



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas**

**Expresión de Metaloproteasas de Matriz en el  
corioamnios de rata durante la gestación y  
el trabajo de parto.**

**T E S I S**

**Que para obtener el grado de:**

**Dr. En Ciencias Biomédicas**

**P R E S E N T A N**

**Biól. NOEMI MERAZ CRUZ**

**Cotutor**

**Dr. Felipe Vadillo Ortega.**



**MÉXICO, D.F.**

**Febrero, 2007**



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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas**

**Expresión de Metaloproteasas de Matriz en el  
corioamnios de rata durante la gestación y  
el trabajo de parto.**

**TESIS**

**Que para obtener el grado de:**

**Dr. En Ciencias Biomédicas**

**P R E S E N T A N**

**Biól. NOEMI MERAZ CRUZ**

**Tutor**

**Dr. Felipe Vadillo Ortega.**

**Cotutores**

**Dr. Gerardo Gamba Ayala**

**Dr. Enrique Pedernera Astegiano**



**MÉXICO, D.F.**

**Febrero, 2007**

**El trabajo de investigación de esta tesis se realizó en el laboratorio de la Dirección de Investigación del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” como parte de los estudios de posgrado en el Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de México.**

**Los estudios de Doctorado fueron posibles gracias al apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca No. 93301.**

# **AGRADECIMIENTOS**

**Agradezco a las siguientes personas:**

**Dr. Felipe Vadillo Ortega, por permitirme estar a su lado  
Compartiendo momentos que nunca se olvidarán,  
Conocimiento y amistad.**

**A mis cotutores e integrantes del jurado por su cuidadosa  
revisión y sus valiosos comentarios para enriquecer  
Este trabajo.**

**A mis amigos: Toñita, Arturo, Aurora, César, Rosario, Paty,  
porque con su amistad la vida es más fácil.**

## **DEDICATORIA**

**Dedico esta tesis a mis pequeños Nelly y Juan Daniel, pues ustedes son mi estímulo para seguir adelante. Ciertamente es que hay momentos que no hemos pasado juntos pero, lo que sigue lo disfrutaremos más.**

**Papá, mamá, Nelly y Wendy, sin su apoyo mi presente no existiría.**

**Juan, que te parece?**

## **Miembros del Jurado**

Dr. Ruy Pérez Montfort.

Dr. Felipe Vadillo Ortega

Dr. Rolando Hernández Muñoz

Dra. Alicia Ortega Aguilar

Dr. Enrique Pedernera Astegiano

## INDICE GENERAL

CONTENIDO	PAGINA
<b>1. ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. RESUMEN .....</b>	<b>2</b>
<b>3. ABSTRACT .....</b>	<b>4</b>
<b>4. INTRODUCCION .....</b>	<b>6</b>
4.1 Membranas Fetales (MF)....	9
4.1.1 Estructura.....	9
4.1.2 Función.....	11
4.1.3 Nuestro modelo.....	13
Cambios observados en la morfología de las membranas fetales de la rata durante la gestación.	
4.2 La familia de las Metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP).....	15
4.3 El papel de las MMP y TIMP en el proceso normal de ruptura y en la RPM.....	20
4.4 Panorama actual en el estudio de la ruptura de membranas.....	21
<b>5. HIPÓTESIS.....</b>	<b>23</b>
<b>6. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>23</b>
6.1 Objetivos particulares.....	23



<b>7. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
7.1 Material Biológico.....	24
7.2 Reactivos y Equipo.....	25
7.3/7.4 Métodos.....	26
7.3 Fase 1.	
7.3.1 Colecta de muestras biológicas.....	26
7.3.2 Preparación de extractos de MCA.....	26
7.3.3 Actividad enzimática.....	27
7.3.4 Electroforesis SDS y Zimografía.....	28
7.3.5 Western Blot.....	29
7.3.6 Northern Blot.....	30
7.4 Fase 2.	
7.4.1 Preparación del tejido.....	30
7.4.2 Cromatografía de filtración molecular.....	31
7.4.3 Calorimetría Diferencial de Barrido.....	32
7.4.4 Actividad enzimática de los extractos de EDTA...	33
7.4.5 Determinación inmunohistoquímica.....	33
7.4.6 Microscopía Confocal.....	34
<b>8.1/8.2 RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>

8.1 Fase 1	
8.1.1 Actividades proteolíticas en extractos tisulares y líquido amniótico.....	35
8.1.2 Perfil de inhibición de proteasas.....	36
8.1.3 Caracterización de MMP por zimografía.....	37
8.1.4 Activación con APMA.....	39
8.1.5 Western Blot y Northern Blot....	40
8.2 Fase 2.	
8.2.1 Zimografía.....	43
8.2.2 Efecto del EDTA sobre la actividad gelatinolítica..	43
8.2.3 Componentes presentes en los extractos con EDTA identificados por western blot.....	45
8.2.4 Cromatografía FPLC.....	46
8.2.5 Calorimetría Diferencial de Barrido.....	48
8.2.6 Dependencia de la actividad enzimática del complejo presente en las membranas fetales al calcio.....	52
8.2.7 Identificación de los componentes del complejo en las MCA libres de células por inmunohistoquímica.....	52
8.2.8 Colocalización de los componentes del complejo por microscopía confocal.....	54
<b>9. DISCUSIÓN.....</b>	<b>57</b>
<b>10. REFERENCIAS.....</b>	<b>71</b>

<b>11. APÉNDICE DE SOLUCIONES UTILIZADAS.....</b>	<b>80</b>
<b>12. INDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>81</b>
<b>13. ARTÍCULOS PUBLICADOS.....</b>	<b>83</b>

## 1. ABREVIATURAS

CDB	microCalorimetría Diferencial de Barrido.
E <sub>Ca</sub>	Extracto conteniendo calcio.
E <sub>EDTA</sub>	Extracto conteniendo EDTA.
EDTA	Etilen Diamino Tetra Acético.
LA	Líquido Amniótico.
MCA	Membranas Corioamnióticas (humano) ó Corioalantoideas (rata). También se denominan membranas fetales.
MMP	Metaloproteinasas de matriz extracelular.
MMP-1	Metaloproteinasa de matriz extracelular-1 o colagenasa Intersticial.
MMP-2	Metaloproteinasa de matriz extracelular-2 o gelatinasa A.
MMP-3	Metaloproteinasa de matriz extracelular-3 o estromelisinina 1.
MMP-7	Metaloproteinasa de matriz extracelular-7 o matrilisinina.
MMP-8	Metaloproteinasa de matriz extracelular-8 o colagenasa de neutrófilos.
MMP-9	Metaloproteinasa de matriz extracelular 9 o gelatinasa B.
MT-MMP	Metaloproteinasas de membrana.
PP	Parto Pretérmino.
RPM	Ruptura Prematura de Membranas.
TIMP-1	Inhibidor tisular de Metaloproteinasa-1.
TIMP-2	Inhibidor tisular de Metaloproteinasa-2.
TP	Trabajo de Parto.

## 2. RESUMEN

Las metaloproteinasas de matriz (MMP) son una familia de enzimas que se secretan en forma inactiva al espacio extracelular y su activación fisiológica es un proceso poco conocido. La degradación de la membrana corioalantoidea (MCA) de la rata representa un ejemplo natural, en el que estas enzimas son selectivamente activadas al momento del desarrollo del trabajo de parto y en asociación estrecha con eventos como la contracción uterina y la dilatación cervical. En este trabajo se caracterizó la expresión y actividad de MMPs en las MCA y líquido amniótico (LA) de la rata durante la gestación y el trabajo de parto. Se demostró la existencia de un complejo de alto peso molecular, formado por diferentes MMPs y TIMPs (inhibidores tisulares de metaloproteasas) que se extrajo de preparaciones de MCA y se mostró su estabilización por calcio. Este complejo, en tanto se encuentra estable, confiere latencia a las enzimas que lo componen, lo que abre la opción de su posible papel en la degradación del tejido conjuntivo en estos tejidos. Para la realización de este estudio se analizaron muestras de MCA y LA obtenidas en ratas con embarazos programados y sincronizados. Se prepararon extractos de MCA en presencia de calcio de las que se eluyó el complejo de MMP mediante un tratamiento con EDTA. Los complejos disociados o restaurados por adición de calcio fueron analizados por calorimetría diferencial, cinética enzimática y zimografía. Así mismo, preparaciones de tejido libre de células fueron sometidas a análisis por inmunohistoquímica y microscopía confocal. Los resultados mostraron que existen diferencias en la expresión de MMPs a lo largo de la gestación, además de un incremento en la actividad

proteolítica en las MCA y LA horas antes del trabajo de parto. La calorimetría reveló en muestras obtenidas al final de la gestación, la existencia de un complejo que en presencia de calcio presentó un amplio rango de desnaturalización ( $T_m$  de  $72^\circ\text{C}$ ). Cuando fue analizado en ausencia de calcio, se observaron ocho diferentes temperaturas de transición con  $T_{ms}$  que correspondían a proMMP-9, MMP-9, proMMP-3, MMP-3, proMMP-2, MMP-2, TIMP-1 y TIMP-2, de acuerdo a los parámetros obtenidos al correr las correspondientes proteínas recombinantes. El perfil cinético, medido como actividad sobre un sustrato sintético de gelatinasas, mostró actividad máxima en un rango de 0.7 a 2.1 mM de calcio. Por arriba de esta concentración las enzimas adquirieron estado latente. Estos resultados fueron confirmados por zimografía. La presencia de cada una de las enzimas y TIMP detectados en presencia de calcio, fue identificada en el tejido por inmunohistoquímica. Finalmente la colocalización de todos los componentes moleculares del complejo fue demostrado sobre la matriz extracelular de las MCA por análisis con microscopía confocal. Todos los resultados obtenidos sustentan la posibilidad de que el complejo de MMP forma parte de la composición normal de las MCA a término. Por otro lado, el ensamble/desensamble del complejo que confiere latencia o actividad enzimática respectivamente, ocurre dentro de un rango de concentración de calcio fisiológica, que permite postular su posible papel en la degradación del tejido conjuntivo que acompaña al evento del trabajo de parto.

### 3. ABSTRACT

Induction of expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and their extracellular activation are key processes in connective tissue degradation in the chorioallantoic membrane (CAM) during rat labor. However, the regulatory mechanisms remain largely unknown. Here we describe and characterize sequentially the activity of the enzymes that degrade connective tissue in the CAM and amniotic fluid (AF) of the rat during pregnancy and labor. Moreover, we report the identification of a calcium-dependent high molecular weight complex composed of different MMPs and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP). Pregnant Wistar rats were sacrificed on different days of gestation and samples of CAM and AF were collected to be analyzed for proteolytic activity, zymography, Western blot and Northern blot. We realized extracts of the CAM obtained 12 hours before labor. These extracts were subjected to fast protein liquid chromatography (FPLC) and differential scanning calorimetry (DSC) for the characterization of a calcium-dependent complex. It was identified in the tissue extracts and using cell-depleted CAM. The identification of this complex was verified by immunohistochemistry and confocal microscopy. Results showed that during labor, there is a significant increase in the proteolytic activity in the CAM and AF. MMPs mRNA expression were coincident with enzymatic activity and Western blot data. Molecular sieve chromatography confirmed the presence of a complex of MMPs and TIMPs with an exclusion volume above 670 kDa. Differential scanning calorimetry of the complex confirmed the existence of a macromolecular complex that unfolds with a broad transition; it is denatured over a wide range of

temperatures and has a  $T_m$  of 72 °C in the presence of  $Ca^{2+}$ . When denatured in the absence of  $Ca^{2+}$ , there were at least eight transitions with  $T_m$ s that corresponded to proMMP-9, MMP-9, proMMP-3, MMP-3, proMMP-2, MMP-2, and TIMP-2. Co-localization of the same molecular components was demonstrated by confocal microscopy using cell-depleted chorioallantoid membranes. The assembly and disassembly of the complex can be reproduced at physiological concentrations of calcium. This complex provides a potential mechanism for the enzymatic regulation of MMPs, which may participate in connective tissue degradation leading to rupture of the fetal membranes during labor.



#### 4. INTRODUCCION

El proceso biológico comprendido desde que se produce la fecundación hasta el nacimiento de un nuevo individuo se denominó gestación, en este período hay crecimiento y desarrollo del feto dentro del útero de la madre, finalizando con un conjunto de acontecimientos que se suceden para permitir la salida del recién nacido. Esta última fase se llama trabajo de parto.

El trabajo de parto comprende la ruptura de las membranas corioamnióticas, de manera sincrónica con las contracciones uterinas, la dilatación y el borramiento del cuello del cérvix, eventos que se presentan asociados para facilitar la expulsión del producto. Sin embargo, en algunos casos se ha observado que las membranas se rompen en ausencia de todos los demás eventos que caracterizan el trabajo de parto, patología que se ha denominado ruptura prematura de membranas (RPM). Esta entidad nosológica se define como la pérdida de continuidad de las membranas fetales con salida de líquido amniótico, por lo menos dos horas antes de que inicie el trabajo de parto, y en embarazos mayores de 20 semanas (ACOG, 2003).

La RPM es una complicación del embarazo, cuya gravedad aumenta directamente con la temporalidad con que se presenta en la gestación, poniendo en riesgo la vida del producto y la madre cuanto más temprana ocurra. Esto la coloca como un problema grave de salud (ACOG, 2003), aportando un tercio de los prematuros que ingresan a terapia intensiva neonatal y es causa directa de la quinta parte de las muertes de estos neonatos (Beltrán y Enríquez, 2004). La frecuencia de RPM en nuestro país es del 10% y en el Instituto Nacional de

Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes (INPerIER), su prevalencia es alta por la naturaleza de la institución, que concentra población de riesgo elevado, alcanzando la cifra de 12% de los nacimientos (INPer, 2000).

A pesar de la frecuencia con la que se presenta la RPM y los elevados riesgos de morbimortalidad por prematurez del producto o por infección materna y perinatal, aún existe controversia en cuanto a su manejo, etiología, factores desencadenantes y asociados. Hasta el momento se considera que la etiopatogenia de la RPM es multifactorial. La infección y la inflamación son sucesos importantes en su génesis (Goldenberg y cols., 2000). Sin embargo, ni todas las RPM cursan con infección, ni todas las mujeres infectadas desarrollan RPM. Otros factores relacionados con la RPM son deficiencia de nutrimentos, tabaquismo, enfermedades transmitidas sexualmente, conización previa, embarazo pretérmino previo, RPM previa, antecedente de amenaza de parto pretérmino, distensión uterina, sangrado transvaginal, cerclaje y amniocentesis (Casanueva,1991; Beltrán y Enríquez, 2004).

A pesar de existir todos estos datos de asociación con la RPM, actualmente el mecanismo que conduce a la ruptura prematura no ha sido completamente esclarecido. Recientemente se han realizado aportaciones para entender que esta complicación obstétrica resulta de una compleja red de señalizaciones, todavía poco caracterizada, entre las poblaciones celulares que se localizan en la interfase entre la madre y los tejidos fetales (Parry y Strauss, 1998).

Se ha propuesto que el mecanismo molecular que desencadena la ruptura de membranas involucra diversos procesos bioquímicos, entre los que se encuentran la disminución en su contenido de colágena, la alteración de su estructura y el

incremento en la actividad colagenolítica (Malak y Bell, 1994; Vadillo y cols., 1990; Vadillo y cols., 1995). En este último punto se ha encontrado la participación de una familia de proteasas denominadas metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP), que se expresan en las membranas corioamnióticas y en células que integran la coriodecidua. Esta familia de enzimas inducen la degradación selectiva de componentes de las membranas fetales y su expresión y actividad fuera de sincronía, con otros eventos del trabajo de parto, podrían explicar la RPM (Vadillo-Ortega y cols., 1992).

La identificación de MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8 y MMP-9 en asociación al desarrollo del trabajo de parto normal y en la RPM (Vadillo-Ortega y Estrada, 2005), ha permitido proponer un proceso bioquímico activo de degradación sobre componentes de la matriz extracelular tanto de la capa compacta, como capas que conforman el amnios y corion de las membranas fetales. De igual manera la identificación de inhibidores tisulares específicos para estas MMPs, conocidos como TIMPs y su determinación cuantitativa han contribuido a postular que existe proteólisis de las membranas en el momento final de la gestación previo a su ruptura, ya que las MMPs se presentan en concentraciones elevadas y TIMPs disminuídos (Vadillo y cols, 1996, Fortunato y cols, 1999).

Cabe mencionar que esta familia de enzimas son secretadas al espacio extracelular en forma de zimógenos requiriendo ser activadas por diferentes mecanismos (Woessner y Nagase, 2000). Por lo que para que se tengan concentraciones elevadas de las MMPs, previo a la ruptura de membranas, es necesario que existan señales que induzcan la expresión de estos genes y que el

mecanismo de activación se ejerza sobre la MMP secretada. Por ello, este paso parece ser el punto más importante de regulación del momento en que se inicia la ruptura fisiológica de las membranas. Dado que hasta el momento se desconoce el mecanismo fisiológico de activación para estas enzimas en torno al trabajo de parto y observando las analogías presentes en la composición de las membranas fetales de diferentes especies, se propone que los mecanismos que operan previos a la ruptura de la membrana fetal guarden similitud interespecies. Este trabajo identifica las diferentes MMPs presentes en la membrana fetal en diferentes momentos de la gestación, observando los cambios en su actividad de manera longitudinal y precisando el tiempo de activación de las diferentes MMPs asociadas con el trabajo de parto.

#### **4.1 Membranas Fetales.**

**4.1.1 Estructura.** Las membranas fetales (MCA), o su equivalente en la rata, las membranas corioalantoideas son tejidos extraembrionarios que delimitan la cavidad amniótica, están constituidas por dos capas histológicas superpuestas que funcionan como una unidad estructural y funcional: el amnios y el corion.

Cada una de las capas están formadas por distintos tipos celulares, incluyendo células epiteliales, mesenquimatosas, inmunológicas y trofoblastos, embebidos en una matriz extracelular cuyo principal componente es la colágena (Harkness y Harkness, 1956; Bryant-Greenwood, 1998a).

Las MCA derivan su fuerza de la colágena y ésta a su vez de su estructura y variedad, al menos cinco de los diferentes tipos de colágena se encuentran en estas membranas y se distribuyen de acuerdo a la función estructural que cumplen en las distintas capas que las conforman (Malak y cols., 1993; 1994).

El amnios carece de vasos sanguíneos y de inervación, los nutrimentos que requiere provienen del LA; 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 a la membrana basal; adyacente a ésta, se encuentra la capa compacta, constituida por tejido conjuntivo que forma un tipo de esqueleto fibroso constituido principalmente por colágena tipo I, III, IV y VI, además de fibronectina; todos estos componentes mantienen 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 matriz extracelular constituida básicamente por colágenas I, III y IV que forman una red con gránulos de glicoproteínas (Malak y cols., 1993; 1994).

La capa esponjosa o intermedia se localiza entre el amnios y el corion, tiene abundante contenido de proteoglicanos y colágena no fibrilar (Meinert y cols.,2001).

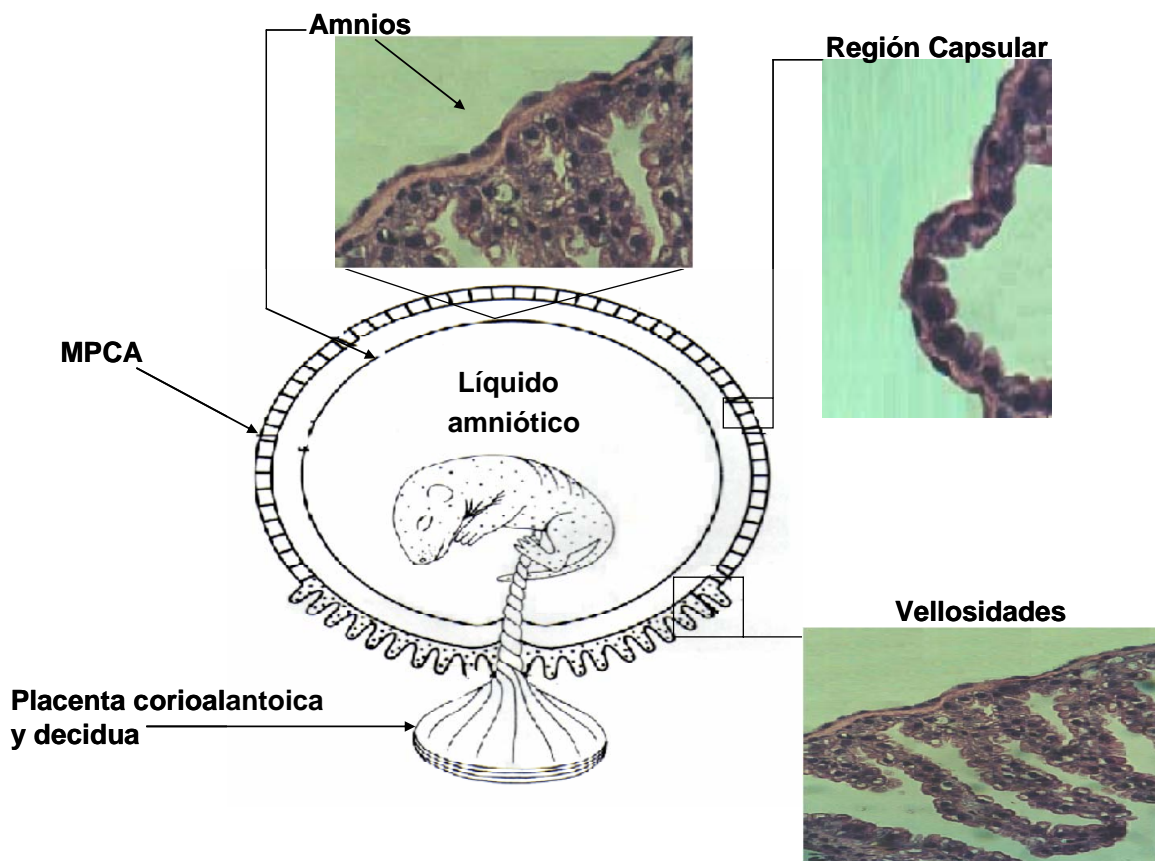
El corion es la zona histológica más gruesa de las membranas fetales. La porción coriónica en contacto con la capa esponjosa del amnios, es una estructura tipo membrana basal que delimita la capa de trofoblastos, formando una barrera celular continua. Además de esta estirpe celular, es posible encontrar 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 y VI y proteoglicanos. La porción final del corion está en contacto con la decidua uterina (Bryant-Greenwood, 1998a; Malak y cols., 1993; Parry y Strauss, 1998).

**4.1.2 Función.** Las MCA integran una identidad anatómica que delimita, transporta selectivamente y secreta diferentes sustancias hacia el LA. Esta estructura funciona como una importante barrera inmunológica y como un sitio altamente especializado que permite la interacción materno-fetal mediada por señales autocrinas y paracrinas en ambas direcciones. Además, el alto contenido de proteoglicanos y colágenas tipo IV, V y VI localizados en la capa esponjosa, permite que el amnios se deslice sobre el corion absorbiendo el estrés mecánico asociado a los movimientos fetales (Bryant-Greenwood, 1998a; Parry y Strauss, 1998).

La figura 1 muestra la distribución anatómica de las MCA en la rata, la cual es similar que en el humano. La definición de nombres que corresponde a cada una de las membranas proviene de la entidad de donde fueron derivadas. La diferenciación de la placenta en la rata origina dos estructuras placentarias: la placenta coriovitelina y la corioalantoica. Cada estructura es fundamental en el desarrollo de la gestación; así, la placenta coriovitelina cumple su función desde la implantación hasta el día  $9 \pm 1$  de preñez y la placenta corioalantoica asume las funciones para el desarrollo del feto a partir del día  $9 \pm 1$  hasta el TP (Soares y cols., 1996). A partir del día  $17 \pm 1$  de gestación en esta especie tenemos formado

el amnios, el corioalantoides y la placenta corioalantoica, las cuales son estructuras similares al amnios, corión y placenta en el humano (Jollie, 1990; Welsh y Enders, 1993; Paavola y cols., 1995).



**Figura 1. Diagrama de las membranas fetales de rata.** Después del día 17 de gestación, el feto de la rata es rodeado por la membrana derivada de la placenta corioalantoica (MPCA) y amnios. La MPCA presenta dos regiones: una capsular y otra con vellosidades. Estas regiones presentan tres capas: una monocapa celular en contacto con la decidua, seguido por una capa de tejido conjuntivo conteniendo vasos sanguíneos y un epitelio cuboideal hacia el amnios. El amnios presenta a su vez un epitelio simple hacia la cavidad amniótica, descansando sobre una delgada capa de tejido conjuntivo, seguido por una zona de células con morfología de fibroblastos hacia la cara de MPCA. La diferencia con el humano es que amnios y MPCA no están fusionadas.

#### **4.1.3 Nuestro modelo. Cambios observados en la morfología de las membranas fetales de la rata durante la gestación.**

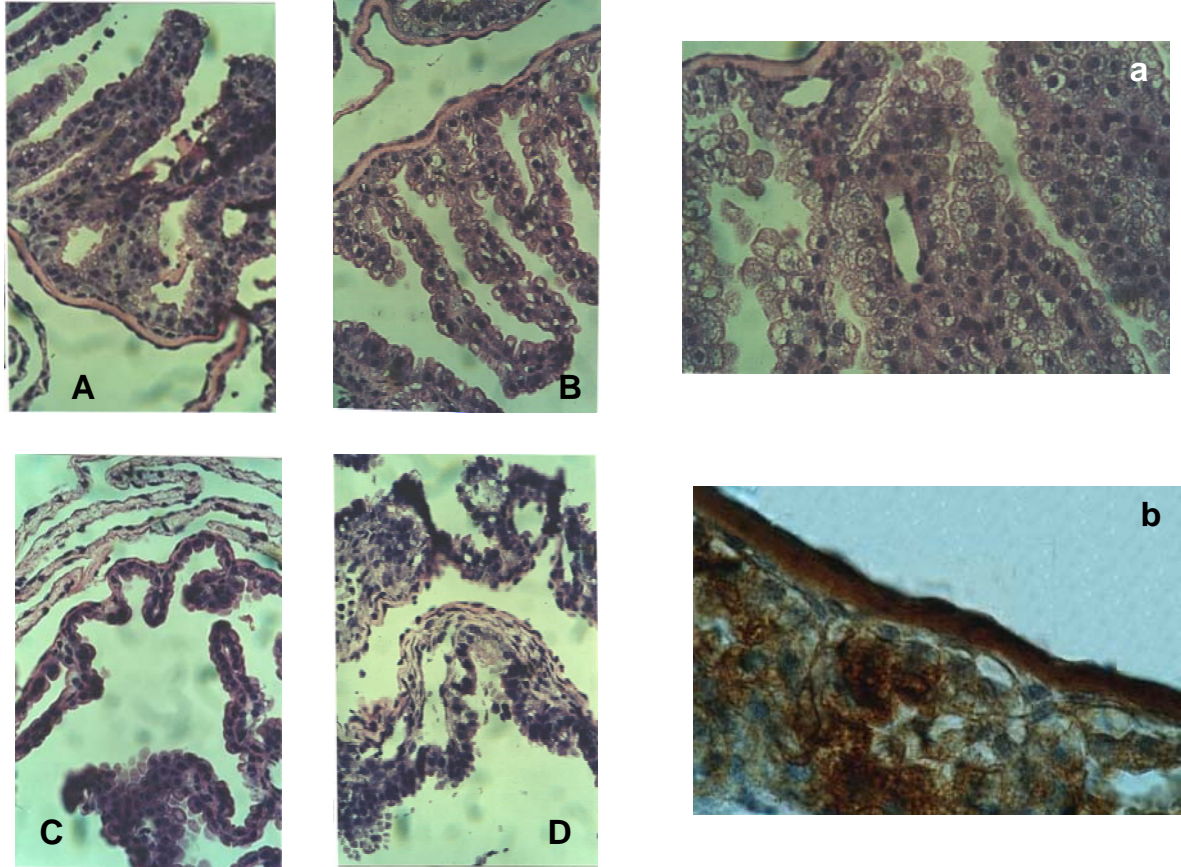
Las membranas fetales parecen tener un momento definido para romperse durante el trabajo de parto, en el cual las fuerzas generadas por el útero no pueden explicar de manera aislada la ruptura. Por ello, parte de los estudios se han enfocado a analizar la composición de los elementos estructurales que conforman a las membranas fetales humanas. Algunos autores han demostrado 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 períodos de gestación menores a las treinta semanas (Kanayama y cols., 1985). Aunque otros estudios no han podido demostrar la existencia de diferencias significativas en el contenido de colágena entre las membranas normales y con RPM, si ha sido 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).

Posteriormente surgieron estudios por microscopía electrónica, donde se han analizado los diferentes tipos de colágena que componen a las MCA y la alteración que ocurre en su estructura momentos antes del trabajo de parto (Malak y cols., 1994), observándose disgregación en las fibras de colágena, con



pérdida en la integridad de la membrana basal. Aunado a estos resultados, existe un reporte en MCA de rata, donde se señalan cambios drásticos en su estructura hacia la fase final de la gestación, mostrando membranas frágiles, con pliegues y alteraciones en la estructura de su membrana basal (Paavola y cols., 1995). En este trabajo, antes de abordar el estudio de los procesos bioquímicos en torno al trabajo de parto, se analizó la morfología de las membranas fetales a lo largo de la gestación en nuestro modelo generado en rata. La Figura 2 muestra los cambios estructurales observados en las MCA obtenidas en los diferentes días de la gestación, señalado que estas membranas en condiciones normales sufren cambios estructurales hacia la fase final de la gestación. Estos cambios concuerdan con los datos mencionados en las membranas fetales descritos por la literatura.

Finalmente, algunos estudios indican que existe correspondencia entre los cambios estructurales de las membranas y el incremento en la actividad de MMP, específicamente la MMP-9. Esta enzima tiene relevancia fisiopatológica en el mecanismo de ruptura de membranas a través de la degradación de la colágena tipo IV, la cual le da soporte a los demás tipos de colágena. Al actuar la MMP-9 sobre su sustrato (colágena de tipo IV) en la matriz extracelular, degrada y produce la disgregación de las colágenas fibrilares, los proteoglicanos tienden a hidratarse y la integridad en su estructura se pierde. Este fenómeno ocasiona el hinchamiento de las membranas y es observable a simple vista en una membrana de término con trabajo de parto (McLaren y cols, 2000).



**Figura 2. Cambios estructurales de MCA a lo largo de la gestación.** Los diferentes paneles muestran cortes semifinos ( $1\ \mu\text{m}$ ) de membranas fetales de rata en diferentes momentos de la gestación, incluidos en parafina y teñidos con hematoxilina y eosina. **A.** Corte transversal (20X) de membrana de 18 días de gestación, en la que se distingue las dos regiones que la constituyen: AMNIOS Y CORIOALANTOIDES. **B.** membrana de 20 días, **C.** día 21 y **D.** membrana de trabajo de parto. A partir del día 21 podemos observar como el amnios está claramente separado del corioalantoides, además de presentar una estructura engrosada. En el momento del trabajo de parto, las membranas se presentan hinchadas y completamente desintegradas. Las fotos **a** y **b** (40X), muestran la estructura que predomina en el día 18 y 20 de gestación. En **b** podemos observar la membrana basal por debajo del epitelio amniótico, la cuál parece casi adosarse a la membrana corioalantoidea.

#### 4.2 La familia de las Metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP).

Las MMP son las principales enzimas responsables de la degradación de la matriz extracelular y desempeñan un papel central en diversos procesos fisiológicos como la morfogénesis, angiogénesis e inflamación (Fata y cols., 2000).

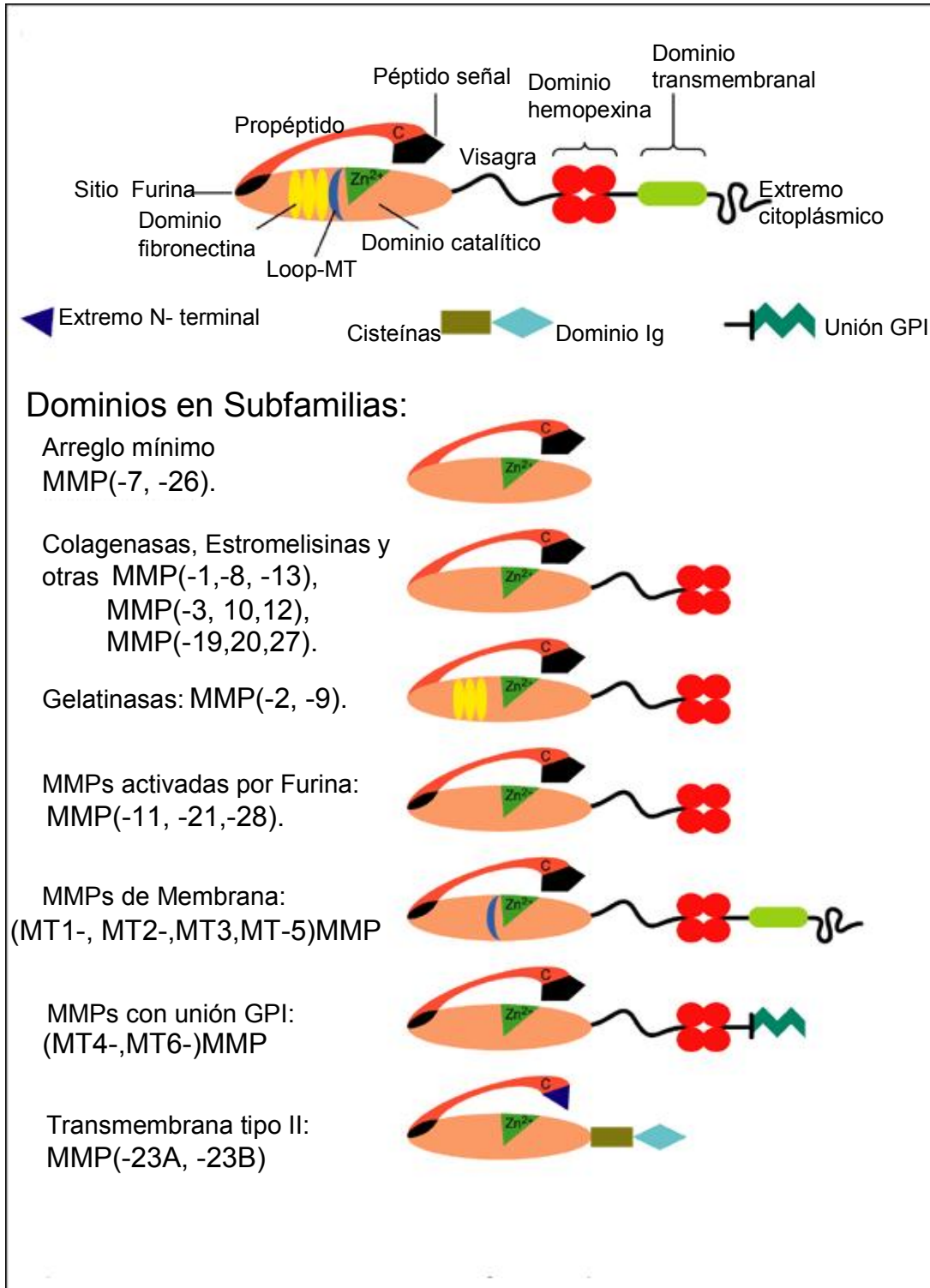
Esta familia de endopeptidasas comparte un conjunto de dominios entre los que se encuentran: 1) Un dominio propéptido responsable de la falta de actividad de las proenzimas. En este dominio existe un residuo de cisteína que forma un enlace coordinado con el  $Zn^{2+}$  presente en el dominio catalítico, y enmascara de esta manera el sitio activo de las proenzimas o zimógenos. 2) El dominio catalítico esencial para la actividad enzimática, que contiene el sitio de unión a  $Zn^{2+}$  y a  $Ca^{2+}$ . 3) Una secuencia rica en prolina que funciona como bisagra y 4) Un sitio carboxilo terminal con un dominio tipo hemopexina (Figura 3).

Las MMPs se pueden clasificar en diferentes subfamilias que incluyen a las colagenasas, gelatinasas, estromelinas y las MMP de membrana celular.

Las colagenasas rompen la región triple helicoidal de las colágenas intersticiales y a la fecha, tres miembros de este grupo han sido clonados: MMP-1, llamada también colagenasa intersticial de fibroblastos (Jozic y cols., 2005) MMP-8 denominada colagenasa de neutrófilos (Hasty y cols., 1990), y MMP-13 o colagenasa 3, clonada de un carcinoma humano mamario (Freije y cols., 1994).

La subfamilia de las gelatinasas degradan colágena tipo IV, principal constituyente de membranas basales, fibronectina y elastina. A la fecha se han caracterizado dos miembros de este subgrupo que son la Gelatinasa A (colágena tipo IV de 72 kDa/MMP-2) (Reponen y cols., 1992) y la gelatinasa B (colagenasa tipo IV de 92 kDa/MMP-9) (Wilhelm y cols., 1989). Ambas enzimas contienen un dominio adicional parecido a fibronectina y la gelatinasa B contiene además una región en el carboxilo terminal que es semejante a la cadena  $\alpha_2$  de la colágena tipo V.

# Dominios estructurales de las MMPs



**Figura 3. Metaloproteinasas de matriz extracelular.** Clasificación de las MMPs de acuerdo a los dominios estructurales que presentan.

La subfamilia de estromelinas tiene una amplia especificidad de sustratos que incluye a la parte proteica de los proteoglicanos, a la fibronectina y la laminina. Varias enzimas se han clasificado tentativamente en este grupo e incluyen a la estromelina 1 (MMP-3) (Chin y cols., 1985), estromelina 2 (MMP-10) (Madlener y Werner, 1997), estromelina 3 (MMP-11) (Murphy y cols., 1993), matrilisina (MMP-7) (Wilson y Matrisian, 1996) y a la metaloelastasa (MMP-12) (Fu y cols., 2001).

Finalmente, la subfamilia de las metaloproteinasas de membrana (MT-MMP). Este grupo de enzimas se caracteriza principalmente por la presencia de un dominio transmembranal que es una extensión terminal rica en residuos hidrofóbicos. Se ha propuesto que este tipo de enzimas son responsables del procesamiento de varias proteínas en la superficie celular (Sato y cols., 1994).

La regulación de las MMPs ocurre a varios niveles tanto intra como extracelulares y la actividad enzimática es el resultado final de una compleja serie de eventos que incluye la expresión del gene, la activación del zimógeno y la inhibición enzimática en el espacio extracelular.

La expresión génica de las MMP es regulada por una variedad de citocinas y factores de crecimiento, los cuales pueden incrementar o disminuir la síntesis de la enzima en una célula específica (Mauviel, 1993).

Otro nivel de regulación es la activación del zimógeno que puede alcanzarse por agentes no enzimáticos y enzimáticos. Se ha observado que la presencia de especies reactivas de oxígeno y compuestos organomercuriales activan a las MMP (Nagase, 1997; Maeda y cols., 1998; Murphy y cols., 1999). En el caso

de los mecanismos enzimáticos encontramos que proteasas bacterianas, el activador de plasminógeno y las mismas MMP activan proMMPs presentes en el espacio extracelular. A este respecto, se ha mostrado que la MMP-2 y la MMP-3 activas, son capaces de activar la proMMP-9 para dar lugar a la MMP-9 (Friedman y cols., 1995; Ogata y cols., 1992).

A pesar de la similitud en la estructura y activación de las MMP, se ha descrito en párrafos anteriores que existen diferencias en la especificidad de los sustratos; por lo tanto, el catabolismo efectivo de los distintos componentes de la matriz extracelular requiere de la acción concertada de varias MMP. Por ejemplo: la MMP-1, -8 y -13 cortan la triple hélice de la colágena fibrilar, dando lugar a fragmentos que se desnaturalizan a gelatina. Estos fragmentos son degradados por las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9), que junto con las estromelinas cortan colágena tipo IV, fibronectina y laminina (Nagase y Woessner, 1999).

La actividad de las MMP debe ser controlada de manera precisa para evitar daño a los tejidos. Existen dos tipos de inhibidores naturales para estas enzimas, los inhibidores presentes en el suero como son las macroglobulinas (Baker y cols., 2000) y la familia de los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP), de los cuales se han identificado cuatro tipos diferentes, denominados TIMP-1, -2, -3 y -4. Los TIMPs forman complejos de alta afinidad con las formas activas de MMPs e inhiben su actividad enzimática a través de una interacción no covalente (Brew y cols., 2000).

### **4.3 El papel de las MMP y TIMP en el proceso normal de ruptura y en la RPM.**

Diversos estudios han relacionado consistentemente la degradación de los diferentes elementos de la matriz extracelular en el proceso que induce la ruptura de las membranas fetales, afectando directamente la fuerza tensil de éstas (Vadillo y cols., 1990, 1996; Fortunato y cols., 2000a).

En condiciones normales, se ha postulado que diferentes estímulos que afectan a las poblaciones celulares de las MCA, desencadenan la secreción de MMP, que inician la degradación de la matriz extracelular y con ello se pierde el soporte estructural y eventualmente aparece la ruptura de estas membranas (Vadillo y cols, 1992). Diferentes grupos han aportado evidencias que apoyan la presencia de MMP-1 (Maymon y cols, 2000a), MMP-2 (Goldman y cols., 2003), MMP-3 (Meraz-Cruz y cols.,2006), MMP-7 (Maymon y cols., 2000b), MMP-8 (Angus y cols., 2001) y MMP-9 ( Vadillo-Ortega y cols., 1995), en las membranas fetales de diferentes especies, incluyendo al humano, las cuales se expresan de manera característica hacia el final de la gestación.

De igual manera se tienen diferentes reportes donde se demuestra la presencia de TIMP (1, 2, 3 y 4) en la membrana fetal (Fortunato y cols., 1998).

Se ha demostrado que comparadas con las membranas fetales normales, la actividad proteolítica en membranas con ruptura prematura se incrementa un promedio de quince veces. Esta actividad ha sido atribuída a las gelatinasas MMP-2 y MMP-9, las cuales pueden degradar colágena tipo IV, V, VII y XI. La colágena tipo IV es el principal componente de las membranas basales, sobre la que descansa la arquitectura estructural que protege a la membrana de la ruptura (Draper y cols, 1995). En reportes recientes, la MMP-2 se asoció y caracterizó

como parte de la maquinaria enzimática responsable de la RPM (Fortunato y cols., 1999; 2000a; 2000b); a este respecto, se ha demostrado que el incremento en los niveles de MMP-2 activa y la disminución significativa de los niveles de TIMP-2 son característicos del líquido amniótico de mujeres con RPM pretérmino (Fortunato y cols., 1999; 2000a).

Con respecto a MMP-9 se ha demostrado su expresión y actividad aumentada en membranas fetales durante los procesos de parto e infección intrauterina (Vadillo-Ortega y cols., 1995; Fortunato y cols., 1999; Vadillo-Ortega y cols., 2002). Estudios experimentales indican que en pacientes con RPM, la concentración, síntesis y actividad de la MMP-9 aumenta significativamente en membranas fetales, líquido amniótico y suero fetal (Athayde y cols., 1998; Romero y cols., 2002). Se ha propuesto también, que el aumento en la actividad de MMP-9 esta acompañado de la disminución en la actividad del TIMP-1 (Vadillo-Ortega y cols., 1996).

#### **4.4 Panorama actual en el estudio de la ruptura de membranas.**

A pesar de existir en la literatura amplia discusión acerca de los posibles factores desencadenantes de la ruptura de membranas, tanto en condiciones normales como patológicas, se carece de un análisis integral que explique cuál es el mecanismo por el cual el tejido conectivo que integra a las membranas, es destruido, provocando en algunos casos el nacimiento prematuro. Si bien es cierto que se conoce la participación de algunos miembros de la familia de MMP en el fenómeno de ruptura, se desconocen los mecanismos de regulación del recambio de la matriz extracelular a lo largo de la gestación y, en especial, desconocemos



mucha de la información asociada al trabajo de parto. Estudios en el humano, mono rhesus y ratas han analizado de manera transversal la expresión y actividad de diferentes MMPs, postulando a la MMP-9 como la enzima eje para el momento de la ruptura de la membrana fetal (Maymon y cols., 2000a; 2000b; Goldman y cols., 2003; Angus y cols., 2001; Vadillo-Ortega y cols., 1995). Desafortunadamente no contamos con descripciones de la secuencia de eventos que conducen a la degradación de la matriz extracelular en el momento de la ruptura de las membranas, sea normal o anormal. Es decir el mecanismo por el cual estas enzimas se activan en el momento preciso del trabajo de parto es tema que ha sido poco estudiado por la mayoría de los grupos de investigación. Todos sugieren la existencia de un mecanismo bioquímico de activación de enzimas en el microambiente fetal y citan la posibilidad de que alguno de los cuatro mecanismos conocidos *in vivo* opere en la membrana fetal (activación extracelular de MMP por proteínas de diferentes familias (Murphy y cols, 1999), activación realizada por otras MMP (Imai y cols., 1995), activación intracelular por furina (Pei y Weiss, 1995) y activación asociada a proteínas de membrana del tipo MT-MMP (Cao y cols., 1995)). Sin embargo, hasta la fecha ninguno se ha analizado para este fenómeno biológico. Para tratar de cubrir este hueco de información, se diseñó el enfoque experimental que es tema de esta tesis y que propone el uso de un modelo animal para estudiar de manera longitudinal algunos de los cambios asociados a la gestación y al trabajo de parto, que se operan en la expresión de las diferentes MMPs, y los mecanismos de activación de este grupo de enzimas durante la gestación y el trabajo de parto de la rata.

## **5. HIPÓTESIS DE TRABAJO.**

La degradación fisiológica de la matriz extracelular de las membranas fetales durante el trabajo de parto de la rata está asociada al aumento en la cantidad y actividad enzimática de diferentes metaloproteasas de matriz extracelular (MMP).

## **6. OBJETIVO GENERAL.**

Analizar y caracterizar a las diferentes MMPs que forman parte del microambiente de las membranas fetales de rata durante el trabajo de parto e iniciar la caracterización de los mecanismos moleculares de activación enzimática de las MMP durante este momento.

### ***6.1 Objetivos particulares.***

-Evaluar la expresión y actividad enzimática de las diferentes MMP presente en el líquido amniótico y en extractos de membranas fetales de la rata durante diferentes etapas de la gestación y el trabajo de parto.

-Caracterizar el mecanismo o mecanismos moleculares de activación enzimática que participan en la ruptura de la membrana fetal durante el trabajo de parto en esta especie.

## **7. MATERIAL Y MÉTODOS.**

El trabajo experimental se subdivide en dos secciones:

1. Análisis descriptivo de la expresión y actividades de MMPs en membranas fetales y líquido amniótico durante la gestación y el parto.
2. Exploración de los mecanismos de activación de las MMP identificadas en la membrana fetal en la etapa periparto (12 horas antes de trabajo de parto).

### **7.1 Material Biológico.**

Este proyecto de investigación fue aprobado por las Comisiones de Investigación y Ética del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes (No. de Registro 212250-06071), utilizando para la estancia de los animales las instalaciones del Bioterio de la Torre de Investigación.

Se utilizaron ratas hembra de 250 g de peso de la cepa *Wistar*, que fueron sincronizadas con ciclos de luz oscuridad 12/12, lo que permitió tener animales con 21 días de gestación. A todas las ratas se les realizó frotis vaginal diario para dar seguimiento a su ciclo estral. Se formaron 20 grupos de 5 ratas hembra en etapa de proestro por 1 rata macho, las cuales fueron colocados juntos durante 24 horas. Esta maniobra permitió hacer coincidir en este lapso el momento de ovulación de las ratas, que se inicia 10 horas después de la etapa en que fueron apareadas. Al momento de retirar al macho se realizó citología vaginal y las ratas con presencia de espermatozoides, se consideraron en el día número 1 de gestación. Las ratas fueron sacrificadas en los días 15, 17, 19, 20 y 21 de la gestación. En el día 21 se sacrificaron a dos tiempos, aproximadamente 12 horas

antes del trabajo de parto (definido como periparto) y al momento del trabajo de parto (momento en que se expulsó el primer producto). Los animales recibieron la misma alimentación y agua ad libitum.

## 7.2 Reactivos y Equipo.

Las proteínas recombinantes y anticuerpos monoclonales se adquirieron de Calbiochem Biochemicals (La Jolla, CA, USA): Proenzima recombinante para MMP-9 (No. cat. PF038), MMP-3 (PF063), MMP-2 (PF037). Enzima activa recombinante para MMP-9 (PF024), MMP-3, sitio catalítico (444217), MMP-2 (PF023), TIMP-2 (PF021) y TIMP-1 (PF019). Anticuerpos monoclonales, Anti-MMP-9 (Ab-9) (Ab-1), Anti-MMP-3 (Ab-1), Anti MMP-2 (Ab-9) (Ab-3), Anti-TIMP-2 (Ab-2) y Anti-TIMP-1 (Ab-1).

Todos los reactivos y soluciones que se usaron fueron de grado analítico: Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) y Vector (Burlingame, CA, USA) .

El equipo utilizado forma parte de la infraestructura del Departamento de Bioquímica y del laboratorio de la Dirección de Investigación:

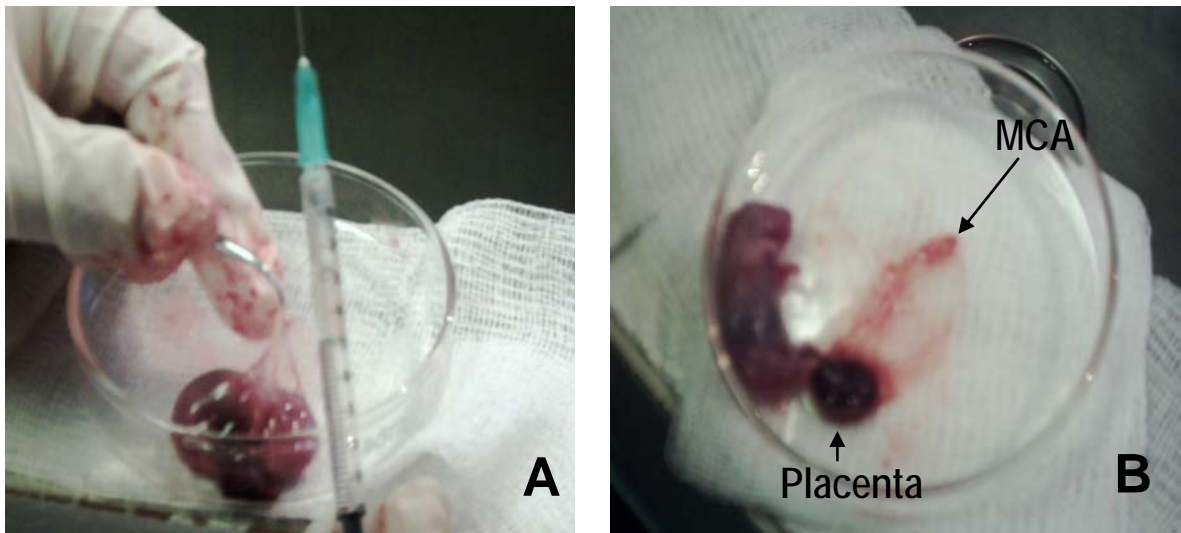
Analizador de imágenes	UVP BioImaging System (Upland, CA).
Espectrofotómetro	DU-65, Beckman (USA)
FPLC	AKTA Prime Amersham Pharmacia Biotech (NJ, USA).
Microcalorímetro diferencial de barrido	MicroCal VP-DSC (MicoCal LLC, Northampton, MA).
Microscopio confocal	Axiowert 100 M, Carl Zeiss (Germany).
Politrón	Brinkman Instrument, Westbury, NY, USA

#### **7.3/7.4 Métodos.**

**7.3 Fase 1.** Análisis descriptivo de la expresión y actividad de MMPs en membranas fetales y líquido amniótico durante la gestación y el parto.

##### **7.3.1 Colecta de Muestras Biológicas.**

Los LA y las MCA se colectaron en cada serie de experimentos. Las MCA se separaron de la placenta, se colocaron en solución salina y se transportaron al laboratorio (Figura 4).



**Figura 4. Colecta de muestras.** El panel A muestra el momento de la colecta del líquido amniótico y el panel B muestra las MCA antes de ser separadas de la placenta.

##### **7.3.2 Preparación de extractos de MCA.**

Las MCA se lavaron con solución salina para remover los coágulos adheridos. Los fragmentos de tejido se colocaron en solución amortiguadora de Tris-Calcio, pH 7.4

(A). Se preparó extracto de membranas por homogenización en un Polytron, en el que se realizaron las determinaciones que se describen adelante. Tanto los homogenados como los LA fueron centrifugados a 10,000 x g durante 15 minutos, colectando los sobrenadantes para análisis. La concentración de proteína de los sobrenadantes de ambos fue determinada por el método de Bradford (1976), usando albúmina bovina como estándar de referencia. El manejo de todas las muestras siempre se hizo a 4°C.

### **7.3.3 Actividad enzimática.**

Para evaluar la actividad proteolítica de cada una de las muestras obtenidas en la gestación de la rata, se realizaron ensayos ante dos diferentes sustratos con la siguiente metodología:

La actividad proteolítica de los extractos de tejido y de LA se determinó usando azocaseína y gelatina marcada con anhídrido acético tritiado. Para el primero, se incubaron 500 µg de azocaseína con 10 µg de proteína de cada muestra y se llevó a 1.0 ml con amortiguador Tris 0.1 M pH 7.8. La mezcla se incubó durante 24 horas a 37°C con agitación constante. La azocaseína no digerida fue precipitada agregando 200 µl de ácido tricloroacético en frío, después de 30 minutos se centrifugó a 12,000 x g por 5 minutos. Los valores de absorbancia de los sobrenadantes fueron leídos a 336 nm en espectrofotómetro. Para la actividad con sustrato radiactivo se utilizó el método de Sunada y Nagai (1980). Se utilizaron 10 µg de proteína de cada muestra incubados con 25 µg de sustrato tritiado (actividad específica  $1.5 \times 10^6$  dpm/mg), amortiguador A, a 37°C por 24 horas. Todos los ensayos se validaron por triplicado. La actividad

gelatinolítica o caseinolítica se expresó como  $\mu\text{g}$  de gelatina o azocaseína degradada/mg de proteína incubada.

Las muestras de LA y de extractos de MCA se incubaron con gelatina tritiada, en presencia de diferentes inhibidores de proteinasas, incluyendo 1-10 ortofenantrolina 80 mM (OF), fluoruro de fenilmetilsulfonilo 10 mM (PMSF), aprotinina 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (AP) , N-etilmaleimida 20 mM (NEM) y pepstatina A 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (PEP).

Otras alícuotas de LA y extractos fueron tratadas con acetato aminofenil mercúrico (APMA) a concentración final 1 mM durante 12 horas a 37°C, para activar a las MMP latentes.

Las actividades enzimáticas fueron expresadas como promedios  $\pm$  desviación estándar. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de ANOVA y valores de  $p < 0.05$  se consideraron con significancia.

#### **7.3.4 Electroforesis SDS y Zimografía.**

El análisis de los pesos moleculares de cada una de las proteínas presentes en los extractos se realizó mediante geles de poliacrilamida con sodio duodecil sulfato (SDS-PAGE), siguiendo las instrucciones recomendadas por Laemmli (1970). La determinación de la presencia y actividad de gelatinasas asociadas, se hizo mediante geles de acrilamida al 8% copolimerizados con gelatina porcina a concentración de 1 mg/ml (Vadillo-Ortega y cols., 1995). 10  $\mu\text{g}$  de proteína se aplicaron por carril en condiciones no desnaturizantes. Después de la electroforesis los geles fueron colocados en Tritón X-100 al 2.5% (2 x 15 min), lavados e incubados toda la noche a 37°C en solución amortiguadora de Tris-Calcio, pH=7.4 (A). Para identificar la actividad



de metaloproteinasas, muestras control con EDTA u orto-fenantrolina fueron preparadas en todos los experimentos. Al finalizar la incubación, los geles se tiñeron con azul de Coomasie R-250 (G) y desteñidos en ácido acético 7.5% y metanol al 5%. Las zonas de actividad enzimática aparecieron como bandas de lisis claras contra fondo azul. En cada corrida se incluyeron marcadores de actividad para MMP-2 y MMP-9, usando el sobrenadante obtenido de la línea celular de promielocitos U-937 (ATCC, Rockville, MD.U.S.A), y marcadores de peso molecular preteñidos con rango de 14 a 200 kDa (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). Las bandas obtenidas se analizaron por densitometría en el analizador de imágenes y se expresaron como actividad por área.

### **7.3.5 Western blot.**

Con el objetivo de validar las MMPs y TIMPs presentes en las muestras de tejido y LA se utilizaron anticuerpos específicos para cada una de estas. Además de comparar la inmunorreactividad para cada MMP y TIMP entre los diferentes tiempos de la gestación. Para ello, se llevaron a cabo electroforesis de todas las muestras, aplicando 5 µg de proteína por carril en geles de poliacrilamida al 10% con SDS, bajo condiciones reductoras o no reductoras. La transferencia de la proteína a membranas Inmobilon-P (Millipore, Medford, MA, USA) se realizó durante 18 horas a 40 V, a 4°C, utilizando el método descrito por Towbin y cols. (1992). El revelado de las membranas se realizó con 1µg/ml de anticuerpos monoclonales específicos contra MMP-9, MMP-3, MMP-2, TIMP-2 y TIMP-1. Los anticuerpos primarios se detectaron con reactivos del kit VectaStain ABC (Vector, Burlingame, CA). Se usaron como controles en todos los

ensayos, las enzimas puras recombinantes específicas para cada una de las MMPs o TIMPs. La intensidad relativa de las bandas fue determinada con el mismo analizador de imágenes.

### **7.3.6 Northern blot.**

Para analizar la expresión del gen de las MMPs identificadas por Western blot, el RNA total de las MCA en las diferentes etapas gestacionales se extrajo con el reactivo de Trizol (Gibco, BRL, USA). Posteriormente, se corrió en geles de agarosa y transferido a membranas Inmobilon-N (Millipore, Medford, USA). Las membranas se hibridizaron con sondas específicas para  $\beta$ -actina, MMP-2 y MMP-9 marcadas por el método de *random primers* con [<sup>32</sup>P]-CTP bajo condiciones ya descritas (Sanbrook y cols., 1989). Las autorradiografías se evaluaron por densitometría con el analizador de imágenes. La expresión relativa de los RNAm de las enzimas se normalizó con el RNAm para  $\beta$ -actina.

**7.4 Fase 2.** Exploración de los mecanismos de activación de las MMP identificadas en la membrana fetal en la etapa periparto (12 horas antes de TP).

#### **7.4.1 Preparación del tejido**

Para esta fase del trabajo se utilizaron las MCA colectadas 12 horas antes del TP, fueron lavadas en solución salina y liberadas de células con Tritón X-100 al 0.25% con cambios de temperatura de -70°C a 37°C. Se realizaron homogenados en solución amortiguadora de Tris-calcio, pH 7.4 (A). Posteriormente, el homogenado se centrifugó a 10,000 x g durante 15 minutos a 4°C y el

sobrenadante se colectó para su análisis posterior. El precipitado se resuspendió en solución amortiguadora de Tris-EDTA, pH=7.4 (B), y nuevamente se centrifugó en las mismas condiciones mencionadas; una vez recuperado el sobrenadante (proteína eluída del precipitado), se dializó exhaustivamente en solución amortiguadora de Tris, pH= 7.4 (C) para eliminar el EDTA. Esta preparación será mencionada como extracto de EDTA ( $E_{EDTA}$ ), y se utilizó en las siguientes metodologías:

#### ***7.4.2 Cromatografía de filtración molecular.***

##### **FPLC (Cromatografía líquida de alta presión).**

Con el objetivo de separar por peso molecular los componentes presentes en los extractos de MCA obtenidos 12 horas antes de TP. Estos fueron corridos en el sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC), usando una columna Superdex 200 (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA). Se realizaron dos corridas: Primero los extractos preparados con EDTA y posteriormente otra muestra después de haberse agregado  $CaCl_2$  a una concentración final de 20 mM. 500  $\mu$ g de proteína fueron inyectados dentro de la columna, colectándose fracciones de 0.5 ml/min. Se determinó actividad de gelatinasa para cada una de estas fracciones por la técnica de zimografía. La calibración de la columna fue realizada usando un cóctel de las siguientes proteínas: Tiroglobulina (670 kDa), catalasa (232 kDa), albúmina bovina (68 kDa) y mioglobina (17 kDa) en solución amortiguadora de Tris ©. Los pesos moleculares de cada una de las fracciones obtenidas se calcularon mediante una curva de regresión lineal.

### **7.4.3 Microcalorimetría diferencial de barrido (CDF).**

La CDF permitió caracterizar termodinámicamente los cambios conformacionales inducidos por cambios de temperatura en las proteínas presentes de los extractos de MCA. Para ello, se realizó la medición de las temperaturas de transición ( $T_m$ ) de las proteínas presentes en el extracto de membrana ( $E_{EDTA}$ ), en presencia y ausencia de  $Ca^{2+}$ . Se definió a  $T_m$  como la temperatura a la cual la capacidad calorífica ( $C_p$ ) de una proteína fue máxima y que también correspondió con el punto de desnaturalización de la misma. La  $C_p$  se midió como una función dependiente de la temperatura. Para realizar los ensayos, los extractos fueron previamente dializados en solución amortiguadora Tris Malato 20 mM, pH 7.4 a concentración final de 1 mg/ml de proteína. El registro calorimétrico de las proteínas se obtuvo usando un calorímetro VP-CDB. Las muestras y soluciones de referencia fueron cuidadosamente degasificadas por 5 minutos antes de cargar las celdas. Una vez aplicada la muestra y estabilizada a 10 °C, la temperatura se aumentó a 100 °C en intervalos de 1 °C/min. Para verificar la desnaturalización reversible de la proteína, la muestra se colocó nuevamente a 10 °C, y se obtuvo un nuevo registro a intervalos de 1 °C/min, hasta llegar a 100 °C. El valor de cada  $T_m$  fue corregido restando los valores obtenidos del segundo registro al primero. En todos los casos, la desnaturalización reversible se restó de la desnaturalización irreversible para cada una de las proteínas. Los perfiles obtenidos por el CDB para cada muestra se analizaron, calculando el mejor ajuste teórico de la curva, asumiendo la desnaturalización irreversible de la proteína (Biltonen y Freire, 1978).

#### **7.4.4 Actividad enzimática de los extractos de EDTA ( $E_{EDTA}$ ).**

Para determinar la actividad enzimática de las muestras de  $E_{EDTA}$  en presencia de concentraciones crecientes de calcio se utilizó el sustrato para las gelatinasas MMP-2/MMP-9: Ac-Pro-Leu-Leu-Gly-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> (Calbiochem). Cada ensayo fue realizado de acuerdo a las recomendaciones sugeridas por Weingarten y Feder (1985), que consistió en incubar 0.1 mM de sustrato con 10  $\mu$ g de proteína de cada una de las muestras en solución amortiguadora de HEPES, pH=7.4 (D). La mezcla se incubó durante 6 h a 25°C. La 4,4'-ditiopiridina contenida en el buffer durante la incubación reacciona con los fragmentos generados por la hidrólisis de enlaces éster y tioéster en el sustrato. Los valores de absorbancia de cada uno de los productos fueron leídos a 324 nm en espectrofotómetro (DU-800, Beckman Coulter, USA). La actividad enzimática se expresó como  $\mu$ g de sustrato degradado/mg de proteína incubada. Todos los ensayos fueron valorados por triplicado.

Las actividades enzimáticas fueron expresadas como promedios  $\pm$  desviación estándar. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de t de Student y valores de  $p < 0.05$  fueron considerados con significancia.

#### **7.4.5 Inmunohistoquímica.**

Para demostrar la existencia de las diferentes MMPs y TIMPs en el tejido libre de células, se utilizaron fragmentos de MCA previamente tratadas con Tritón X-100 y ciclos repetidos de congelación y descongelación. Posteriormente, estos tejidos se fijaron en formol amortiguado al 10% y se incluyeron en parafina para ser procesados por inmunohistoquímica. El reconocimiento primario fue realizado utilizando 1  $\mu$ g/ml de

anticuerpos anti-MMP-9, anti-MMP-3, anti-MMP-2, anti-TIMP-1 y anti-TIMP-2, usando el método de detección Envisión (Dako Envision Sytem-Peroxidase. CA. USA) diseñado por Farr y Nekane (1981).

#### ***7.4.6 Microscopía Confocal.***

Con el objetivo de demostrar que las MMPs y TIMPs además de estar presentes en el tejido libre de células, estaban colocalizadas, Las MCA fueron colocadas en PBS-Tritón, pH=7.4 (F), procesadas mediante ciclos repetidos de congelación del tejido (-70 °C), y posteriormente incubadas a 37 °C, para obtener membranas libres de células. Después de este tratamiento, las MCA fueron lavadas con PBS, se fijaron en formol al 10% y se incluyeron en parafina para ser procesadas por inmunofluorescencia. Se realizaron dobles tinciones de las MCA, utilizando la combinación de cuatro pares de anticuerpos primarios: anti- MMP-9 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Anti-MMP-3, anti-MMP-2, anti-TIMP-2 y anti-TIMP-1, grupo de anticuerpos que fueron identificados usando un anticuerpo secundario marcado con Alexa fluor 568 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). En todos los ensayos, siempre se incluyó una preparación sin anticuerpo primario, que es el control para verificar que la señal no era dada por la fluorescencia del anticuerpo secundario. Las preparaciones se colocaron con Vectashield (Vector Laboratorios, England), cubiertas con cubreobjetos y posteriormente se analizaron por microscopia confocal.

## 8.1/8.2 RESULTADOS.

**8.1 Descripción de los cambios secuenciales en la expresión y actividad de las diferentes MMP en las muestras obtenidas durante la gestación y el trabajo de parto.**

### **8.1.1 La actividad proteolítica en extractos tisulares y líquido amniótico aumenta hacia la fase final de la gestación .**

La actividad sobre gelatina y azocaseína presente en los LA y extractos de membrana (EM) mostró diferencias entre los seis momentos estudiados. La actividad enzimática medida contra los dos sustratos solubles aumentó notablemente a partir de las 24 horas previas al desarrollo de TP (Figura 5). La actividad específica contra gelatina fue superior en todas las muestras y en todos los tiempos con respecto a la azocaseína. Se observó mayor actividad gelatinolítica en el LA que en el tejido 12 horas antes del TP ( $p < 0.001$ ), pero en el momento de TP esta relación se invirtió a favor del tejido ( $p < 0.001$ ) (Tabla 1). Con respecto a la actividad caseinolítica, en el LA observamos resultados similares ( $p < 0.001$ ), pero los extractos de membrana no presentaron diferencias significativas (Tabla 2).

**Tabla 1.** \*Actividad Específica del LA y EM ante el sustrato de gelatina .

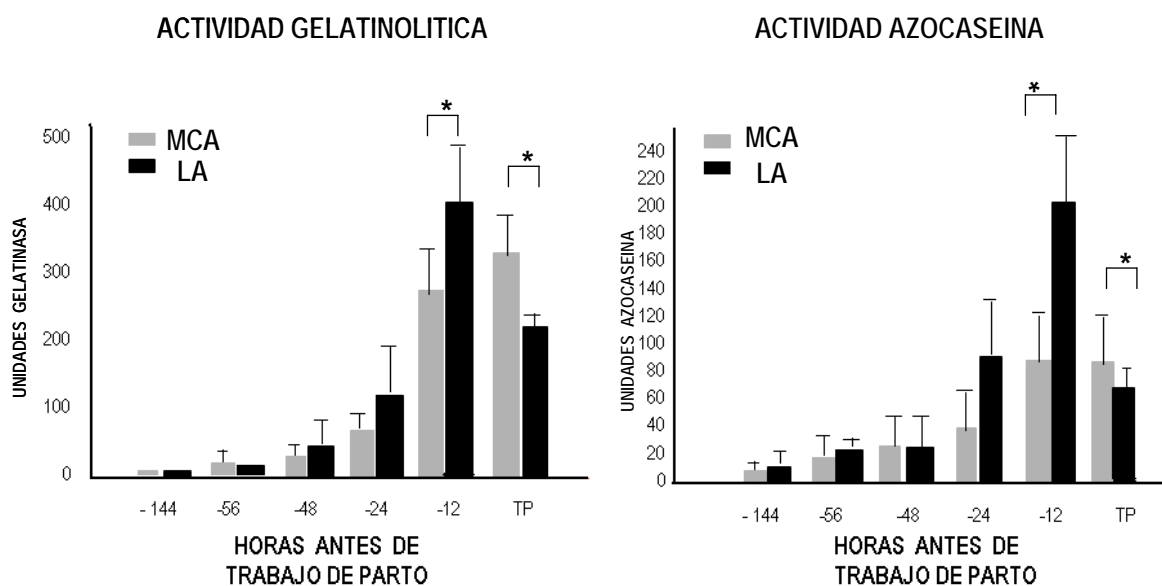
<b>Muestra</b>	<b>12 horas antes de TP</b>	<b>TP</b>
<b>LA</b>	<b>428.0±90.6</b>	<b>242.8±11.3</b>
<b>EM</b>	<b>295.9±60.1</b>	<b>350.3±64.4</b>

\*Actividad Específica= $\mu\text{g}$  de sustrato degradado/mg de proteína/ $37^{\circ}\text{C}/24$  h.

**Tabla 2.** \*Actividad Específica del LA y EM ante el sustrato de azocaseína.

Muestra	12 horas antes de TP	TP
LA	196.6±41.8	63.4±13.0
EM	86.1±27.5	85.0±25.0

\*Actividad Específica=μg de sustrato degradado/mg de proteína/25°C/24 h.



**Figura 5.** Actividad enzimática de proteasas de LA y EM de diferentes edades gestacionales contra los sustratos gelatina y azocaseína. Las unidades enzimáticas se expresan como μg de sustrato degradado/ mg de proteína incubada a 37°C o 25 °C durante 24 horas. El asterisco (\*) señala la existencia de diferencia significativa (p<0.05) en los grupos con trabajo de parto.

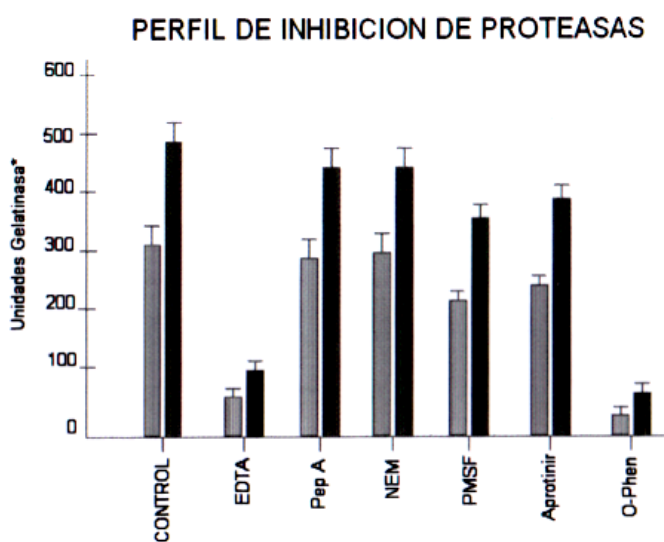
### 8.1.2 Perfil de inhibición de proteasas.

**La actividad enzimática presente en las muestras de LA y MCA es resultado en gran parte por la participación de la familia de las MMPs.**

La figura 6 muestra el perfil de inhibición de las proteasas presentes en las muestras de líquido amniótico y extractos de membrana obtenidos en la fase de TP de la rata, con los siguientes inhibidores: ácido etilendiamino tetraacético (EDTA), pepstatina A (PEP), N-etilmaleimida (NEM), fluoruro sulfonil



fenilmercúrico (PMSF), aprotinina (AP) y ortofenantrolina (OF). Este perfil de inhibidores fue indistinguible al compararlo con el perfil de muestras obtenidas 12 horas antes del TP, donde se alcanzaron los valores más altos de actividad enzimática. La tabla 3 muestra los porcentajes de inhibición de la actividad enzimática obtenida en las muestras ante la presencia de los distintos inhibidores.



**Porcentajes de inhibición de la actividad enzimática.**

Inhibidor	LA	EM
EDTA	80.2	84.4
PEP	3.9	6.4
NEM	3.7	3.4
PMSF	27.9	27.1
AP	24.3	25.7
OF	86.7	91.1

**Tabla 3**

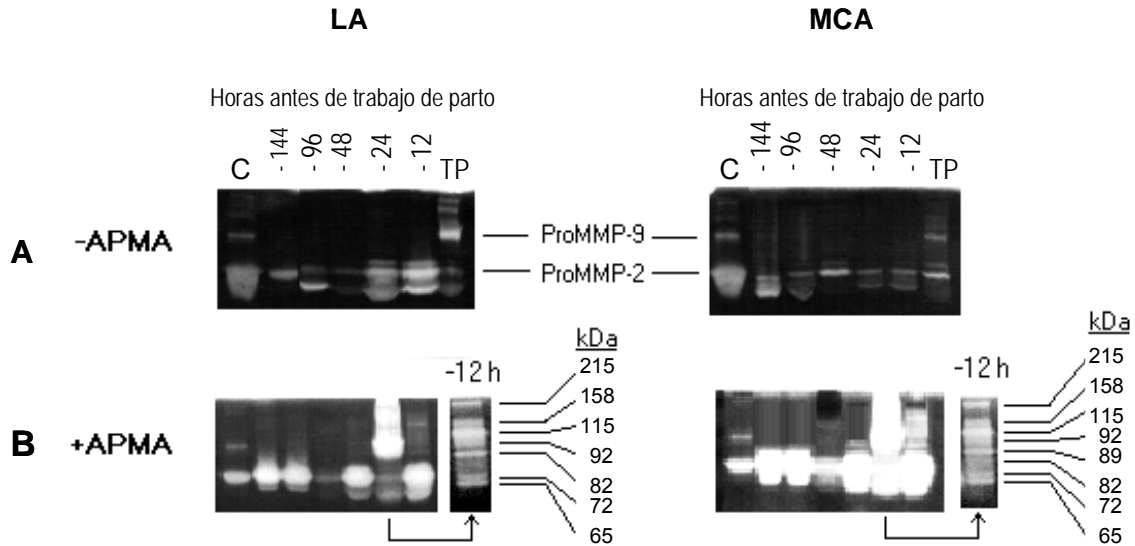
**Figura 6. Perfil de inhibición de proteasas.** Se muestra el perfil de inhibición de diferentes familias de proteasas en Líquido Amniótico (barras negras) y Extractos de Tejido (barras grises). \*Unidad=  $\mu\text{g}$  de gelatina degradada/mg de proteína incubada/24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Al analizar estos datos se concluye que la actividad enzimática presente en ambas muestras, esta dada en su mayoría por MMPs, hay mínima participación de proteasas de serina, cisteína y proteasas ácidas.

### **8.1.3 Caracterización de MMP por zimografía.**

***El zimograma mostró que MMP-9 se presenta únicamente en la fase final de la gestación.***

La identificación mayoritaria de MMP condujo a la caracterización de esta clase de enzimas en los dos compartimentos explorados en el modelo. El análisis de las muestras mediante zimografía mostró que en el día 15 de la gestación (144 h antes del TP), existía una sola banda de lisis con peso molecular estimado de 72 kDa, aunque en los extractos de membrana fue apreciable una banda adicional de 65 kDa. Solamente a partir de 12 horas antes del trabajo de parto se apreció en ambos compartimientos, una gelatinasa de 92 kDa, además de las dos anteriores. Las gelatinasas encontradas corresponden a la proMMP-2 (72 kDa), a la MMP-2 activa (65 kDa) y a la proMMP-9 (92 kDa), de acuerdo con la migración relativa de las gelatinasas de la línea celular U937 (Figura 7). La banda de proMMP-9 representó 40% de toda la actividad gelatinolítica en las muestras con TP (tiempo cero) de acuerdo con la evaluación densitométrica. Por otro lado, la banda de MMP-2 aumentó su actividad a partir de las 24 horas previas al trabajo de parto al menos tres veces por encima del valor previo. En el líquido la actividad aumentó de  $562 \pm 32$  a  $1686 \pm 129$  unidades y en los extractos de tejido aumentó de  $223 \pm 18$  a  $670 \pm 32$  unidades. En este mismo lapso se pudo apreciar la presencia de la forma activa de MMP-2, con 65 kDa. También se identificaron gelatinasas de alto peso molecular que aparecieron en las 12 horas previas al parto (Figura 7, panel A). La incubación de los zimogramas en presencia de ortofenantrolina (inhibidor específico para MMP), tuvo como resultado la inhibición completa de todas las gelatinasas, confirmando la identidad de las enzimas como MMP.



**Figura 7. Zimogramas obtenidos al correr las muestras de LA y extractos de MCA en ausencia o presencia del activador APMA.** Alícuotas de Líquido amniótico y extractos de membrana fueron analizados por zimografía. Panel A, muestra la actividad obtenida a lo largo de la gestación. El carril señalado como C en todos los geles corresponde a marcadores de actividad de proMMP-2 y proMMP-9. Panel B. Se presentan las mismas muestras, pero después de ser activadas con APMA. La muestra obtenida 12 horas antes del TP presentó tal actividad que fue necesario hacer dilución 1:5 de la muestra para mostrar las bandas gelatinolíticas (recuadro).

#### **8.1.4 Activación con APMA.**

***Las muestras obtenidas 12 horas antes del TP mostraron mayor cantidad de enzima latente.***

Los resultados anteriores obtenidos por zimografía mostraban a la MMP-9 en su estado de proenzima tanto 12 horas antes de TP como en el momento de parto. Lo cual sugería que probablemente no estábamos obteniendo toda la enzima activa en nuestras muestras. Por ello se activó toda la enzima latente usando el organomercurial aminofenilmercurio acetato (APMA). En los zimogramas de la Figura 7, en el panel B se observa como el patrón de actividad se modificó luego del tratamiento con APMA. En el tejido, aumentaron todas las bandas de lisis de

las enzimas descritas antes y se identificaron nuevas bandas de gelatinasas con pesos moleculares que van desde 89 a 200 kDa (recuadro de Figura 7B). Las muestras de LA presentaron un patrón similar, excepto en las bandas de 65 y 72 kDa que se apreciaron disminuidas.

Los resultados obtenidos con el sustrato marcado revelaron actividad de gelatinasa latente en extractos de MCA y LA en los grupos de 12 horas antes de TP y con TP principalmente. Los valores mostrados en la Tabla 4 se expresan en  $\mu\text{g}$  de gelatina degradada / mg de proteína incubada.

Tabla 4. Líquido Amniótico Extracto de MCA

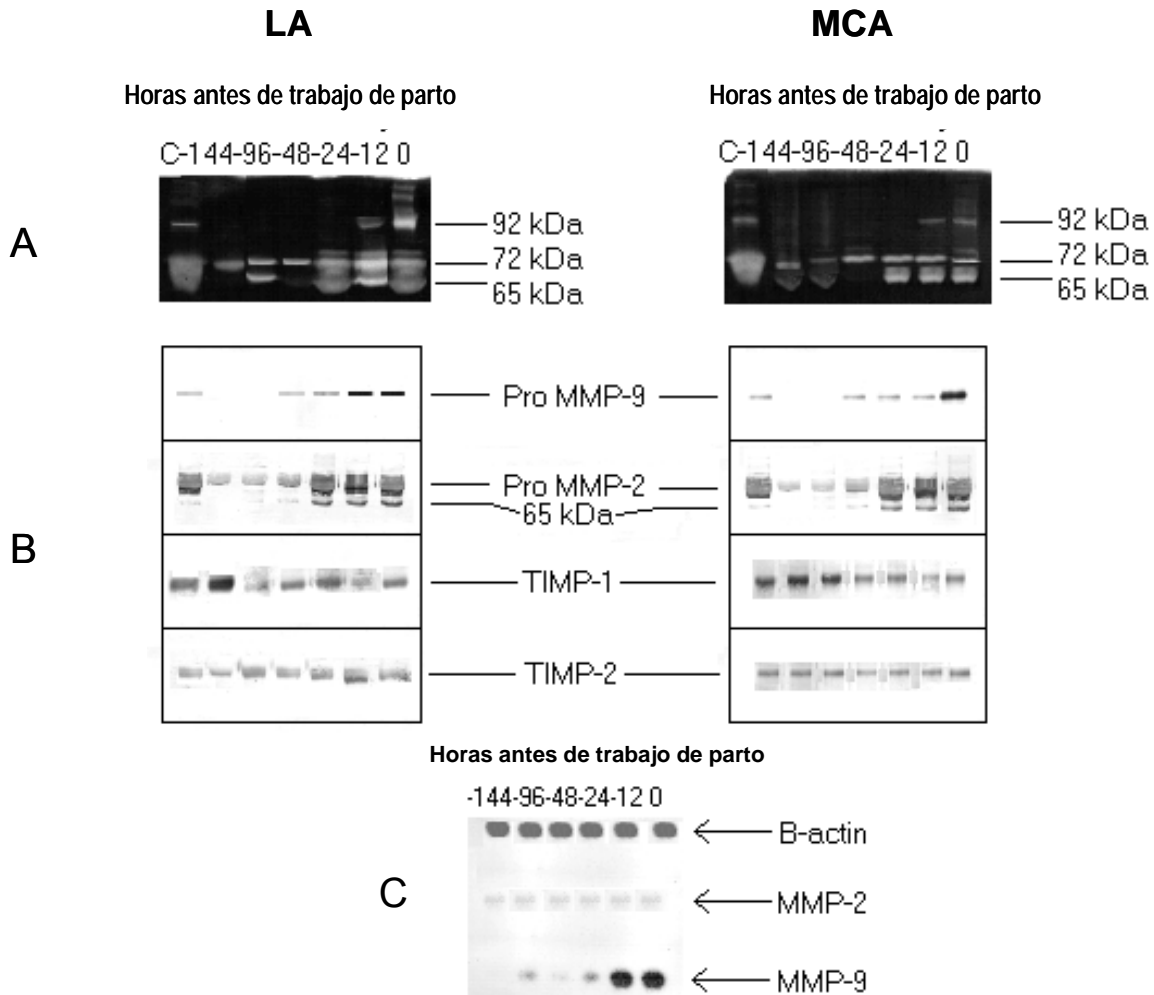
Tratamiento	12 horas antes TP	TP	12 horas antes TP	TP
- APMA	202.35 $\pm$ 60.10	400.22 $\pm$ 56	420.23 $\pm$ 88.90	350.0 $\pm$ 38
+APMA	455.40 $\pm$ 118.22	501.22 $\pm$ 68	2020.4 $\pm$ 104.8	480.0 $\pm$ 62

#### **8.1.5 Caracterización de las MMP presentes en muestras de LA y extractos de MCA por Western Blot y Northern Blot.**

La identidad de la MMP-2, la MMP-9, el TIMP-1 y el TIMP-2 se confirmó por ensayos de Western Blot en ambos compartimentos (Figura 8, Panel B). La inmunorreactividad de ambas enzimas mostró un patrón de expresión similar al desplegado en el zimograma (Figura 8, Panel A). Para efectos de la cuantificación de estas bandas, se utilizó un análisis densitométrico, empleando el fondo de la membrana como blanco y el equipo asignó unidades de densidad (UD) a cada banda. La banda inmunorreactiva para MMP-9 apareció solamente 48 horas

previas al TP y se incrementó 2.5 veces en el momento del TP. En el líquido amniótico fue de  $495 \pm 42$  a  $1238 \pm 102$  UD y en el tejido  $640 \pm 28$  a  $1600 \pm 125$  UD. La banda inmunorreactiva para proMMP-2 fue detectable desde el día 15 de gestación y aumentó cuatro veces su reactividad 24 horas antes del TP (en ambos compartimentos  $975 \pm 36$  a  $3900 \pm 98$  UD) y permaneció así hasta el TP. La forma activa de la MMP-9 no se observó, aun usando condiciones reductoras para el Western Blot. La banda inmunorreactiva para TIMP-1 disminuyó tres veces su valor en el momento del TP, respecto al día 15 de la gestación (144 horas antes de TP). En el líquido amniótico de  $3795 \pm 201$  a  $1265 \pm 122$  UD y para el tejido de  $4002 \pm 136$  a  $1334 \pm 128$  UD. El TIMP-2 no mostró cambios en ningún momento en ambos compartimientos.

Para expresar de manera cuantitativa los datos densitométricos del Northern Blot, se utilizó el mismo principio que para el Western Blot y las lecturas en unidades densitométricas (UD) se normalizaron en cada membrana, utilizando la intensidad de la banda del RNAm de la  $\beta$  – actina. La inducción de la expresión del gene de la MMP-9 fue detectada 96 horas antes del TP (día 17 de la gestación):  $1225 \pm 98$  UD, sin embargo, aumentó cuatro veces 12 horas previas al TP ( $4900 \pm 122$  UD) manteniéndose sin cambio. El RNAm para MMP-2 no se modificó de acuerdo con los valores densitométricos (Figura 8, Panel C).

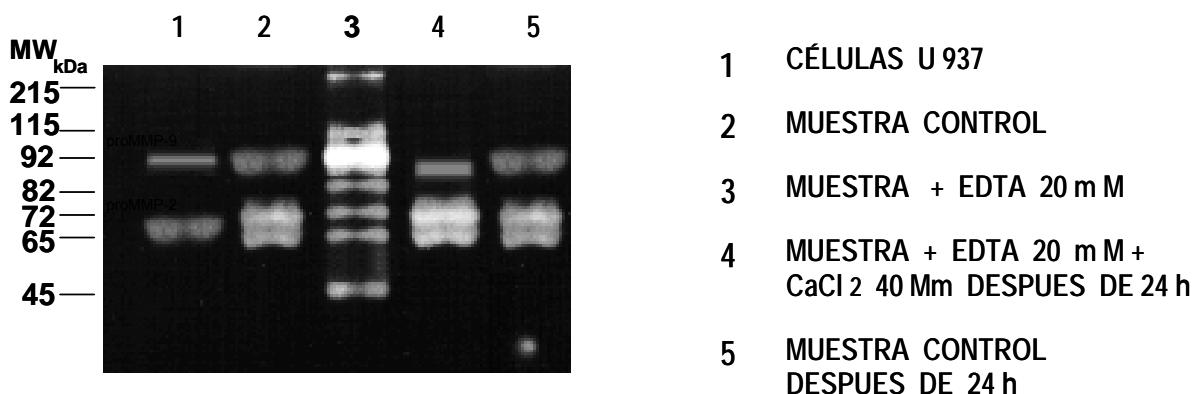


**Figura 8. Zimografía, Western y Northern blot de las muestras obtenidas durante la gestación y el TP de la rata.** El panel A, muestra el zimograma del LA y Extractos de MCA a lo largo de la gestación. El panel B, muestra el Western blot obtenido de las mismas muestras utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra MMP-9, MMP-2, TIMP-1 y TIMP-2. El carril C fue cargado con el estándar purificado correspondiente. El panel C, muestra la hibridación del RNAm extraído de las membranas fetales de diferentes edades gestacionales con sondas específicas para MMP-2 y MMP-9.

## 8.2 Identificación y caracterización de un mecanismo de activación de MMP en las membranas fetales de la rata durante la etapa periparto.

### 8.2.1 Zimografía.

Los sobrenadantes obtenidos de los extractos con calcio ( $E_{Ca}$ ) mostraron tres bandas líticas con peso molecular de 92, 72 y 65 kDa. Estas bandas de acuerdo con nuestro patrón de referencia (sobrenadante de las células U-937), correspondieron a pro-MMP-9, pro-MMP-2 Y MMP-2 (Figura 9, carril 2).



**Figura 9. Actividad enzimática de los extractos de MCA (12 h antes de TP) ante el sustrato gelatina.** La numeración de los carriles se relaciona con la muestra aplicada en el gel y/o tratamiento que se haya dado a cada una de estas (señalado al lado derecho de la figura).

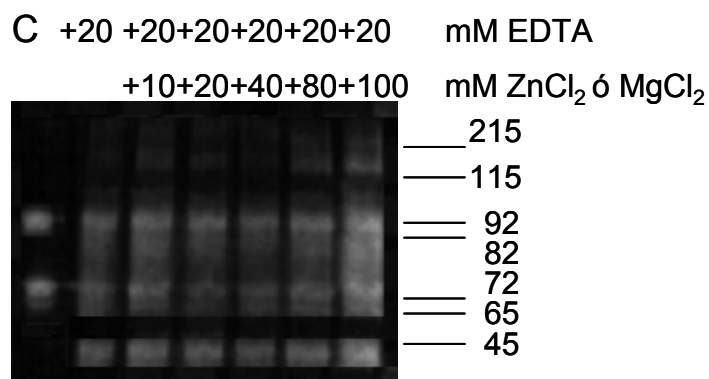
### 8.2.2 Efecto del EDTA sobre la actividad gelatinolítica.

***La presencia del quelante permite observar la presencia de gelatinasas que originalmente no se mostraban en el gel.***

Como parte de las medidas para controlar los experimentos mencionados anteriormente, las muestras  $E_{Ca}$  se incubaron previamente en presencia de EDTA 20 mM y posteriormente se aplicaron en un gel de gelatina (zimograma), aquí aparecieron nuevas bandas líticas, y las previamente identificadas como de 92, 72 y 65 kDa, las cuales aumentaron su intensidad (Figura 9, carril 3). El fenómeno fue reproducido en todas las ocasiones que el ensayo fue realizado, dando siempre el mismo número de bandas. Para verificar los efectos del calcio sobre este

fenómeno y su reversibilidad, se agregó  $\text{CaCl}_2$  en exceso a los extractos con EDTA y la activación de gelatinasas fue completamente reversible (Figura 9, carril 4). Para descartar una activación dada por el tiempo y temperatura de incubación en que se mantuvo a la muestra. Siempre se tuvo una muestra control ( $E_{\text{Ca}}$ ) incubada a temperatura ambiente, sin EDTA. Esta muestra nunca mostró cambios en su actividad gelatinolítica (Figura 9, carril 5).

Para verificar la dependencia del ensamble y desensamble de nuestras proteínas al metal, las muestras con EDTA ( $E_{\text{EDTA}}$ ) se incubaron con concentraciones equimolares de  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ . En ninguno de los ensayos, la adición de estos metales logró revertir la aparición de las nuevas bandas con actividad gelatinolítica (Figura 10). Paralelamente, el efecto se reprodujo con muestras incubadas con EGTA y adicionadas con  $\text{Ca}^{2+}$ , observando el mismo patrón que en la Figura 9.



**Figura 10. Efecto del EDTA sobre otros cationes diferentes al calcio.** La actividad enzimática de los extractos de MCA (12 h antes de TP) con EDTA, incubados con concentraciones crecientes de los cationes  $\text{Zn}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$  no experimentó algún cambio en el patrón de corrida.

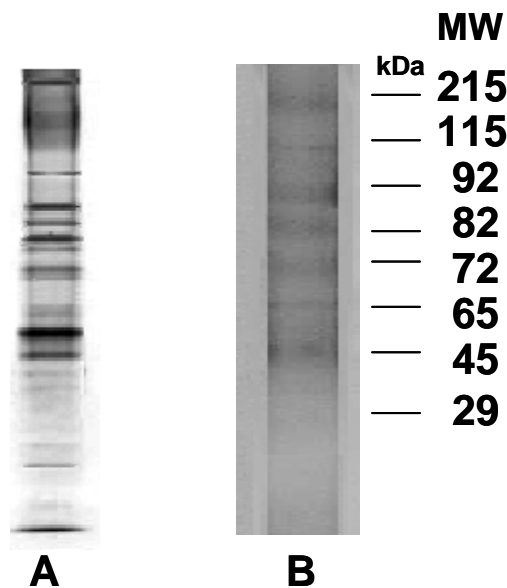
De los resultados obtenidos por zimografía, se logró comprobar el efecto que tenía el EDTA al ser agregado a los extractos de tejido, revelando la presencia de



una cantidad mayor de enzimas con actividad gelatinolítica, y esto fue obtenido por el hecho de incubar el precipitado en presencia de EDTA. De tal manera, que se usó directamente una solución amortiguadora conteniendo EDTA (solución B, ver ápendice), para tratar a los precipitados del tejido obtenidos del extracto de membranas (tal como fue indicado en Métodos, 2a. Parte). Cuando estos extractos fueron sujetos a zimografía, el patrón de gelatinasas apareció y fue indistinguible del extracto inicial activado por EDTA descrito anteriormente (Figura 9, carril 3). También se corroboró el ensamblaje y desensamblaje dependiente de calcio. Como era de esperarse, al correrse geles de poliacrilamida-SDS se revelaron más bandas en los primeros extractos que en los extractos de EDTA (Figura 11, Panel A y B) teniendo  $0.2 \pm 0.05$  mg/g de proteína/g de membranas corioalantoicas. A partir de este punto, todos los experimentos se realizaron usando los extractos con EDTA.

### **8.2.3 Componentes presentes en los extractos con EDTA analizados por Western Blot.**

El Western-blot de los extractos con EDTA reveló la presencia de proteína inmunoreactiva para MMP-9, MMP-3, MMP-2, TIMP-1 y TIMP-2 (Figura 12). Las proteínas recombinantes de MMP-9, MMP-3, MMP-2, TIMP-1 y TIMP-2 fueron usadas como control positivo. El anticuerpo contra MMP-9 mostró la presencia de bandas con peso molecular de 92 y 82 kDa con una relación 2:1, observándose

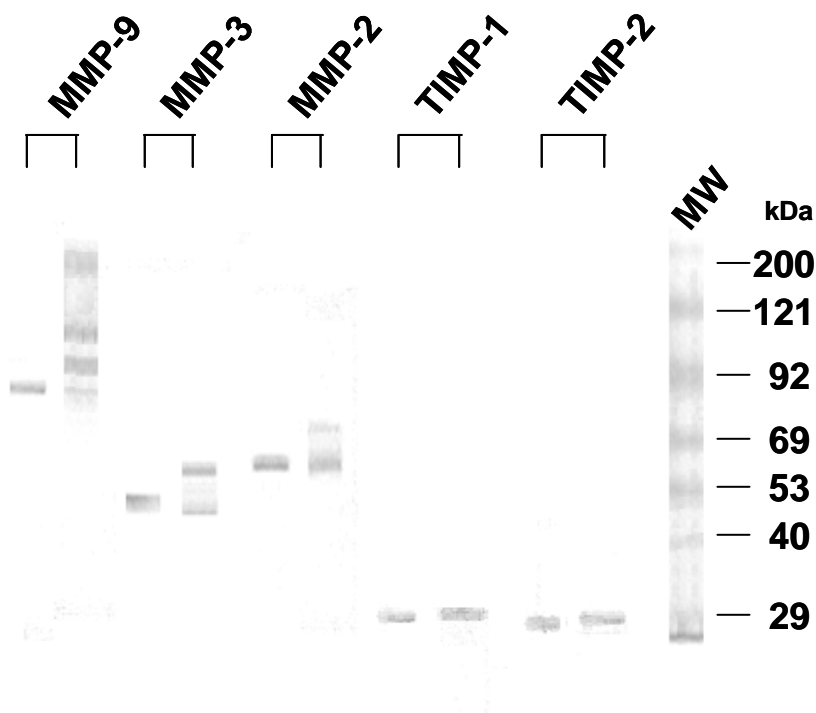


**Figura 11. Extractos de MCA en presencia de EDTA corridos en geles de poliacrilamida al 8%.** El panel A muestra el patrón de proteínas en los extractos de calcio, después de ser incubados durante dos horas en presencia de EDTA (gel teñido con azul de Coomasie). Panel B. Extracto de membrana que se extrajo directamente con EDTA (gel teñido con nitrato de plata).

también bandas de mayor peso molecular (115 y 215 kDa). Usando anti-MMP-2, se mostró una inmunorreactividad ante pesos moleculares de 72 y 65 kDa en una relación de 1:2. Con anti-MMP-3 se mostró inmunorreactividad ante pesos moleculares de 60 y 45 kDa, en una relación 1:1. En relación con TIMP-1 y TIMP-2, apareció como una sola banda a un peso molecular de 29 kDa.

#### **8.2.4 Análisis de las fracciones de los extractos de MCA después de ser corridas por cromatografía FPLC. Observación de la existencia de un complejo de alto peso molecular.**

La figura 13 (Panel A) muestra el perfil de elusión de gelatinasas presentes en los extractos de EDTA después de ser procesados por filtración molecular (FPLC)



**Figura 12. Western blot del extracto de MCA tratado con EDTA.** El extracto de EDTA fue analizado usando anticuerpos monoclonales para metaloproteínase 9 (MMP-9), MMP-3, MMP-2, inhibidor tisular de metaloproteínasa 2 (TIMP-2) y TIMP-1. Al lado izquierdo de cada uno de los carriles conteniendo la muestra del extracto está la proteína recombinante correspondiente. El último carril muestra el patrón de pesos moleculares.

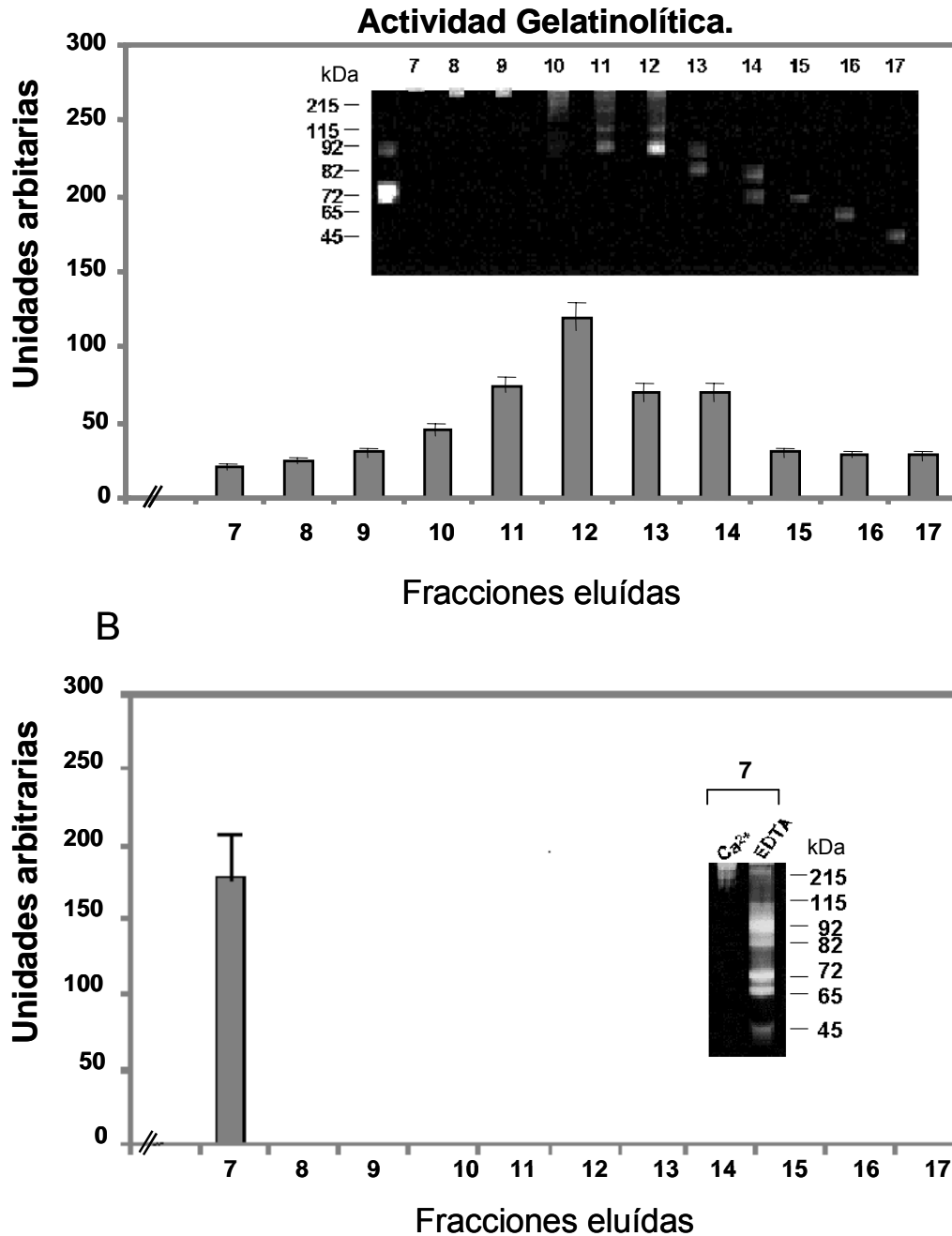
y analizados por zimografía. Se observó la presencia de gelatinasas con diferentes pesos moleculares, las cuales coincidían con las identificadas por la técnica de Western blot. La mayor parte de la actividad gelatinolítica apareció en la fracción correspondiente a 92 kDa (28% de la proteína cargada), seguida por la fracción de 72 kDa (16% de la proteína) y 120 kDa (14%). La Figura 13 (Panel B) muestra el análisis por zimografía de los extractos de EDTA separados por HPLC después de la adición de  $\text{CaCl}_2$  20 mM. Este perfil de la actividad de gelatinasas fue completamente diferente del observado en los extractos con EDTA (Panel A).

Se vió una sola fracción con actividad, la cual eluyó muy cercana al volúmen de exclusión de la columna, correspondiendo a > de 670 kDa y siendo el 11.5% de la proteína cargada. Las fracciones eluidas correspondientes a este pico de actividad con alto peso molecular se trataron con EDTA y posteriormente sujetas a zimografía. En el recuadro del panel B de la figura 13 se muestra que esta fracción contenía todas las gelatinasas previamente observadas.

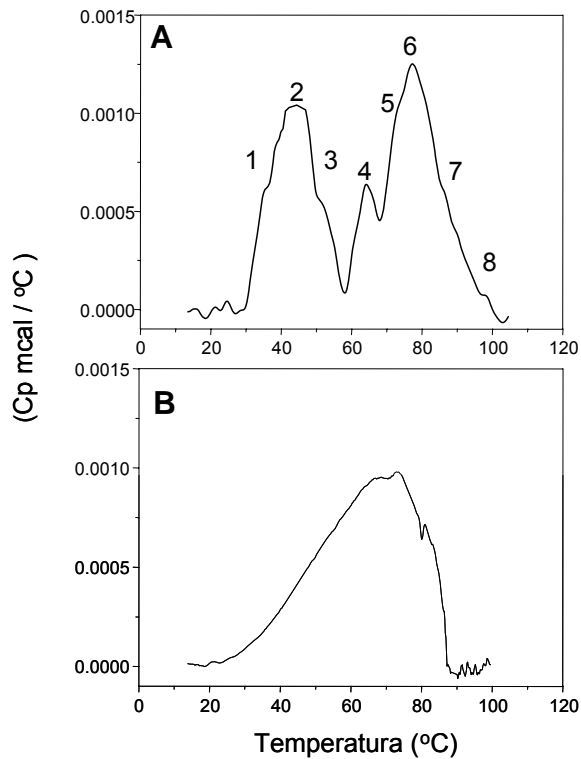
#### ***8.2.5 Termogramas obtenidos por CDB de los componentes presentes en el extracto de MCA con EDTA. Se verifica la existencia de un complejo de MMPs y TIMPs dependiente de calcio.***

El perfil obtenido por calorimetría de los extractos tratados con EDTA, muestra por lo menos ocho temperaturas diferentes de desnaturalización ( $T_m$ ), y van desde 35.5°C a 92.6°C (Figura 14, Panel A). Para la identificación de cada uno de los componentes del complejo observado en los termogramas, se utilizó el perfil de desnaturalización obtenido con las proteínas recombinantes (Tabla 4). Este análisis da la siguiente composición: proMMP-9, MMP-9, proMMP-3, MMP-3, proMMP-2, MMP-2, TIMP-2 y TIMP-1. Cuando a este extracto se le agregó  $\text{CaCl}_2$  20 mM, se obtuvo un amplio termograma correspondiente a la desnaturalización de varias proteínas (transición endotérmica) (Figura 14, panel B). La temperatura de transición obtenida fue de 72°C, con una entalpía de 870 kcal/KJ por mol, determinada por deconvolución (Biltonen y Freire, 1978).

De acuerdo a estas observaciones, el peso mínimo del complejo fue de 480 kDa, calculado por la suma de la masa de cada componente individual sin tomar en cuenta la estequiometría real de éstos.



**Figura 13. Cromatografía por filtración molecular (HPLC).** Extractos de MCA con EDTA se aplicaron a una columna de Superdex 200. Alícuotas de cada una de las fracciones obtenidas fueron analizadas por zimografía. El panel A muestra la actividad gelatinolítica relativa para cada fracción, y el recuadro muestra un zimograma representativo de la corrida. Los marcadores de peso molecular se muestran al lado derecho de cada recuadro. El panel B muestra el perfil de elusión de gelatinasas del extracto con EDTA pero, después de ser incubado en presencia de calcio. Se obtuvo un solo pico de actividad gelatinolítica, cercano al volumen de exclusión de la columna (fracción 7). En el recuadro se muestra la fracción 7 (Ca<sup>2+</sup>) con actividad de gelatinasas con muy alto peso molecular. El carril (EDTA) muestra la actividad gelatinolítica de la misma fracción, pero después de que el calcio fue removido por el quelante.



### Proteínas presentes en el complejo

MMP	Tm (°C)
proMMP-9	92.6±0.04
MMP-9	76.1±0.04
proMMP-3	43.1±0.13
MMP-3	84.4±0.06
proMMP-2	54.4±0.08
MMP-2	62.4±0.20
TIMP-2	71.6±0.12
TIMP-1	35.5±0.12

Tabla 5

**Figura 14. Microcalorimetría Diferencial de Barrido (CDB).** El panel A muestra el termograma obtenido al correrse los extractos de membrana conteniendo EDTA (1 mg/ml) por CDB. Se revela la presencia de al menos ocho diferentes temperaturas de transición ( $T_m$ ) bien definidas (Tabla 5). Cuando a estos extractos se les agregó 20 mM de  $\text{CaCl}_2$  (Panel B), solo el valor de una amplia temperatura de transición fue obtenida ( $T_m=72^\circ\text{C}$ ), afirmando la formación de un complejo en la presencia de calcio.

Tabla 6.

Parámetros termodinámicos del despliegue irreversible de las MMP recombinantes.

MMP Recombinante	pico	T <sub>m</sub> (°C)	ΔH (°K)	ΔS (J/°K/mol)	ΔG	
Pro-MMP-1	I	81.9 ± 0.10	354.9	55.06	0.155	0.06
MMP-1	I	36.5 ± 0.41	309.5	48.95	0.158	0.05
	II	53.3 ± 0.57	326.3	68.19	0.208	0.32
	III	65.2 ± 0.10	338.2	66.47	0.196	0.19
Pro-MMP-2	I	54.1 ± 0.08	327.1	129.19	0.394	0.32
	II	71.3 ± 0.05	344.3	188.67	0.547	0.34
MMP-2	I	62.7 ± 0.20	335.7	182.01	0.542	0.07
	II	77.6 ± 0.29	350.6	76.98	0.219	0.20
Pro-MMP-3	I	41.2 ± 0.13	314.2	103.76	0.330	0.08
	II	45.7 ± 0.18	318.7	157.70	0.494	0.27
	III	80.0 ± 0.05	353.0	18.44	0.052	0.09
MMP-3	I	24.3 ± 0.55	297.3	103.76	0.349	0.01
	II	31.5 ± 0.27	304.5	17.99	0.059	0.03
	III	83.9 ± 0.06	356.9	157.73	0.442	0.21
CD-MMP-3	I	83.4 ± 0.15	356.4	223.00	0.624	0.61
MMP-7	I	98.3 ± 0.27	371.3	57.73	0.155	0.18
MMP-8	I	32.0 ± 0.02	305.0	24.68	0.080	0.01
	II	74.8 ± 0.37	347.8	229.70	0.660	0.16
Pro-MMP-9	I	76.5 ± 0.22	349.5	4.18	0.011	0.34
	II	92.6 ± 0.04	365.6	233.04	0.637	0.96
MMP-9	I	30.9 ± 0.15	303.9	24.26	0.079	0.26
	II	40.7 ± 0.39	313.7	94.97	0.302	0.24
	III	76.1 ± 0.04	349.1	592.45	1.697	0.03
Amniotic Fluid	I	41.7 ± 0.52	314.7	—	—	—
	II	53.6 ± 0.85	326.6	—	—	—
	III	68.8 ± 2.05	341.8	—	—	No determinado
	IV	76.2 ± 0.19	349.2	—	—	—
	V	84.3 ± 1.16	357.3	—	—	—
	VI	92.4 ± 0.60	365.4	—	—	—

(n=3), SE (±).

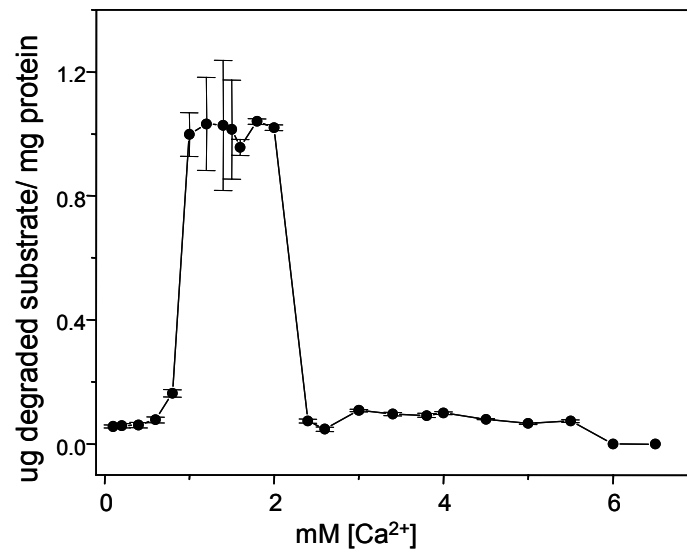
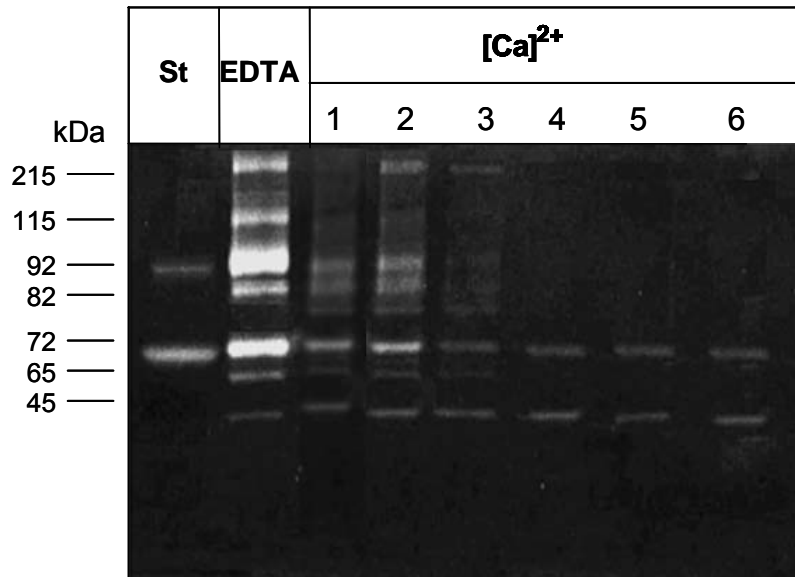
### ***8.2.6 Dependencia al calcio de la actividad enzimática del complejo presente en las MCA.***

La figura 15 muestra la actividad enzimática obtenida por la acción combinada de MMP-2 y MMP-9 presentes en el extracto de EDTA como una función a la concentración de calcio presente. Como se muestra en el panel A, no se detectó actividad gelatinolítica a concentraciones inferiores a 0.7 mM y mayores de 2.2 mM de calcio. El panel B muestra la actividad gelatinolítica obtenida de los extractos de EDTA por la técnica del zimograma, demostrando que la actividad enzimática es dependiente de la concentración de calcio presente en el microambiente. Los resultados de ambas metodologías corroboran esta dependencia ante concentraciones fisiológicas de calcio.

### ***8.2.7 Identificación de los componentes del complejo en las MCA libres de células por inmunohistoquímica.***

La existencia de los componentes del complejo en la matriz extracelular de las membranas fetales fue observada en preparaciones reveladas mediante inmunohistoquímica. La Figura 16 muestra las MCA libres de células con reacción positiva para los anticuerpos anti-MMP-9, anti-MMP-3, anti-MMP-2, anti-TIMP-1 y anti-TIMP-2, usando el método de detección Envisión.



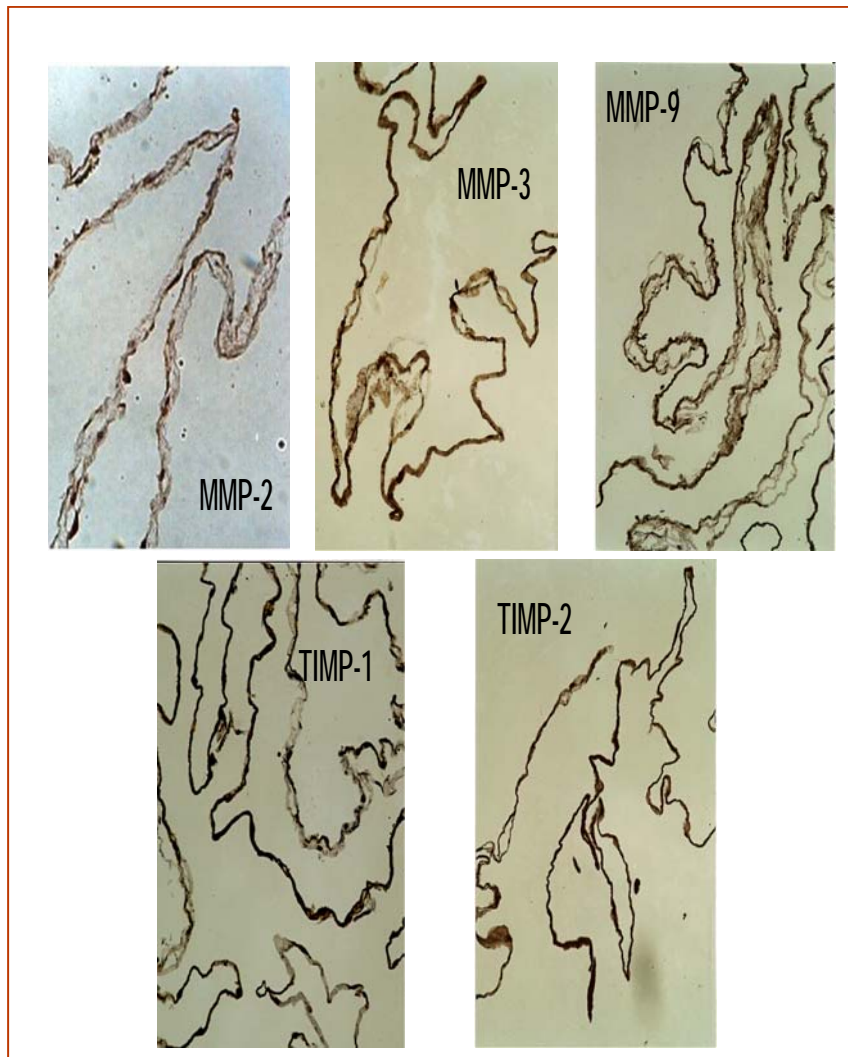
**A****B**

**Figura 15. Efecto de la concentración del calcio sobre la actividad enzimática.** El panel A muestra la actividad mezclada para MMP-2/MMP-9 de los extractos de membranas conteniendo EDTA, en función del incremento de la concentración de calcio (n=6; X±SD). El panel B muestra la actividad enzimática ante el sustrato de gelatina por la técnica del zimograma. St: sobrenadante de las células U937 (estándar de MMP-9 y MMP-2), EDTA: extractos conteniendo EDTA, los números superiores indican la concentración final (mM) agregada a cada uno de los extractos con EDTA, antes de la aplicación al gel. Los números de la izquierda indican el peso molecular de las bandas.

### **8.2.8 Colocalización de los componentes del complejo por microscopía confocal.**

El propósito de utilizar membranas fetales libres de células para ensayos de inmunofluorescencia, fue reproducir las condiciones del tejido de donde los extractos de EDTA eran obtenidos. Como se describió en la metodología, el extracto de MCA utilizado para la segunda fase del estudio (caracterización del complejo) fue derivado de la elusión con EDTA que se hizo de los precipitados de estas membranas. Las membranas libres de células dieron señal positiva para cada una de las combinaciones usadas en las dobles tinciones con anticuerpos. La MMP-2, MMP-3, TIMP-1 y TIMP-2 colocalizaron con la MMP-9, mostrando regiones de la matriz donde la señal producto de la doble tinción era más intensa (Figura 17). Los controles en ausencia del anticuerpo primario, y las membranas lavadas exhaustivamente con solución amortiguadora conteniendo EDTA antes de que se hiciera cualquier combinación de anticuerpos, no mostraron señal positiva.

## INMUNOHISTOQUIMICA



Membranas  
libres de  
células.

**Figura 16. Inmunohistoquímica de las MCA libres de células.** Los cortes semifinos ( $1\mu\text{m}$ ) de cada una de las membranas fetales, libres de células se incluyeron en parafina, y se prepararon para la tinción con cada uno de los anticuerpos requeridos. Cada uno de los recuadros muestran la señal positiva obtenida con cada uno de ellos.

## MICROSCOPIA CONFOCAL

MCA rata  
Colocalización

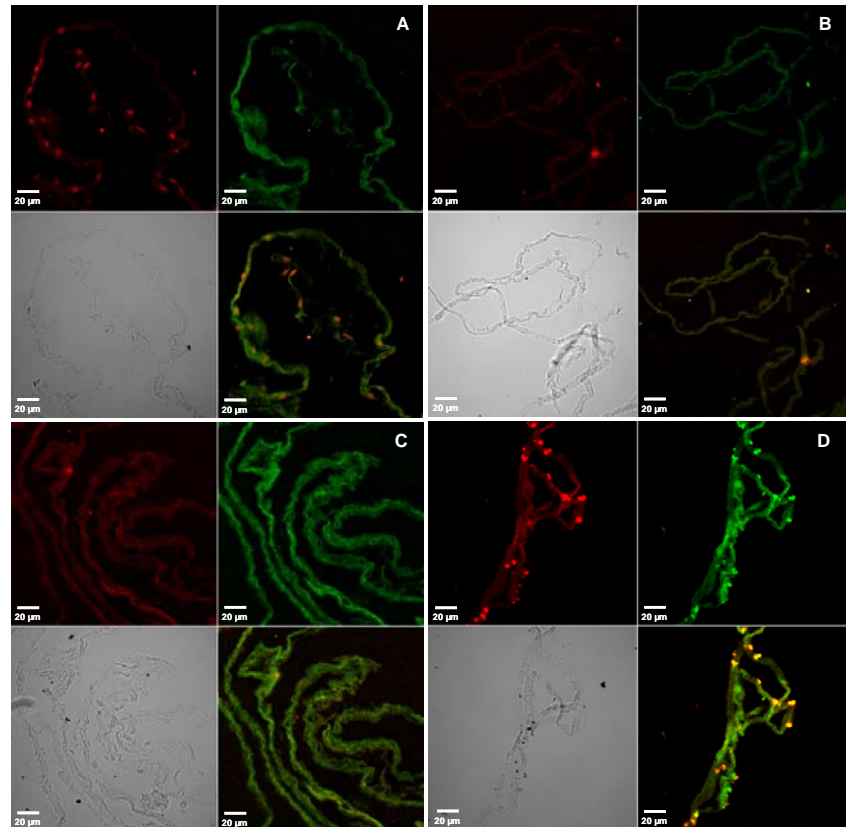
Ac MMP-9/FITC

Ac MMP-2/Alexa 568 (A)

Ac MMP-3/Alexa 568 (B)

Ac TIMP-1/Alexa 568 (C)

Ac TIMP-2/Alexa 568 (D)



**Figura 17. Microscopia confocal realizada en las MCA libres de células.** Las MCA de la rata fueron completamente liberadas de células y preparadas para microscopia confocal como se señaló en métodos. Cada uno de los paneles (A-D) incluye, en el mismo orden, en el cuadrante superior derecho la señal (verde) obtenida para anti-MMP-9, y en el cuadrante superior izquierdo en rojo, la señal obtenida para anti-MMP-2 (A), anti-MMP-3 (B), anti-inhibidor tisular de metaloproteinas-1 (TIMP-1) (C) o anti-TIMP-2(D). La confluencia de los canales rojo y verde se muestra en el cuadrante inferior derecho y muestra la colocalización de todos los componentes y MMP-9 (señal en color amarillo-naranja). El cuadrante inferior izquierdo muestra la microscopía de contraste de fases de la secciones preparadas para la doble tinción. Amplificación 63X.

## **9. DISCUSION.**

### **Caracterización de las enzimas responsables de la actividad proteolítica en las MCA.**

Las MCA delimitan el ambiente del feto y tienen funciones que le permiten su desarrollo hasta el final de la gestación. Se ha observado que el tejido epitelial y conjuntivo en las MCA presentan cambios en su estructura y organización en la etapa periparto, sugiriendo que hay modificaciones que conducen a las membranas a romperse durante el TP (Paavola y cols., 1995). Se ha mostrado en modelos animales y en el humano (Malak y Bell, 1994; Vadillo y cols., 1990;1995) que en el período inmediato previo al parto, hay una pérdida de colágena con un aumento en la expresión de la colagenasa tipo IV de 92 kDa (MMP-9) (Lei y cols., 1995) asociado a la disminución en la fuerza tensil de estas membranas (Harkness y Harkness, 1956).

En este trabajo se ha realizado la descripción de los cambios en el perfil de enzimas presentes en el LA y en extractos de MCA de la rata a partir del día 15 de la gestación. La caracterización de este perfil solamente fue posible a partir de este día, dado que el tamaño de las estructuras fetales no permite una adecuada manipulación en los días previos.

El análisis de la expresión de enzimas proteolíticas en el modelo de la rata coincide con estudios previos que muestran aumento de actividad enzimática en las horas previas al inicio del TP en el humano (Vadillo-Ortega y cols., 1995). Estas enzimas son en su mayoría metaloproteinasas y son detectables tanto en el LA, como en los extractos tisulares con un patrón equivalente a lo largo de todos

los períodos observados. Llamó la atención que antes del trabajo de parto, la mayor parte de la actividad proteolítica se encuentra en el LA y cerca del momento del parto, se invierte la relación a favor del tejido (MCA), lo que pudiera interpretarse como un secuestro de las enzimas hacia el compartimiento en donde ejercerán su actividad catabólica, que resultará en degradación del tejido conjuntivo, la ruptura de la membrana y el inicio del trabajo de parto. El perfil de proteasas y sustratos demostró que la mayor parte de las enzimas que aumentan al acercarse el parto, ya sea en el líquido amniótico o en las membranas, son gelatinasas dependientes de calcio, es decir metaloproteinasas.

Las enzimas más abundantes tanto en los extractos tisulares, como en el LA son la MMP-2 y la MMP-9. La actividad enzimática de la MMP-2 aumentó considerablemente al acercarse el momento del parto y está directamente relacionada a la aparición de la forma activa de la enzima, lo que constituye un hallazgo diferente al reportado para esta enzima, que se considera relativamente constante en su actividad en las MCA del humano (McLaren y cols., 2000; Maymon y cols., 2001). Estudios previos han asociado y caracterizado a la MMP-2 como parte de la maquinaria enzimática responsable de la regulación y ejecución en la ruptura prematura de membranas (Fortunato y cols., 1999; 2000a; 2000b).

En este estudio, los cambios en la actividad enzimática observados de la MMP-2 parecen estar relacionados con la activación de la enzima que se encuentra presente en forma latente. El hecho de que no haya sido posible demostrar la inducción de la expresión del gene, en el momento previo a la ruptura de membranas, hace que se considere un gene constitutivo (Corcoran y cols., 1996;

Hulboy y cols., 1997). Sin embargo, el mecanismo por el cual se mantiene la latencia de la enzima *in vivo* ya que esta latencia puede ser evidenciada por la activación con organomercuriales (Nagase, 1997), aún requiere ser caracterizada. Al ser la MMP-2 la única metaloproteinasa presente entre 15 y 19 días de gestación en la rata, se postula que esta enzima es la responsable de mantener el recambio de la matriz extracelular de las membranas fetales durante esta etapa de la gestación. Sin embargo, el aumento en la actividad de la MMP-2 a partir de las 24 horas previas al TP, sugiere que la MMP-2 también participa en la degradación de tejido conjuntivo durante la ruptura de las membranas fetales. La participación de la MMP-2 en este evento puede estar directamente relacionada a su actividad proteolítica o a través de activar a la proMMP-9, por lo que su incremento sincrónico con la aparición de la proMMP-9 (Friedman y cols., 1995), en el último día de la gestación, podría estar relacionado con esta función. Por otro lado, la MMP-9 apenas fue detectable en algunas muestras cercanas al final de la gestación, pero aumentó de modo evidente al acercarse el trabajo de parto, confirmado por actividad enzimática, inmunorreactividad y la expresión del gene respectivo. Estos datos concuerdan con lo ya citado en la literatura, en donde se describe aumento de la expresión del gene de la MMP-9 a finales de la gestación (Vadillo-Ortega y cols., 1995; McLaren y cols., 2000). Lo anterior refuerza la idea de que la MMP-2 actúa en conjunto con la MMP-9 en las alteraciones de las membranas fetales previas a su ruptura. Es importante mencionar que, la identificación de estas dos metaloproteinasas no descarta la participación de otras MMPs.

## **Regulación de la actividad catalítica presente en las MCA.**

Una primer interrogante de los resultados presentados era la observación de que en ningún líquido amniótico o extracto de membranas, se demostraba la forma activa de la MMP-9 y solamente en algunas muestras fue posible demostrar MMP-2 activa. Sin embargo, tal y como lo demostraron los ensayos con APMA, era posible revelar la latencia de las enzimas en ambos compartimientos a partir de 12 horas previas al trabajo de parto. Con base en lo anterior, hasta esta parte del estudio se podía concluir que a pesar de existir un aumento en la expresión de la MMP-9, por datos de Western blot, zimografía y activación con APMA, la regulación de su actividad catalítica es dependiente de algún mecanismo que modula la activación de la proenzima.

Dentro de los posibles mecanismos que podrían ser responsables de la latencia de las enzimas, se pensó en la interacción de estas metaloproteinasas con sus inhibidores específicos. Se ha descrito que la membrana amniótica produce TIMP-1 y TIMP-2 (Rowe y cols., 1997), pero no se habían analizado los cambios en sus concentraciones a lo largo de la gestación. La determinación semicuantitativa de TIMP-1, reveló que el inhibidor específico de la MMP-9 disminuye hacia el momento del trabajo de parto y en ese sentido, su cantidad va en dirección opuesta al de la MMP-9, con lo que el balance entre proteasa e inhibidor se inclina a favor de la proteólisis al momento del trabajo de parto, lo que apoya a la hipótesis de participación de las metaloproteinasas de matriz en la ruptura de las membranas fetales. El hecho de que el TIMP-2, que tiene actividad selectiva por la MMP-2, no se modifique a lo largo de la gestación, sugiere que el eje principal de regulación se ejerce sobre la MMP-9.



Los resultados obtenidos en esta fase del estudio tienen correlación directa con los datos transversales que se han descrito en el humano y coinciden completamente con el seguimiento longitudinal realizado en el mono rhesus (Vadillo-Ortega y cols., 2002). En este sentido, la expresión de las dos enzimas en la rata sigue un patrón similar al humano, en el que es posible detectar MMP-2 durante las etapas previas al desarrollo del trabajo de parto y la expresión selectiva de la MMP-9 una vez iniciado éste (Vadillo-Ortega y cols., 1995; Fortunato y cols., 2000a). Asimismo, la disminución en la concentración del TIMP-1, una vez llegado el final de la gestación, también ha sido descrito en el humano (Vadillo-Ortega y cols., 1996). Por todo lo anterior, el modelo de estudio en la rata parece tener aplicaciones directas relevantes al humano y su accesibilidad hizo posible abordar la segunda parte de este estudio encaminada al entendimiento de los mecanismos de regulación de la actividad de las metaloproteinasas en torno al trabajo de parto. Marcándose como punto de estudio 12 horas antes del trabajo de parto.

En este estudio, al igual que en el de otros grupos de investigación y usando diferentes modelos experimentales (Niu y cols., 2000; Vadillo-Ortega y cols., 2002; Xu y cols., 2002), no se detectó a las formas activas de las metaloproteinasas implicadas en el trabajo de parto por zimografía. Este hallazgo planteaba una inconsistencia biológica, porque solo las formas activas de estas enzimas pueden tener una función en la degradación del tejido conjuntivo, conduciendo a la ruptura de las membranas durante el trabajo de parto en la rata. Más que descartar la participación de estas proteínas, se pensó que algún error en las metodologías

que se estaban utilizando para demostrar formas activas debía de estar ocurriendo.

### **El efecto del EDTA.**

Cuando se estaban analizando los mecanismos de activación para prometaloproteinasas que han sido citados en la literatura (Friedman y cols., 1995; Sang y cols., 1995; Murphy y cols., 1999), se obtuvo un hallazgo por serendipia.

Se encontró un fenómeno de activación de metaloproteinasas con el EDTA, que reveló la existencia de nuevas bandas de gelatinasas con diferente peso molecular, más las bandas ya identificadas en los mismos extractos de membranas o líquidos amnióticos que habían sido caracterizado antes. Después de corroborar la reproducibilidad del hallazgo, se concluyó que al incubar la muestra con el quelante, se estaba propiciando un evento activo de liberación de diferentes MMPs, que podrían encontrarse como un agregado macromolecular presente tanto en líquido amniótico como en el tejido fetal. El hecho de que las muestras fueran primero pre-incubadas con EDTA, posteriormente aplicadas al zimograma y más tarde incubadas en condiciones óptimas para demostrar la actividad de MMPs, fue lo que permitió la identificación de este efecto. Fue posible corroborar que el evento era altamente reproducible y que dependía estrictamente de calcio, ya que se realizaron titulaciones para observar el desensamble y ensamble de los componentes de nuestra muestra con EDTA y/o calcio en concentraciones crecientes. Otros cationes divalentes no fueron útiles para revertir el efecto.

Los resultados anteriores nos colocaban ante un fenómeno paradójico, en que la remoción del calcio antes de la separación electroforética revelaba diferentes

actividades de MMP insospechadas. Por medio de este tratamiento, se obtenía la presencia de las formas activas esperadas para MMP-2, MMP-9 y una MMP más, que apareció formando parte de los componentes del extracto de membranas, cuyo peso molecular sugería se trataba de la MMP-3. Además, al correr las muestras bajo las mismas condiciones en geles de acrilamida se pudo observar la presencia de bandas con bajo peso molecular que correlacionaban con los pesos de los inhibidores tisulares específicos para estas MMP, formando parte del despliegue de proteínas en nuestra muestra. Se sospechó en la existencia de un complejo de MMP dependiente de calcio presente en los extractos del tejido.

#### **Caracterización inicial del complejo dependiente de calcio.**

Para iniciar la caracterización bioquímica de este complejo hipotético de MMP TIMP, se decidió hacer un extracto enriquecido usando una metodología diferente, tomando en cuenta la disgregación de gelatinasas observada, mediada por el EDTA. Primero, se observó que el tratamiento directo de los precipitados obtenidos de los extractos de membranas fetales con una solución amortiguadora conteniendo EDTA, eluía una cantidad significativa del mismo complejo hipotético de gelatinasas. Esta preparación eluída con EDTA se usó para todos los experimentos posteriores. Una propiedad adicional de este complejo surgió inmediatamente, proponiendo que estos componentes moleculares estaban unidos a la matriz extracelular, donde ellos podían ser disociados por la quelación del calcio usando EDTA.

Los datos mostraban la existencia de un proceso dependiente de calcio porque solo la presencia o ausencia de este catión divalente en particular reproducía el

ensamblaje y desensamblaje hipotético de las MMP y TIMP, respectivamente. La técnica de Western blot permitió caracterizar los componentes individuales presentes en el complejo desensamblado tratado con EDTA. Este ensayo reveló la presencia de pro-MMP-9, MMP-9, pro-MMP-3, MMP-3, pro-MMP-2, MMP-2, TIMP-1 y TIMP-2. En adición a estas MMP, proteínas inmunoreactivas de alto peso molecular para la MMP-9 fueron observadas a 115 y 215 kDa. Estas formas moleculares pueden corresponder a la asociación descrita para MMP-9 con  $\alpha_2$ -microglobulina o lipocalina (neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), proteína asociada de 25 kDa) para producir la forma de 125 kDa (Triebel y cols., 1992a; Yan y cols., 2001) o a la forma dimérica de 215 kDa (Triebel y cols., 1992b). Estos datos plantean investigaciones a futuro.

Los resultados obtenidos al pasar el extracto de membranas con EDTA a través de una columna de Superdex 200 (HPLC), dieron el primer argumento para corroborar que se estaba ante la presencia de un complejo integrado por diferentes metaloproteinasas e inhibidores tisulares, modulable por la remoción de calcio. Este complejo en presencia de calcio salía casi en el límite superior de exclusión de la columna de filtración molecular y para demostrar su actividad total debía ser incubado con el quelante para liberar las enzimas que se habían observado en el extracto con EDTA. Posteriormente, los datos obtenidos por Microcalorimetría Diferencial de Barrido, para caracterizar la contribución de los diferentes componentes proteicos que estaban en nuestro extracto (estudiando las características estructurales a través de su perfil que despliegan por calentamiento), demostró finalmente la formación de un complejo. Cuando el extracto con EDTA se calentó, se mostró un perfil de desnaturalización en el cual

ocho diferentes temperaturas de transición fueron claramente identificadas como pro-MMP-9, MMP-9, pro-MMP-3, MMP-3, pro-MMP-2, MMP-2, TIMP-1 y TIMP-2 (de acuerdo al análisis de temperaturas de transición obtenidas en el termograma de las proteínas recombinantes). Sin embargo, cuando este extracto se incubó en presencia de calcio, previo a la corrida, mostró un termograma con solo una temperatura de transición. La carencia de transiciones exotérmicas en este estudio sugirió la formación de un complejo más que la agregación de las proteínas (Ortega y Lepock, 1995).

El extracto con EDTA fue semipuro, ya que se eliminó virtualmente a todos los contaminantes celulares por repetidas lavadas de los precipitados de homogenados de membrana. Este proceso permitió obtener la elución de las proteínas contenidas en la biomatriz con un paso que implicaba la incubación del tejido con EDTA, obteniendo la liberación de las mismas gelatinasas que nosotros habíamos observado en los extractos originales. Además, nosotros duplicamos el ensamblaje y desensamblaje del complejo de gelatinasas y TIMPs dependiente de calcio con estos extractos enriquecidos. Esto sugirió que el complejo identificado existía in vivo, formando un complejo estable con la matriz extracelular. Para confirmar esta suposición se usó la combinación de dos metodologías: inmunohistoquímica y microscopía confocal para identificar la presencia de cada uno de los componentes descritos en el tejido y colocalizar la presencia de todos los componentes moleculares en la biomatriz de las membrana fetales, obtenida a través del tratamiento con detergente y ciclos de congelamiento y descongelamiento de las membranas fetales.

## **Identificación del complejo de MMP y TIMP en la matriz extracelular de las MCA.**

Los resultados por inmunohistoquímica mostraron que cada uno de los componentes del complejo se encontraban depositados en la matriz del tejido libre de células. Además, la distribución heterogénea de los complejos, como se reveló por microscopía confocal, sugiere la existencia de componentes específicos de la matriz extracelular a los cuales el complejo tenga afinidad, tales como tipos específicos de colágena. Algunos reportes señalaron a la matriz extracelular como un tejido donde las MMP se encuentran fuertemente unidas. La demostración de que la colagenasa está unida al tejido conjuntivo *in vivo* se ha reportado en tejidos de rata normal, en los modelos experimentales de cirrosis en el hígado y en el útero de rata (Montfort y Pérez Tamayo, 1975;1978). Pardo y cols. (1980) reportaron la presencia de una enzima con actividad colagenolítica (probablemente MMP-13), como un contaminante constante unido fuertemente a las fibras de colágena. Esta sugerencia de un probable papel fisiológico de esta enzima unida a su sustrato es apoyada por nuestros hallazgos reportados aquí.

El inicio de la caracterización bioquímica de los extractos con EDTA involucró una cromatografía de tamiz molecular, la cual corroboró la existencia de las mismas gelatinasas que han sido identificadas por Western blot y CDB. Cuando el calcio se añadió a estos extractos antes de cargarlo en la columna, estas enzimas desaparecieron, y solo una fracción de alto peso molecular pudo ser dissociada dentro de los mismos componentes moleculares por la quelación del calcio disponible. Sorpresivamente, sólo el 15% de la proteína cargada pudo ser

recuperada de la columna de tamiz molecular cuando el calcio estuvo presente en las soluciones; estas condiciones favorecieron la formación del complejo. Esto nuevamente sugiere que es un complejo de muy alto peso molecular que no entra a la resina de Superdex 200 o a la malla formada por el polímero de la acrilamida durante el SDS-PAGE o zimograma. De acuerdo al límite de exclusión de la columna, el peso molecular mínimo para este complejo es de 480 kDa, lo cual hace que sea uno de los más grandes complejos de proteasas multicatalítico descrito (Dutta y Berman, 2005). El tamaño propuesto de este complejo puede explicar los resultados de microscopía confocal, los cuáles revelaron la presencia de grandes racimos de proteínas inmunorreactivas colocalizadas en las membranas fetales libres de células. Esta es una clara evidencia que existe un complejo de MMP y TIMP formando parte del degradoma extracelular, al menos en las membranas fetales de la rata.

Las MMP requieren calcio para llevar a cabo su actividad proteolítica sobre sus diferentes sustratos, al menos esta dependencia ha sido demostrada en los siguientes casos: Los dominios catalíticos de la estructura de las MMP poseen iones de calcio (mínimo dos) que son indispensables para ejercer su actividad enzimática, participan en el plegamiento de la proteína, facilitando el reconocimiento por su sustrato, y por lo tanto su catálisis. Por otra parte, se ha observado que un sólo ión de calcio está asociado con el dominio de la hemopexina de las MMP, sugiriendo su posible participación en la interacción con otras moléculas, lo cual no afecta la función catalítica de estas enzimas. Hay evidencia que el dominio de la hemopexina tiene afinidad por la heparina y que la interacción que se establece entre estas es dependiente de calcio (Wallon y

Overall, 1997). En este estudio no se logró purificar el complejo propuesto con el uso de las metodologías tradicionales, así que no se logró abordar el mecanismo de interacción entre los componentes moleculares. Sin embargo, se muestran evidencias de que MMP-2, MMP-3 y MMP-9 tanto en sus formas inactivas, como activas; además de TIMP-1 y TIMP-2, están fuertemente unidos en un complejo que tiene afinidad por la matriz extracelular, cuyas interacciones son dependientes de calcio y aún no han sido descritas.

Este complejo no se ha identificado en otros extractos de tejido, posiblemente porque las soluciones amortiguadoras que se utilizan para la extracción de MMP contienen concentraciones milimolares de calcio, de tal manera que es posible que la ausencia de formas activas de MMP en las membranas y otros extractos tisulares bajo análisis zimográfico puedan ser explicados por estos hallazgos.

### **Papel fisiológico del complejo de alto peso molecular en el control de la actividad.**

La presencia de un complejo proteico conteniendo formas activas e inactivas de diferentes MMPs y TIMPs sugieren un mecanismo de actividad enzimática latente que puede participar en el control de la actividad de MMP en el tejido. Los ensayos dirigidos para confirmar dicha propuesta fueron diseñados usando un rango de concentraciones fisiológicas de calcio, y el fenómeno del mecanismo de activación mediado por calcio siempre fue reproducible. De acuerdo a estos experimentos, las actividades de las MMPs pueden experimentar una transición en su estructura y función, formando un complejo estable a concentraciones fisiológicas de calcio mayores a 2 mM, confiriendo la latencia a estas enzimas. Por el contrario, si el



calcio cae menor a esta concentración (2 mM), se propone que el complejo se disocia y las enzimas activas pueden actuar sobre sus respectivos sustratos. Es probable que un cambio en la concentración extracelular de calcio pueda ocurrir en este microambiente durante el TP, porque la concentración miometrial genera un flujo de calcio que es dirigido del espacio extracelular y LA hacia el miometrio. En consecuencia, es posible que la concentración de calcio por arriba de 2 mM pueda ser alcanzada en la membrana fetal (Sanborn, 2000). La formación de este complejo de MMPs activas e inactivas pudiera estar en sincronía con la contracción miometrial y la ruptura de membranas. Otra ventaja fisiológica, podría presentar al complejo como un reservorio de enzimas en forma latente, las cuales al activarse podrían inducir una degradación masiva de los componentes de la matriz extracelular en las MCA, al momento de la ruptura, en el TP. Aunque se ha reportado que la síntesis de MMP se induce varias horas antes del TP en ratas (Lei y cols., 1995), algunos días antes en los humanos (Vadillo-Ortega y cols., 1995) y primates (Vadillo-Ortega y cols., 2002). Por lo que es poco probable que la síntesis de novo de MMPs asociada a su activación extracelular sea la responsable de la ruptura de las membranas de forma simultánea con el inicio de la actividad muscular uterina.

La composición del complejo aquí reportado, no comprende únicamente a las MMPs y TIMPs, es probable que otras proteasas lo integren, ya que los componentes de la matriz extracelular que incluyen proteoglicanos, fibronectina, laminina, elastina y diferentes tipos de colágena, sugieren la necesidad de una degradación mas generalizada en el momento de la ruptura de las membranas fetales.

En resumen, en este trabajo se ha identificado un mecanismo novedoso de control enzimático, que descubre la posibilidad de incursionar en mecanismos de secuestro de calcio que se den en la etapa periparto para entender el proceso fisiológico del evento.

La propuesta de este estudio es que el mecanismo que opera en el desarrollo del TP se lleva a cabo a través de una secuencia de diferentes pasos de control proteolítico, cuyo umbral resultaría en la ruptura de las membranas fetales. Se propone: a) la formación de un complejo extracelular que puede ser originado simultáneamente con la secreción de MMP al espacio extracelular, produciendo un sistema de enzimas latentes bajo concentraciones fisiológicas de calcio. Lo cual provocaría la progresiva acumulación de una cantidad masiva de enzimas con potencial para degradar componentes de la matriz extracelular durante los primeros estadios del trabajo de parto.

b) Una vez iniciadas las contracciones del miometrio, esto ocasiona una disminución local del calcio extracelular, haciendo inestable al complejo.

c) Inician los mecanismos de activación de las MMPs del complejo, provocando la degradación del tejido, lo que resulta en la ruptura de las membranas fetales.

Esta hipótesis asume que las concentraciones de calcio presentes en este microambiente, dependen de un amplio rango de condiciones relacionadas íntimamente a la actividad del miometrio.

Por lo que este trabajo tiene una implicación directa en la investigación del mecanismo de ruptura prematura de membranas. Lo que hace necesario hacer una caracterización molecular completa del complejo, entender los mecanismos de activación del mismo y validar su papel fisiológico durante el TP.

## REFERENCIAS.

- The American College of Obstetricians and Gynecologist (ACOG). Preterm premature rupture of the membranes. ACOG 2003;101:178-193.
- Angus SR, Segel SY, Hsu CD, Locksmith GJ, Clark P, Sammel MD, Macones G A, Strauss JF 3rd. y Parry S. Amniotic fluid matrix metalloproteinase-8 indicates intra-amniotic infection. Am J Obstet Gynecol 2001;185:1232-1238.
- 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.
- Baker A, Edwards D y Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutics opportunities. J Cell Sci 2000;115:3719–3727.
- Beltrán MJ y Enríquez PMM. Asistencia actual n la rotura prematura de membranas. En: Prematurez, un enfoque perinatal. ETM, S.A. de C.V. 2004; 118-127.
- Biltonen RL y Freire E. Thermodynamic characterization of conformational states of biological macromolecules using differential scanning calorimetry. Crit Rev Biochem 1978; 5:85–124.
- Bowen JM, Chamley L, Keelan JA y Mitchel MD. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: role and regulation during human pregnancy and parturition. Placenta 2002;23:257-273.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram Quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248–254.
- Brew K, Dinakarandian D y Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: Evolution, structure and function. Bioch. Biophys. Acta 2000;1477:267-283.
- 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 y Tashima L. Preterm birth: the premature rupture of the fetal membrane in the absence of infection. Prenat Neonat Med 1998;3:60-63.
- Cao J, Sato H, Takino T y Seiki M. The C-terminal region of membrane type matrix metalloproteinase is a functional transmembrane domain required for

- pro-gelatinase A activation. *J Biol Chem* 1995;270:801–805.
- Casanueva E, Magaña L, Pfeffer F y Baez A. Incidente of premature rupture of Membranes in pregnant women with low leukocyte levels of vitamin C. *Eur J Clin Nut* 1991;45:401-405.
- Challis JRG y Smith SK. Fetal endocrine signals and preterm labor. *Biol Neonate* 2001; 79:163-167.
- Chin JR, Murphy G y Werb Z. Stromelysin, a connective tissue degrading metalloendopeptidase secreted by stimulated rabbit synovial fibroblasts in parallel with collagenase. Biosynthesis, isolation, characterization and substrates *J Biol Chem* 1985;260:12367-12376.
- Corcoran M L, Hewitt R E, Kleiner D E y Stetler-Stevenson W G. MMP-2 : expression, activation and inhibition. *Enzyme Protein* 1996;49:7-19.
- 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.
- Dutta S y Berman H. Large macromolecular complexes in the protein data bank: a status report. *Structure* 2005;13:381-388.
- Elliot CL, Slater DM, Dennes W, Poston L y 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.
- Fata JE, Ho AT-V, Leco KJ, Moorehead RA y Khokha R. Cellular turnover and Extracellular matrix remodeling in female reproductive tissues: functions of metalloproteinases and their inhibitors. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:77-95.
- Fortunato SJ, Menon R y Lombardi SJ. Presence of four tissue inhibitors of matriz metalloproteinases (TIMP-1,-2,-3,-4) in human fetal membranas. *Am J Am J Reprod Immunol* 1998;40:395-400.
- Fortunato SJ, Menon R y Lombardi SJ. MMP/TIMP imbalance in amniotic fluid during PROM: an indirect support for endogenous pathway to membrane rupture. *J Perinat Med* 1999; 27:362-368.
- Fortunato SJ, Menon R y 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 y Lombardi SJ. Programmed cell death (apoptosis) as a posible pathway to metalloproteinase activation and

- fetal membrana degradation in premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2000b;182:1468-1476.
- Friedman R, Toth M, Peña D, Mobashery S. Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2). *Cancer Res* 1995;55:2548-2555.
- Fu JY, Lyga A, Shi H, Blue ML, Dixon B y Chen D. Cloning, expression, purification, and characterization of rat MMP-12. *Protein Expr Purif* 2001;21:268-274.
- Gibb W. y Challis JR. Mechanisms of term and preterm birth. *J Obstet Gynaecol Can* 2002; 24:874-883.
- Goldenberg R L, Hauth J y Andrews W. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med* 2000;342;1500-1507.
- Goldenberg R L. The management of preterm labor. *Obstet Gynecol* 2002;100:1020-1037.
- Goldman S, Weiss A, Eyali V, Shalev E. Differential activity of the gelatinases (matrix metalloproteinases 2 and 9) in the fetal membranes and deciduas, associated with labour *Mol Hum Rep* 2003; 9:367-373.
- Harkness P y Harkness R D. Changes in the physical properties and in the collagen and hexosamine content of the foetal membranes during pregnancy in rat. *J Physiol* 1956;132:482-491.
- Hasty KA, Pourmotabbed TF, Goldberg GI, Thompson JP, Spinella DG, Stevens RM. Human neutrophil collagenase. A distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1990;265:11421-11424.
- Hulboy DL, Rudolph LA y Matrisina LM. Matrix metalloproteinases as mediators Of reproductive function. *Mol Hum Reprod* 1997;3:27-45.
- Imai K, Yokohama Y, Nakanishi Y, Ohuchi E, Fuji Y, Nakai N y Okada Y. Matriz metalloproteinase 7 (matrilysin) from human rectal carcinoma cells. Activation of the precursor, interaction with other matrix metalloproteinases and enzymic properties. *J Biol Chem* 1995;270:6691-6697.
- Instituto Nacional de Perinatología (INPer). Anuario estadístico 2000.
- Instituto Nacional de Perinatología. Amenaza y trabajo de parto pretérmino. En: Normas y procedimientos de ginecología y obstetricia. México, D.F.: Instituto Nacional de Perinatología 2002;15-18.

Jollie WP. Development, morphology, and function of the yolk-sac placenta of laboratory rodents. *Teratology* 1990;1:361-381.

Jozic D, Bourenkov G, Lim N-H, Visse R, Nagase H, Bode W y Maskos K. X-ray Structure of Human proMMP-1. New insights into procollagenase activation And collagen binding. *J Biol Chem* 2005;280:9578-9585.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.

Lei H, Vadillo-Ortega F, Paavola LG y Strauss JF III. 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 KB, Jeffrey JJ y 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.

Madlener M y Werner S. cDNA cloning and expression of the gene encoding murine stromelysin-2 (MMP-10). *Gene* 1997;202:75-81.

Malak TM, Ockleford CD, Bell SC, Dalglish, Bright N y MacVicar J. Confocal Immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V y VI and their ultrastructural organization in term fetal membranes. *Placenta* 1993; 14:385-406.

Malak TM y Bell SC. Structural characteristics of term human fetal membranes: a novel zone of extreme morphological alteration within the rupture site. *Br J Obstet Gynecol* 1994;101:375-386.

Malak TM, Mulholland G y 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.

Maeda H, Okamoto T y Akaike T. Human matrix metalloproteinase activation by Insults of bacterial infection involving proteases and free radicals . *Biol Chem* 1998;379:193-200.

Mauviel A. Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *J Cell Biochem* 1993;53:288-295.

Maymon E, Romero R, Pacora P, Gervasi MT, Bianco K, Ghezzi F y Yoon BH. Evidence for the participation of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase 1) in preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2000a; 183:914-920.

Maymon E, Romero R, Pacora P, Gervasi MT, Edwin SS, Gomez R y Seubert DE. Matrilysin (matrix metalloproteinase 7) in parturition, premature rupture of membranes, and intrauterine infection. *Am J Obstet Gynecol* 2000b; 182:1545-1553.

Maymon E, Romero R, Pacora P, Gomez R, Mazor M, Edwin S, Chaiworapongsa T, Kim JC, Yoon HB, Menon R, Fortunato S y 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.

McLaren J, Malak TM y Bell SC. Structural characteristics of term fetal Membranes prior to labour: identification of an area of altered morphology overlying the cervix. *Hum Reprod* 1999;14:237-241.

McLaren J, Taylor D J y Bell S C. Increased concentration of pro-matrix metalloproteinase 9 in term fetal membranes overlying the cervix before labor: Implications for membrane remodeling and rupture. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182:409-416.

Meinert M, Eriksen GV, Petersen AC, Helmig RB, Laurent C, Uldbjerg N y Malmstrom A. Proteoglycans and hyaluronan in human fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184(4):679-85.

Meraz-Cruz N, Beltrán MJ, Bustos LH, Flores PA, Espejel A, Buendía DG y Vadillo-Ortega F. Propiedades de la zona del corioamnios que inducen la rotura prematura de membranas. *Ginec Obst Mex* 2003a;71:551-558.

Meraz-Cruz N, Molina DG y 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 Invest Clin* 2003b;

Meraz-Cruz N, Beltrán MJ, Estrada GG y Vadillo-Ortega F. Identificación de la metaloproteasa de matriz extracelular -3 en la membrana fetal de la rata y su posible implicación en la ruptura de las membranas corioamnióticas. *Ginec Obst Mex* 2006;

Montfort I y Pérez Tamayo R. The distribution of collagenase in normal rat tissues. *J Histochem Cytochem* 1975;23:910-920.

Montfort I y Pérez Tamayo R. Collagenase in experimental carbon tetrachloride cirrhosis of the liver. *Am J Pathol* 1978;92:411-420.

Murphy G, Segain JP, O'Shea M, Cockett M, Ioannou C, Lefebvre O, Chambon P Y Basset P. The 28-kDa N-terminal domain of mouse stromelysin-3 has the general properties of a weak metalloproteinase. *J Biol Chem* 1993;268:15435-15441.

- Murphy G, Stanton H, Cowell S, Butler G, Knauper V, Atkinson S y Gavrilovic J. Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *APMIS* 1999;107:38-44
- Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1997;378:151-160.
- Nagase H y Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274:1999;274:21491-21494.
- Niu R, Okamoto T, Iwase K, Nomura S y Mizutani S. Quantitative analysis of matrix metalloproteinases-2 and -9, and their tissue inhibitors-1 and -2 in human placenta throughout gestation. *Life Sci* 2000;66:1127-1137.
- Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H. Matriz metalloproteinase 3 (stromelysin-1) Activates the precursor for the human matriz metalloproteinase-9. *J Biol Chem* 1992;267:3581-3584.
- Ortega A y Lepock J. Use of thermal analysis to distinguish magnesium and calcium stimulated ATPase activity in isolated transverse tubules from skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 1995;1233:7-13.
- Paavola LG, Furth EE, Delgado V, Boyd CO, Jacobs CC, Lei H y Strauss JF III. Striking changes in the structure and organization of rat fetal membranes precede parturition. *Biol Reprod* 1995;53:321-338.
- Pardo A, Soto H, Montfort I y Pérez Tamayo R. Collagen-bound collagenase. *Connect Tissue Res* 1980;7:253-261.
- Parry S y Strauss JF III. Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med* 1998;338:663-668.
- Pei D y Weiss S. Furin - dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* 1995;375:244-247.
- Reponen P, Sahlberg C, Huhtala P, Hurskainen T, Thesleff I y Tryggvason K. Molecular cloning of murine 72-kDa Type IV collagenase and its expression during mouse development. *J Biol Chem* 1992;267:7856-7862.
- 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.
- Rowe T F, King L A, MacDonald P C y Casey M L. Tissue inhibitor of Metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in Human amnion mesenchymal and epithelial cells. *Am J Obstet Gynecol* 1997;176:915-921.



- Sanborn B. Relationship of ion channel activity to control of myometrial calcium. *J Soc Gynecol Investig* 2000;7:4-11.
- Sanbrook J, Fritsch E, Maniatis T, Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989, p.7.26-7.29.
- Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E y Seiki M. A Matriz metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature* 1994;370:61-65.
- Soares MJ, Chapman BM, Rasmussen CA, Dai G, Kamei T y Orwig KE. Differentiation of trophoblast endocrine cells. *Placenta* 1996;17:277-289.
- Sunada H y Nagai Y. A rapid microassay method for gelatinolytic activity using tritium-.labeled heat-denatured polymeric collagen as a sustrate and its application to the detection of enzymes involved in collagen metabolism. *J Biochem* 1980;87:1765-1771.
- The American College of Obstetricians and Gynecologist (ACOG). Preterm premature rupture of the membranes. *ACOG* 2003;101:178-193.
- Towbin H, Staehelin T y Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology* 1992;24:145–149.
- Triebel S, Blaser J, Reinke H y Tschesche H. A 25 kDa  $\alpha_2$ -microglobulin-related protein is a component of the 125 kDa form of human gelatinase. *FEBS Lett* 1992a; 314:386-388.
- Triebel S, Blaser J, Reinke H, Knauper V y Tschesche H. Mercurial activation of human PMN leucocyte type IV procollagenase (gelatinase). *FEBS Lett* 1992b;298:280-284.
- Vadillo-Ortega F, González-Avila G, Karchmer S, Meraz-Cruz N, Ayala-Ruiz A y Selmán LM. Collagen metabolism in premature rupture of amniotic membranes. *Obstet Gynecol* 1990;75:84-88.
- Vadillo-Ortega F, Hernández MA, Meraz-Cruz N, Monzón BF, Beltrán MJ, Soto MJ, Bustos LH. Participación de las metaloproteasas de matriz extracelular en la ruptura prematura de membranas fetales: un modelo fisiopatogénico novedoso. *Ginec Obst Mex* 1992;60:79-85.
- Vadillo-Ortega F, González-Avila G, Furth EE, Lei H, Muschel RJ, Stetler-Stevenson WG y Strauss III 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 MA, González-Avila G, Bermejo L, Iwata K y Strauss J. 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 R, Gravett MG y 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 Pathol* 2002;186:128-138.
- Vadillo-Ortega F, Estrada Gutiérrez G. Role of matrix metalloproteinases in preterm labor. *Brit J Gynecol Obstet* 2005;112:19-22.
- Wallon U M y Overall C M. The hemopexin-like domain (C domain) of human gelatinase A (matrix metalloproteinase-2) requires  $Ca^{2+}$  for fibronectin and heparin binding. Binding properties of recombinant gelatinase A C domain to extracellular matrix and basement membrane components. *J Biol Chem* 1997;272:7473-7481.
- Weingarten H and Feder J. Spectrophotometric assay for vertebrate collagenase. *Anal Biochem* 1985; 147: 437–440.
- Welsh AO y Enders AC. Chorioallantoic Placenta Formation in the rat. III. Granulated cells invade the uterine luminal epithelium at the time of epithelial cell death. *Biol Reprod* 1993;49:38-57.
- Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA y Goldberg GI. SV-40 Transformed human lung fibroblasts secrete a 92 kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J Biol Chem* 1989;264:17213-17221.
- Wilson CL y Matrisian LM. Matrilysin: an epithelial matrix metalloproteinase with potentially novel functions. *Int J Biochem Cell Biol* 1996;28:123-136.
- Woessner JF, Nagase H. MMP Sequences. En: *Matrix Metalloproteinases and TIMPs*. Oxford University Press, 2000, 1a Ed. 11-40.
- Xu P, Alfaidy N y Challis JRG. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in human placenta and fetal membranes in relation to preterm and term labor. *J. Clin Endocrinol* 2002;87:1353-1361.
- Yan L, Borregaard N, Kjeldsen L y Moses M A. The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/ B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of of MMP-9 activity by NGAL. *J Biol Chem* 2001;276:37258-37265.

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 deciduas at term and preterm delivery. *Placenta* 2002;23:288-293.

Zaga V, Estrada-Gutiérrez G, Beltrán-Montoya J, Maida-Claros R, López-Vancell R y Vadillo-Ortega F. Secretions of interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor  $\alpha$  By whole fetal membranes depend on initial interactions of amnion or choriodecidua with lipopolysaccharides or group B streptococci. *Biol Rep* 2004;71:1296-1302.

## **Apéndice de soluciones utilizadas.**

(A) Solución amortiguadora de Tris-calcio, pH 7.4

(mM): Trizma Base 50, CaCl<sub>2</sub> 20, NaCl 150 y azida de sodio 0.02%.

(B) Solución amortiguadora de Tris-EDTA, pH 7.4

(mM): Trizma Base 50, EDTA 40, NaCl 150 y azida de sodio 0.02%.

(C) Solución amortiguadora Tris, pH 7.4

(mM): Trizma Base 50, NaCl 150 y azida de sodio 0.02%.

(D) Solución amortiguadora de HEPES, pH 7.4

(mM): HEPES 50, 4,4'-ditiopiridina 1.0.

(E) Solución amortiguadora Tris-Malato, pH 7.4

(mM): Tris-Malato 20, NaCl 0.15

(F) Solución PBS-Tritón, pH 7.4

(mM): PBS 10, NaCl 100, KCl 3. Tritón X-100 0.1%

(G) Solución teñidora

0.25% de azul de Coomasie R-250 en ácido acético 10% y metanol al 45%

## ÍNDICE DE FÍGURAS.

Figura	Contenido	Página
1	Diagrama de las membranes fetales de la rata	12
2	Cambios estructurales de las membranas fetales de rata a lo largo de la gestación.	15
3	Dominios estructurales de las MMP	17
4	Colecta de muestras biológicas	26
5	Actividad enzimática de proteasas en LA y MCA a lo largo de la gestación.	36
6	Perfil de inhibición de proteasas en LA y MCA obtenidos en el día 21 de gestación.	37
7	Actividad gelatinolítica en LA y MCA a lo largo de la gestación, evaluada por la técnica del zimograma. (Activación con APMA)	39
8	Panorama obtenido por Zimografía, Western Blot y Northern Blot de las MMP presentes en el LA y MCA a lo largo de la gestación	42
9	Actividad enzimática evaluada por zimografía de extractos de MCA obtenidos doce horas antes del TP	43

10	Efecto del $Mg^{2+}$ , $Mn^{2+}$ y $Zn^{2+}$ en extractos de MCA I	44
11	Extractos de MCA tratados con EDTA	46
12	Western Blot de extractos de MCA tratados con EDTA	47
13	Cromatografía por filtración molecular (FPLC) de extractos de MCA en presencia y ausencia de calcio	49
14	Microcalorimetría Diferencial de Barrido de extractos de MCA en presencia y ausencia de calcio	50
15	Efecto de la concentración del calcio sobre la actividad enzimática.	53
16	Inmunohistoquímica de las MCA libres de células	55
17	Microscopía confocal realizada en las MCA libres de células	56