Placenta 1986; 7:377-389.
- Arechavaleta-Velasco F, Ogando D, Parry S, Vadillo-Ortega F. **Production of matrix metalloproteinase-9 in lipopolysaccharide-stimulated human amnion occurs through an autocrine and paracrine proinflammatory cytokine-dependent system.** Biol Reprod 2002a; 67:1952-1958.
- Arechavaleta-Velasco F, Mayon-González J, González-Jimenez M, Hernández-Guerrero C, Vadillo-Ortega F. **Association of type II apoptosis and 92-kDa type IV collagenase expression in human amniochorion in prematurely ruptured membranes with tumor necrosis factor receptor-1 expression.** J Soc Gynecol Investig 2002b; 9:60-67.
- Artal R, Sokol RJ, Neuman M, Burstein AH, Stojkov J. **The mechanical properties of prematurely and non-prematurely ruptured membranes.** Am J Obstet Gynecol 1976; 125:655-683.
- Artal R, Burgeson R, Fernandez FJ, Hobel CJ. **Fetal and maternal copper levels in patients at term with and without premature rupture of membranes.** Obstet Gynecol 1979; 53:608-610.
- Asrat T. **Intra-amniotic infection in patients with preterm prelabor rupture of membranes. Pathophysiology, Detection, and Management.** Clin Perinatol 2001;28:735-751.
- Athayde N, Edwin, SS, Romero, R, Gomez R, Maymon E, Pacora, P, Menon R. **A role for matrix metalloproteinase-9 in spontaneous rupture of the fetal membranes.** Am J Obstet Gynecol 1998; 179:1248-1253.

- Athayde N, Romero R, Maymon E, Gomez R, Pacora P, Araneda H, Yoon BH. **A role for the novel cytokine RANTES in pregnancy and parturition.** Am J Obstet Gynecol 1999; 181:989-994.
- Athayde N, Romero R, Maymon E, Gomez R, Pacora P, Yoon BH, Edwin SS. **Interleukin 16 in pregnancy, parturition, rupture of fetal membranes, and microbial invasion of the amniotic cavity.** Am J Obstet Gynecol 2000; 182:135-141.
- Barabas AP. **Ehlers-Danlos syndrome: associated with prematurity and premature rupture of fetal membranes, possible increase in incidence.** Biol Mol J 1966; 5515:682-684.
- Baergen R, Benirschke K, Uliche TR. **Cytokine expression in the placenta; the role of interleukin-1, receptor-antagonist expression in chorioamnionitis and parturition.** Arch Path Lab Med 1994; 118:52-55.
- Barclay CG, Brennand JE, Kelly RW, Calder AA. **Interleukin-8 production by the human cervix.** Am J Obstet Gynecol 1993; 169:625-632.
- Barsig J, Kuesters S, Vogt K, Volk D, Tiegs G, Wendel A. **Lipopolysaccharide-induced interleukin-10 in mice: role of endogenous tumor necrosis factor- $\alpha$ .** Eur J Immunol. 1995; 25:2888-2893.
- Bautler B. **Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signaling.** Nature 2004; 430:257-263.
- Boggess KA, Watts DH, Hillier SL, Krohn MA, Benedetti TJ, Eschenbach DA. **Bacteremia shortly after placental separation during cesarean delivery.** Obstet Gynecol 1996; 87:779-784.
- Bowen JM, Chamley L, Keelan JA, Mitchel MD. **Cytokines of the placenta and extra-placental membranes:role and regulation during human pregnancy and parturition.** Placenta 2002; 23:257-273.
- Bradford MM. **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.

- Brown MB, Peltier M, Hillier M, Crenshaw B, Reyes L. **Genital mycoplasmosis in rats: a model for intrauterine infection.** Am J Reprod Immunol 2001; 46:243-241.
- Bryant-Greenwood GD, Yamamoto SY. **Control of peripartal collagenolysis in the human chorion-decidua.** Am J Obstet Gynecol 1995; 172:63-70.
- Bryant-Greenwood GD. **The extracellular matrix of the human fetal membranes: structure and function.** Placenta 1998a; 19:1-11.
- Bryant-Greenwood GD, Millar LD, Yamamoto SY, Bogic LV, Tashima L. **Preterm birth: the premature rupture of the fetal membrane in the absence of infection.** Prenat Neonat Med 1998b; 3:60-63.
- Cai Z, Pan ZL, Pang Y, Evans OB, Rhodes PG. **Cytokine induction in fetal rat brains and brains injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration.** Pediatr Res 2000; 47: 67-42.
- Casey ML, McDonald PC. **Biomolecular processes in the initiation of parturition: decidual activation.** Clin Obstet Gynecol 1988; 31:533-552.
- Casey ML, McDonald PC. **Interstitial collagen synthesis and processing in human amnion: a property of the mesenchymal cells.** Biol Reprod 1996;55:1253-1260.
- Casanueva E, Vadillo-Ortega F, Pfeffer F, Tejero E. **Vitamin C and premature rupture of chorioamniotic membranes.** Nut Res 1998; 18:63-70.
- Challis JRG, Smith SK. **Fetal Endocrine Signals and Preterm Labor.** Biol Neonate 2001; 79:163-167.
- Cheng-Rae R, Won-Jong Oh, Byung-Koo Y, Je-Ho L. **Up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in human myometrium during labour: a cytokine-mediated process in uterine smooth muscle cells.** Mol Hum Reprod 2000; 6:96-102.
- Creatas G, Palvlatos M, Lolis D, Aravantinos D, Kaskarelis D. **Bacterial contamination of the cervix and premature rupture of membranes.** Am J Obstet Gynecols, 1981; 139:522-525.



- Cox SM, MacDonald PC, Casey ML. **Assay of bacterial endotoxin (lipopolysaccharide) in human amniotic fluid: potential usefulness in diagnosis and treatment of preterm labor.** Am J Obstet Gynecol 1988; 159:99-106.
- Curran S, Murray GI. **Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis.** J Pathol 1999, 189:300-308.
- Draper D, McGregor J, Hall J, Jones W, Bautz M, Heine P, Porreco R. **Elevated protease activities in human amnion and chorion correlate with preterm premature rupture of membranes.** Am J Obstet Gynecol 1995; 173:1506-1512.
- Dudley DJ, Trautman MS, Araneo BA, Edwin SS, Mitchell MD. **Decidual cell biosynthesis of interleukin-6: regulation by inflammatory cytokines.** J Clin Endocrinol Metab 1992a; 74:884-889.
- Dudley DJ, Trautman MS, Edwin SS, Ludin-Schiller S, Mitchell MD. **Biosynthesis of interleukin-6 by cultured human chorion leave cells: regulation by cytokines.** J.Clin Endocrinol Metab 1992b; 75:1081-1086.
- Dudley DJ, Trautman MS, Mitchell MD. **Inflammatory mediators regulate interleukin-8 production by cultured gestational tissues: evidence for a cytokine network at the chorio-decidual interface.** J Clin Endocrinol Metab 1993; 76:404-410.
- Dudley DJ, Edwin SS, Dangerfield A, Van Waggoner J, Mitchell MD. **Regulation of cultured human chorion cell chemokine production by group B streptococci and purified bacterial products.** Am J Repd Immunol 1996a; 36:264-268.
- Dudley DJ, Hunter C, Mitchell MD, Vamer MW. **Elevation of amniotic fluid macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  concentrations in women during term and preterm labor.** Obstet Gynecol 1996b; 87:94-98.
- Dudley DJ, Hunter C, Vamer MW, Mitchell MD. **Elevation of amniotic fluid interleukin-4 concentrations in women with preterm labor and chorioamnionitis.** Am J Perinatol 1996c; 13: 443-444.
- Dudley DJ, Edwin SS, Dangerfield A, Jackson K, Trautman MS. **Regulation of decidual cell and chorion cell production of interleukin-10 by purified bacterial products.** Am J Reprod Immunol 1997a; 38:246-251.

- Dudley DJ, Edwin SS, Wagoner JV, Augustine NH, Hill HR, Mitchell DP. **Regulation of decidual cell chemokine production by group B streptococci and purified bacterial cell wall components.** Am J Obstet Gynecol 1997b; 177:666-72.
- Ekwo EE, Gosselink CA, Woolson R, Moawad A. **Risks of premature rupture of amniotic membranes.** Internat J Epidemiology 1993; 22:495-503.
- Elliot CL, Slater DM, Dennes W, Poston L, Bennett PR. **Interleukin 8 expression in human myometrium : changes in relation to labor onset and with gestational age.** Am J Reprod Immunol 2000; 43:272-277.
- Eschenbach D. **Amniotic fluid infection is a fetal infection.** Prenat Neonat Med 1998; 3:76-81.
- Espinoza J, Chaiworapongsa T, Romero R, Edwin S, Rathnasabapat C, Gomez R, Bujold E, Camacho N, Kim YM, Hassan S, Blackwell S, Whitty J, Berman S, Redman M, Yoon BH, Sorokin Y. **Antimicrobial peptides in amniotic fluid: defensins, calprotectin and bacterial/permeability-increasing protein in patients with microbial invasion of the amniotic cavity, intra-amniotic inflammation, preterm labor and premature rupture of membranes.** J Matern Fetal Neonatal Med 2003; 13:2-21.
- Estrada G, Vadillo-Ortega F, Jiménez MA, Beltran J, Giono S. **Caracterización bioquímica y ultraestructural del efecto de la interleucina 1-β como mediador de degradación de tejido conectivo en membranas corioamnióticas humanas en cultivo.** Ginec Obstet Mex 2002; 70:190-195.
- Fortunato SJ, Menon R, Swan KF. **Expression of TNF-α and TNFR, p55 in cultured amniochorionic membrane.** Am J Reprod Immunol 1994; 32:188-193.
- Fortunato SJ, Menon R, Swan KF. **Amniochorion: a source of interleukin-8.** Am J Reprod Immunol 1995; 34:154-162.
- Fortunato SJ, Menon R, Swan KF, Menon R. **Inflammatory cytokine (interleukins 1,6, and 8 and tumor necrosis factor-α) release from cultured human fetal membranes in response to endotoxic lipopolysaccharide mirrors amniotic fluid concentrations.** Am J Obstet Gynecol 1996; 174:1855-1862.

- Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. **Collagenolytic enzymes (gelatinases) and their inhibitors in human amniochorionic membrane.** Am J Obstet Gynecol 1997; 177:731-741.
- Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. **MMP/TIMP imbalance in amniotic fluid during PROM: an indirect support for endogenous pathway to membrane rupture.** J Perinat Med 1999a; 27:362-368
- Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. **Stromelysins in placental membranes and amniotic fluid with premature rupture of membranes.** Obstet Gynecol 1999b; 94:435-440.
- Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. **Amniochorion gelatinase-gelatinase inhibitor imbalance in vitro: a possible infectious pathway to rupture.** Obstet Gynecol 2000a; 95:240-244.
- Fortunato SJ, Rambkumar M, Bryant C, Lombardi SJ. **Programmed cell death (apoptosis) as a possible pathway to metalloproteinase activation and fetal membrane degradation in premature rupture of membranes.** Am J Obstet Gynecol 2000b; 182:1468-1476.
- Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. **Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the premature rupture of membranes and preterm labor pathways.** Am J Obstet Gynecol 2002; 187:1159-1162.
- Gardella C, Hitti J, Martin TR, Ruzinski JT, Eschenbach D. **Amniotic fluid lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 as mediators of the inflammatory response in preterm labor.** Am J Obstet Gynecol 2001; 184:1241-1248.
- Gaslak RP, Vamer MW, Rosemarie PC, Wilbur SL. **Bacterial attachment to the chorioamniotic membranes.** Am J Obstet Gynecol 1984; 148:915-926.
- Gerlier D, Thomasset N. **Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation.** J. Immunol Methods 1986; 94:57-63.
- Gibb W, Challis JR. **Mechanisms of term and preterm birth.** J Obstet Gynaecol Can. 2002; 24: 874-883.
- Gibson RL, Lee MK, Soderland C, Chi EY, Rubens CE. **Group B Streptococci invade endothelial cells: type III capsular polysaccharide attenuates invasion.** Infect Immun 1993; 61:478-485.

- Goldenberg RL, Andrews WW, Hauth JC. **Markers of preterm birth.** *Prenat Neonat Med* 1998; 3:43-46.
- Goldschmidt JC, Panos C. **Teichoic acids of *Streptococcus agalactiae*; chemistry, cytotoxicity, and effect on bacterial adherence to human cells in tissue culture.** *Infect Immun* 1984; 43:670-677.
- Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. **Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions.** *Eur J Cell Biol* 1997a; 74: 111-122.
- Gomez R, Romero R, Edwin SS, David C. **Pathogenesis of preterm labor and preterm premature rupture of membranes associated with intraamniotic infection.** *Infec Dis Clin North Am* 1997b; 11:135-176.
- Gravett MG, Witkin SS, Novy MJ. **A Nonhuman primate model for chorioamnionitis and preterm labor.** *Sem Reprod Endocrinol* 1994; 15:210-224.
- Greig PC. **The diagnosis of intrauterine infection in women with preterm premature rupture of the membranes (PPROM).** *Clin Obstet Gynecol* 1998; 41:849-863.
- Halabourt JT, Uldberg N, Helmig R, Ohlsson K. **The concentration of collagen and collagenolytic activity in the amnion and the chorion.** *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1989; 31: 75-82.
- Harirah H, Donia SE, Hsu CD. **Amniotic fluid matrix metalloproteinase-9 and interleukin-6 in predicting intra-amniotic infection.** *Obstet Gynecol* 2002; 99: 80-84.
- Heddleston L., McDuffie RS, Gibbs RS. **A rabbit model for ascending infection in pregnancy: intervention with indomethacin and delayed ampicillin-sulbactam therapy.** *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169:708-712.
- Herbert MA, Beveridge CJE, Saunders NJ. **Bacterial virulence factors in neonatal sepsis: group B streptococcus.** *Curr Opin Infect Dis* 2004; 17: 225-229.
- Hernandez-Guerero C, Monzon-Bordanoba F, Jimenez-Zamudio L, Ahued-Ahued R, Arachavelta F, Strauss JF, Vadillo-Ortega F. **In vitro secretion of proinflammatory cytokines by human amniochorion carrying hyper-**

**responsive gene polymorphisms of tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$ .** Mol Hum Reprod 2003; 9:1-5.

- Holmlund U, Cebers G, Dahlfor AR, Sandstedt B, Bremme K, Ekstrom ES, Scheynius A. **Expression and regulation of the pattern recognition receptors Toll-like receptor-2 and Toll-like receptor-4 in the human placenta.** Immunology 2002, 107:145-151.
- Hsu CD, Meaddough E, Aversa K, Hong SF, Lu LC, Jones DC, Copel JA. **Elevated amniotic fluid levels of leukemia inhibitory factor, interleukin 6, and interleukin 8 in intra-amniotic infection.** Am J Obstet Gynecol 1998; 179:1267-1270.
- Huang HY, Wen Y, Irwin JC, Kruessel JS, Soong YK, Polan ML. **Cytokine-mediated regulation of 92-kilodalton type IV collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), and TIMP-3 messenger ribonucleic acid expression in human endometrial stromal cells.** J Clin Endocrinol Metab 1998; 83:1721-1729.
- Hulbooy DL, Rudolph LA, Matrisina LM. **Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function.** Mol Hum Reprod 1997, 3: 27-45.
- Ito A, Sato T, Iga T, Mori Y. **Tumor necrosis factor bifunctionally regulates matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) production by human fibroblasts.** FEBS Lett 1990; 269:93-95.
- Kanayama N, Terao T, Kawashima Y, Horiuchi K, Fujimoto D. **Collagen types in normal and prematurely ruptured amniotic membranes.** Am J Obstet Gynecol 1985; 153:899-903.
- Katsura M, Ito A, Hirakawa S, Mori Y. **Human recombinant interleukin-1 $\beta$  increases biosynthesis of collagenase and hyaluronic acid in cultured human chorionic cells.** FEBS Lett 1989; 244:315-318.
- Keelan JA, Coleman M, Mitchel MD. **The molecular mechanisms of term and preterm labor: recent progress and clinical implications.** Clin Obstet Gynecol 1997; 40:460-478.
- Kelly RW. **Inflammatory mediators and cervical ripening.** J Reprod Immunol 2002; 57:217-224.

- Kelly RW, Leask R, Calder AA. **Choriodecidual production of interleukin-8 and mechanism of parturition.** Lancet 1992; 339:776-777.
- Kemp B, Winkler M, Maas A, Maul H, Ruck P, Reineke T, Rath W. **Cytokine concentrations in the amniotic fluid during parturition at term: correlation to lower uterine segment values and to labor.** Acta Obstet Gynecol Scand 2002; 81:938-942.
- Kent ASH, Sullivan MHF, Elder MG. **Transfer of cytokines through human fetal membranes.** J Reprod Fertil 1994; 110:81-84.
- Knox IC Jr, Hoerner JK. **The role of infection in premature rupture of the membranes.** Am J Obstet Gynecol 1950; 59: 190-194.
- Kumazaki K, Nakayama M, Yanagihara I, Suehara N, Wada Y. **Immunohistochemical distribution of Toll-like receptor-4 in term and preterm human placenta from normal and complicated pregnancy including chorioamnionitis.** Hum Pathol 2004; 35:47-54.
- Laham N, Brennecke SP, Rice GE. **Interleukin-8 release from human gestational tissue explants: effects of gestation, labor and chorioamnionitis.** Biol Reprod 1999; 61:823-827.
- Lappas M, Permezel M, Rice GE. **N-Acetyl-cysteine inhibits phospholipid metabolism, proinflammatory cytokines release, protease activity, and nuclear factor-kappa B deoxyribonucleic acid-binding activity in human fetal membranes in vitro.** J. Clin Endocrinol Metab 2003; 88:1723-1729.
- Lei H, Vadillo-Ortega F, Paavola LG, Strauss JF. **92-Kda gelatinase (Matrix Metalloproteinase-9) is induced in rat amnion immediately prior to parturition.** Biol Reprod 1995; 53:339-344.
- Lei H, Furth EE, Kalluri R, Chiou T, Tilly KI, Tilly JL, Elkon BK, Jeffrey JJ, Strauss JF III. **A program of cell death and extracellular matrix degradation is activated in the amnion before the onset of labor.** J Clin Invest 1996; 98:1971-1978.
- Leslie KK, Lee SL, Woodcock SM, Davies JK, McDuffie RS, Hirsch E, Sherman MP, Eskens JL, Gibbs RS. **Acute intrauterine infection results in an imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines in the pregnant rabbit.** Am J Reprod Immunol 2000; 43:305-311.

- Locksmith GJ, Clark P, Duff P, Schultz GS. **Amniotic fluid matrix metalloproteinase-9 levels in women with preterm labor and suspected intra-amniotic infection.** *Obstet Gynecol* 1999; 94: 1-6.
- Lopez- Vancell R, Montfort I, Perez-Tamayo R. **Galactose-specific adhesin and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica*.** *Parasitol Res* 2000; 86:226-231.
- Lundin-Schiller S, Mitchell MD. **Prostaglandin production by human chorion leave cells in response to inflammatory mediators.** *Placenta* 1991; 12:353-363.
- Malak TM, Ockleford CD, Bell SC, Dalgleish R, Bright N, Macvicar J. **Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes.** *Placenta* 1993; 14:385-406.
- Malak TM, Mulholland G, Bell SC. **Morphometric characteristics of the decidua, cytotrophoblast, and connective tissue of the prelabor ruptured fetal membranes.** *Ann N Y Acad Sci* 1994;734:430-433.
- Maymon E, Romero R, Pacora P, Gervasi MT, Gomez R, Edwin SS, Yoon BH. **Evidence of in vivo differential bioavailability of the active forms of matrix metalloproteinases 9 and 2 in parturition, spontaneous rupture of membranes, and intra-amniotic infection.** *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183:887-894.
- Maymon E, Romero R, Pacora P, Gomez R, Mazor M, Edwin S, Chaiworapongsa T, Kim JC, Yoon HB, Menon R, Fortunato S, Berry SM. **A role for the 72 kDa gelatinase (MMP-2) and its inhibitor (TIMP-2) in human parturition, premature rupture of membranes and intraamniotic infection.** *J Perinat Med* 2001; 29:308-316.
- McDonald HM, O'Loughlin JA, Jolley PT, Vigneswaran R, Mc Donald PJ. **Changes in vaginal flora during pregnancy and association with preterm birth.** *J Infect Dis* 1994;170:724-728.
- McGregor JA, Lawellin D, Franco-Buff A, Todd JK, Makowski L. **Protease production by microorganisms associated with reproductive tract infection.** *Am J Obstet Gynecol* 1986;154:109-114.

- McGregor JA, French JI, Lawellin D, Franco-Buff A, Smith C, Tood JK. **Bacterial protease-induced reduction of chorioamniotic membrane strength and elasticity.** *Obst Gynecol* 1987;69:167-174.
- McGregor JA, French JI, Jones W, Parker R, Patterson E, Draper D. **Association of cervicovaginal infections with increased vaginal fluid phospholipase A2 activity.** *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167:1588-1594.
- McGregor JA, French JI. **Bacterial vaginosis in pregnancy.** *Obstet Gynecol Surv.* 2000; 55: S1-S19.
- Meadows, JW, Eis AL, Brockman DE, Myatt L. **Expression and localization of prostaglandin E sintaza isoforms in human fetal membranes in terms and preterm labor.** *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:433-9.
- Menon R, Swan KF, Lyden TW, Rote NS, Fortunato SJ. **Expression of inflammatory cytokines (interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6) in amniochorionic membranes.** *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172:493-500.
- Meráz-Cruz N, Molina DG, Vadillo-Ortega F. **Cambios secuenciales de metaloproteinasas de matriz extracelular durante la gestación y el trabajo de parto en el corioalantoides de la rata.** *Rev Inv Clin* 2003; 55:36-42.
- Mercer BM. **Preterm premature rupture of the membranes:etiology and implications for treatment .** *Prenat Neonat Med* 1998;3:91-97.
- Minkoff H. **Prematurity: infection as an etiologic factor.** *Obstet Gynecol* 1983; 62:137-144.
- Mitchel MD, Branch DW, Lundin-Schiller S, Romero RJ, Daynes RA, Dudley DJ. **Immunologic aspects of preterm labor.** *Sem Perinat* 1991; 15:210-224.
- Mitchell MD, Trautman MS, Dudley DJ. **Cytokine networking in the placenta.** *Placenta* 1993; 14:249-75.
- Modlin R, Bightbill H. **The Toll of innate immunity on microbial pathogens.** *N Engl J Med* 1999; 340:1834-1835.



- Moss TJ, Nitsos I, Newnham JP, Ikegami M, Jobe AH. **Chorioamnionitis induces by subchorionic endotoxin infusion in sheep.** Am J Obstet Gynecol 2003; 189:1771-1776.
- Moyo SR, Hagerstrand I, Nystrom L, Tswana SA, Blomberg J, Bergstrom S, Ljungh A. **Stillbirths and intrauterine infections, histologic Chorioamnionitis and microbiological findings.** Int J Gynecol Obstet 1996; 54:115-123.
- Murphy G, Docherty AJP. **The matrix metalloproteinases and their inhibitors.** Am J Respir Cell Mol Biol 1992; 7:120-125.
- Nagase H, Woessner F. **Matrix Metalloproteinases.** J Biol Chem 274:21491-21494.
- Narcio-Reyes ML, Polo E, Tejero E, López S, Casanueva E. **Etiología y sintomatología de la infección cervicovaginal en pacientes embarazadas y su relación con la incidencia de la ruptura prematura de membranas.** Perinatol Reprod Hum 1994; 8:207-211.
- Newton ER, Clark M. **Group B streptococcus and preterm rupture of membranes.** Obstet Gynecol 1988; 71:198-202.
- Newton ER. **Chorioamnionitis and intraamniotic infection.** Clin Obstet Gynecol 1993; 36:795-808.
- Nusrat A, Turner JR, Madara JL. **Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells.** Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2000; 279:851-857.
- Ognjanovic S, Bryant-Greenwood GD. **Pre-B-Cell colony-enhancing factor, a novel cytokine of human fetal membranes.** Am J Obstetric Gynecol 2002; 187:1051-1058.
- Paavola LG, Emma EF, Delgado V, Boyd CO, Jacobs C, Lei H, Strauss JF. **Striking changes in the structure and organization of rat fetal membranes precede parturition.** Biol Reprod 1995; 53:321-338.
- Pacora P, Romero R, Maymon E, Gervasi MT, Gomez R, Edwin SS, Yoon BH. **Participation of the novel cytokine interleukin 18 in the host**

**response to intra-amniotic infection.** Am J Obstet Gynecol 2000a; 183: 1138-1143.

- Pacora P, Maymon E, Gervasi MT, Gomez R, Edwin SS, Yooh BH, Romero R. **Lactoferrin in intrauterine infection, human parturition, and rupture of fetal membranes.** Am J Obstet Gynecol 2000b; 183:904-910.
- Parry-Jones E, Priya A. **A study of elasticity and tension of fetal membranes and of the relation of the area of the gestational sac to the area of the uterine cavity.** Br J Obstet Gynecol 1976; 83:205-212.
- Parry S, Strauss JF. **Premature Rupture of the fetal membranes.** N Engl J Med 1998; 338:663-668.
- Pfeffer F, Casanueva E, Kamar J, Guerra A, Perichart O, Vadillo-Ortega F. **Modulation of 72-Kilodalton type IV collagenase (matrix metalloproteinase-2) by ascorbic acid in cultured human amnion-derived cells.** Biol Reprod 1998; 59:326-329.
- Polette M, Birembaut P. **Membrane-type metalloproteinases in tumor invasion.** Int J Biochem Cell Biol 1998; 30:1195-1202.
- Pugin J, Shurer-Maly CC, Leturcq D, Moriarty A, Ulevitch RJ, Tobias PS. **Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14.** Proc Natl Acad Sci USA 1993; 249:1431-1433.
- Rajasingam D, Bennett R, Alvi SA, Elder MG, Sullivan MHF. **Stimulation of prostaglandin production from intact human fetal membranes by bacteria and bacterial products.** Placenta 1998; 19:301-306.
- Reisenberger K, Egarter C, Schiebel I, Obermair A, Kiss H, Lehner R. **In vitro cytokine and prostaglandin production by amnion cell in the presence of bacteria.** Am J Obstet Gynecol 1997; 176:981-984.
- Reisenberger K, Egarter C, Knöfler M, Schiebel I, Gregor H, Hirschl AM, Heinza G, Husslein P. **Cytokine and prostaglandin production by amnion cells in response to the addition of different bacteria.** Am J Obstet Gynecol 1998; 178:50-53.
- Riley SC, Leask R, Chard T, Wathen NC, Calder AA, Howe DC. **Secretion of matrix metalloproteinase-2, matrix metalloproteinase-9 and tissue**

**inhibitor of metalloproteinases into the intrauterine compartments during early pregnancy.** Mol Hum Reprod 1999; 5:376-381.

- Roberts AK, Monzon-Bordonaba F, Van Deerlin PG, Holder J, Macones GA, Morgan MA, Strauss JF, Parry S. **Association of polymorphism with the promotor of the tumor necrosis factor  $\alpha$  gene with increased risk of preterm premature rupture of the fetal membrane.** Am J Obstet Gynecol 1999; 180:1297-1302.
- Romero R, Lefreniere D, Duff GW, Kadar N, Durum S, Hobbins JC. **Failure of endotoxin to cross the chorioamniotic membranes in vitro.** Am J Perinatol 1987; 4:360-362.
- Romero R, Mazor M, Wu YK, Sirtori M, Oyarzun E, Mitchell MD, Hobbins JC. **Infection in the pathogenesis of preterm labor.** Sem Perinatol, 1988; 12:262-279.
- Romero R, Wu YK, Brody DT, Oyarzun E, Duff GW Durum SK. **Human decidua: A source of interleukin-1.** Obstet Gynecol 1989a; 73:31-34.
- Romero R, Roslanky P, Oyarzun E, Wan M, Emamian M, Novitsky TJ, Gould MJ, Hobbins JC. **Labor and Infection. II. Bacterial endotoxin in amniotic fluid and its relationship to the onset of preterm labor.** Am J Obstet Gynecol 1989b;158:1044-1049.
- Romero R, Brody DT, Oyarzun E, Mazor M, Wu YK, Hobbings JC, Durum SK. **Infection and labor. III. Interleukin-1: A signal for the onset of labor.** Am J Obstet Gynecol 1989c; 160: 1117-23.
- Romero R, Manogue KR, Mitchell MD, Wu YK, Oyarzun E, Hobbins JC, Cerami A. **Infection and preterm labor. IV. Cachectin-tumor necrosis factor in the amniotic fluid of women with intraamniotic infection and preterm labor.** Am J Obstet Gynecol 1989d; 161:336-41.
- Romero R, Avila C, Santhanam U, Sehgal PB. **Amniotic fluid interleukin-6 in preterm labor: Association with labor.** J Clin Invest 1990; 85:1392-1400.
- Romero R, Mazor M, Sepulveda W, Avila C, Copeland D, Williams J. **Tumor necrosis factor in preterm and term labor.** Am J Obstet Gynecol 1992; 166:1576-1587.

- Romero R, Chaiworapongsa T, Espinoza J, Gomez R, Yoon HB, Edwin S, Mazor M, Maymon E, Berry S. **Fetal plasma MMP-9 concentrations are elevated in preterm premature rupture of the membranes.** Am J Obstet Gynecol 2002; 187:1125-1130.
- Salamonsen LA. **Matrix Metalloproteinases and their tissue inhibitors in Endocrinology.** Trends Endocrinol Metab 1996; 7:28-34.
- Sato TA, Keelan JA, Gupta DK, Mitchell MD. **Gestational age-dependent effects of lipopolysaccharide on prostaglandin production by murine decidual caps.** Prostaglandin Leukot Essent Fatt Acid 2001; 64:135-138.
- Sato TA, Keelan JA, Mitchell MD. **Critical paracrine interactions between TNF $\alpha$  and IL-10 regulate lipopolysaccharide-stimulate human choriondecidual cytokine and prostaglandin E<sub>2</sub> production.** J Immunol 2003;170:158-166.
- Sbarra AJ, Selvaraj RJ, Cetrulo CL, Feingold M, Newton E, Thomas GB. **Infection and phagocytosis as possible mechanisms of rupture in premature rupture of the membranes.** Am J Obstet Gynecol 1985; 153:38-43.
- Schoonmaker JN, Lawellin DW, Lunt B, McGregor JA. **Bacteria and inflammatory cells reduce chorioamniotic membrane integrity and tensile strength.** Obstet Gynecol 1989;74: 590-596.
- Senior RM, Shapiro SD. **Introduction: the matrix metalloproteinase family.** Am J Respir Cell Mol Biol 1992; 7:119.
- Sennstrom MB, Ekman G, Westergren-Thorsson G, Malmstrom A, Bystrom B, Endresen U, Mlambo N, Norman M, Stabi B, Brauner A. **Human cervical ripening, an inflammatory process mediated by cytokines.** Mol Hum Reprod 2000; 6:375-381.
- Shubert PJ, Diss E, Iams JD. **Etiology of preterm premature rupture of membranes.** Obstet Gynecol Clin North Am 1992;19:251-263.
- Silver RM, Edwin SS, Trautman MS, Simons DL, Branch DW, Dudley DJ, Mitchell MD. **Bacterial lipopolysaccharide mediated fetal death: production of a newly-recognized form of inducible cyclooxygenase (COX-2) in murine decidua in response to lipopolysaccharide.** J Clin Invest 1995; 95:725-731.

- Silver RM, Edwin SS, Umar F, Dudley DJ, Mitchel MD. **Bacterial lipopolysaccharide-mediated murine fetal death:the role of interleukin-1.** Am J Obstet Gynecol 1997; 176:544-549.
- Singer CF, Marbais E, Lemoine P, Courtoy PJ, Eeckhout Y. **Local cytokines induce differential expression of matrix metalloproteinases but not their tissue inhibitors in human endometrial fibroblasts.** Eur J Biochem 1999; 259:40-45.
- Skinner SJM, Campos GA, Liggins GC. **Collagen content of human amniotic membranes: effect of gestation length and premature rupture.** Obstet Gynecol 1981; 57:487-489.
- So T, Ito A, Sato T, Mori Y, Hirakawa S. **Tumor necrosis factor- $\alpha$  simulates biosynthesis of matrix metalloproteinases and plasminogen activator in cultured human chorionic cells.** Biol Reprod 1992;46:772-778.
- Steinborn A, Kühnert M, Halberstadt E. **Immunomodulating cytokines induce term and preterm parturition.** J Perinat Med 1996; 24:381-390.
- Steinborn A, Gall CV, Hildenbrand R, Stutte HJ, Kaufmann M. **Identification of placental cytokine-producing cells in term and preterm labor.** Obstet Gynecol 1998a; 91:329-335.
- Steinborn A, Geisse M, Kaufmann M. **Expression of cytokine receptors in the placenta in term and preterm labour.** Placenta 1998b; 19:165-170.
- Stiemer B, Elder MG, Bisson S, Opri F, Weitzel HK, Sullivan MHF. **Transfer of interleukin-8 through human fetal membranes in vitro.** Med Sci Res 1998; 26:63-66.
- Stroup PE. **Amniotic fluid infection and the intact fetal membrane.** Obstet Gynecol 1962; 19:736-739.
- Svanborg C, Godaly G, Hedlund M. **Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defense.** Curr Opin Microbiol 1999; 2:99-105.

- Tayson JE, McCoshen JA, Dubin NH. **Inhibition of fetal membrane prostaglandin production by prolactin; relative importance in the initiation of labor.** Am J Obstet Gynecol 1985; 151:1032-1038.
- Trautman MS, Dundley DJ, Edwin SS, Collmer D, Mithchell MD. **Amnion Cell Biosynthesis of Interleukin-8: Regulation by Inflammatory cytokines.** J Cell Physiol 1992; 153:38-43.
- Tashima LS, Millar LK, Bryant-Greenwood GD. **Genes upregulated in human fetal membranes by infection or labor.** Obstet Gynecol 1999; 94:441-449.
- Turner MA, Shaikh SA, Greenwood SL. **Secretion of interleukin-1 beta and interleukin-6 by fragments of term human placental villi: signaling pathways and effects of tumor necrosis factor alpha and mode of delivery.** Placenta 2002; 23:467-474.
- Vadillo-Ortega F, González-Avila G, Karchmer S, Meraz-Cruz N, Ayala-Ruiz A, Selman-Lama M. **Collagen Metabolism in Premature Rupture of Amniotic Membranes.** Obstet Gynecol 1990; 75:84-88.
- Vadillo-Ortega F, González-Avila G, Furth EE, Lei H, Muschel RJ, Stetler-Stevenson WG, Strauss JF. **92-kd type IV Collagenase (Matrix Metalloproteinase-9) activity in human amniochorion increases with labor.** Am J Pathol 1995; 146:148-156.
- Vadillo-Ortega F, Hernández A, González-Avila G, Bermejo L, Iwata K, Strauss JF. **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; 174:1371-1376.
- Vadillo-Ortega F, Sadowsky DW, Haluska GJ, Hernández-Guerrero C, Guevara-Silva Rebeca, Gravett MG, Novy MJ. **Identification of matrix metalloproteinase-9 in amniotic fluid and amniochorion in spontaneous labor and after experimental intrauterine infection or interleukin-1 $\beta$  infusion in pregnant rhesus monkeys.** Am J Obstet Gynecol 2002;186:128-138.
- Vettrano IM, Roby J, Tolle T, Parks WC. **Collagenase-I, Stromelysin-I, and matrilysin are expressed within the placenta during multiple stages of human pregnancy.** Placenta 1996;17:557-563.

- Watari M, Watari H, Nachamkin I, Strauss JF. **Lipopolysaccharide induces expression of genes encoding pro-inflammatory cytokines and elastin-degrading enzyme, cathepsin S in human cervical smooth-muscle cells** . J Soc Gynecol Investig 2000; 7:190-198.
- Werb Z, Chin JR. **Extracellular matrix remodeling during morphogenesis**. Ann N Y Acad Sci 1998, 23:110-118.
- Williams MA, Mittendorf R, Stubblefield PG, Lieberman E, Schoenbaum SL. **Cigarettes, coffee and preterm premature rupture of the membranes**. Am J Epidemiology 1992; 135:895-903.
- Winkler M. **Role of cytokines and other inflammatory mediators**. BJOG 2003; 110 Suppl 20:118-23.
- Winkler M, Oberpichler A, Tschetsche H, Ruck P, Fischer DC, That W. **Collagenolysis in the lower uterine segment during parturition at term: correlations with stage of cervical dilatation and duration of labor**. Am J Obstet Gynecol 1999; 181:153-8.
- Winram SB, Jonas M, Chi E, Rubens CE. **Characterization of Group B Streptococcal Invasion of Human Chorion and Amnion Epithelial Cells in vitro**. Infect Immun 1998; 66:4932-4941.
- Woessner JF, Nagase H. **MMP Sequences**. En: Matrix Metalloproteinases and TIMPs. Oxford University Press, 2000, 1a Ed. Pp11-40.
- Woods JR. **Reactive oxygen species and preterm premature rupture of membranes- A Review**. Placenta 2001; 22: S38-S44.
- Yan X, Sun M, Gibb W. **Localization of nuclear factor-kappa B (NF kappa B) and inhibitory factor-kappa B (I kappa B) in human fetal membranes and decidua at term and preterm delivery**. Placenta 2002; 23: 288-293.
- Yoon BH, Romero R, Park JS, Chang JW, Kim YA, Kim JC, Kim KS. **Microbial invasion of the amniotic cavity with *Ureaplasma urealyticum* is associated with a robust host response in fetal, amniotic, and maternal compartments**. Am J Obstet Gynecol 1998; 179:1254-1260.
- Zahl PA, Bjerknes C. **Induction of decidua-placental hemorrhage in mice by the endotoxins of certain gram-negative bacteria**. Proc Soc Exp Biol Med 1943;54:329-232.

- Zimmerman EF, Potturi IB, Resnick E, Fisher JE. **Role of oxygen free radicals in cocaine-induced vascular disruption in mice.** *Teratology* 1994; 49:192-201.



## 15. ABREVIATURAS

### 15.1 ABREVIATURAS EN ESPAÑOL

EGB	Estreptococo del grupo B
HLA	Hidrolizado de lactoalbúmina
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IL-16	Interleucina-16
IL-18	Interleucina-18
LPS	Lipopolisacárido
MCH	Membranas corioamnióticas humanas
MEC	Matriz extracelular
MIP-1 $\alpha$	Proteína inflamatoria de macrófagos -1 $\alpha$
MMP's	Metaloproteasas de matriz extracelular
MMP-2	Metaloproteasa de matriz extracelular-2
MMP-9	Metaloproteasa de matriz extracelular-9
PG's	Prostaglandinas
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
RET	Resistencia eléctrica transmembranal
RPM	Ruptura prematura de membranas
SFB	Suero fetal bovino
TIMP1	Inhibidor tisular de metaloproteasas de matriz extracelular -1
TIMP2	Inhibidor tisular de metaloproteasas de matriz extracelular -2
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$

### 15.2 ABREVIATURAS EN INGLES

LBP	Lipopolysacharide binding protein
GBS	Group B Streptococci
NF-K $\beta$	Nuclear factor-kappa B
RANTES	Regulated on activation normal T cell expressed and secreted
PROM	Premature rupture of membranes
TLR	Toll-Like receptors

**16. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS DEL TRABAJO  
EXPERIMENTAL**

## Secretions of Interleukin-1 $\beta$ and Tumor Necrosis Factor $\alpha$ by Whole Fetal Membranes Depend on Initial Interactions of Amnion or Chorion with Lipopolysaccharides or Group B Streptococci<sup>1</sup>

Veronica Zaga,<sup>3</sup> Guadalupe Estrada-Gutierrez,<sup>4</sup> Jorge Beltran-Montoya,<sup>5</sup> Rolando Maida-Claros,<sup>6</sup> Rosario Lopez-Vancell,<sup>7</sup> and Felipe Vadillo-Ortega,<sup>2,4</sup>

Biomedical Research Branch,<sup>1</sup> Direction of Research,<sup>4</sup> Obstetrics and Gynecology Branch,<sup>5</sup> and Neonatology Branch,<sup>6</sup> Instituto Nacional de Perinatología, Mexico City 11000, Mexico  
Experimental Medicine Department,<sup>7</sup> School of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico

### ABSTRACT

The present study evaluated the secretions of interleukin (IL)-1 $\beta$  and tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$  by fetal membranes stimulated with group B streptococci (GBS) and lipopolysaccharide (LPS). The aim was to evaluate the initial response of full-thickness membranes to the microbial insult using an *in vitro* experimental model that allowed testing of the individual contributions of amnion and chorion to stimulation. Full-thickness membranes were obtained after delivery by elective cesarean section from women at 37–40 wk of gestation without evidence of active labor. The membranes were mounted in Transwell devices, physically separating the upper and lower chambers. The LPS (500 ng/ml) or GBS ( $1 \times 10^6$  colony-forming units/ml) was added to either the amniotic or chorionic surface, and accumulation of IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  were measured in both compartments using a specific ELISA. Fetal membranes followed different patterns of secretion of proinflammatory cytokines that depended on the side to which the stimulus was added or the nature of the stimulus itself. The TNF $\alpha$  was secreted by amnion and chorion in the presence of LPS or GBS, and stimulation with GBS induced a greater synthesis of IL-1 $\beta$  than did stimulation with LPS. Chorionic tissue was more responsive than amniotic tissue, and this response tended to be higher even when the stimulation was only on the amniotic side. However, the amnion plays an active role in recognizing LPS or GBS, contributing a significant amount of TNF $\alpha$ . Thus, cooperative and bidirectional communications occur between amnion and chorion in response to bacterial products, which include intermembranous cytokine traffic and signaling between tissues.

*cytokines, parturition, placenta, pregnancy*

### INTRODUCTION

Intrauterine infection is a plausible explanation for premature rupture of fetal membranes (PROM) [1]. Even though the entire pathogenesis has not been described, a hypothesis linking the inflammatory response to PROM has emerged, and ascendant colonization of the genital tract is

a proposed mechanism [2]. The presence of pathogenic microorganisms, such as group B streptococci (GBS), in the cervix, decidual chorionic tissues, or amniotic cavity triggers a local network of signals produced by both immune and nonimmune cells [3]. These signals coordinate the host defenses against infection, but unfortunately, they also may produce selective damage to fetal membranes, leading to PROM (among other pathogenic effects) [4]. The molecular mechanism of damage is supposed to occur after the initial contact between reproductive tract cells and bacteria or some toxic bacterial products, such as lipopolysaccharide (LPS), lipid A, or lipoteichoic acid [5], which results in the induction of a proinflammatory condition. The secretion of various cytokines [6] triggers a secondary wave of local mediators, including prostaglandin (PG) E<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  [7], and matrix metalloproteinases [8]. The resulting microenvironment results in variable amounts of uterine compounds and extracellular matrix-degrading enzymes that may act on both fetal membranes and cervix [9], leading to either PROM or preterm delivery. Although we do not know the specific mechanisms that lead to PROM or preterm delivery, rupture of the membranes will develop if selective degradation of the amniochorionic extracellular matrix is the main event [10–12].

Several reports have evaluated human fetal membrane responses to entire bacteria and their products by using *in vitro* models that resemble intrauterine infection. Decidual cells are capable of synthesizing at least interleukin (IL)-1 $\beta$  and tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$  as well as IL-6, IL-8, and IL-10 in response to infection-like conditions [5, 13–15], and they have IL-1, IL-6, TNF-I, and TNF-II receptors [16]. Chorionic cells are also capable of responding to bacterial products secreting at least IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, and IL-10 [17, 18], and they express IL-1 $\beta$  and IL-6 receptors [19]. Local macrophages express IL-6, TNF-I, and TNF-II receptors [16]. Epithelial amnion cells can also react to infection-emulating conditions by secreting IL-6 and IL-8 [20]. This reveals the existence of complex autocrine and paracrine interactions between amniochorionic cells when exposed to intrauterine infections [21]. However, few experimental studies using entire membranes have been conducted to study the integral reaction of the amniochorion to bacterial products by trying to emulate the natural conditions of bacteria and host interactions. Enough clinical information is available to support the idea that intrauterine infections arise from initial bacterial growths in the lower genital tract that overcome natural, nonspecific defense barriers in the cervix, making the chorion the next site

<sup>1</sup>Supported by a grant from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-21117), Mexico.

<sup>2</sup>Correspondence: Felipe Vadillo-Ortega, Instituto Nacional de Perinatología, Montes Urales 800, Lomas de Virreyes, Mexico D.F. 11000, Mexico. FAX: 52 5 5520 0034; e-mail: felipe.vadillo@uia.mx

Received: 17 February 2004.

First decision: 5 March 2004.

Accepted: 7 June 2004.

© 2004 by the Society for the Study of Reproduction, Inc.

ISSN: 0006-3363. <http://www.biolreprod.org>

of microbial invasion [2]. At this stage, the membranes must act as a mechanical barrier and deploy an inflammatory response to control the infection. We have evidence from experimental models that choriodecidual infection can follow a chronic course or may be controlled without any further complications [9]. Although pregnancy is severely compromised when intraamniotic infection occurs, further knowledge regarding the mechanisms of interaction between different microorganisms and fetal membranes is central to the understanding of how infection may end in PROM or preterm labor.

To understand the interactions between choriodecidia and amnion in the presence of infectious agents, we have developed an *ex vivo* experimental model in which we emulate the anatomical relationships of the fetal membranes, maintaining the selective barrier function of the membranes (making possible selective stimulation of either the choriodecidia or amnion with LPS or GBS) and measuring the compartmentalized secretions of IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$ . Characterization of the initial response of amnion or choriodecidia resulting in secretion of these cytokines is addressed.

## MATERIALS AND METHODS

### Fetal Membrane Explants and Culture

This project was approved by the Internal Review Board of Instituto Nacional de Perinatología in Mexico City (register no. 212250-06101). Ten fetal membranes were obtained after delivery by elective cesarean section with written informed consent. Five of the membranes were used for stimulation with LPS, and the other five were used for GBS experiments. Women at 37–40 wk of gestation without evidence of active labor or clinical or microbiological signs of chorioamnionitis or lower genital tract infections were included. General microbiological analyses were conducted on the placenta and fetal membranes immediately after delivery by rolling a sterile swab across a randomly selected area and performing standard microbiological procedures.

The membranes were transported to the laboratory in sterile Dulbecco modified Eagle medium (DMEM; Gibco BRL, Bethesda, MD) and rinsed in sterile Hanks balanced salt solution (Gibco BRL) to remove adherent blood clots. Membranes were manually cut into disks (diameter, 18 mm) and were held with silicone rubber rings in the upper chamber of a Transwell system (Costar, New York, NY) in which the original polyethylene terephthalate membrane had been removed. In this model, the choriodecidia faces the upper chamber, and the amnion faces the lower chamber, making it possible to test the two compartments independently (Fig. 1).

One milliliter of DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 1 mM sodium pyruvate, and 1 $\times$  antibiotic-antimycotic solution (penicillin, 100 U/ml; streptomycin, 100  $\mu$ g/ml; amphotericin B, 0.25  $\mu$ g/ml; Gibco BRL) was added to each chamber. The mounted explant was then placed in a 12-well tissue-culture plate (Costar) and incubated under 5% CO<sub>2</sub> in 95% air at 37°C.

Another set of studies was performed simultaneously in which amnion and choriodecidia were manually separated and cut into disks (diameter, 12 mm) using a biopsy punch. Two pieces of choriodecidia or amnion were placed in each well of a 24-well tissue-culture plate with 1 ml of DMEM supplemented as described above.

### Tissue Viability

Viability of membranes in the two-chamber model and in separated amnion or choriodecidia was determined by a colorimetric assay using tetrazolium salts added to the culture medium (Boehringer Mannheim, Germany). The assay is based on cleavage by metabolically active cells of the yellow tetrazolium salt XTT to form an orange formazan dye [22]. The assay was performed every 24 h of culture over 5 days.

Verification of the existence of a "two-chamber" system in which the amniochorion acts as a true selective barrier was evaluated by measuring the transepithelial electrical resistance (TER) of membranes as a measure of their physical integrity during experimental manipulation [23]. Briefly, randomly chosen membranes that were in culture in the Transwell model were taken out at 24, 48, 72, and 96 h under every experimental condition and immediately placed as a flat sheet between two Lucite chambers (filled with DMEM) of an Ussing chamber (UNAM, Mexico). A Millipore ace-

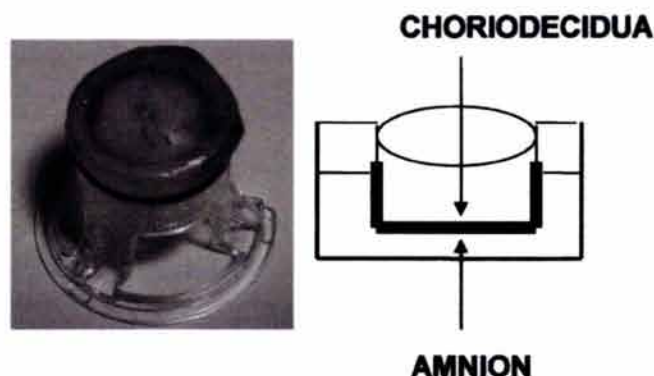


FIG. 1. Diagram of the Transwell culture system. The fetal membranes were held with silicone rubber rings in the upper chamber of a Transwell unit. In this model, the choriodecidia faces the upper chamber, and the amnion faces the lower chamber, making it possible to test two independent compartments separately.

tate filter (diameter, 13 mm) was used as a support for the membrane. A current pulse of 20  $\mu$ A was applied, and the voltage deflection was monitored in the vicinity of the membrane by two silver electrodes. Electrical resistance was measured in at least 10 different points for each membrane, and the contributions of the filter, solutions, and electrodes were subtracted. This information was interpreted as the actual integrity of the membranes at different incubation times. At least five different membranes were evaluated in each experiment.

### Microscopy

Membranes were analyzed by standard histology techniques using hematoxylin-and-eosin staining to verify the anatomical integrity of the tissues following incubation.

### Stimulation of Membranes in Culture

Explants were preincubated for 48 h in medium containing FCS to stabilize the tissues after manipulation [24]. After this time, the medium was changed to DMEM with 0.2% lactalbumin hydrolysate (Gibco BRL), and all experiments were carried out in this medium after 24 h. The explants were stimulated with 500 ng/ml of LPS from *Escherichia coli* 055:B5 (Sigma, St Louis, MO) [24] or coincubated with  $1 \times 10^6$  colony-forming units/ml of *Streptococcus agalactiae* [5], serotype III (9710860) isolated from vaginal exudates. Potentially toxic effects of bacterial overgrowth were prevented by the presence of antibiotics in the media. Media from either the amnion- or the choriodecidia-facing chamber were collected after 24 h of incubation.

Each experiment with explants mounted in the Transwell system included the following four conditions in triplicate for each membrane: 1) control membranes in which only medium was added to the compartments, 2) GBS or LPS were added simultaneously to both compartments, 3) GBS or LPS were only added to the choriodecidual side, and 4) GBS or LPS were only added to the compartment in contact with the amnion. The media on either side were collected at 24 h and stored frozen at  $-70^\circ\text{C}$  until assayed.

Separated amniotic or choriodecidual tissues were stimulated under equivalent conditions. The concentrations of protein in all samples were estimated using the method of Bradford [25].

### Cytokine Assays

The IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  concentrations were quantified by ELISA according to standard methods [24]. Monoclonal antibodies against IL-1 $\beta$  or TNF $\alpha$  (R&D Systems, Minneapolis, MN) were used as the capture antibodies, and polyclonal biotinylated antibodies against both cytokines were used as detection antibodies (R&D Systems). Standard curves were developed using human recombinant IL-1 $\beta$  (R&D Systems) or human recombinant TNF $\alpha$  (R&D Systems). The IL-1 $\beta$  ELISA had a sensitivity of 15.6 pg and was linear in the range from 20 to 1000 pg/ml. The TNF $\alpha$  ELISA had a sensitivity of 3.91 pg/ml and was linear in the range from 5.0 to 500 pg/ml. Both intra- and interassay coefficients of variation were

TABLE 1. Secretions of IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  after 24-h stimulation with LPS.

	Basal		Stimulation in chorion		Stimulation in amnion		Stimulation in both sides	
	CHD <sup>a</sup>	Amnion	CHD response	Amnion response	CHD response	Amnion response	CHD response	Amnion response
IL-1 $\beta$ (pg/cm <sup>2</sup> )	38.0 ( $\pm 44.7$ ) <sup>b</sup>	27.0 ( $\pm 29.5$ )	1184.2 <sup>c</sup> ( $\pm 767.4$ )	653.0 <sup>c</sup> ( $\pm 353.3$ )	830.0 <sup>c</sup> ( $\pm 375.69$ )	612.0 <sup>c</sup> ( $\pm 236.6$ )	1167.0 <sup>c</sup> ( $\pm 142.8$ )	627.0 <sup>c</sup> ( $\pm 400.6$ )
TNF $\alpha$ (ng/cm <sup>2</sup> )	3.3 ( $\pm 0.46$ )	2.5 ( $\pm 1.3$ )	222.0 <sup>c</sup> ( $\pm 96.8$ )	88.0 <sup>c</sup> ( $\pm 43.0$ )	104.5 <sup>c</sup> ( $\pm 48.6$ )	168.9 <sup>c</sup> ( $\pm 37.7$ )	233.1 <sup>c</sup> ( $\pm 17.5$ )	84.4 <sup>c</sup> ( $\pm 4.6$ )

<sup>a</sup> CHD, Choriodecidua.

<sup>b</sup> Values in parentheses represent mean  $\pm$  SD.

<sup>c</sup> Statistically significant with respect to basal values.

less than 5%. A rigorous quality-control program, including external and internal standards for both cytokines, is followed in our laboratory.

### Statistical Analysis

Comparisons between groups were performed using the Kruskal-Wallis one-way analysis of variance on rank tests, and  $P < 0.05$  was considered to be significant. All values are mean  $\pm$  SD unless otherwise stated.

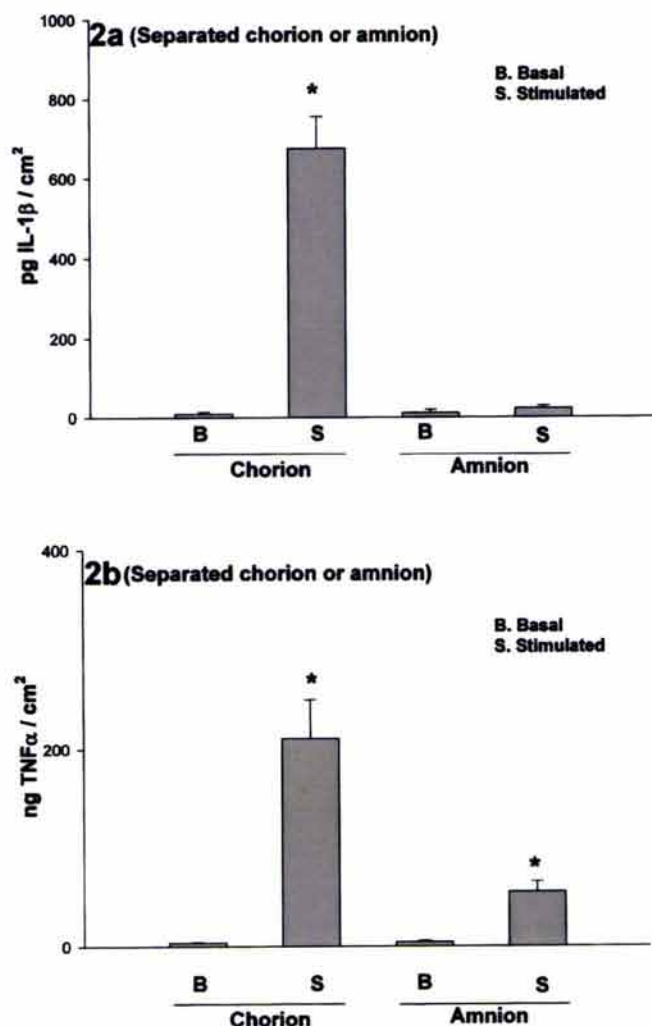


FIG. 2. Amnion and choriodecidua were separated and stimulated in explant culture over 24 h with 500 ng/ml of lipopolysaccharide, and the *in vitro* productions of IL-1 $\beta$  (a) and TNF $\alpha$  (b) were measured. Each bar represents the mean  $\pm$  SD of five different experiments. Significant differences between basal (B) and stimulated (S) conditions are indicated (\* $P < 0.05$ ).

### RESULTS

Histology, TER, and tissue-viability assays indicated that the integrity and function of the membranes were maintained under the culture conditions for at least 96 h. The TER basal values ( $42.81 \pm 5.5 \Omega/\text{cm}^2$ ) did not show a significant decline during incubation with either LPS ( $53.38 \pm 13.56 \Omega/\text{cm}^2$ ) or GBS ( $48.59 \pm 10.0 \Omega/\text{cm}^2$ ). Cytokine production was normalized as ng/cm<sup>2</sup> of full-thickness membranes.

We evaluated IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  secretion into the culture media after stimulation with 500 ng/ml of LPS for 24 h. Stimulation of any side of the membranes with LPS using the Transwell model induced a minimum increase of 22-fold in the IL-1 $\beta$  concentration in both amniotic and choriodecidual compartments compared with the corresponding controls ( $n = 5$ ,  $P < 0.05$ ) (Table 1). However, IL-1 $\beta$  reached twice the concentration in the choriodecidual compartment compared with the amniotic compartment when the choriodecidua was directly stimulated either alone or simultaneously with the amnion ( $n = 5$ ,  $P < 0.001$ ) (Table 1). When choriodecidua and amnion were cultured and assayed individually, only the choriodecidua secreted IL-1 $\beta$  in response to LPS ( $n = 5$ ,  $P < 0.05$ ) (Fig. 2a).

Similar results were obtained for TNF $\alpha$  secretion after stimulation with LPS, except that the minimum increase in secretion was 35-fold above the basal conditions ( $n = 5$ ,  $P < 0.05$ ) (Table 1). When amnion and choriodecidua were manually stripped and cultured, they secreted TNF $\alpha$  in response to LPS; however, the choriodecidua secreted three-fold more cytokine than the amnion ( $n = 5$ ,  $P < 0.01$ ) (Fig. 2b).

When the membranes were stimulated with GBS, the IL-1 $\beta$  concentration increased in the choriodecidual compartment to an average level 30-fold above the basal concentrations and only when GBS was added directly to the choriodecidual compartment ( $n = 5$ ,  $P < 0.05$ ) (Table 2). Adding GBS simultaneously to amnion and choriodecidua resulted in increased secretion of IL-1 $\beta$  into the choriodecidual compartment, but this never reached the response observed when the choriodecidua was stimulated alone ( $n = 5$ ,  $P < 0.05$ ) (Table 2). The nonresponsive behavior of the amnion was confirmed using separated membranes. In those experiments, only the choriodecidua was capable of secreting IL-1 $\beta$  ( $n = 5$ ,  $P < 0.05$ ) (Fig. 3a). However, the maximum secretion of IL-1 $\beta$  by the isolated choriodecidua was only a fraction of that secreted when the membranes were cultured together (Fig. 3a).

Secretion of TNF $\alpha$  was induced by GBS, and higher concentrations were found in the choriodecidual compartment when this portion of the membranes was stimulated directly ( $n = 5$ ,  $P < 0.05$ ) (Table 2). However, concentrations never reached the maximum responses observed with

TABLE 2. Secretions of IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  after 24-h stimulation with GBS.

	Basal		Stimulation in chorion		Stimulation in amnion		Stimulation in both sides	
	CHD <sup>a</sup>	Amnion	CHD response	Amnion response	CHD response	Amnion response	CHD response	Amnion response
IL-1 $\beta$ (pg/cm <sup>2</sup> )	268.2 ( $\pm$ 326.0) <sup>b</sup>	205.3 ( $\pm$ 361.2)	7832.0 <sup>c</sup> ( $\pm$ 694.1)	799.0 ( $\pm$ 575.4)	226.9 ( $\pm$ 160.8)	195.0 ( $\pm$ 214.5)	2027.8 <sup>c</sup> ( $\pm$ 982.4)	324.3 ( $\pm$ 161.7)
TNF $\alpha$ (ng/cm <sup>2</sup> )	1.9 ( $\pm$ 1.7)	2.5 ( $\pm$ 2.8)	77.1 <sup>c</sup> ( $\pm$ 58.5)	16.4 ( $\pm$ 3.9)	48.0 <sup>c</sup> ( $\pm$ 11.1)	33.0 <sup>c</sup> ( $\pm$ 30.4)	32.2 <sup>c</sup> ( $\pm$ 17.0)	2.8 ( $\pm$ 0.69)

<sup>a</sup> CHD, Choriodecidua.

<sup>b</sup> Values in parentheses represent mean  $\pm$  SD.

<sup>c</sup> Statistically significant with respect to basal values.

LPS stimulation. When choriodecidua or amnion were cultured in separate wells and stimulated with GBS, the production of TNF $\alpha$  was significantly higher in the amnion ( $n = 5$ ,  $P < 0.05$ ) (Fig. 3b).

## DISCUSSION

Different clinical and epidemiological evidence supports the hypothesis that infection starting in the cervicovaginal area may reach the amniotic cavity by an ascendant and progressive invasion of the internal cervix, choriodecidua, and chorioamniotic membranes [2, 26]. The experimental model we used in the present study was designed to emulate the presence of two compartments separated by a fully functional amniochorion and to replicate the response of fetal membranes to LPS and GBS when added to either choriodecidua or amnion. This can be relevant to our understanding of the actual mechanisms of ascending cervicovaginal infections. For these infections, the first step must be contact with the choriodecidua before reaching the amniotic face of the fetal membranes. In addition, experiments to evaluate the individual response of separated choriodecidua and amnion were performed under equivalent experimental conditions to isolate the individual response of both tissues. Fetal membranes were fully functional during the experimental procedures, and evidence of physical integrity allowed us to show that IL-1 $\beta$  or TNF $\alpha$  found in the choriodecidua or amniotic compartments after stimulation with LPS or GBS were selectively secreted by these membranes. We selected these cytokines as functional markers of membrane responses to LPS or GBS, both because other reports have shown that entire membranes can express these cytokines on stimulation with bacterial products and because they are key modulators of the inflammatory response. Previous reports on the amniochorionic response to infectious elements have focused on the effects on isolated cells [17, 18] or entire membranes in which no effort was made to preserve the in vivo spatial relations of amnion and choriodecidua as a separating barrier between the maternal/fetal compartments [24, 27]. To our knowledge, in only two published studies have entire membranes been evaluated using a system such as ours, and these studies have demonstrated that PGs are synthesized in the amniotic compartment following stimulation of the choriodecidua side [28, 29].

The amniotic membrane and the choriodecidua showed selective and distinct TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  secretion patterns after stimulation with LPS and GBS. Some of these effects appear to be tissue-specific responses, but others can only be explained by cooperative interaction between the amnion and choriodecidua. In general, the choriodecidua was the more reactive tissue, secreting both IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$ , and the amnion was only capable of secreting TNF $\alpha$ . On

the other hand, stimulation with LPS elicited high secretion of TNF $\alpha$  by both amnion and choriodecidua, whereas GBS elicited a higher secretion of IL-1 $\beta$  by the choriodecidua alone. This supports the concept that the fetal membranes have polarity both for stimulus recognition and for cytokine secretion.

Stimulation with LPS resulted in accumulation of IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  in both compartments, independently if the com-

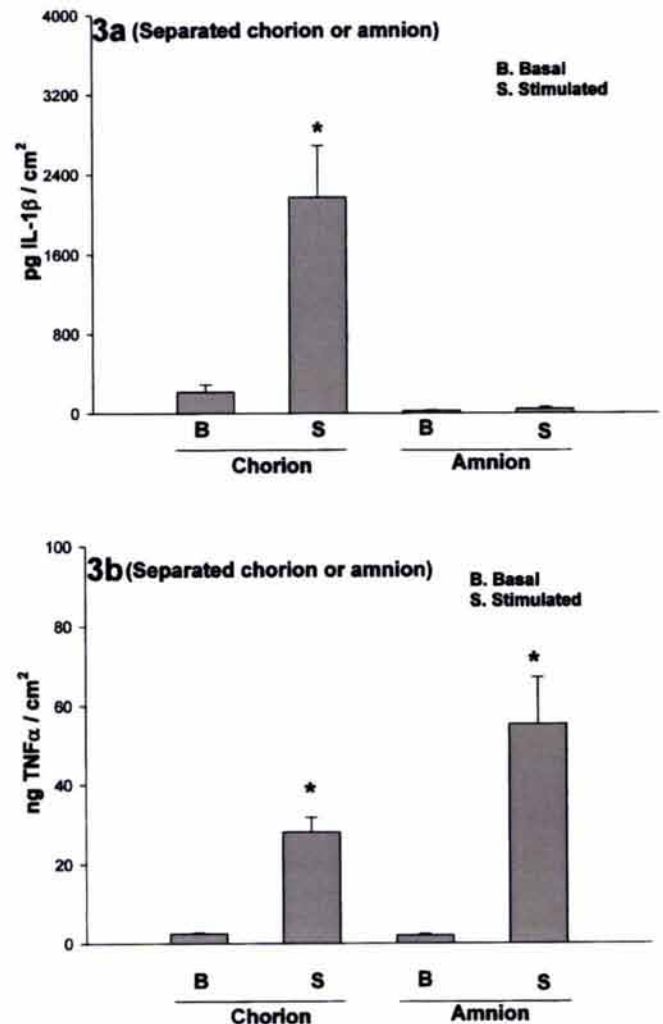
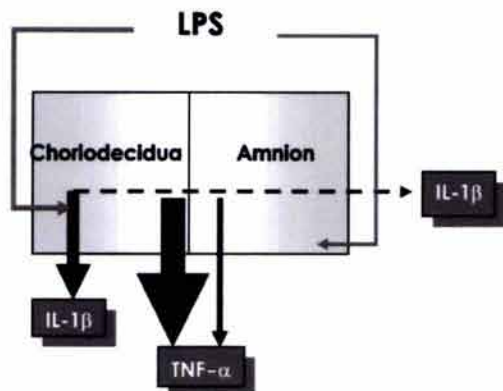


FIG. 3. Amnion and choriodecidua were separated and stimulated in explant culture over 24 h with  $1 \times 10^6$  colony-forming units of GBS, and the in vitro productions of IL-1 $\beta$  (a) and TNF $\alpha$  (b) were measured. Each bar represents the mean  $\pm$  SD of five different experiments. Significant differences between basal (B) and stimulated (S) conditions are indicated (\* $P < 0.05$ ).

4a



4b

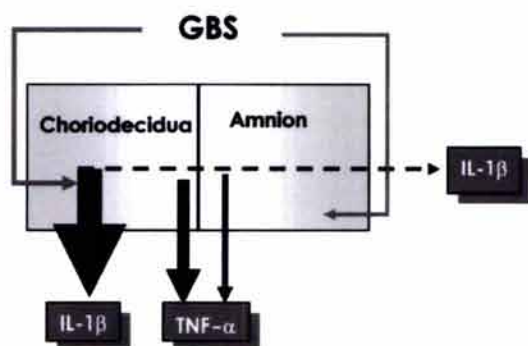


FIG. 4. Integrated view of amniochorion response to LPS and GBS. Bacterial endotoxin can be recognized by both choriodecidua and amnion. The resulting  $\text{TNF}\alpha$  secretion is mainly caused by the choriodecidua's response; however, the amnion can also provide some (a). Group B streptococci are mainly recognized by the choriodecidua, which secretes higher amounts of  $\text{IL-1}\beta$  than under LPS stimulation. Both choriodecidua and amnion contribute to  $\text{TNF}\alpha$  secretion in response to bacteria. The  $\text{IL-1}\beta$  is secreted only by the choriodecidua; cytokine in the amniotic compartment can be explained by transmembrane trafficking (dotted line; b).

compound was only added to the amnion or to the choriodecidua. Secretion of  $\text{IL-1}\beta$  to the amniotic compartment was demonstrable only when choriodecidua and amnion were together, in contrast to experiments in which both tissues were mechanically separated and stimulated, and only the choriodecidua secreted  $\text{IL-1}\beta$ . These results are in agreement with previous results demonstrating that the mRNA for this cytokine is only expressed in the choriodecidua [19]. Therefore, the presence of  $\text{IL-1}\beta$  in the amniotic compartment during our experiments can only be explained by the diffusion of choriodecidua-secreted  $\text{IL-1}\beta$  through the fetal membranes. This possibility has been addressed by Kent et al. [30], who demonstrated the transmembrane diffusion of several cytokines. Although we know little about the cellular biology of cytokine transport across tissues, we know that these signals can modify paracellular transport, a phenomenon that has been explored in several epithelial tissues and that may explain the extensive diffusion of cytokines in our model. On the other hand, stimulation of  $\text{IL-1}\beta$  secretion by the choriodecidua after amniotic stimulation with LPS implies that this molecule can travel across

the amnion to reach the choriodecidua or that there occurs an initial recognition of LPS by amnion and transduction of the signal to the choriodecidua. The chemical nature of LPS makes it a nondiffusible compound in the amniochorion, and to our knowledge, no experimental evidence suggests LPS transmembrane transport [28, 31]. Hence, the only mechanism to explain the amnion-dependent choriodecidua secretion of  $\text{IL-1}\beta$  is an intramembranous signaling pathway that starts in the amnion.

The release of large amounts of  $\text{TNF}\alpha$  by membranes under LPS stimulation results from summative amniochorion secretion, because both tissues can independently secrete this cytokine, as shown by the experiments using separated amnion or choriodecidua. The choriodecidua compartment accumulated more  $\text{TNF}\alpha$  than the amniotic compartment, but the presence of  $\text{TNF}\alpha$  in the choriodecidua compartment after amniotic stimulation can also be explained by diffusion of the cytokine or activation of choriodecidua secretion of  $\text{TNF}\alpha$  by a hitherto-unknown, intramembranous signaling pathway.

In contrast to the effects of LPS, stimulation of either amnion or choriodecidua with GBS resulted in  $\text{IL-1}\beta$  secretion only by the choriodecidua. We found no evidence of cooperative communication between the fetal membranes, and GBS was better than LPS for stimulating the choriodecidua secretion of  $\text{IL-1}\beta$ . These findings support the idea that the choriodecidua is the only source for  $\text{IL-1}\beta$  secretion and that it contains the elements for recognition of GBS. However, as demonstrated previously,  $\text{IL-1}\beta$  can reach the amniotic compartment by a poorly characterized, intramembranous trafficking pathway [19, 28, 31]. On the other hand, both amnion and choriodecidua can cooperate in recognizing GBS, leading to  $\text{TNF}\alpha$  secretion as well as  $\text{IL-1}\beta$  secretion. The choriodecidua was the main source for  $\text{TNF}\alpha$  even when the amnion face received the primary stimulus, reinforcing the hypothesis of an intramembranous signaling pathway. However, a puzzling situation emerged when the secretions of both  $\text{IL-1}\beta$  and  $\text{TNF}\alpha$  were analyzed under simultaneous stimulation of choriodecidua and amnion. We observed no response in the amniotic compartment and lower secretions of both cytokines in the choriodecidua compartment relative to the maximum secretion induced with GBS. This also contrasts with the capacities of the amnion and choriodecidua when they were tested separately, at which time the amnion secreted appreciable amounts of  $\text{TNF}\alpha$ . It is possible that counterregulatory signals were exchanged between tissues, resulting in a state of pseudoanergy to GBS. The possibility that this situation occurs in vivo is highly improbable but deserves further investigation.

Our results add to the information about the widely recognized secretion of proinflammatory cytokines in amniotic fluids from women with intraamniotic infections [5], and they point toward a cellular origin of these compounds (Fig. 4). Because the choriodecidua appears to be the major source of cytokines in response to infection, further research concerning the choriodecidua/amnion interactions resulting in cytokine release is needed. The inflammatory-response genetic background may explain the variable response of membranes to infection; as demonstrated recently [32], membranes carrying the "hyper-responsive" gene polymorphisms of  $\text{IL-1}\beta$  may secrete greater amounts of this cytokine on equivalent stimulation with LPS compared to membranes carrying the more common gene polymorphism. This may account for the observed difference in the basal secretion of this cytokine in our experiments.

Also of interest is the mechanism of cytokine transmembrane passage. In the present study, we found evidence that the fetal membranes can react differently to the arrival of microorganisms depending on the primary route of contact (amnion or choriodecidua) or the nature of the stimuli (entire organism or soluble products). Our results also suggest the existence of a cooperative interrelation between both membranes and the existence of at least two different mechanisms for membrane activation in response to microorganisms. One depends on the interaction between soluble products, such as LPS. This compound may exert a whole response in chorioamnion, independently of the stimulated side. Toll-like receptors (TLRs) are essential for the induction of innate immune response and were identified early on as receptors for LPS-induced signal transduction. The effective TLR4 activation by LPS requires the interaction of LPS with CD14 and the accessory protein MD-2 [33]. Although to our knowledge no reports of TLR expression in fetal membranes have appeared, some reports have demonstrated TLR2 and TLR4 proteins in human placenta of normal-term deliveries [34]. Furthermore, other authors have demonstrated up-regulation of TLR4 expression in villosus Hofbauer cells of preterm placentas and amniotic fluid with chorioamnionitis [35, 36], stressing their possible role in the initial recognition of LPS-containing bacteria.

Recent evidence of an amnion-derived mediator able to activate chorion under infection-related conditions has been described by Ognjanovic et al. [37]. They showed that pre-B-cell colony-enhancing factor is a cytokine that is expressed constitutively by the human fetal membranes during pregnancy but is up-regulated during chorioamnionitis.

The second mechanism can only be explained by invoking the recognition of GBS by immune cells located in the choriodecidual side to initiate an inflammatory response. In addition, our experiments suggest the existence of a non-characterized, intermembranous signaling network that permits the coordinate and bidirectional activation of both amnion and choriodecidua.

## ACKNOWLEDGMENT

We thank Magdalena Beltran Zuñiga for providing all the microbiological methodology.

## REFERENCES

- Asrat T. Intraamniotic infection in patients with preterm prelabor rupture of membranes. Pathophysiology, detection, and management. *Clin Perinatol* 2001; 28:735-751.
- Romero R, Mazur M, Wu YK, Sirtori M, Oyarzun E, Mitchell MD, Hobbs JC. Infection in the pathogenesis of the preterm labor. *Semin Perinatol* 1988; 12:262-279.
- Schoonmaker JN, Lawellin DW, Lunt B, McGregor JA. Bacteria and inflammatory cells reduce chorioamnionic membrane integrity and tensile strength. *Obstet Gynecol* 1989; 74:590-596.
- Athayde N, Edwin SS, Romero R, Gomez R, Maymon E, Pacora P, Menon RA. Role for matrix metalloproteinase-9 in spontaneous rupture of the fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179:1248-1253.
- Dudley DJ, Edwin SS, Wagoner JV, Augustine NH, Hill HR, Mitchell DP. Regulation of decidual cell chemokine production by group B streptococci and purified bacterial cell wall components. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177:666-672.
- Steiborn A., Kühnert M, Halberstadt E. Immunomodulating cytokines induce term and preterm parturition. *J Perinat Med* 1996; 24:381-390.
- Lundin-Schiller S, Mitchell MD. Prostaglandin production by human chorion laeve cells in response to inflammatory mediators. *Placenta* 1991; 12:353-363.
- Estrada G, Vadillo-Ortega F, Jiménez MA, Beltrán J., Giono S. Caracterización bioquímica y ultraestructural del efecto de la interleucina 1-β como mediador de degradación de tejido conectivo en membranas corioamnióticas humanas en cultivo. *Ginec Obstet Mex* 2002; 70:190-195.
- Maymon E, Romero R, Pacora P, Gervasi MT, Gomez R, Edwin SS, Yoon BH. Evidence of in vivo differential bioavailability of the active forms of matrix metalloproteinases 9 and 2 in parturition, spontaneous rupture of membranes, and intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183:887-894.
- Vadillo-Ortega F, Sadowsky DW, Haluska GJ, Hernández-Guerrero C, Guevara-Silva R, Gravett MG, Novy MJ. Identification of matrix metalloproteinase-9 in amniotic fluid and amniochorion in spontaneous labor and after experimental intrauterine infection or interleukin-1β infusion in pregnant rhesus monkeys. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186:128-138.
- Lei H, Furth EE, Kalluri R, Chiou T, Tilly KI, Tilly JL, Elkon BK, Jeffrey JJ, Strauss JF III. A program of cell death and extracellular matrix degradation is activated in the amnion before the onset of labor. *J Clin Invest* 1996; 98:1971-1978.
- Fortunato SJ, Menon RP, Swan KF, Menon R. Inflammatory cytokine (interleukins 1, 6, and 8 and tumor necrosis factor α) release from cultured human fetal membranes in response to endotoxin lipopolysaccharide mirrors amniotic fluid concentrations. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174:1855-1862.
- Mitchell MD, Trautman MS, Dudley DJ. Cytokine networking in the placenta. *Placenta* 1993; 14:249-275.
- Dudley DJ, Trautman MS, Mitchell MD. Inflammatory mediators regulate interleukin-8 production by cultured gestational tissues: evidence for a cytokine network at the choriodecidual interface. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76:404-410.
- Laham N, Brennecke SP, Rice GE. Interleukin-8 release from human gestational tissue explants: effects of gestation, labor, and chorioamnionitis. *Biol Reprod* 1999; 61:823-827.
- Steinborn A, Geisse M, Kaufmann M. Expression of cytokine receptors in the placenta in term and preterm labor. *Placenta* 1998; 19:165-170.
- Dudley DJ, Edwin SS, Dangerfield A, Van Waggoner J, Mitchell MD. Regulation of cultured human chorion cell chemokine production by group B streptococci and purified bacterial products. *Am J Reprod Immunol* 1996; 36:264-268.
- Dudley DJ, Trautman MS, Edwin SS, Ludin-Schiller S, Mitchell MD. Biosynthesis of interleukin-6 by cultured human chorion laeve cells: regulation by cytokines. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75:1081-1086.
- Menon R, Swan KF, Lyden TW, Rote NS, Fortunato SJ. Expression of inflammatory cytokines (interleukin-1β and interleukin-6) in amniochorionic membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172:493-500.
- Reisenberger K, Egarter C, Schiebel I, Obermair A, Kiss H, Lehner R. In vitro cytokine and prostaglandin production by amnion cell in the presence of bacteria. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176:981-984.
- Sato TA, Keelan JA, Mitchell MD. Critical paracrine interactions between TNFα and IL-10 regulate lipopolysaccharide-stimulated human choriodecidual cytokine and prostaglandin E<sub>2</sub> production. *J Immunol* 2003; 170:158-166.
- Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods* 1986; 94:57-63.
- López-Vancell R, Montfort I, Pérez-Tamayo R. Galactose-specific adhesion and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Res* 2000; 86:226-231.
- Arechavala-Velasco F, Ogando D, Parry S, Vadillo-Ortega F. Production of matrix metalloproteinase-9 in lipopolysaccharide-stimulated human amnion occurs through an autocrine and paracrine proinflammatory cytokine-dependent system. *Biol Reprod* 2002; 67:1952-1958.
- Bradford MM. 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.
- Gomez R, Romero R, Edwin SS, David C. Pathogenesis of preterm labor and preterm premature rupture of membranes associated with intraamniotic infection. *Infect Dis Clin North Am* 1997; 11:135-176.
- Dudley DJ, Edwin SS, Dangerfield A, Jackson K, Trautman MS. Regulation of decidual cell and chorion cell production of interleukin-10 by purified bacterial products. *Am J Reprod Immunol* 1997; 38:246-251.
- Rajasingam D, Bennett R, Alvi SA, Elder MG, Sullivan MHE. Stimulation of prostaglandin production from intact human fetal membranes by bacteria and bacterial products. *Placenta* 1998; 19:301-306.
- Tayson JE, McCoshen JA, Dubin NH. Inhibition of fetal membrane



## Infección intrauterina y nacimiento pretérmino

Felipe Vadillo-Ortega,\* Jorge Beltrán-Montoya,\*\* Verónica Zaga-Clavellina\*

\*Dirección de Investigación y \*\*Departamento de Urgencias y Tococirugía. Instituto Nacional de Perinatología

### CASO CLÍNICO

Nombre: ZSMA. Registro: 1585000. Edad: 28 años.

**AHF:** Abuela materna DM Tipo 2. **APNP:** Residente y originaria del Estado de México. Ocupación: Hogar. Escolaridad: Secundaria. Estado civil: Unión libre. **APP:** Negados. **AGO:** Menarca 15 años, ritmo 30x3, eumenorreica. IVSA 24 años. FUM 30/07/02. PS: Una. PF: Preservativo. GIII. P = I C = I; GI = 1999, eutocia masculino, 1,800 g MNT. GII = 2001 cesárea (pretérmino), femenino 1,900 g. G III = Embarazo actual.

#### Consulta primera vez: 10-02-03

- B. Embarazo de 27.6 semanas.
- S. Movimientos fetales presentes.
- O. Fondo uterino de 26 cm frecuencia cardiaca fetal normal, leucorrea amarilla.
- A: Cervicovaginitis bacteriana.
- P. Clindamicina más ketokonazol óvulos vaginales por siete días. No actividad sexual más indicaciones de alarma obstétrica.

#### Subsecuente: 10-03-03

- B. Embarazo de 31.6 semanas de gestación.
- S. Movimientos fetales presentes.
- O. Fondo uterino de 28 cm, frecuencia cardiaca fetal normal.
- A. Ultrasonido 24-02-03, reporta producto único vivo, fetometría de 27.2 semanas, placenta posterior fúndica, líquido amniótico normal.
- P. Vitaminas y cita en un mes.

#### Subsecuente: 24-03-03

- A. Embarazo de 33.6 semanas de gestación.
- S. Refiere actividad uterina irregular, movimientos fetales presentes.
- O. Fondo uterino de 29 cm, frecuencia cardiaca fetal normal, al tacto vaginal cérvix corto y reblandecido.
- P. Cita en dos semanas.

#### Urgencias: 24-03-03 23 h

- B. Embarazo de 33.6 semanas, amenaza de parto pretérmino.
- S. Refiere actividad uterina irregular, sin pérdidas transvaginales, movimientos fetales presentes.
- O. TA de 110/70 mm Hg, FC 96', FR 20', T 36.6. Fondo uterino de 29 cm, FCF 150, se corrobora actividad uterina. Tacto vaginal cérvix blando, 2 cm de dilatación, membranas íntegras.
- A. Embarazo de 33.6 semanas de gestación complicado con amenaza de parto pretérmino, ultrasonido acorde, se canaliza glucosada 5% y se inicia uteroinhibición con indometacina vía rectal y orprenalina subcutánea. EGO alterado por lo que se inicia tratamiento con gentamicina 80 mg IV C/8 h. La paciente continúa con actividad uterina regular por lo que pasa a la UTQ para uteroinhibición parenteral.

#### UTQ: 25-03-03. 9:00 h

- A. Embarazo de 34 semanas de gestación, amenaza de parto pretérmino asociado a infección de vías urinarias, más ruptura prematura de membranas.

- S. Refiere actividad uterina regular, movimientos fetales presentes, y salida de abundante líquido transvaginal.
- O. Signos vitales normales, fondo uterino de 28 cm frecuencia cardiaca fetal normal, producto en situación transversa polo cefálico izquierdo, al tacto vaginal cérvix central borrado con 5 cm de dilatación, líquido amniótico claro sin grumos.
- A. Embarazo complicado con APP secundaria a IVU, más RPM.
- P. Pasa a cesárea.

### Nota operatoria

Diagnóstico preoperatorio: Embarazo de 34 semanas, APP secundaria a IVU, más RPM y producto en situación transversa polo cefálico izquierdo. Puerperio inmediato postcesárea. Operación proyectada y efectuada: Cesárea Kerr. Hemorragia: 500 mL Anestesia: BPD. Complicaciones: No. Hallazgos: RN 10:58 h, peso 1770 g, Apgar 8/9 Silverman 4, Capurro 33 semanas, talla 44 cm. Se inician antibióticos terapéuticos. La paciente cursa tres días de postoperatorio sin complicaciones. Egresa el 28 de marzo del 2003.

### Recién nacido

Diagnósticos de ingreso a terapia intermedia: Recién nacido pretérmino de 34 semanas.

Retardo en el crecimiento intrauterino. Síndrome de dificultad respiratoria por enfermedad de membrana hialina. Procedimientos: Intubación orotraqueal y cateterismo umbilical.

Fecha de nacimiento: 25-03-03; 10.58 h. Fecha de defunción: 26-03-03; 23.03 h.

### Diagnósticos del recién nacido

1. Prematurez.
2. Enfermedad de membrana hialina III.
3. Probable neumonía congénita.
4. Enfisema intersticial.
5. Choque séptico
6. Probable hemorragia intraventricular.

No acepta autopsia. Cultivo de líquido cefalorraquídeo negativo. Placenta: corioamnioitis severa.

### INFECCIÓN INTRAUTERINA Y NACIMIENTO PRETÉRMINO

El nacimiento pretérmino es un problema de salud pública mundial, ya que es causa directa de al menos

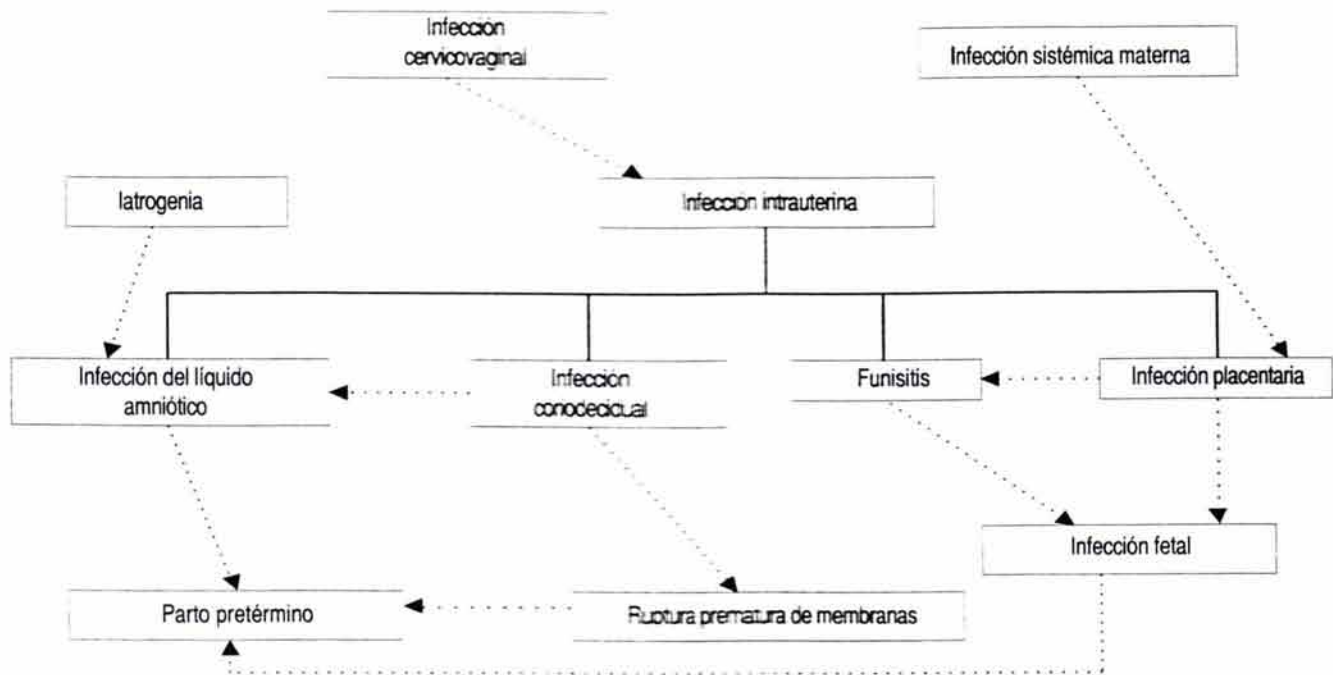
70% de los casos de muertes neonatales, además de ello, es un problema clínico para el que los servicios de salud deben asignar recursos de atención de alta especialidad y de costo elevado.<sup>1</sup> En países como el nuestro, en el que la frecuencia de nacimientos pretérmino se calcula entre 10 a 12% de todos los embarazos,<sup>2</sup> es claro que sectores amplios de población no dispongan de los recursos de atención necesarios y aquellos que sí cuentan con ellos, están expuestos de cualquier manera a las complicaciones graves que pueden afectar al recién nacido y/o a su madre y que pueden manifestarse muchos años después del periodo perinatal, derivado de las secuelas neuromotoras en el infante.

Una conclusión grave vigente es que pese a todos los esfuerzos, la incidencia del nacimiento pretérmino no se ha podido abatir en ninguna parte del mundo y lo que parece más preocupante es que hay evidencia de que está aumentando.<sup>3</sup> Por otro lado, la disminución reportada en la mortalidad en los neonatos prematuros, obedece estrictamente al desarrollo de tecnologías de soporte de funciones vitales que han permitido mover hacia abajo la barrera de edad gestacional a la que es posible sacar adelante a un recién nacido.

Los mecanismos de inicio y control del trabajo de parto humano normal, son aún poco entendidos y como una consecuencia directa, la comprensión de la fisiopatogenia del nacimiento pretérmino es igualmente escasa; por esta razón, el manejo y prevención de esta patología del embarazo permanece sin cambios desde hace varias décadas.<sup>4</sup>

El paradigma vigente a la definición y manejo clínico del parto pretérmino es que tanto éste, como el trabajo de parto a término comparten el mismo grupo de mecanismos, excepto por la edad gestacional a la que ocurren. Ambos procesos muestran características finales comunes como son la inducción de la contractilidad del miometrio, maduración y dilatación cervical, así como ruptura de las membranas corioamnióticas.<sup>5</sup> Si se excluyen los casos de nacimiento pretérmino que resultan de una indicación para interrumpir el embarazo, como sería el caso de una embarazada afectada por enfermedad hipertensiva, el mecanismo fundamental del nacimiento pretérmino es la pérdida de sincronización de la actividad de los tejidos mencionados arriba y que queda de manifiesto en diferentes cuadros clínicos así, es posible distinguir al menos las tres siguientes entidades nosológicas que pueden desembocar en nacimiento pretérmino (Figura 1):

1. Amenaza de parto pretérmino. Presencia de actividad uterina aumentada en frecuencia, intensi-



**Figura 1.** Secuencia del proceso infeccioso intrauterino. Se acepta que la mayor parte de las infecciones intrauterinas se originan por ascenso desde el tracto genital en su porción cervicovaginal, aunque es posible que también sean producto de la diseminación hematológica de microorganismos o bien, por introducción accidental durante procedimientos como la amniocentesis diagnóstica. Una vez que los microorganismos han alcanzado el espacio intrauterino, podrían instalarse en el microambiente corioaldecidual o bien migrar a través de las membranas y alcanzar el líquido amniótico y eventualmente al producto. La evidencia clínica apunta a que cuando la infección afecta al espacio intraamniótico, se desencadena parto pretérmino, en tanto que las infecciones de placenta o corioaldecidua podrían tener un curso crónico y eventualmente complicarse con ruptura prematura de membranas.

dad y duración, acompañada de modificaciones cervicales a edad gestacional menor de 37 semanas o menor de 259 días.<sup>6</sup>

2. Ruptura prematura de membranas (RPM). Definida como ruptura de membranas fetales con salida de líquido amniótico transvaginal sin trabajo de parto.<sup>6</sup>
3. Incompetencia cervical. Se define como la incapacidad del cuello uterino para retener un embarazo intrauterino hasta el término del mismo o a la viabilidad del feto.<sup>6</sup>

Cada una de estas entidades clínicas se caracteriza por la inducción asincrónica de actividad de alguno de los tejidos que operan durante el trabajo de parto, es decir, la activación primaria de la actividad contráctil del miometrio en la amenaza de parto pretérmino, la inducción de la ruptura de las membranas corioamnióticas en la RPM o la dilatación prematura del cérvix en la incompetencia cervical. De este modo, las patologías obstétricas mencionadas constituyen la evidencia biológica de existencia de mecanismos de control que modulan la respuesta independiente del miometrio, cérvix y membranas feta-

les, así como la existencia inherente de una red de comunicación que permite la sincronización de todos estos subsistemas bajo las condiciones del trabajo de parto fisiológico. Y aunque desconocemos la totalidad de los detalles de la regulación del progreso del trabajo de parto normal o el que desencadena el nacimiento pretérmino, en los últimos años se ha incrementado de modo considerable la comprensión de los mecanismos moleculares y celulares implicados. Dentro de las áreas que han arrojado más información para la comprensión del problema, se cuenta aquella derivada del estudio de la asociación clínica de presencia de infección intrauterina y desarrollo de parto pretérmino. El cuerpo de conocimientos derivados del estudio de esta asociación permite incluso establecer ya algunas relaciones causa/efecto entre estas dos condiciones.

## INFECCIÓN Y NACIMIENTO PRETÉRMINO

El factor de riesgo con mayor asociación con el parto pretérmino es la presencia de infección durante el embarazo, y por ello se ha propuesto que de ma-

nera directa o indirecta la existencia de un proceso infeccioso en la mujer embarazada y en especial en cualquier región anatómica dentro del útero gestante, podría explicar el nacimiento pretérmino. La revisión de la literatura permite sostener la existencia de especificidad, consistencia y temporalidad de asociación entre la infección intrauterina con el parto pretérmino y/o la RPM.<sup>7,8</sup>

Son varios los microorganismos identificados como agentes causales de cuadros infecciosos intrauterinos y los datos epidemiológicos en la literatura anglosajona han demostrado diferente, pero constante incremento de riesgo para desarrollar parto pretérmino en presencia de colonización por *Streptococcus* del grupo B, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Ureaplasma urealyticum* y los microorganismos que causan vaginosis bacteriana como los anaerobios facultativos, *Gardnerella vaginalis*, micoplasmas genitales y *Mobiluncus* sp.<sup>9,10</sup> En el único estudio hecho en nuestro país, resalta la importancia de *Ureaplasma urealyticum* como agente infeccioso asociado al desarrollo de parto pretérmino y la ausencia de casos en los que se documente *Streptococcus* del grupo B,<sup>11</sup> lo que hace a la microbiología del embarazo de la población mexicana diferente a lo que hasta ahora se ha reportado en otros países.

Aunque se considera posible que una infección sistémica pueda diseminarse al entorno uterino por vía hematogena, provocando infección placentaria y llegar a infectar al producto de manera directa, se ha propuesto un modelo general que pretende explicar el desarrollo de la mayor parte de las infecciones intrauterinas por ascensión progresiva de los microorganismos desde la región de cérvix y vagina.<sup>12</sup> Bajo este modelo de tres etapas se propone que de manera inicial existe alteración en la flora microbiana del tracto genital externo y que se manifiesta en la mayor parte de los casos como una infección centinela denominada vaginosis bacteriana, caracterizada por disminución de lactobacilos y establecimiento de anaerobios facultativos.<sup>13</sup> La ruptura del equilibrio ecológico en vagina y cérvix permitiría la proliferación de microorganismos patógenos que en una segunda etapa pasarían a través del canal cervical y ascenderían hasta el espacio coriódécidual, delimitado entre la pared uterina y las membranas corioamnióticas (infección coriódécidual y corioamnionitis). Esta etapa podría considerarse como de duración variable, pero generalmente crónica y precede al paso de los patógenos a través de las membranas corioamnióticas, con la posterior e inmediata infección del líquido amniótico (corioamnionitis) y del producto

(infección fetal), que constituyen la última etapa del modelo. Se ha propuesto que el arribo de los microorganismos a cada uno de estos compartimientos podría resultar en la activación con magnitud variable de respuestas tisulares que desencadenarían inducción de amenaza de parto pretérmino y/o ruptura prematura de membranas. La hipótesis que vincula la infección intrauterina con el nacimiento pretérmino, propone dos posibilidades para el esquema fisiopatológico:

1. Que las manifestaciones clínicas sean efecto directo de diferentes productos bacterianos, que resultarían en la activación directa de ejes de señales que inducen contracción del miometrio, dilatación cervical o ruptura de las membranas corioamnióticas.
2. Que la enfermedad sea el resultado de la actividad cruzada de los mediadores de la respuesta inflamatoria materna y/o fetal, lo que incluye a diferentes señales intercelulares como las citocinas.

## PRODUCTOS BACTERIANOS

Diferentes investigaciones han sugerido que el inicio del trabajo de parto normal está asociado a la activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub> tisular (FLA2), la cual hidroliza los fosfolípidos de las membranas celulares locales, produciendo un incremento en el araquidonato libre, que al difundir a las células vecinas induce aumento en la síntesis de prostaglandinas por diferentes células, como las del epitelio amniótico, que son especialmente ricas en un tipo de ciclooxigenasa inducible y cuyo mRNA aumenta hasta en dos órdenes de magnitud en la etapa periparto.<sup>14,15</sup> Las prostaglandinas producidas por esta ruta difunden de manera paracrina hacia la musculatura lisa del miometrio e inducen su actividad contráctil. La presencia de ciertos microorganismos que colonizan y/o infectan el tracto genital femenino puede aumentar la actividad local de la FLA2 en etapas intermedias de la gestación y provocar desde irritación uterina hasta trabajo de parto pretérmino. Tal es el caso de la *Gardnerella vaginalis* que cuenta con una FLA2 ligada a membrana y que mediante el mecanismo mencionado, produce la liberación de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) con efecto uterotónico.

Otros productos bacterianos que de manera directa son capaces de provocar daño tisular incluye a algunas proteasas producidas por distintos microorganismos causantes de infecciones cervicovaginales, como el *Streptococcus* del grupo B y que tienen actividad limitada para degradar componentes moleculares de

la matriz extracelular, pero que, en relación con la dosis del inóculo bacteriano podrían provocar reducción en la fuerza mecánica tensil del cérvix y de las membranas corioamnióticas.<sup>16</sup> Es preciso señalar que las bacterias que producen colagenasas, como algunas especies del género *Chlostridium* no se han descrito como patógenos asociados al tracto genital, y por ello la participación de estas enzimas con actividad específica alta sobre colágena, no se considera en el esquema fisiopatogénico del parto pretérmino.

De modo reciente se ha reportado un efecto aún más complejo de algunos productos bacterianos y que involucra al lipopolisacárido de la pared celular de algunos microorganismos gramnegativos, que es capaz de estimular a células musculares lisas localizadas en la región cervical a producir citocinas proinflamatorias y una enzima con actividad lítica sobre elastina, uno de los componentes relevantes de la matriz extracelular de este tejido.<sup>17</sup>

### RESPUESTA INFLAMATORIA Y NACIMIENTO PRETÉRMINO

La respuesta del huésped ante una infección intrauterina consiste en la liberación de una red de citocinas que modulan la respuesta inflamatoria destinada a controlar el proceso infeccioso. La respuesta inflamatoria es desplegada por las diferentes células profesionales que secretan la primera oleada de señales, que es seguida por las producidas por estirpes celulares no inmunológicas.<sup>18,19</sup> Los principales mediadores inflamatorios involucrados incluyen a la interleucina-1 (IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8) y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), los cuales son producidos por macrófagos, neutrófilos, linfocitos, células epiteliales, musculares y deciduales en respuesta a una gran variedad de bacterias y productos bacterianos.<sup>17,20,21</sup> Así se explica que en el líquido amniótico de mujeres con infección intramniótica y parto pretérmino las concentraciones de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y prostaglandinas se encuentren incrementadas.<sup>22,23</sup>

Diferentes estudios con membranas corioamnióticas en cultivo tratadas con bacterias o productos bacterianos como lipopolisacárido (LPS) han demostrado que estos estímulos inducen la producción y secreción significativa de las citocinas proinflamatorias mencionadas.<sup>24,25</sup> Es preciso enfatizar que si bien la respuesta inicial es responsabilidad de las células inflamatorias clásicas, una vez establecida la respuesta primaria, son las células locales como la decidua y el corion, en coordinación con los linfocitos, las que producen citocinas como IL-1 $\alpha$  e IL-

1 $\beta$ ,<sup>26</sup> cuya secreción involucra complejos mecanismos regulatorios autocrinos y paracrinos.<sup>27</sup> Estos mecanismos han sido estudiados en diferentes modelos animales experimentales, de los que los primates no humanos dan una referencia más cercana al caso que interesa y en ellos ha sido posible reconstruir la secuencia temporal que sigue a la inoculación de microorganismos patógenos en el compartimiento intrauterino. A los pocos minutos de la inoculación de *Streptococcus* del grupo B en el líquido amniótico se puede documentar incremento de la concentración de TNF- $\alpha$ , seguido al cabo de algunos minutos de aumento de IL-1 $\beta$  e IL-6, para que después de algunas horas se incremente la síntesis y secreción de prostaglandinas PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ,<sup>28</sup> momento en que se documenta aumento progresivo de la actividad uterina. En todos los casos en que se realizó la maniobra de inoculación en la cavidad intramniótica el embarazo terminó dentro de las siguientes 48 horas. Esto contrasta con el destino de los animales experimentales en los que la inoculación de las mismas bacterias y dosis se realizó en el espacio coriodecidual y en los que también se documentó aumento de las citocinas, nunca tan alto como en el primer caso, pero que no desarrollaron parto pretérmino.<sup>29</sup>

Además de la participación de los tejidos maternos en la respuesta inflamatoria, en los años recientes ha sido posible reconocer que el feto es capaz de reaccionar y complementar la respuesta inflamatoria destinada a eliminar la infección intrauterina.<sup>30</sup> Esto parece explicar algunas observaciones previas en las que se consideraba que el sistema inmunológico fetal no se encontraba adecuadamente desarrollado y, sin embargo, es un hecho que el producto no sólo dirige la producción de los polimorfonucleares que se encuentran en el líquido amniótico hacia el final de la gestación y en casos con infección intramniótica,<sup>31</sup> sino que es capaz de coordinar en su compartimiento, la secreción de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ .<sup>21</sup> Algunos autores proponen incluso la existencia de un síndrome fetal inflamatorio, que podría representar un mecanismo inespecífico de respuesta fetal a condiciones intrauterinas que comprometen su crecimiento y desarrollo, como la infección.<sup>32</sup>

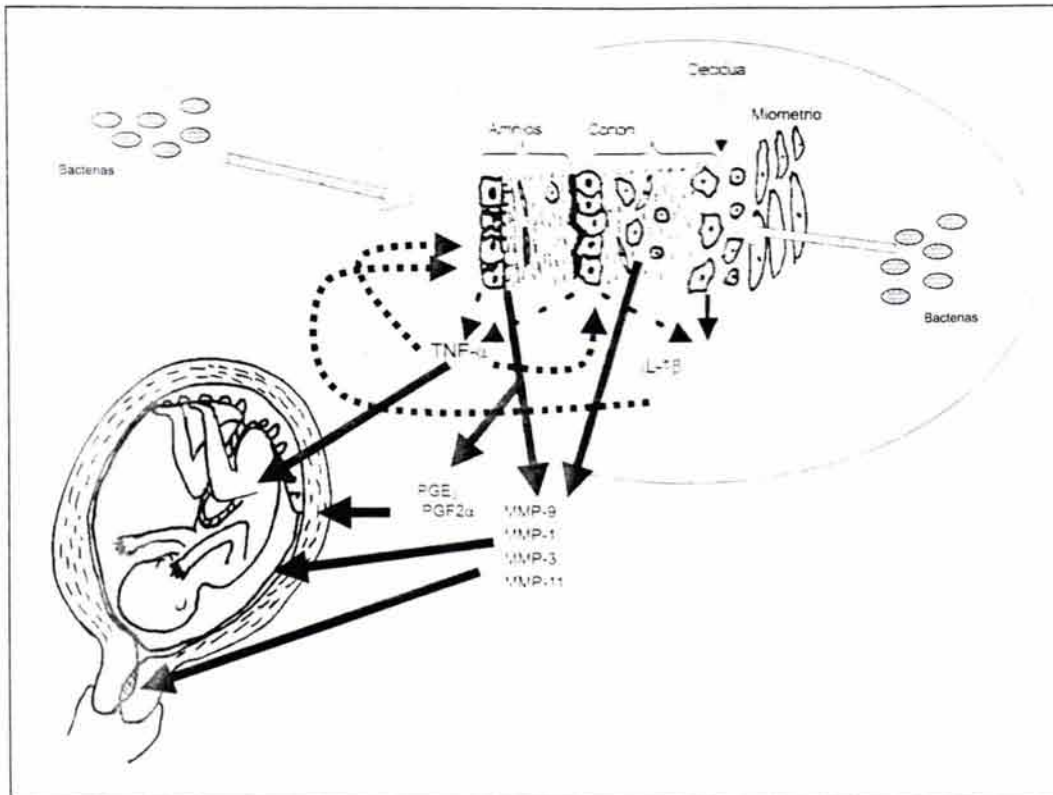
Las consecuencias de la activación de toda esta cascada de señales al arribo de los microorganismos al entorno intrauterino, resulta de manera normal en el control y/o eliminación de la invasión microbiana, pero desafortunadamente, todas las señales mencionadas arriba tienen efectos adicionales secundarios sobre otros sistemas que al ser inducidos pueden explicar el desarrollo del nacimiento pretérmino. Estas consecuencias, aunque ya se mencionaron

arriba, se enfatizan en los siguientes ejes fisiopatogénicos (Figura 2):

1. Efectos uterotónicos. La estimulación de diferentes células de las membranas corioamnióticas con IL-1 $\beta$  resulta en la inducción secundaria de la secreción de PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , las que a su vez promueven actividad de contracción uterina. Este efecto es mediado por la inducción de expresión del gene de ciclooxigenasa-2 en las células del epitelio amniótico por un mecanismo inhibible con IL-10 y dexametasona.<sup>33</sup>
2. Inducción de maduración cervical. El proceso ligado a la maduración cervical consiste en la degradación del tejido conectivo que compone a esta estructura y que permite su dilatación y borramiento. Además del efecto del TNF- $\alpha$  y de la IL-1 $\beta$ , que resultan en la secreción de diferentes enzimas con actividad lítica sobre la colágena, algunos productos bacterianos como el LPS son capaces de inducir la expresión de enzimas elastinolíticas.<sup>17</sup>
3. Ruptura de membranas corioamnióticas. A semejanza del proceso de preparación del cervix, la ruptura de las membranas corioamnióticas resulta de la degradación selectiva de los componentes de la

matriz extracelular, compuesta de colágena y que será descrita en detalle en la sección siguiente.

4. Efectos sistémicos sobre el feto. Durante el proceso infeccioso, el feto se encuentra expuesto a concentraciones elevadas de citocinas como el TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$ , que tienen efectos sobre los diferentes tejidos, incluyendo el sistema nervioso central, por lo que se ha propuesto que consecuencias como la sordera, la parálisis cerebral y otras secuelas neuromotoras resultan de la exposición directa de las neuronas susceptibles a las citocinas proinflamatorias, en especial el TNF- $\alpha$ .<sup>34</sup> Estos efectos deletéreos del TNF- $\alpha$  podrían ser amplificados en algunos individuos portadores de un polimorfismo del gene de TNF- $\alpha$  que afecta la región promotora e induce un fenotipo de transcripción del gene de hasta cinco veces mayor que el polimorfismo más común.<sup>35</sup> Esto significa que ante infecciones equivalentes los productos que acarrean el polimorfismo-2 del TNF- $\alpha$ , estarían expuestos a dosis mayores de la citocina. Estudios recientes han permitido establecer que las mujeres heterocigotas para el polimorfismo hiperfuncional tienen mayor susceptibilidad para desarrollar RPM y parto pretérmino.<sup>36</sup>



**Figura 2.** Secuencia fisiopatogénica del nacimiento pretérmino. El arribo de los microorganismos a cualquiera de los microambientes intrauterinos desencadena la respuesta inflamatoria, que de manera primaria es activada por células inmunitarias, para después ser amplificada por células locales. Los dos mediadores iniciales principales son el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y la interleucina 1-beta (IL-1 $\beta$ ). Estas dos citocinas inducen a las poblaciones del corion y amnios a sintetizar prostaglandinas y metaloproteasas de matriz extracelular (MMP), que finalmente ejecutan su acción sobre la actividad uterina o la degradación de matriz extracelular de las membranas y cervix.

## Ruptura prematura de membranas

Por lo menos 40% de todos los nacimientos pretérmino se asocian a ruptura prematura de membranas y por ello ésta patología obstétrica es la causa identificada más común del nacimiento pretérmino. En el caso de la RPM las manifestaciones se caracterizan por disolución de las membranas fetales o corioamnios en ausencia de otros eventos del trabajo de parto. En contraste, la historia natural del trabajo de parto muestra que las membranas corioamnióticas se rompen de modo tardío, en las fases 2 o 3 y son precedidas en la mayor parte de las mujeres, de contracciones uterinas y de dilatación cervical. Por muchos años, prevaleció la explicación de la RPM como consecuencia de la actividad uterina normal (contracciones de Braxton-Hicks) actuando sobre estructuras debilitadas. Sin embargo, a lo largo de los últimos años se ha conformado un panorama explicativo más complejo y que nos permite entender el origen multifactorial de la RPM. Nuestro grupo de investigación se ha ocupado del estudio de los mecanismos fisiopatogénicos involucrados en la RPM durante la última década y ha propuesto un mecanismo que ha sido aceptado de manera amplia en la literatura internacional.

Las membranas fetales que delimitan la cavidad amniótica están constituidas por dos capas histológicas adosadas, el amnios y el corion, cada una está formada por diferentes tipos celulares, incluyendo células epiteliales, mesenquimatosas, inmunológicas y trofoblastos, todos ellos embebidos en una prominente matriz extracelular cuyo principal componente es la colágena. Las membranas corioamnióticas en conjunto son una identidad anatómica sumamente dinámica que secreta diferentes sustancias hacia el líquido amniótico y es capaz de responder a diferentes señalizaciones bioquímicas provenientes tanto del producto como de la madre.<sup>9,37</sup>

El soporte estructural de las membranas es proporcionado en su mayoría por el amnios que con su capa compacta, constituida de tejido conectivo que forma un esqueleto fibroso formado principalmente de colágenas tipo I, III, IV, V y fibronectina. El corion es más grueso que el amnios, pero su contenido y organización de matriz extracelular, constituida por colágenas tipo I, III, IV, V y proteoglicanos, solamente soportan alrededor de 30% del estrés mecánico.<sup>38</sup> Dado que la colágena es el principal soporte estructural de las membranas corioamnióticas y tomando en cuenta que el mantenimiento de la fuerza tensil de éstas parece involucrar el equilibrio entre la síntesis y la degradación de los componentes de la

matriz extracelular, nuestro grupo ha aportado evidencias que indican que el incremento en la actividad colagenolítica es el mecanismo central en la fisiopatología de la RPM y que explican los cambios morfológicos tan aparentes en las membranas fetales de estos casos.<sup>39</sup>

La degradación de la colágena está mediada bajo condiciones fisiológicas por una familia de endopeptidasas llamadas metaloproteasas de matriz extracelular (MMP), también conocidas como matrixinas. Estas enzimas tienen características funcionales muy semejantes, todas ellas actúan en condiciones fisiológicas, dependen de  $Zn^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  y muestran gran selectividad por su sustrato. Todos los miembros de esta familia son secretados como proenzimas, las cuales son activadas por otros miembros de la familia o por diferentes proteasas extracelulares, como el activador de plasminógeno. Las MMP hidrolizan al menos un componente de la matriz extracelular y en la mayoría de los casos el catabolismo de los diferentes componentes de ésta es el resultado de una acción concertada entre varias enzimas.<sup>40</sup> Tomando en cuenta que la colágena tipo IV es uno de los principales constituyentes de las membranas corioamnióticas<sup>41</sup> se han caracterizado los mecanismos moleculares que resultan en la pérdida de este componente en el proceso de ruptura normal y en el que se asocia a la RPM. Los primeros estudios permitieron establecer que la actividad de uno de los miembros de las metaloproteasas, la MMP-9 o gelatinasa de 92 kDa se incrementa de manera específica en las membranas fetales humanas al momento del parto normal: antes de este momento es indetectable.<sup>42</sup> Este comportamiento se ha corroborado y caracterizado en modelos animales en roedores<sup>43</sup> y primates no humanos.<sup>29</sup> La MMP-9 es producida por diferentes células de la membrana fetal, incluyendo al trofoblasto, la célula decidual y el epitelio amniótico.<sup>44</sup> Sin embargo, durante el trabajo de parto normal o en la RPM, son poblaciones de células circulantes que arriban al entorno coriodecidual, las más relevante en términos de la cantidad de enzima secretada. Estas poblaciones celulares reclutadas al ambiente de las membranas aún no han sido caracterizadas, pero tienen fenotipo CD3+, lo que las identifica como linfocitos.

La RPM, por su parte, se caracteriza por incremento en la expresión de la MMP-9 y disminución de su inhibidor tisular específico, conocido como TIMP-1.<sup>45-47</sup> Observaciones más detalladas han permitido determinar que la concentración de MMP-9 en líquido amniótico es dos veces más alta en aquellas mujeres con RPM pretérmino que en las que el embara-

zo llegó a término. Se observó también que la concentración de MMP-1, otra metaloproteasa relevante no se encuentra alterada.<sup>48</sup>

Cuando las membranas corioamnióticas son estimuladas con LPS, TNF- $\alpha$  o IL-1 $\beta$ , responden incrementando la síntesis y secreción de MMP-9<sup>27,49</sup> y otras metaloproteasas como MMP-2,<sup>50</sup> MMP-3 y MMP-11.<sup>51</sup> Por otro lado, las membranas corioamnióticas tienen la capacidad de sintetizar TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en respuesta a la estimulación con LPS y lo hacen con polaridad, ya que la secreción de IL-1 $\beta$  está restringida a células del corion, en tanto que el TNF- $\alpha$  puede ser secretado por ambas membranas, aunque el amnios parece ser la fuente principal.<sup>52</sup> La capacidad para responder al estímulo con IL-1 $\beta$  se ha ensayado en modelos animales íntegros y la respuesta de secreción de MMP-9 es indistinguible si se utiliza esta citocina o bacterias patógenas depositadas en la zona coriódécidual.<sup>29</sup>

Todo lo anterior permite corroborar que las membranas corioamnióticas conforman uno de los subsistemas que participan en el desarrollo del parto humano normal y que al ser estimuladas por componentes del proceso infeccioso, cuenta con toda la maquinaria necesaria para activarse y llevar adelante el proceso de ruptura característico del trabajo de parto o al que define a la RPM.

## CONCLUSIONES

Existe suficiente evidencia biomédica, clínica y epidemiológica para establecer una relación causa efecto entre la infección intrauterina y el desarrollo del nacimiento pretérmino. Aunque ya se han publicado varios estudios dirigidos a intervenir en el desarrollo de la infección clínica o subclínica durante el embarazo, como una manera de prevenir la activación del parto prematuro o la RPM, es preciso afinar más las metodologías dirigidas a detectar la infección y sus consecuencias. Esto permitiría la identificación temprana de las pacientes embarazadas en riesgo. Tampoco hay que perder la perspectiva de que existen otras causas y mecanismos involucrados en la fisiopatología del nacimiento pretérmino y que aún desconocemos.

## PREGUNTAS Y RESPUESTAS

1. Dr. Gerardo Gamba Ayala (Unidad de Fisiología Molecular, INCMNSZ e Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM). ¿A qué se puede atribuir las diferencias en la frecuencia de la infección por ureaplasma en México, comparada con otras series? ¿Es diferente el método de detección?

Dr. Vadillo: El estudio al que hice referencia durante la plática, es el primero realizado en población mexicana (referencia 11 del manuscrito principal) y refleja información de pacientes capturadas en tres instituciones de la ciudad de México y en otra de la ciudad de Culiacán, Sinaloa. Los datos muestran que la prevalencia de la infección por *Ureaplasma* parece ser distintiva de la población analizada, ya que utilizamos los criterios de identificación vigentes y que incluyó su identificación por métodos microbiológicos, así como la confirmación de la presencia de la bacteria por hibridación con sondas de DNA específicas.

2. Dr. Gerardo Gamba Ayala (Unidad de Fisiología Molecular, INCMNSZ e Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM). En la gráfica que presentaste, en donde se muestra el aumento de la IL-1beta, en los pacientes con polimorfismos, yo había entendido que era un polimorfismo en un aminoácido, es decir, que cambia un aminoácido. Por otro lado, ¿la gráfica muestra actividad o concentración?

Dr. Vadillo: Es correcto, el polimorfismo que exploramos para el gene de la interleucina-1 $\beta$  corresponde a una mutación puntual en la posición +3953 y que resulta en secreción aumentada de la citocina, aunque desconocemos el mecanismo de este efecto. En la gráfica en la que se exploró la capacidad de respuesta de membranas corioamnióticas portadoras de diferentes polimorfismos del gene de IL-1 $\beta$ , solamente cuantificamos la concentración de la citocina liberada al medio, luego de la estimulación con lipopolisacárido bacteriano.

3. Dr. Eduardo Carrillo Maravilla (Médico Adscrito a Medicina Interna, Dirección de Medicina, INCMNSZ). ¿Existe alguna correlación entre el tipo de microorganismo que infecta, el tipo de productos bacterianos de éste, y la capacidad de inducir el trabajo de parto pretérmino?

Dr. Vadillo: En el estudio al que me refería en la primera pregunta hecha por el Dr. Gerardo Gamba, encontramos que la identificación de *Ureaplasma urealyticum* en el exudado cervicovaginal de la mujer embarazada, representa un factor de riesgo de hasta 9.1 (IC 6.93-12.1), sin duda el más alto de los descritos. Sin embargo, desconocemos los mecanismos patogénicos de la bacteria. En otros estudios ha sido posible asociar la presencia de microorganismos gramnegativos, como *E. coli*, que podrían explicar su patogénesis al liberar lipopolisacáridos.



4. Dr. Eduardo Carrillo Maravilla (Médico Adscrito a Medicina Interna, Dirección de Medicina, INCMNSZ). ¿Se ha encontrado algún tipo de receptor de la clase Toll-like (receptores de inmunidad innata) ligado con la expresión de la metaloproteína-9?

Dr. Vadillo: El mejor estudiado es el receptor de lipopolisacárido, que se encuentra presente en diferentes poblaciones celulares distintas a las inmunológicas. Dentro de ellas, y de interés para la fisiopatología del parto pretérmino, hemos caracterizado en otros trabajos, la respuesta de secreción de MMP-9 por células del epitelio amniótico y de trofoblastos, al ser estimuladas *in vitro* con LPS.

5. Dr. Enrique Coss Adame (Residente de 1er. año de Medicina Interna, INCMNSZ). ¿Existe una contraparte en el cérvix de lo que ocurre a nivel de membranas en cuanto a la respuesta inflamatoria y a la actividad de la metaloproteinasas de la matriz extracelular?

Dr. Vadillo: Lo que sabemos del fenómeno de dilatación y borramiento cervical durante el trabajo de parto normal o pretérmino, involucra fenómenos muy equivalentes a los detallados para la ruptura de las membranas corioamnióticas y solamente se distinguen porque en el cérvix, la metaloproteína de matriz extracelular que participa proviene de los fibroblastos locales y corresponde a la colagenasa intersticial o MMP-13.

6. Dr. Lorenzo Sánchez (Residente de 3er. año de Medicina Interna, INCMNSZ). Debido a que la IL-1 regula la expresión de las metaloproteinasas de matriz extracelular, ¿se puede correlacionar los valores de proteína C reactiva con la expresión de proteasas y, por lo tanto, pudiera ser una prueba diagnóstica de trabajo de parto pretérmino o corioamniotitis?

Dr. Vadillo: Hace algunos años se intentó correlacionar la concentración sérica de proteína C reactiva con el desarrollo de parto pretérmino, sin embargo, dado su carácter altamente inespecífico, resultó poco útil como prueba diagnóstica o pronóstica. La impresión es que es posible utilizarla en combinación con otros marcadores pronósticos de parto pretérmino, como la fibronectina oncofetal en exudado cervicovaginal, lo que aumenta su sensibilidad y especificidad.

#### REFERENCIAS

- Alexander GR. Preterm birth: etiology, mechanisms and prevention. *Prenat Neonat Med* 1998; 3: 3-9.
- Anuario Estadístico 2001. Instituto Nacional de Perinatología.
- Alexander GR, Weiss J, Hulsey TC, Papiernik E. Preterm birth prevention: an evaluation of programs in the United States. *Birth* 1991; 18: 160-9.
- Goldenberg RL, Andrews WW. Editorial. Intrauterine infection and why preterm prevention programs have failed. *Am J Pub Health* 1996; 86: 781-3.
- Gomez R, Romero R, Edwin SS, David C. Pathogenesis of preterm labor and preterm premature rupture of membranes associated with intraamniotic infection. *Infect Dis Clin North Am* 1997; 11: 135-76.
- Normas y procedimientos de Ginecología y Obstetricia. Instituto Nacional de Perinatología 2002.
- Romero R, Avila C, Brekus CA, Morotti R. The role of systemic and intrauterine infection in preterm parturition. *Ann New York Acad Sci* 1991; 622: 355-75.
- Goldenberg R, Aut. J, Andrews W. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Eng J Med* 2000; 1500-7.
- Parry S, Strauss JF. Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med* 1998; 338: 663-8.
- McGregor JA, French JI. Bacterial vaginosis in pregnancy. *Obstet Gynecol Surv* 2000; 55: S1-S19.
- Beltran J, Avila M, Vadillo-Ortega F, Hernandez C, Peraza F, Olivares S. Infección cervicovaginal como factor de riesgo para parto pretérmino. *Ginecol Obstet Mex* 2002; 70: 203-9.
- Romero R, Quintero R, Oyarzun E, Wu YK, et al. Intraamniotic infection and the onset of labor in preterm premature rupture of the membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 159: 661-6.
- McDonald HM, O'Loughlin JA, Jolley PT, Vigneswaran R, McDonald PJ. Changes in vaginal flora during pregnancy and association with preterm birth. *J Infect Dis* 1994; 170: 724-8.
- Lamont R, Anthony F, Myatt L, Booth L, Path M, Furr P, Taylor-Robinson D. Production of prostaglandin E<sub>2</sub> by human amnion *in vitro* in response to addition of media conditioned by microorganisms associated with chorioamnionitis and preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162: 819-25.
- Reisenberger K, Egarter C, Knöfler M, Schiebel I, Gregor H, Hirschl A, Heinza G, Husslein P. Cytokine and prostaglandin production by amnion cells in response to the addition of different bacteria. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178: 50-3.
- Draper D, McGregor J, Hall J, Jones W, Bautz M, Heine P, Porreco R. Elevated protease activities in human amnion and chorion correlate with preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 1506-12.
- Watari M, Watari H, Nachamkin I, Strauss JF. Lipopolysaccharide induces expression of genes encoding pro-inflammatory cytokines and elastin-degrading enzyme, cathepsin S in human cervical smooth-muscle cells. *J Soc Gynecol Invest* 2000; 7: 190-8.
- Hersh D, Weiss J, Zychlinsky A. How bacteria initiate inflammation: aspects of the emerging story. *Curr Opin Microbiol* 1998; 1: 43-8.
- Svanborg C, Godaly G, Hedlund M. Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defense. *Curr Opin Microbiol* 1999; 2: 99-105.
- Mitchell M, Edwin S, Lundin-Sciller S, Silver R, Smotkin D, Trautman M; mechanism of interleukin-1 $\beta$  stimulation of human amnion prostaglandin biosynthesis: mediator via a novel inducible cyclooxygenase. *Placenta* 1993; 14: 615-25.
- Yoon B, Romero R, Park J, Chang J, Kim Y, Kim J, Kim K. Microbial invasion of the amniotic cavity with *Ureaplasma urealyticum* is associated with a robust host response in fetal, amniotic, and maternal compartments. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179: 1254-60.

22. Keelan J, Coleman M, Mitchel M. The molecular mechanisms of term and preterm labor: recent progress and clinical implications. *Clin Obstet Gynecol* 1997; 40: 460-78.
23. Hsu C, Meaddough E, Aversa K, Hong S, Lu L, Jones D, Copel J. Elevated amniotic fluid levels of leukemia inhibitory factor, interleukin 6, and interleukin 8 in intra-amniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179: 1267-70.
24. Reisenberger K, Egarter C, Schiebel I, Obermair A, Kiss H, Lehner R. *In vitro* cytokine and prostaglandin production by amnion cells in the presence of bacteria. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176: 981-4.
25. Tashima L, Millar L, Bryant-Greenwood G. Genes upregulated in human fetal membranes by infection or labor. *Obstet Gynecol* 1999; 94: 441-9.
26. Steiborn A, Gall C, Hildenbrand R, Stutte H, Kaufmann M. Identification of placental cytokine-producing cells in term and preterm labor. *Obstet Gynecol* 1998; 91: 329-35.
27. Arechavaleta-Velasco F, Ogando D, Parry S, Vadillo-Ortega F. Production of matrix metalloproteinase-9 in lipopolysaccharide-stimulated human amnion occurs through a autocrine/paracrine proinflammatory cytokine-dependent system. *Biol Reprod* 2002; 67: 1952-8.
28. Gravett M, Witkin S, Novy M. A nonhuman primate model for chorioamnionitis and preterm labor. *Sem Reprod Endocrinol* 1994; 15: 210-24.
29. Vadillo-Ortega F, Sadowsky D, Haluska G, Hernandez-Guerrero C, Guevara Silva R, Gravett M, Novy M. Identification of matrix metalloproteinase-9 in amniotic fluid and amniochorion in spontaneous labor and after experimental intrauterine infection or interleukin-1 $\beta$  infusion in pregnant rhesus monkeys. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186: 128-38.
30. Eschenbach D. Amniotic fluid infection is a fetal infection. *Prenat Neonat Med* 1998; 3: 76-81.
31. Sampson J, Theve R, Blatman R, Shipp T, Bianchi D, Ward B, et al. Fetal origin of amniotic fluid polymorphonuclear leukocytes. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176: 77-81.
32. Gomez R, Romero R, Ghezzi F, Yoon B, Mazor M, Berry S. The fetal inflammatory response syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179: 194-202.
33. Sadowsky D, Novy M, Witkin S, Gravett M. Dexamethasone or interleukin-10 blocks interleukin-1 $\beta$ -induced uterine contractions in pregnant rhesus monkeys. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188: 252-63.
34. Romero R, Maymon E, Pacora P, Gomez R, Mazor M, Yoon B, et al. Further observations on the fetal inflammatory response syndrome: a potential homeostatic role for soluble receptors of tumor necrosis factor alpha. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: 1070-7.
35. Hernandez-Guerrero C, Monzon-Bordonaba F, Jimenez-Zamudio L, Ahued-Ahued R, Arechavaleta-Velasco F, Strauss JF III, Vadillo-Ortega F. *In vitro* secretion of proinflammatory cytokines by human amniochorion carrying hyperresponsive gene polymorphisms of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$ . *Mol Hum Reprod* 2003; 9: 1-5.
36. Roberts AK, Monzon-Bordonaba F, Van Deerlin PG, Holder J, Macones GA, Morgan MA, Strauss JF, Parry S. Association of polymorphism within the promoter of the tumor necrosis factor a gene with increased risk of preterm premature rupture of the fetal membrane. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180: 1297-302.
37. Bryant-Greenwood GD. The extracellular matrix of the human fetal membranes: structure and function. *Placenta* 1998; 19: 1-11.
38. Malak TM, Mulholland G, Bell SC. Morphometric characteristics of the decidua, cytotrophoblast, and connective tissue of the prelabor ruptured fetal membranes. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 734: 430-3.
39. Paavola LG, Emma EF, Delgado V, Boyd CO, Jacobs C, Lei H, Strauss JF. Striking changes in the structure and organization of rat fetal membranes precede parturition. *Biol Reprod* 1995; 53: 321-8.
40. Woessner F, Nagase H. *Matriz metalloproteinases and TIMPs*. London: Oxford University Press; 2000.
41. Malak TM, Ockleford CD, Bell SC, Dalgleish R, Bright N, Mavcicar J. Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes. *Placenta* 1993; 14: 385-406.
42. Vadillo-Ortega F, Gonzalez-Avila G, Furth EE, Lei H, Muschel RJ, Stetler-Stevenson WG, Strauss JF. 92-kd type IV Collagenase (Matrix Metalloproteinase-9) activity in human amniochorion increases with labor. *Am J Pathol* 1995; 146: 148-56.
43. Lei H, Vadillo-Ortega F, Paavola LG, Strauss JF. 92-Kda Gelatinase (Matrix Metalloproteinase-9) is induced in rat amnion immediately prior to parturition. *Biol Reprod* 1995; 53: 339-44.
44. Arechavaleta F, Hernández Guerrero C, Vadillo-Ortega F. Type-II apoptosis and 92 kDa type-IV collagenase expression in human amniochorion in prematurely rupture membranes is associated with tumor necrosis factor receptor-1 expression. *J Soc Gynecol Invest* 2002; 9: 60-7.
45. Vadillo-Ortega F, Hernández A, González-Avila G, Bermejo L, Iwata K, Strauss JF. 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: 1371-6.
46. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SL. MMP/TIMP imbalance in amniotic fluid during PROM: an indirect support for endogenous pathway to membrane rupture. *J Perinat Med* 1999; 27: 362-8.
47. Locksmith GJ, Clark P, Duff P, Schultz GS. Amniotic fluid matrix metalloproteinase-9 levels in women with preterm labor and suspected intra-amniotic infection. *Obstet Gynecol* 1999; 94: 1-6.
48. Athayde N, Edwin S, Romero R, Gomez R, Maymon E, Pacora P, et al. A role for matrix metalloproteinase-9 in spontaneous rupture of the fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179: 1248-53.
49. Estrada G, Vadillo-Ortega F, Jiménez M, Beltran J, Giono S. Caracterización bioquímica y ultraestructural del efecto de la interleucina 1 $\beta$  como mediador de degradación de tejido conectivo en membranas corioamnióticas humanas en cultivo. *Ginecol Obstet Mex* 2002; 70: 190-5.
50. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Collagenolytic enzymes (gelatinases) and their inhibitors in human amniochorionic membrane. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177: 731-41.
51. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Stromelysins in placental membranes and amniotic fluid with premature rupture of membranes. *Obstet Gynecol* 1999; 94: 435-40.
52. Zaga V, Estrada-Gutierrez G, Beltran-Montoya J, Maida R, Lopez-Vancell R, Vadillo-Ortega F. Differential secretion of cytokines by amniochorion is dependent of lipopolysaccharide or group b *Sreptococcus* primary contact with fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* (en prensa).

#### Reimpresos

**Dr. Felipe Vadillo Ortega**

Dirección de Investigación

Instituto Nacional de Perinatología

Montes Urales 800, Lomas de Virreyes

11000, México, D.F.

Correo electrónico: fvadillo@servidor.inper.edu.mx

Recibido el 1 de julio de 2003.

Aceptado el 30 de septiembre de 2003.