



la

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

**Mecanismos de Translocación Tisular de
Metaloproteasas de Matriz Extracelular en el
Corioamnios Humano Durante el Trabajo de Parto**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

L.N. MARISOL CASTILLO CASTREJÓN

DIRECTOR DE TESIS: DR. FELIPE VADILLO ORTEGA

MÉXICO, D.F.

MAYO 2008



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.

MIEMBROS DEL JURADO

PRESIDENTE: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO

VOCAL: DR. LUIS ARTURO BAIZA-GUTMAN

SECRETARIO: DR. FELIPE VADILLO ORTEGA

SUPLENTE: DRA. NOEMÍ MERAZ CRUZ

SUPLENTE: DR. JESÚS CHIMAL MONRROY

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, bajo la dirección del Dr. Felipe Vadillo Ortega.

Mis estudios de Maestría fueron posibles gracias al apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca No. 203418

Los grandes conocimientos engendran las grandes dudas.

Aristóteles

Agradezco al Dr. Felipe Vadillo Ortega por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por otorgarme el honor de crecer académica y profesionalmente y ser una guía en el camino de la ciencia.

Si he conseguido ver más lejos, es porque me he aupado en hombros de gigantes.

Isaac Newton

Mi especial agradecimiento a los miembros del Comité Académico quienes enriquecieron este trabajo con sus conocimientos, observaciones y puntos de vista.

Suficiente investigación respaldará cualquier teoría.

A mi esposo Manuel por apoyarme a realizar este sueño.

En las alegrías, festejamos.

En los momentos difíciles, me confortaste.

En las decisiones, me orientaste.

En los desvelos, me acompañaste.

En las horas de estudio, me esperaste.

Y en los momentos de trabajo, me alentaste.

Haz sido un pilar durante mi vida académica, pero no lo hubiera logrado sin esas palabras de tranquilidad y consuelo que me brindaste en los momentos más importantes de mi vida.

No tengo palabras para decirte lo feliz que soy cuando estoy contigo.

El amor verdadero hace milagros, porque él mismo es ya el mayor milagro.

Amado Nervo

A mis queridos padres Hilda y Juan José, a mi hermana Hilda y a mi hermano Juan Pablo, por haber apoyado mis ideas y actos desde el momento que nací. Han sido un sustento para mi desarrollo como persona integral y responsable.

Gracias por creer en mí.

No es la carne y la sangre, sino el corazón, lo que nos hace padres e hijos.

Friedrich von Schiller

A mis compañeros de laboratorio y amigos, quienes con su dedicación y conocimientos me ayudaron a llevar a cabo mis ideas. Gracias por hacer del trabajo un tiempo de placentero y productivo.

La amistad es la ciencia de los hombres libres.

Albert Camus

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	4
ÍNDICE DE FIGURAS	5
RESUMEN	7
ABSTRACT	9
INTRODUCCION	11
ANTECEDENTES	12
<i>Trabajo de Parto</i>	<i>12</i>
<i>Membranas corioamnióticas humanas</i>	<i>14</i>
<i>Componentes de la matriz extracelular de las membranas fetales</i>	<i>18</i>
Colágena	19
Elastina	19
Fibronectinas	20
Lamininas	21
<i>Ruptura de las membranas corioamnióticas</i>	<i>21</i>
<i>Metaloproteasas de matriz extracelular</i>	<i>23</i>
Gelatinasa B ó MMP-9	25
Estructura	26
Activación	26
Regulación	27
Métodos de detección	27
Funciones biológicas y fisiopatológicas de la MMP-9	28
Reproducción	28
<i>Transporte de moléculas</i>	<i>30</i>
JUSTIFICACIÓN	31
HIPÓTESIS	32
OBJETIVO GENERAL	32
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
METODOLOGÍA	33
Muestras Biológicas	33
Marcaje de MMP-9 y albúmina con isotiocianato de fluoresceína (FITC)	34
Modelo de cultivo de membranas corioamnióticas con MMP-9/FITC ó ALB/FITC	35
Extractos de membrana corioamniótica cultivada con MMP-9/FITC	36
Cultivo de amnios con MMP-9/FITC	37
Cultivo de amnios con tratamiento de tripsina/EDTA	38
RESULTADOS	39
DISCUSIÓN	57
ANEXOS	64

ABREVIATURAS

ALB	Albúmina humana
ALB/FITC	Albúmina humana conjugada con isotiocianato de fluoresceína
C/TP	Con trabajo de parto
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
DAPI	4-6 diamino-2-fenilindol (Marcaje fluorescente para DNA)
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfoxido
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HLA	Hidrolizado de lactoalbúmina
MCA	Membrana corioamniótica humana
MMPs	Metaloproteasas de matriz extracelular
MMP-9	Metaloproteasa de matriz extracelular 9
MM-9/FITC	MMP-9 conjugada con isotiocianato de fluoresceína
MT-MMPs	Metaloproteasas de matriz extracelular de tipo membrana
NGAL	Gelatinasa B de neutrófilos asociada a lipocalina
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PGDH	Prostaglandina deshidrogenasa
RNA	Acido ribonucleico
RNA _m	Mensajero del RNA
RPM	Ruptura prematura de membranas
RPMP	Ruptura prematura de membranas pretérmino
SDG	Semanas de gestación
S/TP	Sin trabajo de parto
SFB	Suero fetal bovino
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TIMPs	Inhibidores tisulares específicos de metaloproteasas de matriz extracelular
Tissue Tek [®]	Medio de inclusión para congelar tejidos

1. Diagrama para la obtención de explantes de MCA _____	64
2. Diagrama de cultivo de MCA con MMP-9/FITC ó ALB/FITC _____	64
REFERENCIAS _____	66
PUBLICACIONES CIENTÍFICAS Y CONGRESOS DERIVADOS DEL TRABAJO EXPERIMENTAL _____	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1

Modelo de maduración del útero y el cérvix desde el momento de la concepción hasta el trabajo de parto activo. _____ **13**

Figura 2

Micrografía electrónica de barrido de membranas corioamnióticas de término sin trabajo de parto. _____ **15**

Figura 3

Micrografía electrónica de barrido de amnios. _____ **16**

Figura 4

Micrografías electrónicas de barrido de fibras de colágena y su organización en las membranas corioamnióticas. _____ **17**

Figura 5

Representación esquemática de la estructura de las membranas corioamnióticas humanas de término. _____ **18**

Figura 6-A

Cinética de la translocación tisular de la *MMP-9* a través de la MCA sin trabajo de parto. Tiempos de incubación de 30 minutos y 1 hora. _____ **41**

Figura 6-B

Continuación de la cinética de la translocación tisular de la *MMP-9* a través de la MCA sin trabajo de parto. Tiempos de incubación de 2 horas, 3 horas y 6 horas. _____ **42**

Figura 6-C

Continuación de la cinética de la translocación tisular de la *MMP-9* a través de la MCA sin trabajo de parto. Tiempos de incubación de 12 horas y 24 horas. _____ **43**

Figura 7-A

Cinética de la translocación tisular de la albúmina a través de la MCA sin trabajo de parto. Tiempos de incubación 30 minutos y 1 hora _____ **44**

Figura 7-B

Continuación de la cinética de la translocación tisular de la *albúmina* a través de la MCA sin trabajo de parto. Tiempos de incubación 2 horas, 3 horas y 6 horas. _____ **45**

Figura 7-C

Continuación de la cinética de la translocación tisular de la *albúmina* a través de la MCA sin trabajo de parto. Tiempo de incubación 12 horas y 24 horas. _____ **46**

Figura 8

Translocación tisular de la *MMP-9* en MCA *sin* trabajo de parto incubada por *24 horas*. _____ **47**

Figura 9

Translocación tisular de la *MMP-9* en MCA *con* trabajo de parto incubada por *24 horas*. _____ **48**

Figura 10

Análisis de la MCA *con* trabajo incubada por *24 horas* con *MMP-9/FITC*. _____ **49**

Figura 11

Localización de la *MMP-9* en el epitelio amniótico proveniente de MCA con trabajo de parto. _____ **50**

Figura 12

Identificación de *MMP-9/FITC* en extractos proteicos de *corion* de MCA con trabajo de parto. _____ **51**

Figura 13

Cinética del paso de la *MMP-9* hacia en interior del epitelio amniótico proveniente de MCA sin trabajo de parto. _____ **53**

Figura 14

Inhibición con tripsina/EDTA de la incorporación de *MMP-9* en el amnios después de *3 horas* de cultivo. _____ **55**

Figura 15

Inhibición con tripsina/EDTA de la incorporación de *MMP-9* en el amnios después de *6 horas* de cultivo. _____ **56**

Figura 16

Modelo propuesto de translocación tisular de la *MMP-9* en las membranas corioamnióticas humanas. _____ **62**

RESUMEN

El trabajo de parto humano es un proceso fisiológico que se caracteriza por contracciones uterinas sincronizadas con la dilatación del cérvix y la ruptura de las membranas corioamnióticas (MCA). Las MCA ó membranas fetales son tejidos extraembrionarios que tienen como función la secreción de sustancias al líquido amniótico y al útero, contener al feto y proteger a este del ambiente extrauterino a lo largo de la gestación. Las MCA son tejidos multilaminares integrados por dos capas principales: el amnios y el corion. La capa compacta del amnios está compuesta exclusivamente por un arreglo de fibras de colágena y es el principal esqueleto del amnios, ya que en esta zona reside la mayor fuerza tensil mecánica durante la gestación. El debilitamiento estructural de estos tejidos está mediado por la familia de las metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs). La metaloproteasa más implicada en la ruptura de las MCA durante el trabajo de parto es la MMP-9, la cual se ha reportado que es capaz de degradar colágena tipo IV, uno de los principales componentes de la matriz extracelular de dichos tejidos. La MMP-9 es sintetizada por diferentes tipos celulares que en su mayoría se localizan en el corion, el lado opuesto a la capa compacta del amnios. Es esperado que exista un mecanismo de tránsito transmembranal para que la MMP-9 cruce desde el corion hasta las capas del amnios ricas en tejido conectivo. Por lo dicho antes, el objetivo de este trabajo fue el identificar y analizar el paso intratisular de la MMP-9 en el corioamnios humano emulando *in vitro* las condiciones del trabajo de parto.

Se obtuvieron MCA de mujeres con trabajo de parto a término y de mujeres sujetas a cesárea sin trabajo de parto. Se realizaron explantes de las MCA de ambos grupos y se cocultivaron a diferentes tiempos con MMP-9 recombinante humana conjugada con FITC y se analizaron por microscopía confocal. Se utilizó albúmina/FITC como un control negativo. Posterior al cocultivo, se realizaron extractos de estos tejidos para comprobar la presencia de la MMP-9/FITC mediante electroforesis en

geles de poliacrilamida. Finalmente se comprobó la participación de estructuras de superficie celular del epitelio amniótico en el almacenamiento de la MMP-9/FITC mediante el uso de tripsina/EDTA por diferentes tiempos.

La MMP-9/FITC que se adicionó del lado del corion de las MCA, se incorporó gradualmente desde el corion hasta llegar al amnios conforme aumentaba el tiempo de incubación. Se observó reactividad de la MMP-9/FITC desde la primera hora de cultivo y la mayor incorporación de esta proteína fue a las 24 horas de cultivo, en ambos grupos de MCA. En las MCA provenientes de mujeres con trabajo de parto se observó mayor incorporación de MMP-9/FITC en comparación con las MCA provenientes de mujeres sin trabajo de parto. Se observó a la MMP-9 en el ambiente citoplasmático del epitelio amniótico. En el caso de la albúmina/FITC no se observó en el amnios en ningún tipo de MCA. La electroforesis de los extractos de amnios y corion, mostró que la MMP-9/FITC está presente en ambos tejidos en forma de homodímero. Al parecer el paso de la MMP-9/FITC al interior de la célula amniótica es mediado por estructuras de superficie celular, ya que el tratamiento dado al tejido amniótico con tripsina/EDTA disminuyó la incorporación de la proteasa.

Los hallazgos obtenidos en este estudio nos permiten proponer que la MMP-9 atraviesa específicamente a través de los diferentes estratos de las MCA. Este evento se favorece en los tejidos provenientes de mujeres con trabajo de parto. Asimismo, la MMP-9 que pasó el tejido fetal es capaz de almacenarse en el citoplasma del epitelio amniótico. Al parecer este mecanismo de almacenamiento está mediado por estructuras de superficie celular del amniocito. Tanto el paso selectivo como el almacenamiento de la MMP-9 en el tejido amniótico, son eventos que podrían estar participando en la degradación de la matriz extracelular de la MCA, permitiendo así la ruptura de estos tejidos durante el trabajo de parto.

ABSTRACT

Human parturition is a complex physiological process that is characterized by uterine contractions, cervix dilatation and the rupture of fetal membranes. Fetal membranes are extraembryonic tissues that retain amniotic fluid, secrete substances to amniotic fluid and towards the uterus and protect the fetus from the extrauterine environment during gestation. Fetal membranes are multilayered tissues formed by two principal layers: the amnion and the chorion. The compact layer of the amnion is composed principally of an exclusive arrangement of collagen fibers, this is the area where the mechanical and tensile strength resides during gestation. Structural weakening of fetal membranes is mediated by matrix metalloproteinases (MMPs), a family of calcium-dependent zinc-containing endopeptidases; which are responsible for tissue remodeling and degradation of the extracellular matrix (ECM).

The MMP-9 is the main metalloproteinase associated to the rupture of fetal membranes at the onset of labor. This protease can degrade type IV collagen fibers, one of the principal components of the ECM of fetal membranes. MMP-9 is synthesized by different types of cells majorly localized in the chorion, that is located in the opposite side of the compact layer of the amnion where the principal substrate is present. So, it is expected that a mechanism for the tissue traffic of MMP-9 to cross from the chorion to the rich connective tissue layers of the amnion exists. The objective of this study was to identify and analyze the transmembranal transit of MMP-9 in amniochorion, emulating *in vitro* labor conditions.

Non infected fetal membranes were obtained from two groups of women: 1) term with labor, and 2) term without labor. Membranes were mounted in an *in vitro* model, with the chorion facing the upper chamber and the amnion towards the lower chamber. MMP-9 conjugated with fluorescein (FITC) was

added on the chorion layer and incubated during different periods. Albumin conjugated with FITC was used as a negative control. Frozen sections were obtained and analyzed by confocal microscopy. We made tissue extracts to demonstrate the presence of MMP-9/FITC using polyacrylamide gel electrophoresis with SDS (PAGE). Finally we evaluate the participation of structures of the membrane of the amniotic epithelium in the intracellular transport of MMP-9.

The MMP-9/FITC added on the chorion of fetal membranes was gradually incorporated into the membranes, reaching the amnion. We observed MMP-9/FITC in the amnion from the first hour of incubation. However, it was after 24 hours of incubation when we observed maximum incorporation of labeled MMP-9 in this layer. Traffic of MMP-9/FITC to the amnion appears to be higher in fetal membranes with labor than in membranes without labor. We also observed that MMP-9 was localized in the cytoplasm of the amnion epithelial cells. The albumin/FITC had no transit in any case of fetal membranes. The SDS PAGE showed that MMP-9/FITC is present in both layers in a high molecular weight form. The treatment with trypsin to the amniotic cells abolished the transport of MMP-9. Apparently, the storage of MMP-9 is mediated by cellular structures of the cellular membrane.

The findings of this work let us to propose that the MMP-9 is trafficked through fetal membranes. Likewise, the MMP-9 can be stored inside amnion epithelial cells and it seems that a specific transporter is involved in this process. The selective transit and storage of MMP-9 in the amnion, are events that can be participating in the extracellular matrix degradation leading to the rupture of fetal membranes during labor at term of gestation.

INTRODUCCION

El trabajo de parto es un proceso fisiológico complejo que está definido por la sincronización de las contracciones uterinas, la dilatación del cérvix y la ruptura de las membranas fetales que se inducen por eventos de señalización autocrinos/paracrinos que parecen ser específicos de la especie humana. Sin embargo, estos procesos son aún poco comprendido y por ello es necesario conocer los cambios sistémicos y la sincronización de éstos para producir cambios locales que limitan el tiempo de gestación y dan origen al nacimiento humano.

Nuestro grupo de trabajo ha enfocado su interés en caracterizar los diferentes mecanismos fisiológicos que se llevan a cabo durante el final de la gestación, con el fin de comprender los procesos patológicos que se manifiestan en el periodo gestacional. Los sucesos patológicos como el parto pretérmino, la ruptura prematura de membranas (RPM) y son las principales causas de mortalidad neonatal y han sido un tema de estudio por diversos grupos de investigación a nivel mundial. Los mecanismos que están involucrados en la ruptura espontánea de las membranas fetales posterior al trabajo de parto y a la ruptura de membranas en condiciones patológicas tampoco han sido definidos en su totalidad. La identificación de los posibles mecanismos que provocan la ruptura de las MCA en condiciones fisiológicas del trabajo de parto ayudará a entender los cambios asociados a condiciones no fisiológicas y sus consecuencias clínicas.

ANTECEDENTES

Trabajo de Parto

A lo largo del embarazo humano el útero se mantiene relativamente sin actividad contráctil y el cérvix permanece rígido y cerrado. Al término de la gestación, cuando el feto está totalmente desarrollado, el cérvix se dilata, el útero se contrae y las membranas fetales se rompen dando como resultado la expulsión del feto (Bryant-Greenwood y Millar, 2000; Garfield y Maner, 2007). A este proceso fisiológico se le denomina trabajo de parto y se logra por una serie de eventos de señalización autócrino/parácrino que afectan el ambiente uterino. Se considera un embarazo de término cuando el trabajo de parto sucede entre las 37-40 semanas de gestación.

El trabajo de parto se compone de dos fases principales (*Figura 1*): la preparatoria que es relativamente larga (meses); seguida de la segunda que es corta (horas) y que se denomina fase activa. Entre ellas existe una fase intermedia, la cual tiene una duración de días (Garfield y Maner, 2007).

En tanto el embarazo avanza, el útero brinda al feto el espacio suficiente para su crecimiento y ofrece soporte a las MCA las cuales se alinean completamente con éste a la mitad del embarazo. Sin embargo, en la etapa final del embarazo (fase preparatoria) el crecimiento uterino cesa y se incrementa la tensión de las paredes de éste, iniciando la señalización necesaria para el trabajo de parto activo. Durante la fase activa del trabajo de parto el útero deja de ser un tejido con baja conectividad y cambia a ser un sincicio. Estas conexiones intercelulares se dan por dos diferentes vías: la formación de poros mediados por proteínas denominadas conexinas

La conectividad física y bioquímica permite la despolarización individual del miocito y posteriormente de las células vecinas; generando una cascada extensiva de despolarización y contracción sincronizada que cubre grandes áreas del útero. Este fenómeno causa aumento en la presión intrauterina y en conjunto con la progresiva dilatación del cérvix y la ruptura de las MCA se induce la expulsión del feto al término de la gestación (Smith R, 2007).

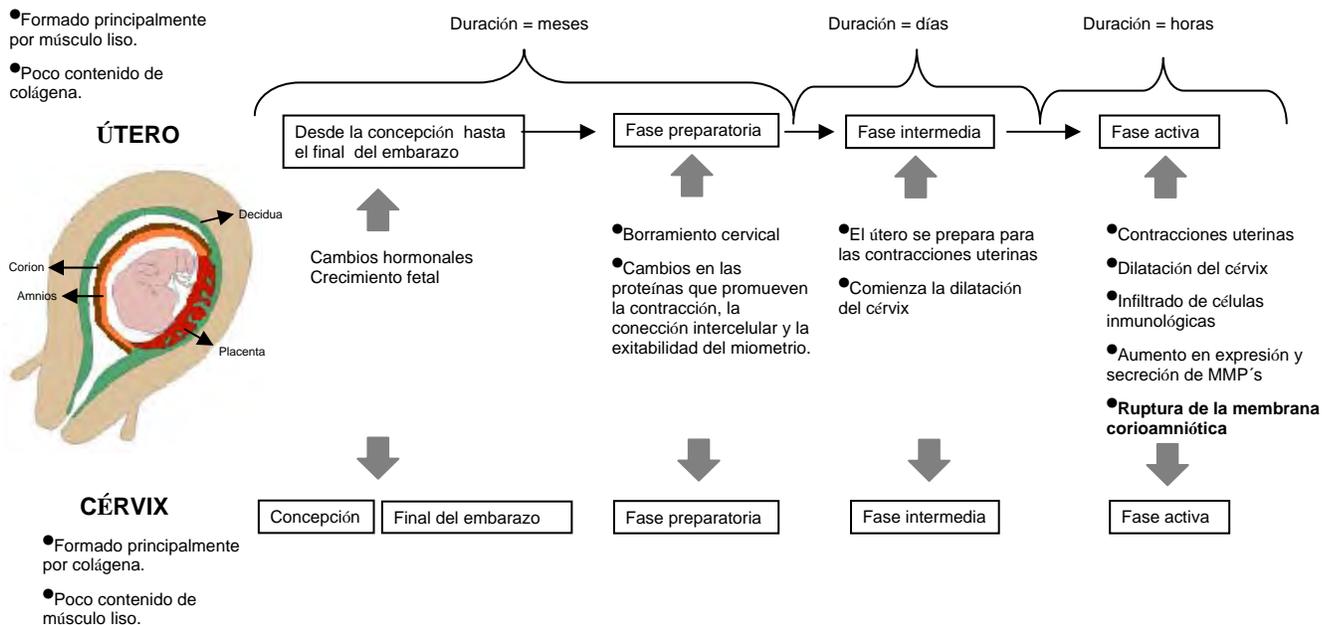


Figura 1. Modelo de maduración del útero y el cérvix desde el momento de la concepción hasta el trabajo de parto activo. Modificado de: Garfield y Maner, 2007.

Un componente crítico para la expulsión del feto es la dilatación del cérvix. El cérvix está formado principalmente de fibras de colágena, las cuales le brindan la estructura necesaria para permanecer cerrado durante el embarazo. El trabajo de parto está asociado al arribo de un infiltrado de células inmunológicas al cérvix y a la secreción de metaloproteasas de matriz extracelular, alterando su estructura y provocando su dilatación.

Membranas corioamnióticas humanas

Las membranas fetales ó membranas corioamnióticas son tejidos extra embrionarios, accesorios, los cuales son genéticamente idénticos al feto. Tienen un tiempo de vida limitado ya que sólo están presentes hasta que el feto se desarrolla en su totalidad hasta convertirse en un individuo funcional (Bryant-Greenwood, 1998). Durante el embarazo existe la necesidad que las membranas fetales sean lo suficientemente fuertes y elásticas para soportar el estiramiento del doble de su tamaño original, simultáneamente resistir el peso y los movimientos fetales vigorosos principalmente al término del embarazo. Por esta razón, la estructura de las MCA es especializada e importante para la gestación humana.

Las membranas corioamnióticas tienen diversas funciones, tales como: contener el líquido amniótico, secreción de sustancias dirigidas al líquido amniótico y al útero; y proteger al feto del ambiente extrauterino. Estos tejidos son multilaminares, integrados por dos principales capas: el amnios y el corion (*Figura 2*). El corion se forma del blastocisto implantado en el polo que apunta hacia la cavidad endometrial. El amnios se forma separadamente del componente epitelial y mesenquimal; que al fusionarse con el mesodermo del corion forman el corioamnios.

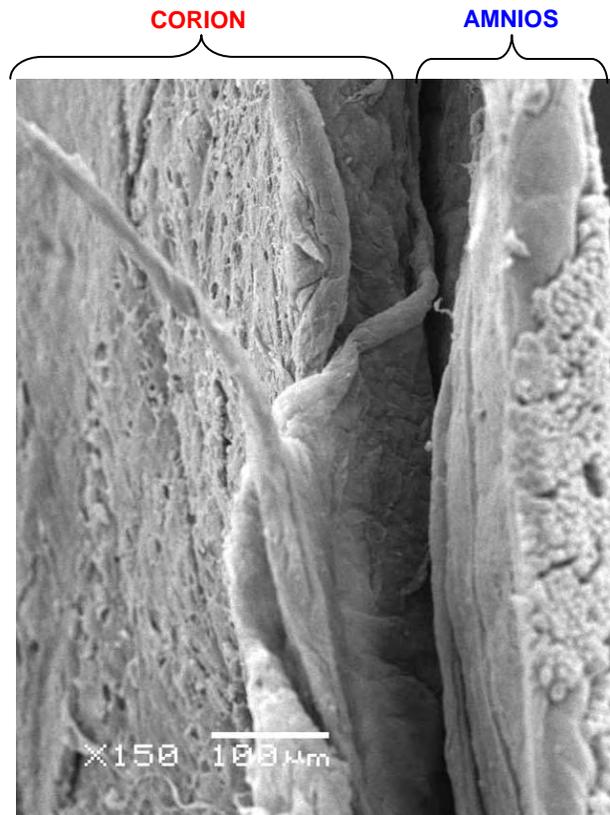


Figura 2. Micrografía electrónica de barrido de membrana corioamniótica, de término sin trabajo de parto. Se observa el corion (izquierda) y el amnios (derecha). Aumento 150X

El amnios es la capa interna que está en contacto con el líquido amniótico y el corion es la parte externa que está en contacto con la decidua materna. Las MCA están constituidas por células epiteliales, mesenquimales y citotrofoblásticas, embebidas en una matriz extracelular rica en agua y colágena (Xu y col, 2002; Lei y col, 1999; Parry y Straus, 1998). Los tipos de colágena más abundantes en esta matriz son: I, III, IV, V y VI. Sin embargo, se sabe que el tejido que brinda soporte está compuesto por fibras de colágena tipo I y III, que están estabilizadas por una red de colágena tipo IV, V y VI (Vadillo-Ortega y Estrada-Gutiérrez, 2005).

A su vez, el amnios está formado por cinco capas histológicas: el epitelio amniótico, la membrana basal, la capa compacta, la capa de fibroblastos y la zona esponjosa. El amnios no contiene vasos sanguíneos y no está inervado; por lo que los nutrimentos que se requieren provienen del líquido

amniótico (Parry y Straus, 1998). El *epitelio* amniótico, secreta colágena tipo III, IV y glicoproteínas que dan lugar a la *membrana basal* (Figura 3).

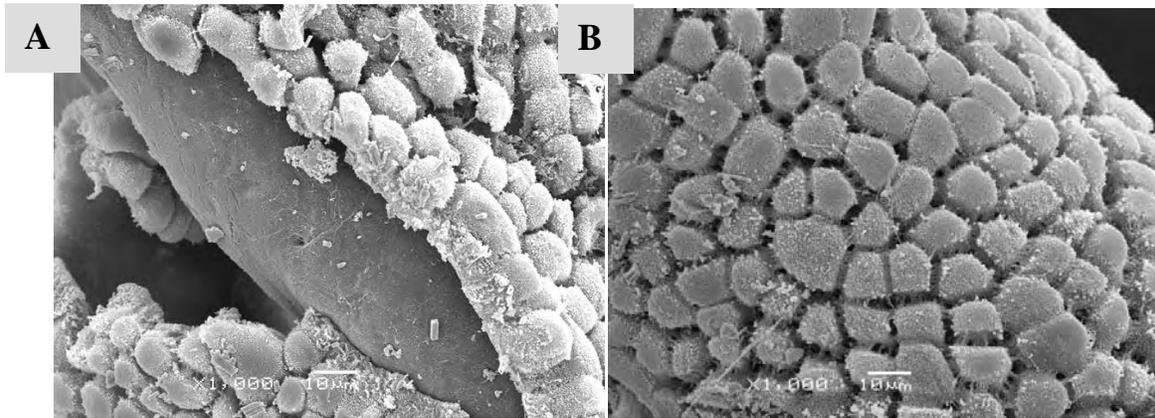


Figura 3. Micrografía electrónica de barrido de amnios.

A. Se observa la membrana basal y el epitelio amniótico. **B.** Epitelio amniótico. Se puede observar conexiones entre amniocitos las cuales pueden tener un papel importante en el intercambio de moléculas. Aumento 1000X

El tejido adyacente a la membrana basal se denomina *capa compacta*, la cual está compuesta exclusivamente por un arreglo de fibras de colágena y es el principal esqueleto del amnios; ya que en esta zona reside la mayor fuerza tensil y mecánica durante el embarazo. El arreglo de éste tejido está dado por las colágenas de tipo I y III, que forman uniones paralelas que mantienen la integridad mecánica del amnios. La colágena tipo V y VI forman uniones entre la colágena I y III y la membrana basal del epitelio amniótico; lo que proporciona mayor fuerza a las membranas corioamnióticas necesaria para soportar el crecimiento y el movimiento fetal durante la gestación (Figura 4) (Bryant-Greenwood, 1998; Vadillo-Ortega y Estrada-Gutiérrez, 2005).

Adosada a la capa compacta existe una capa de *fibroblastos*, la cual consiste en células mesenquimales y macrófagos embebidos en la matriz extracelular. La colágena en ésta zona conforma una estructura de red laxa asociada a glicoproteínas.

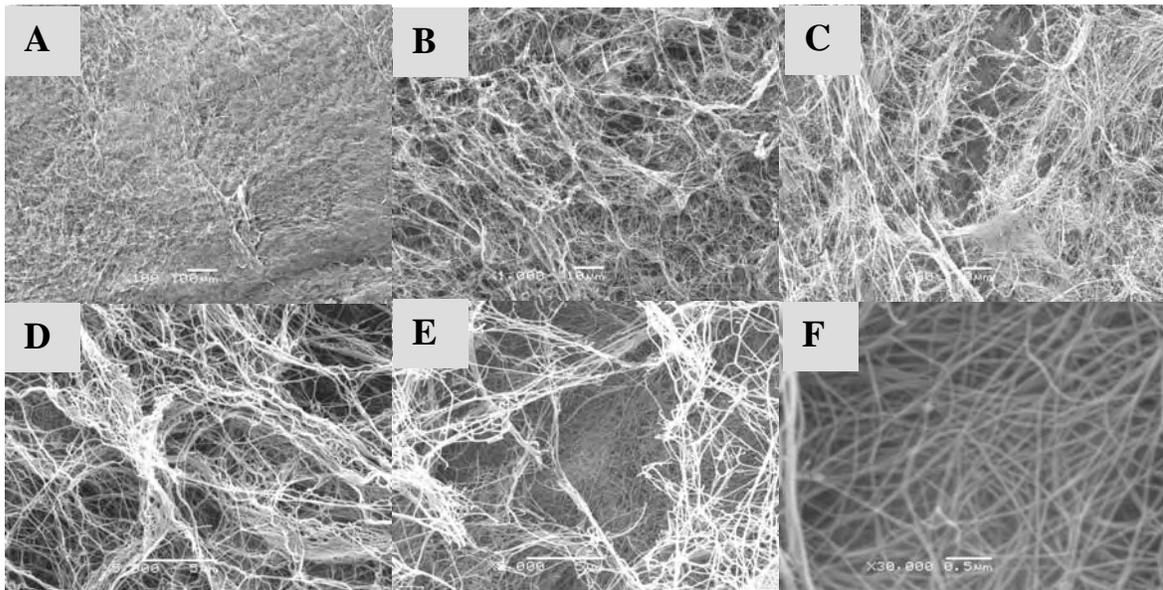


Figura 4. Micrografías electrónicas de barrido de fibras de colágena y su organización en las membranas corioamnióticas. Se observa la estructura de las fibras de colágena del amnios que está adosado al corion. A partir del corion estas fibras de colágena se arreglan de tal manera que ya en el amnios muestran una estructura compactada.

Aumentos: **A.** 100X, **B y C.** 1000X, **D y E.** 5000X, **F.** 30000X

En contacto con el corion, se localiza la *zona intermedia o zona esponjosa*, la cual se denomina de tal manera por su contenido abundante de proteoglicanos hidratados, glicoproteínas y colágena tipo III. Esta capa tiene como función absorber el estrés físico permitiendo que el amnios se deslice sobre el corion.

El corion se asemeja a una membrana epitelial que está compuesta por una membrana basal y de tejido conectivo rico en colágena (Parry y Straus, 1998) (Figura 5). El corion se sobrepone al tejido decidual, el cual es una zona compuesta por células deciduales, leucocitos infiltrados, trofoblastos y vasos sanguíneos (Kaerns y Lala, 1985) embebidos en una matriz extracelular. El corion tiene una función protectora frente al rechazo inmunológico del feto, así como también de síntesis de moléculas como hormonas, prostaglandinas y oxitocina entre otras (Germain y col, 1994). La decidua humana es una mezcla de células maternas de diferentes orígenes y abundante matriz extracelular. El punto de contacto entre el citotrofoblasto y la decidua materna es una región importante donde se mantiene una barrera inmunológica durante el embarazo.

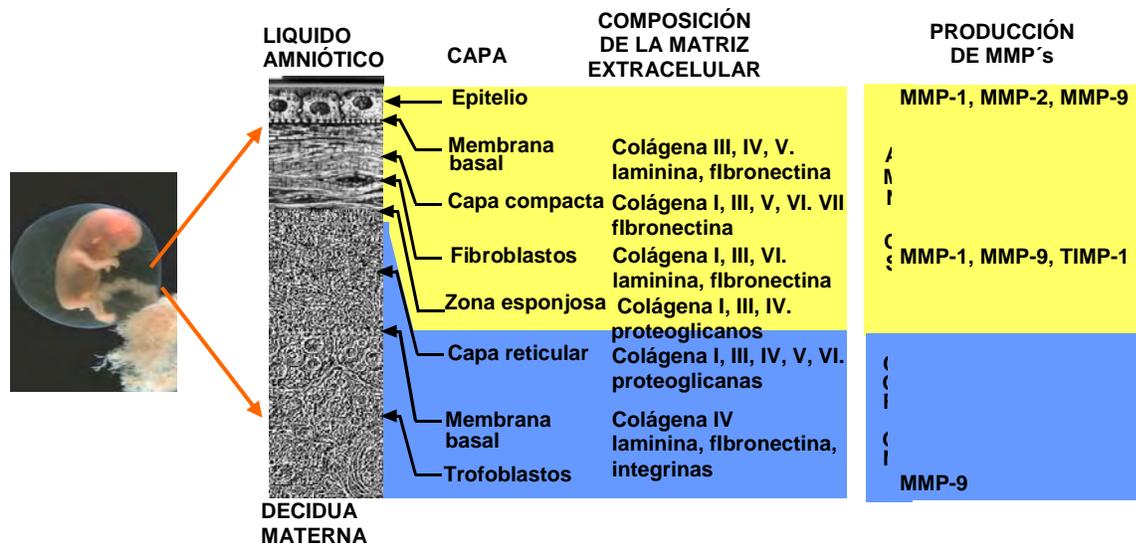


Figura 5. Representación esquemática de la estructura de las membranas corioamnióticas (MCA) humanas de término. Modificado de: Parry y Strauss, 1998

Componentes de la matriz extracelular de las membranas fetales

Los componentes de la matriz extracelular son responsables de las propiedades biomecánicas del tejido, también son elementos de señalización que permiten responder a las necesidades cambiantes del tejido. Los principales componentes de la matriz extracelular de las MCA son: la colágena, la elastina, la laminina y la fibronectina. La distensión mecánica puede resultar en cambios de la respuesta autócrina/parácrina de la matriz extracelular. En la situación homeostática normal, existe una ruptura continua y regeneración de componentes de la matriz extracelular. Previo al parto, la matriz extracelular puede responder a la distensión uterina y al estiramiento de las MCA con una pérdida coordinada de las interacciones célula/matriz y perder estructura (Reyna-Villasmil y col, 2003). La pérdida de la estructura de la matriz extracelular durante el trabajo de parto puede repercutir en un incremento en la apoptosis de las células del epitelio amniótico.

Colágena

Se reconocen por lo menos 27 tipos de colágena genéticamente distintos que están codificados en al menos 30 genes formando una familia especializada de glicoproteínas estructurales. La colágena es el principal componente estructural de las MCA. La mayor fuerza tensil de dichas membranas es provista por las colágenas intersticiales tipo I y III, en conjunto con pequeñas cantidades de colágena tipo V, VI y VII en la capa compacta del amnios. Estos escasos componentes en la región compacta son importantes para el reforzamiento debido a que los tipos V y VI forman fibrillas heterotípicas con la colágena tipo I y III. La membrana basal clásica está conformada por colágena tipo IV, la cual sirve de base para el ensamblaje de otros componentes de la membrana basal como lo son la laminina y el proteoglicano heparan sulfato. La colágena tipo V es considerada como la colágena fibrilar menor, sin embargo, su distribución en la vecindad inmediata a la membrana basal amniótica sugiere que tiene funciones de anclaje (Malak y col, 1993).

Aunque la colágena tipo IV esta asociada con las membranas basales, se ha sugerido que este tipo de colágena puede tener un papel en el desarrollo y mantenimiento de la estructura de la matriz.

Elastina

Las MCA han sido descritas como tejidos que contienen componentes elásticos que recobran su estructura original cuando son sometidos al estiramiento; y componentes no elásticos los cuales pierden su estructura con el estrés. La elastina es un componente amorfo de las fibras elásticas, la cual se organiza a partir de proteínas precursoras colectivamente denominadas tropoelastina. Estudios muestran que la decidua, el corion y el amnios expresan el RNAm para la tropoelastina. Sin embargo, la elastina que se ha localizado en las MCA es de menor el tamaño en comparación de las fibras de elastina clásicas localizadas en otros tejidos (Hieber y col, 1997).

La presencia de fibras delgadas de elastina en las membranas fetales sugiere que existe alguna limitación para la formación de fibras de elastina de mayor grosor, lo que puede brindar suficiente elasticidad a la membrana sin ser un obstáculo para la ruptura fisiológica de éstas al término del embarazo.

Fibronectinas

Las fibronectinas son glicoproteínas sintetizadas por una gran variedad de tipos celulares los cuales dirigen su organización subsiguiente en las fibrillas de la matriz extracelular. Esta familia de glucoproteínas son el producto de un solo gene que puede sufrir splicing alternativo y dar origen a 20 tipos diferentes de fibronectina humana. Las fibronectinas tienen múltiples dominios de unión a células, así como a otros componentes que estabilizan a la matriz extracelular.

La molécula de fibronectina es compleja, cada cadena forma dímeros de 250 kDa y polímeros asociados a la superficie celular. La fibronectina tiene un dominio de unión a la colágena, que se une preferentemente a la colágena desnaturalizada pero sobretodo a colágena tipo I. La fibronectina en las membranas corioamnióticas es de tipo onco-fetal, una forma glucosilada única. La fibronectina onco fetal es una proteína de matriz extracelular que corresponde a una isoforma de la fibronectina sérica, pero que es expresada solamente en tejidos fetales y por algunos tipos de células neoplásicas (Vadillo y col, 2002). Estudios de inmunolocalización muestran que su distribución es generalizada en la matriz extracelular de las membranas fetales, desde la decidua hasta el amnios (Lockwood y col, 1991). La activación decidual hacia el final del embarazo puede involucrar la pérdida de contacto entre la fibronectina y las células. Durante el trabajo de parto hay una separación entre la decidua y el corion en el segmento bajo del útero. Esta separación puede ser el resultado de la disociación entre la fibronectina a sus receptores y a proteínas extracelulares; por tanto la fibronectina libre es detectable en secreciones cervicales y vaginales. Es por esta razón que en la actualidad se utiliza a la

fibronectina como un marcador clínico del inicio del trabajo de parto a término o pretérmino (Malak y col, 1996).

Lamininas

Las lamininas son el mayor componente de las membranas basales y se forman por varias subunidades acopladas por puentes disulfuro. Las lamininas son el producto de varios genes similares pero diferentes los cuales producen siete diferentes isoformas que van a interactuar con las células mediante el reconocimiento de secuencias específicas y de receptores tipo integrinas (Yamada, 1991). La laminina ancla a las células a la membrana basal, así como también ancla la membrana basal del epitelio amniótico al tejido adyacente a través de la colágena tipo VII (Champlaud y col, 1996). La laminina en sus diferentes variantes, tiene como principal función fortalecer al amnios.

Ruptura de las membranas corioamnióticas

El amnios y el corion son tejidos fetales con alto contenido de tejido conectivo, que proveen la fuerza para mantener al feto a lo largo del embarazo (Bell y Malak, 1997). Durante la fase tardía del trabajo de parto normal se da la ruptura de las MCA que generalmente coincide con la dilatación avanzada del cuello uterino. Cuando la ruptura de las MCA está disociada del trabajo de parto se define como ruptura prematura de membranas (RPM) y si ésta sucede antes de la semana 37 de gestación se denomina ruptura prematura de membranas pretérmino (RPMP) (Vadillo-Ortega y Col, 1994). La RPM y la RPMP son la primera causa de parto pretérmino y de mortalidad en neonatos (Vadillo-Ortega y Estrada-Gutiérrez, 2005). Del 8% al 10% de las mujeres con embarazo de término

(>37sdg) presentan RPM. Sin embargo, la RPMP ocurre aproximadamente en el 1% de todos los embarazos y está asociada en un 30%-40% con el nacimiento pretérmino (Parry y Straus, 1998).

Tradicionalmente se ha descrito que la ruptura de las MCA se debe al estrés físico, particularmente durante el trabajo de parto. Sin embargo, las evidencias sugieren que la ruptura de las membranas está relacionada a cambios bioquímicos, como la degradación de la matriz extracelular y del tejido conectivo tanto del amnios como del corion; y a la muerte celular programada de las células embebidas en este tejido fetal.

El mantenimiento de la fuerza tensil de las MCA implica que haya un equilibrio entre la síntesis y la degradación de los componentes de la matriz extracelular. Se ha propuesto que los cambios en el contenido de colágena, alteraciones en su estructura y un incremento de la actividad colagenolítica, están asociados con la ruptura de estos tejidos durante el trabajo de parto (Parry y Straus, 1998).

Se ha postulado que las MCA y la decidua responden a estímulos sintetizando mediadores como citocinas, prostaglandinas, hormonas y metaloproteasas de matriz extracelular que van a dirigir la degradación de la matriz extracelular de las membranas corioamnióticas favoreciendo su ruptura durante el trabajo de parto y el nacimiento.

El modelo hipotético de la ruptura fisiológica de las MCA involucra la inducción, la expresión, la secreción y la activación de las MMPs por células infiltradas y locales, lo cual está sincronizado con cambios cervicales y del miometrio. Actualmente, el mecanismo propuesto para explicar la ruptura de estos tejidos consiste en el ataque enzimático a las capas histológicas ricas en tejido conectivo, en específico a la capa compacta y a la capa esponjosa del amnios, que en conjunto soportan el 75% de la fuerza tensil de las membranas durante el embarazo. Llevando a la pérdida de la estructura, a la

disminución de su resistencia mecánica y finalmente a la ruptura de las membranas corioamnióticas tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Vadillo Ortega, 1995). Sin embargo, la secuencia de eventos que tienen como resultado la degradación de la matriz extracelular y la consecuente ruptura de las membranas corioamnióticas no se ha definido totalmente.

Metaloproteasas de matriz extracelular

La degradación de la matriz extracelular es importante en el desarrollo, la morfogénesis, reparación y remodelación tisular. En condiciones fisiológicas la degradación tisular es finamente regulada; sin embargo, en condiciones patológicas esta regulación se ve afectada causando enfermedades como la artritis, nefritis, encefalomiелitis, úlceras, fibrosis, entre otras.

La remodelación descontrolada de la matriz extracelular del miocardio y de las vías sanguíneas causa por ejemplo aterosclerosis, estenosis, hipertrofia ventricular izquierda, falla cardíaca y aneurisma. Diferentes tipos de proteasas están implicadas en la degradación de la matriz extracelular; las principales son las metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs) ó también denominadas matrixinas (Nagase y col, 2006).

La degradación del tejido conectivo de las MCA está mediada por las metaloproteasas de matriz extracelular, una familia de enzimas dependientes de zinc y calcio, que tienen afinidad por diferentes sustratos de la matriz extracelular, tales como la colágena, la elastina, la fibronectina, la laminina y otros componentes que forman esta matriz.

Con excepción de la MMP-11, la mayoría de los miembros de esta familia son secretados como proenzimas, con una región de propéptido que tiene que ser catalizado para que la enzima ejerza su función.

La familia de las MMPs se caracteriza por la presencia de dominios proteicos conservados: péptido señal cuya función es dirigir a la proteína hacia el lumen del retículo endoplásmico para ser exportada por la célula; el propéptido, de aproximadamente 100 residuos que puede ser catalizado durante el proceso de activación; el dominio catalítico que contiene el sitio activo que permite la unión a un ión de Zn^{2+} a través de tres residuos de histidina y una molécula de agua (Woessner y Nagase, 2000). Todas las MMPs, con excepción de la MMP-7 y la MMP-26, contienen un dominio tipo hemopexina.

Las MMPs pueden variar por su peso molecular, estructura, afinidad a diferentes sustratos y por los mecanismos de regulación. Al menos 20 miembros de la familia de las MMPs han sido reportados y por su afinidad a diferentes sustratos se clasifican en:

1. colagenasas intersticiales (MMP-1,-8,-13 y -18);
2. gelatinasas A y B (MMP-2 y -9);
3. estromelinas (MMP-3, -10 y -11);
4. matrilisina o MMP-7; y
5. metaloproteasas de matriz extracelular de tipo membrana (MT-MMPs) (MMP-14, -15, -16 y -17).

Son sintetizadas por diferentes tipos celulares tales como los fibroblastos, el endotelio, las células epiteliales y las células inmunes como los macrófagos, los eosinófilos, los neutrófilos y los mastocitos.

La actividad de las MMPs está regulada a nivel de la transcripción, activación de las proenzimas por un proceso post-transcripcional y su inhibición en el espacio extracelular. Estas enzimas pueden regular la homeostasis de diferentes tejidos por medio de los inhibidores tisulares específicos de

metaloproteasas (TIMPs). Los TIMPs son glicoproteínas estables con un peso molecular relativamente bajo (20-30 kDa) que contienen seis puentes disulfuro conservados. El mantener la estructura y la fuerza tensil de las membranas corioamnióticas implica que haya un equilibrio entre la síntesis y la degradación de los componentes de la matriz extracelular, por lo que es necesario que exista un equilibrio entre MMPs/TIMPs. Un desequilibrio entre MMPs y TIMPs puede llevar a una serie de estados patológicos como metástasis en el cáncer, esclerosis múltiple, artritis reumatoide entre otros (Nakatani y col, 2006). En el caso de las membranas fetales un desequilibrio entre proteasas e inhibidores podría tener como consecuencia la ruptura de membranas, ya sea en condiciones fisiológicas o bien patológicas.

Estos inhibidores forman un complejo estequiométrico que impide la actividad proteolítica mediante la unión al dominio catalítico de las MMPs. Se han identificado al menos cuatro miembros de esta familia (TIMP-1,-2,-3,-4). TIMP-1 y -2 presentan un patrón de expresión inducible, mientras que TIMP-3 tiene un patrón constitutivo y el de TIMP-4 aún es poco claro.

Gelatinasa B ó MMP-9

La gelatinasa B (92kDa) ó también conocida como MMP-9, es sintetizada por un grupo selecto de células como los son los queratinocitos, monocitos, macrófagos, polimorfonucleares, células NK y por una amplia variedad de células malignas. La secreción de MMP-9 puede ser inducida por factores de crecimiento, factores tumorales, producto de oncogenes, productos virales, ésteres de forbol, citocinas y por moléculas fisiológicas como iones de metales y hormonas. La combinación de dos inductores como las citocinas y/o factores de crecimiento pueden estimular o inhibir la expresión de MMP-9 en un microambiente específico.

Por otro lado, la expresión de MMP-9 también puede ser modulada por interacciones célula-célula. Por ejemplo, las células T activadas son capaces de inducir la expresión de MMP-9 en monocitos y mastocitos mediante el contacto intercelular (Lacraz y col, 1994; Malik y col, 1996). Debido a que las gelatinasas tienen un papel importante en la degradación de la matriz extracelular, el contacto de las células con la matriz extracelular va a ser un punto clave para la expresión de estas enzimas.

Estructura

La MMP-9, es el miembro más complejo estructuralmente en comparación con otras MMPs. Su gene se localiza en el cromosoma 20 q12-13 del mapa génico humano. Además de los dominios conservados en la familia de las MMPs, la MMP-9 y la MMP-2 (gelatinasa A) tienen un dominio de fibronectina compuesto por tres repetidos insertados entre el sitio activo y el sitio de unión a Zn^{2+} . Los repetidos de fibronectina en la familia de las gelatinasas tienen como función la unión a gelatinas, laminina y colágena de tipo I y IV (Allan y col, 1995). La MMP-9 tiene un dominio extra de unión a colágena tipo V. El dominio tipo hemopexina en la MMP-9 es el responsable de la unión de los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs).

El estado de activación en el que se encuentra la MMP-9 es trascendente, cuando la MMP-9 se encuentra como proenzima se une con mayor afinidad a la colágena tipo I y a gelatina y con menor afinidad a colágena tipo IV, en comparación a la MMP-9 en estado activo (Allan y col, 1995).

La MMP-9 puede ser secretada como una mezcla de monómeros y homodímeros dependiendo del tipo celular que la produce. Los neutrófilos secretan una forma específica de MMP-9, la cual es un complejo de MMP-9 asociada a lipocalina, denominada "neutrophil gelatinase B- associated lipocalin" (NGAL) (Kjeldsen y col, 1993). Existen dos cisteínas adicionales en la MMP-9 (Cys₄₄₉ en el dominio de

unión a colágena tipo V y Cys₆₁₅ en el dominio tipo hemopexina) que pueden ser las responsables de la homodimerización y heterodimerización.

Activación

La MMP-9 es sintetizada y secretada al ambiente extracelular en forma de proenzima, que es latente hasta que es activada mediante la eliminación de la región propéptido. El propéptido contiene una secuencia conservada (PRCGXPD), en donde la cisteína está coordinada con el ión de Zn²⁺. Cuando existe un cambio en esta conformación, por ejemplo, mediante la proteólisis del propéptido, hay un cambio conformacional dejando accesible el ión de Zn²⁺ a moléculas de agua y al sustrato; resultando en la activación de la enzima (Van Wart y Birkedal-Hansen, 1990).

Diferentes proteasas son capaces de activar a la MMP-9, por ejemplo la familia de las proteasas de serina, las elastasas y las mismas MMPs. Las dos proteínas más implicadas en la activación de las MMPs son: el plasminógeno (plasmina) y las MT-MMPs. Estas últimas pueden activar a otras MMPs, dando como resultado la activación de la MMP-9 (Cuzner y Opdenakker, 1999).

Regulación

Una vez que la MMP-9 es secretada y activada, su actividad catalítica puede ser regulada mediante su degradación o por su inhibición en el ambiente extracelular. La MMP-9 puede ser inhibida por la α 2 – macroglobulina, una proteína inhibidora universal y presente en el ser humano (Birkedal-Hansen y col, 1993). Sin embargo, los TIMPs tienen un papel importante en su regulación. La MMP-9 tanto en su forma latente o activa tiene la capacidad de unirse a varios tipos de TIMPs como TIMP-1 y -3. Sin embargo, el TIMP-1 se une con mayor afinidad a la gelatinasa B mediante la interacción entre el dominio N-terminal de TIMP-1 y el sitio activo de la enzima.

Otros mecanismos de regulación de la MMP-9 son menos entendidos, sin embargo, la glicosilación de la enzima puede tener un papel importante en ella. Estudios muestran que el ácido siálico de la MMP-9 influye en la unión con TIMP-1 (Van den Steen y col, 2001).

Métodos de detección

El método más utilizado para la detección de la MMP-9 es el gel de sustrato o zimografía. El método se basa en la electroforesis de geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina, posteriormente incubados a 37°C durante la noche, lo que permite a la enzima degradar el sustrato copolimerizado. A continuación, los geles se tiñen con azul de Coomassie y las áreas de sustrato que fueron degradadas por la enzima aparecen como blancas sobre un fondo azul que contiene sustrato íntegro. Este método tiene la sensibilidad de microgramos y tiene la capacidad de diferenciar entre las dos gelatinasas, su estado de activación y de dimerización basándose en su peso molecular. La cuantificación de su concentración es posible mediante densitometría.

Existen otros métodos para la detección de MMP-9 como los basados en anticuerpos, como inmunoreactividad, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, también los ensayos de fluorescencia basados en sustratos fluorescentes y marcajes para citometría de flujo, entre otros.

Funciones biológicas y fisiopatológicas de la MMP-9

La MMP-9 participa en procesos biológicos como el desarrollo embrionario, crecimiento neural, remodelación ósea y la angiogénesis entre otros.

El papel de la MMP-9 en diferentes condiciones patológicas se basa en su capacidad para provocar daño tisular. La falla de los mecanismos de regulación de su actividad puede llevar a la disminución o

a una excesiva producción de esta enzima y la subsecuente restringida, extensiva o inadecuada degradación de la matriz extracelular. Algunos procesos patológicos donde la MMP-9 participa son: enfermedad cardiovascular, nefritis, enfermedades neurológicas, enfermedad periodontal, úlcera gástrica y córnea, enfisema y fibrosis en diferentes órganos, enfermedades autoinmunes e inflamación.

Reproducción

La MMP-9 está involucrada en el ciclo reproductivo de la mujer en diferentes etapas: el ciclo menstrual, la implantación, el trabajo de parto y la lactancia. Durante el embarazo temprano, el citotrofoblasto penetra el epitelio uterino y su membrana basal e invaden el endometrio. Se ha demostrado que el citotrofoblasto humano, que tiene un fenotipo invasivo durante el primer trimestre de la gestación expresa MMP-9 (Fisher y col, 1991). Adicionalmente, la MMP-9 contribuye en el desprendimiento de la placenta de la pared uterina posterior al trabajo de parto (Shimamori y col, 1995); y posteriormente en la involución de las glándulas mamarias al término de la lactancia (Werb y col, 1996).

La metaloproteasa más implicada en el evento del trabajo de parto es la MMP-9, la cual es capaz de degradar diferentes tipos de colágena y gelatinas. Sin embargo, con mayor eficiencia degrada a la colágena tipo IV, la cual está implicada en proporcionar soporte a las membranas corioamnióticas (Xu y col, 2002). Se ha demostrado que la concentración y la actividad de la MMP-9 se incrementa durante el trabajo de parto, lo que hace a esta enzima un marcador bioquímico de la degradación de las membranas corioamnióticas y un posible blanco de acción para inhibir el evento (Lei y col, 1999).

Transporte de moléculas

Las MCA son tejidos que permiten el paso de moléculas a través de sus capas histológicas. Mediante estudios electrofisiológicos se ha demostrado que las membranas corioamnióticas son permeables y selectivas. (Hardy y col, 1989). La difusión en las diferentes capas de las membranas fetales demuestra que existen rutas transcelulares para el transporte de solutos; las cuales pueden discriminar selectivamente moléculas tan pequeñas como el agua. Esta discriminación es mayor en el amnios que en el corion, lo que muestra que el amnios es una barrera más eficiente para la difusión de sustancias.

El epitelio amniótico está compuesto por una capa de células polarizadas separadas por espacios intercelulares, en comparación con el epitelio clásico. Las vías principales de transporte en el epitelio amniótico son la paracelular y la celular, en la última los solutos pueden cruzar la membrana celular. La ruta celular es importante para el intercambio de sustancias entre el medio exterior y el interior de la célula amniótica (Guet-Bara y Bara, 1984). El modelo del amnios como una membrana permeable fue descrito por King (1985) donde se postula que la ruta paracelular es la principal vía de transporte de agua y solutos, y que la permeabilidad selectiva puede deberse a componentes de la matriz extracelular.

Se ha demostrado que en el contexto de las MCA, las citocinas como la $IL-1\alpha$, $IL-1\beta$, $TNF-\alpha$ e $IL-6$ transitan en dirección materno-fetal y fetal- materno. Este tránsito sucede desde las 4 horas de incubación y de la misma manera en ambas direcciones (Kent y col, 1994).

JUSTIFICACIÓN

Teniendo en cuenta que las MMPs pueden ser sintetizadas por diferentes tipos celulares, resulta complejo establecer su origen durante el trabajo de parto y la consecuente ruptura fisiológica y/o patológica de las membranas corioamnióticas. Sin embargo, se sabe que las células del epitelio amniótico, los trofoblastos y las células deciduales son capaces de producir MMP-9 en su forma de proenzima (Xu y col, 2002). Recientemente nuestro grupo ha demostrado que los leucocitos que arriban al entorno de las MCA en el espacio decidual, son capaces de producir gran cantidad de esta enzima y su producción se modula al contacto con estos tejidos (Vadillo-Ortega y Estrada-Gutiérrez, 2005).

El trabajo de parto humano es un proceso que se caracteriza por contracciones uterinas sincronizadas a la dilatación del cérvix y la ruptura de las membranas fetales. La ruptura de estos tejidos implica la degradación del tejido conectivo que les brinda soporte, principalmente la capa compacta del amnios. El debilitamiento de la estructura de dichas membranas está mediado por la familia de las MMPs, en particular por la MMP-9. La MMP-9 es sintetizada por diferentes tipos celulares que en su mayoría se localizan en el corion, el lado opuesto de la capa compacta. Por lo cual, es esperado que exista un mecanismo de tránsito transtisular para que la MMP-9 cruce desde la coriodecidua hasta las capas del amnios ricas en tejido conectivo, y provocar la ruptura de las membranas corioamnióticas durante el trabajo de parto.

HIPÓTESIS

Existen mecanismos de translocación tisular específicos para la MMP-9, que permiten su paso selectivo desde la capa del corion, hasta las capas de tejido conectivo del amnios durante el trabajo de parto.

OBJETIVO GENERAL

Identificar la existencia de los mecanismos de translocación tisular de MMP-9 en el corioamnios humano emulando *in vitro* las condiciones del trabajo de parto e iniciar su caracterización funcional.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar la existencia de translocación de MMP-9 a través de los diferentes estratos histológicos de la membrana corioamniótica humana.
2. Analizar la cinética de translocación transmembranal de la MMP-9 en la membrana corioamniótica emulando *in vitro* las condiciones del trabajo de parto humano.
3. Iniciar la caracterización de (los) mecanismo (s) que permiten la translocación de la MMP-9 en el corioamnios.

METODOLOGÍA

Muestras Biológicas

Se utilizaron MCA obtenidas en la Unidad de Tococirugía del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes (INPerIER). Todas las membranas provinieron de mujeres que resolvieron su embarazo a término (37 a 40 semanas de gestación) por cesárea sin indicios de trabajo de parto o bien de mujeres que resolvieron su embarazo con trabajo de parto; sin evidencias de infección por cultivo microbiológico. Las membranas se cortaron cerca del sitio de unión a la placenta y se transportaron al laboratorio en medio DMEM con 1% de antibiótico-antimicótico. En condiciones de esterilidad se lavaron con solución salina fisiológica y se procesaron de acuerdo a la metodología específica.

Marcaje de MMP-9 y albúmina con isotiocianato de fluoresceína (FITC)

Para poder evaluar el paso de la MMP-9 en el tejido corioamniótico se decidió incluir a la metodología de pulso/caza, utilizando la enzima marcada con isotiocianato de fluoresceína mediante la siguiente metodología:

- a.** Se colocó MMP-9 recombinante humana (48.0 ng/1.5ml) y albúmina (1g/4ml) en diálisis con amortiguador de boratos (ácido bórico 0.05M, NaCl 0.2M, pH 9.2, 4°C), utilizando una membrana Spectrum® (Spectra/Por® 4MWCO, 12,000kDa).
- b.** Se resuspendió FITC (Sigma) en DMSO (5mg/1ml).
- c.** Se dejó incubar 48.0 ng de MMP-9 dializada con 100 μ L de FITC/DMSO y 2.5 mg de albúmina dializada con 200 μ L de FITC/DMSO por dos horas a temperatura ambiente.
- d.** Se removió la FITC no conjugada mediante ultrafiltración (Microcon YM-50, Milipore® 42415), los cuales dejan pasar todo aquello menor a 50,000 kDa. Se fue agregando el conjugado en pequeños volúmenes y se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min a 4°C.
- e.** Se lavó la muestra con PBS hasta obtener un eluido claro.
- f.** Se obtuvieron 220 μ L de MMP-9/FITC (48ng) y 500 μ L de albúmina/FITC (2.5mg).
- g.** Se realizó una electroforesis en geles de acrilamida al 8% con SDS (SDS PAGE). Los geles se observaron en un analizador de imágenes con luminiscencia (Typhoon /Fluorecein 560). Posteriormente se hizo una tinción con azul de Coomasie.

Modelo de cultivo de membranas corioamnióticas con MMP-9/FITC ó ALB/FITC

Para evaluar el tránsito de la MMP-9 sobre las membranas fetales se utilizó la metodología de pulso/caza mediante un modelo *in vitro* que permitió colocar a la MMP-9 conjugada con FITC en contacto directo con las membranas y seguir su paso a través de éstas (*Anexos: diagrama 1 y 2*).

- a.** Se realizaron explantes de MCA a término (37-40 SDG) sin trabajo de parto, con indicación de resolución del embarazo por vía cesárea y sin evidencia de infección. Por otro lado se realizaron explantes de MCA a término (37-40 SDG) con trabajo de parto y sin evidencia de infección.
- b.** Los explantes se montaron en el modelo de "Transwell[®]", colocando el corion hacia la parte interna y el amnios hacia la parte externa, permitiendo un análisis que reproduce la situación anatómica de las membranas corioamnióticas.
- c.** Los explantes de las MCA montados en "Transwell" se colocaron en DMEM con 10% SFB por 24 horas.
- d.** Se cambió el medio de cultivo por DMEM con 1% HLA por 24 horas.
- e.** Se adicionó en la parte interna (corion) MMP-9/FITC (0.436ng) ó Alb/FITC (0.5 ng) a los explantes de MCA montados en Transwell[®]. Se dejaron incubar desde 30 minutos hasta 24 horas.
- f.** A los tiempos establecidos se realizaron lavados a los explantes de la siguiente manera: 3 lavados con DMEM 1% HLA por 5 minutos a temperatura ambiente en agitación, 1 lavado con PBS por 5 minutos a temperatura ambiente en agitación.
- g.** Al término de los lavados se incluyeron en Tissue Tek[®] y se colocaron a -70°C hasta su utilización.
- h.** Posteriormente se realizaron cortes histológicos de 10 μm en criostato.
- i.** Se montaron en medio de montaje "Vectashield[®]" que contiene DAPI.

j. Se observaron por microscopía confocal; utilizando un microscopio LSM 510 META ZEISS. Las condiciones de la toma de micrografías fue la siguiente: Scan Mode: plane, Scan Zoom: 1, Objetivo: 20x, Pinhole: Ch2-1 146/ Ch2 -2 174, Filtros: Ch2-1 BP 420-480/Ch2-2 BP 505-570 IR, Láser: 405 nm 10%/ 488 nm 10%.

Extractos de membrana corioamniótica cultivada con MMP-9/FITC

Con el fin de comprobar el estado de la MMP-9 dentro del modelo *in vitro* se llevaron a cabo extractos de los tejidos fetales que estuvieron en contacto directo con la MMP-9 que se les adicionó utilizando la siguiente metodología:

- a.** Se realizaron explantes de MCA a término con trabajo de parto y sin evidencia de infección.
- b.** Se llevó a cabo el modelo de cultivo de MCA con trabajo de parto incubada con MMP-9/FITC anteriormente descrito.
- c.** Al término del cultivo se desmontaron los explantes. Se separó manualmente el amnios y el corion de cada explante, obteniendo 4 muestras: amnios y corion sin MMP-9/FITC, amnios y corion con MMP-9/FITC.
- d.** A cada muestra se le adicionó 150 μ L de amortiguador (1% Tritón X100, Tris 0.5 M, CaCl₂ 20 mM, pH 7.4).
- e.** Se realizaron 2 ciclos de congelación/descongelación (-70°C/Temp. ambiente) a todas las muestras, con el fin de extraer de cada parte de la membrana la MMP-9/FITC que se les adicionó. No se realizó fragmentación u homogeneización de las MCA.
- f.** Se realizó SDS PAGE al 8% de los extractos.
- g.** Los geles obtenidos se analizaron en un escáner para muestras con luminiscencia (Typhoon, Láser de excitación 488nm).

Cultivo de amnios con MMP-9/FITC

Para iniciar la caracterización del mecanismo (s) que permite el paso de la MMP-9 al interior del epitelio amniótico se recurrió a la siguiente metodología:

- a.** Se realizaron explantes de MCA a término con trabajo de parto.
- b.** Se separó físicamente el amnios del corion.
- c.** Se montó el amnios en el modelo de "Transwell[®]". Se incubaron con MMP-9/FITC como se describe anteriormente. Los tiempos de incubación del amnios con MMP-9/FITC fueron de 24 horas.
- d.** Por otro lado se colocó el amnios sin el modelo de "Transwell[®]". Se incubaron con MMP-9/FITC como se describe anteriormente. Los tiempos de incubación fueron de 3 horas, 6 horas y 12 horas.
- e.** Al término del modelo de cultivo, todas las muestras se incluyeron en "Tissue Tek[®]" y se colocaron a -70°C hasta su utilización.
- f.** Se realizaron cortes histológicos de 10 μm en criostato de cada muestra.
- g.** Se montaron en medio de montaje Vectashield[®] que contiene DAPI.
- h.** Se observaron por microscopía confocal.

Cultivo de amnios con tratamiento de tripsina/EDTA

Para caracterizar si el mecanismo que emplea el epitelio amniótico para permitir el paso de la MMP-9 al ambiente citoplasmático involucra receptores de membrana, se empleó la siguiente metodología:

- a.** Se obtuvo MCA con trabajo de parto, a término y sin infección.
- b.** Se separó el amnios y el corion. Se realizaron explantes de aproximadamente 1 cm² de amnios y se colocaron en DMEM 1% HLA.
- c.** Se adicionó tripsina/EDTA 1x (100 μ l) a cada explante de amnios y se agitó manualmente por 1, 2, 3 y 5 minutos.
- d.** Al término del tratamiento con tripsina/EDTA se agregó 1ml de solución de HANK´s (Gibco BRL) con 20% de suero fetal bovino.
- e.** Se realizaron 3 lavados con DMEM 1% HLA a todos los explantes.
- f.** Los explantes se incubaron con MMP-9/FITC como se describe anteriormente por 3 horas y 6 horas.
- g.** Al término de la incubación con MMP-9/FITC, los explantes se incluyeron en "Tissue Tek[®]" y se congelaron a -70°C hasta su utilización.
- h.** Se realizaron cortes histológicos de 10 μ m en criostato de cada muestra.
- i.** Se montaron en medio de montaje Vectashield[®] que contiene DAPI.
- j.** Se observaron por microscopía confocal.

RESULTADOS

En este proyecto se propuso documentar la existencia e iniciar la caracterización del (los) probable (s) mecanismo(s) de tránsito transmembranal que requiere la MMP-9, para atravesar desde la coriodecidua donde es sintetizada hasta las capas del amnios, donde reside la mayor parte de la fuerza mecánica del tejido rico en tejido conectivo.

Se estandarizó un modelo *in vitro* que reproduce la situación anatómica de las membranas corioamnióticas. El modelo consistió en colocar a la MMP-9 conjugada con fluoresceína en el lado del corion, para documentar su paso al amnios y seguir su tránsito a través de los diferentes estratos de estos tejidos.

La MMP-9/FITC que se adicionó en el corion de las MCA provenientes de mujeres con trabajo de parto y sin trabajo de parto se incorporó gradualmente en los distintos estratos del tejido, desde el corion hasta el amnios conforme aumentaba el tiempo de incubación. A los 30 minutos de incubación la MMP-9/FITC se localizó específicamente en la decidua. A la hora la MMP-9 se localizó en el corion y se comenzó a visualizar en el amnios. A partir de ésta último y hasta las 24 horas la MMP-9/FITC se localizó tanto en el corion y en el amnios. Esto indicó que hubo tránsito tisular de la MMP-9/FITC a través de las diferentes capas del tejido fetal (n=10). El paso intratisular de la MMP-9 desde el corion hacia el amnios fue directamente proporcional al tiempo de incubación. (*Figuras 6A-C*). En el caso de la albúmina/FITC, no hubo evidencia de translocación tisular a ningún tiempo de incubación ya que siempre se observó en el corion. Tampoco existieron diferencias de su comportamiento en ningún grupo de MCA (*Figuras 7A-C*).

La MMP-9/FITC que fue incubada por 12 horas y 24 horas se localizó en el corion y evidentemente en el amnios de las MCA sin importar su condición. Por lo que se utilizó los tiempos de incubación de 12 horas y 24 horas como los representativos para demostrar la translocación de MMP-9 en las MCA (*Figuras 6-9*).

Se identificaron diferencias en el tránsito de la MMP-9/FITC a través de las membranas provenientes de mujeres con trabajo de parto y sin trabajo de parto. En las MCA provenientes de mujeres sin trabajo de parto la MMP-9/FITC posterior a 24 horas de incubación se localizó en mayor proporción tanto afuera como adentro de las células del corion y en menor proporción en las células del amnios. (*Figura 8*). En contraste, las MCA provenientes de mujeres con trabajo de parto la MMP-9 posterior a 24 horas de incubación se localizó principalmente en el interior de las células del corion y del amnios (*Figura 9*). No se observaron diferencias en el comportamiento de la albúmina/FITC cuando se incubó con MCA provenientes de ambos grupos.

Una vez identificado el paso transtisular de la MMP-9/FITC a través de las MCA se realizó la reconstruir tridimensionalmente de estos tejidos. La reconstrucción tridimensional de las MCA provenientes de mujeres con trabajo de parto e incubadas por 24 horas con MMP-9/FITC mostró que esta enzima se localizó en las células del corion, así como en el citoplasma celular del amniocito (*Figura 10*).

Se corroboró la localización de la MMP-9/FITC en interior del amnios por medio del cultivo de amnios de MCA proveniente de mujer con trabajo de parto. Se confirmó que la MMP-9/FITC es capaz de incorporarse dentro del ambiente citoplásmico del epitelio amniótico. Por otro lado, la albúmina/FITC no se localizó dentro el epitelio amniótico (*Figura 11*).

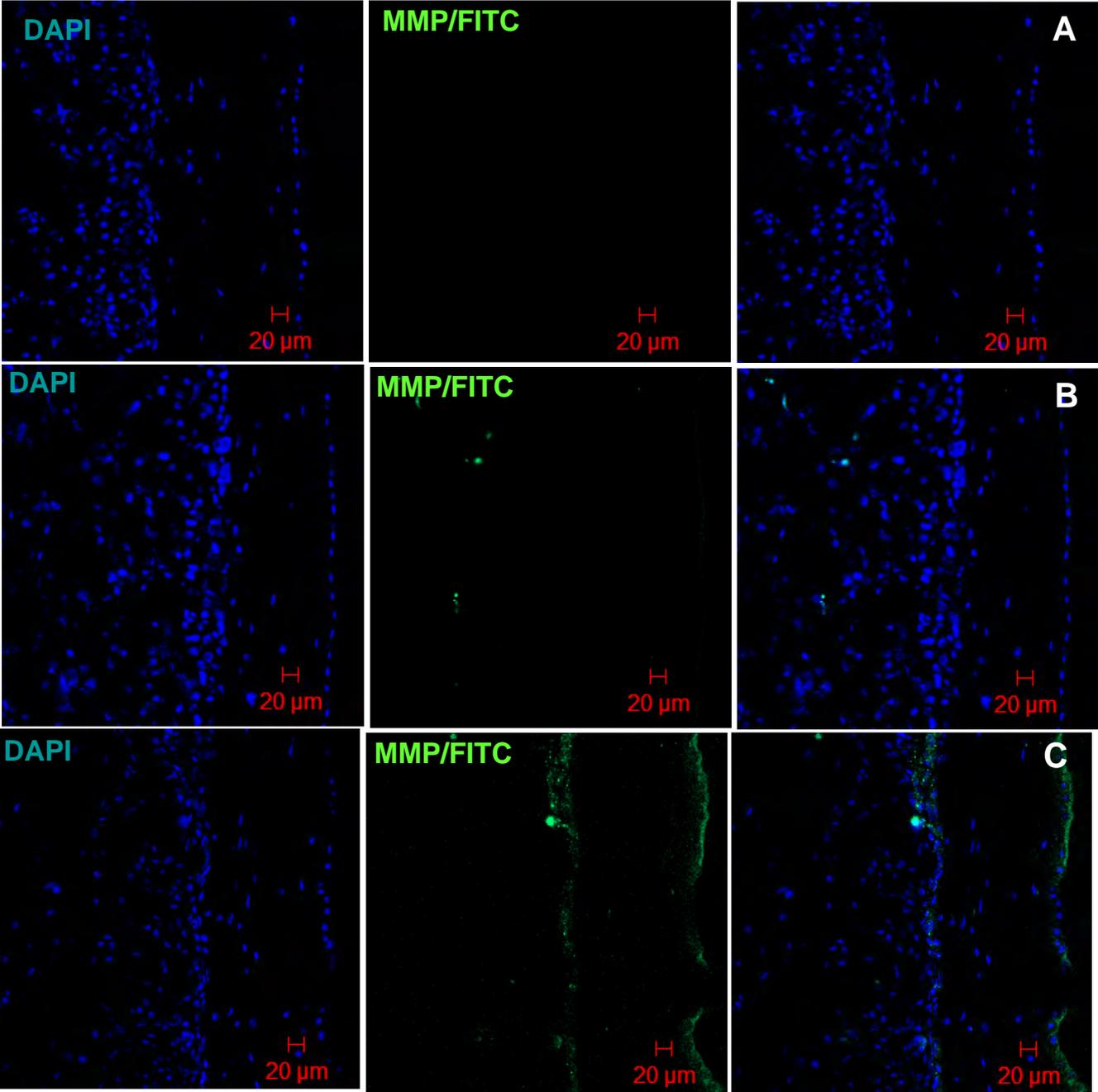
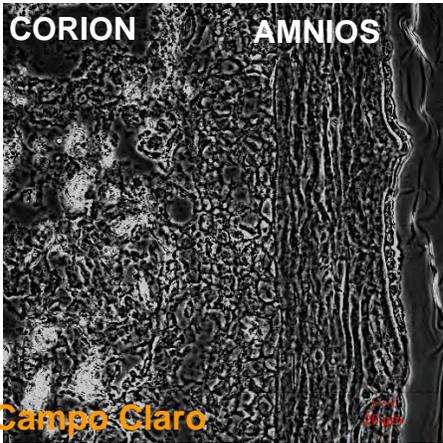


Figura 6-A. Cinética de la translocación tisular de la MMP-9 a través de la MCA sin trabajo de parto.

Los colores corresponden a las señales fluorescentes de: azul, DAPI (núcleos celulares); verde MMP-9/FITC. Aumento 20x, Barra 20 μm .

A. MCA incubada sin MMP-9.

B. MCA incubada con MMP-9/FITC por 30 min.

C. MCA incubada con MMP-9/FITC por 1 hora.

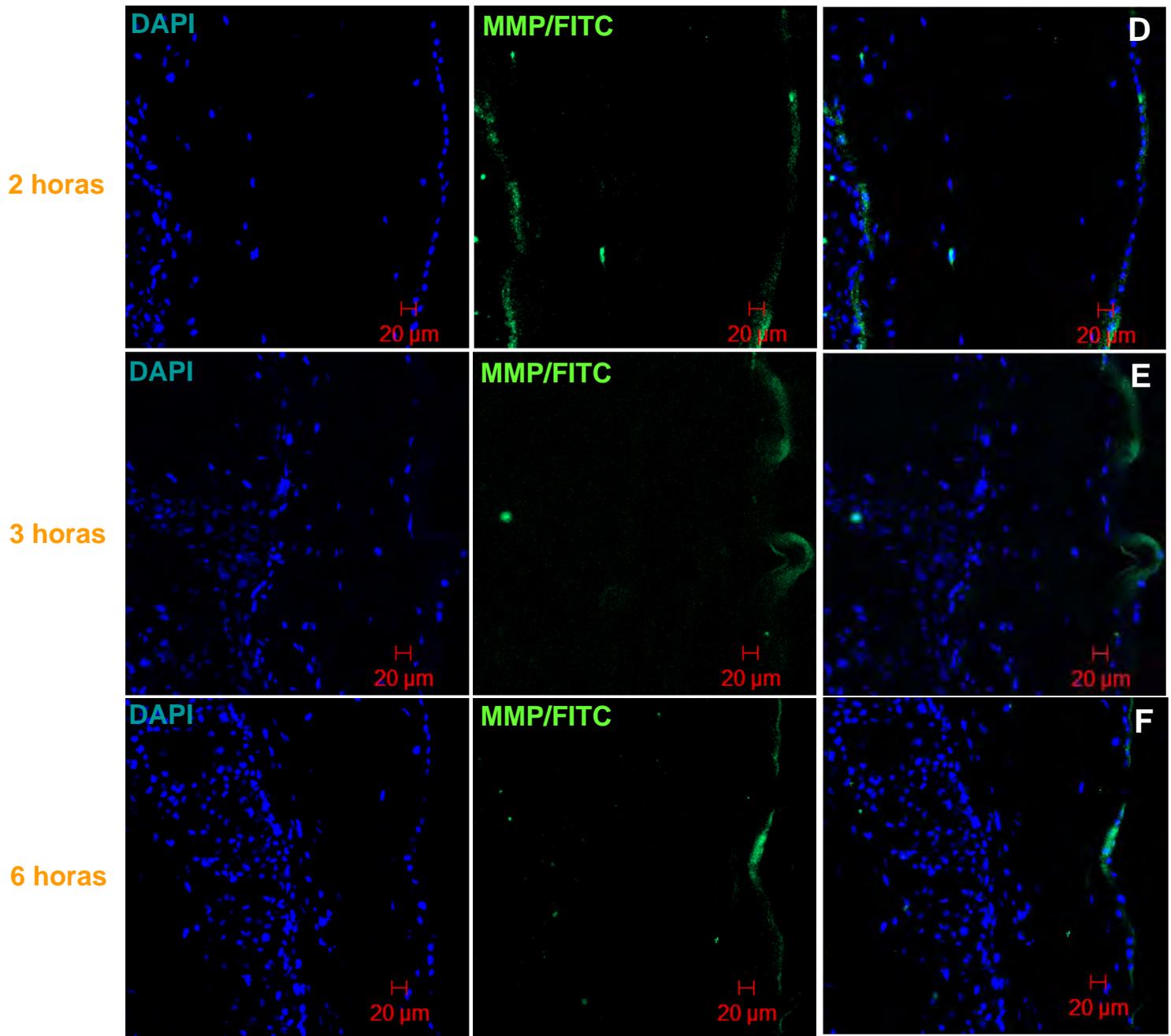


Figura 6-B. Continuación de la cinética de la translocación tisular de la MMP-9 a través de la MCA sin trabajo de parto.
 Los colores corresponden a las señales fluorescentes de: azul, DAPI (núcleos celulares); verde MMP-9/FITC. Aumento 20x, Barra 20 μm .

- D. MCA incubada con MMP-9/FITC por 2 horas.
- E. MCA incubada con MMP-9/FITC por 3 horas.
- F. MCA incubada con MMP-9/FITC por 6 horas.

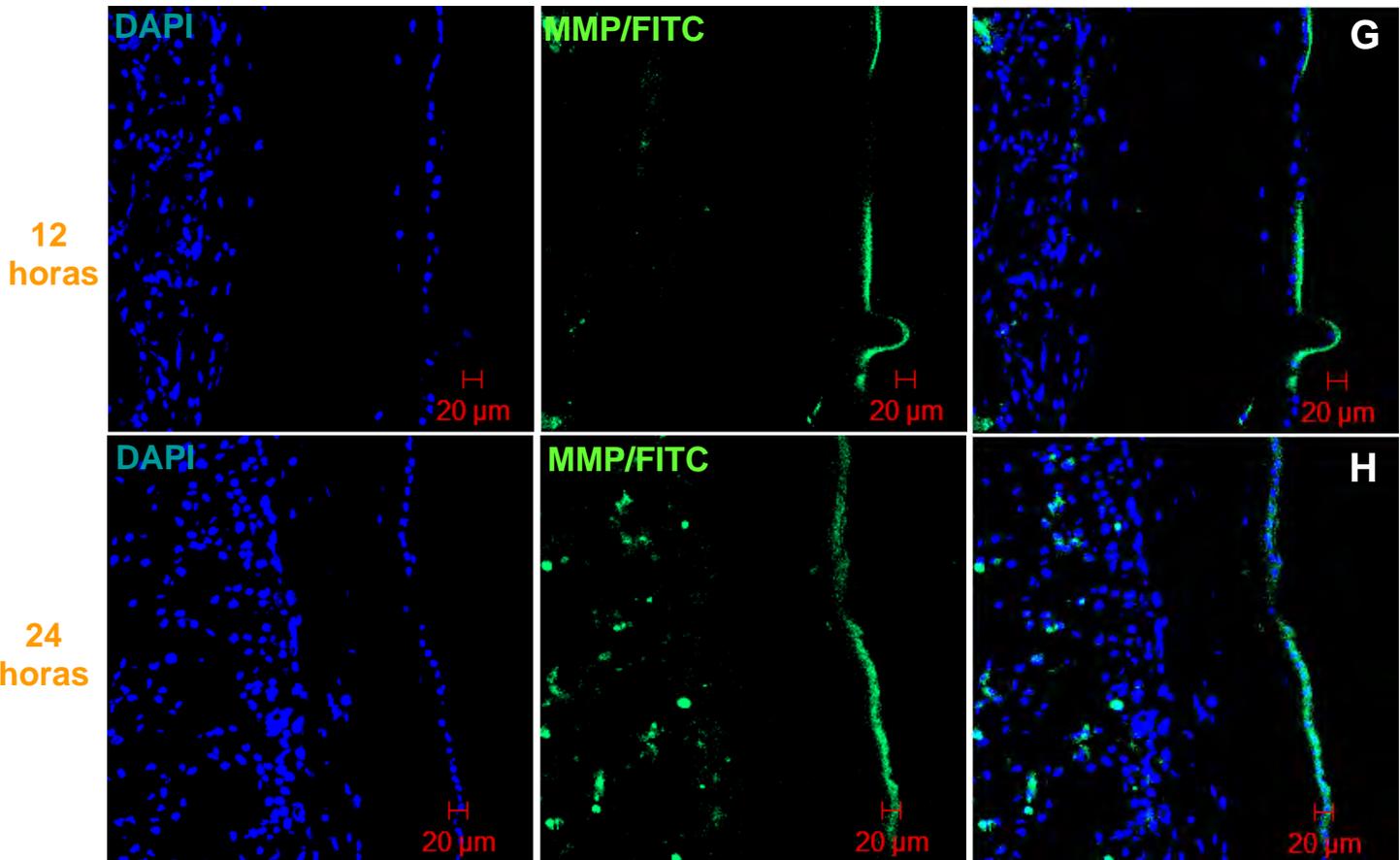


Figura 6-C. Continuación de la cinética de la translocación tisular de la MMP-9 a través de la MCA sin trabajo de parto.

Los colores corresponden a las señales fluorescentes de: azul, DAPI (núcleos celulares); verde MMP-9/FITC. Aumento 20x, Barra 20 μm .

G. MCA incubada con MMP-9/FITC por 12 horas.

H. MCA incubada con MMP-9/FITC por 24 horas.

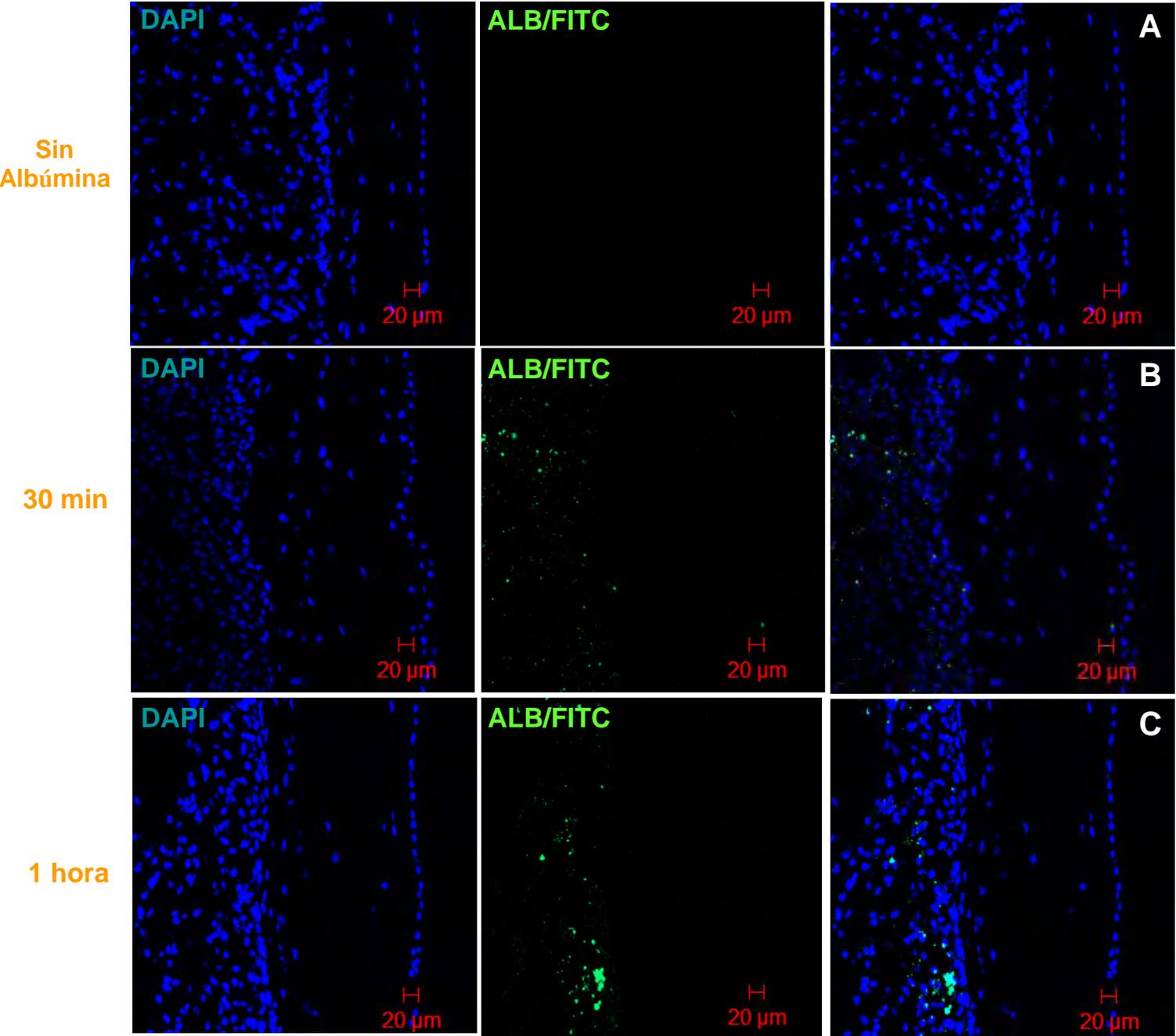
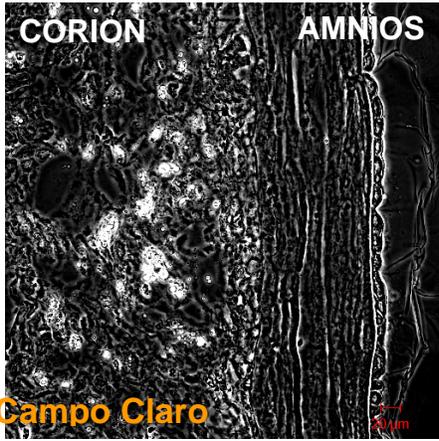


Figura 7-A. Cinética de la translocación tisular de la albúmina a través de la MCA sin trabajo de parto. Los colores corresponden a las señales fluorescentes de: azul, DAPI (núcleos celulares); verde ALBÚMINA/FITC. Aumento 20x, Barra 20 µm .

- A. MCA incubada sin ALB/FITC.
- B. MCA incubada con ALB/FITC por 30 min.
- C. MCA incubada con ALB/FITC por 1 hora.

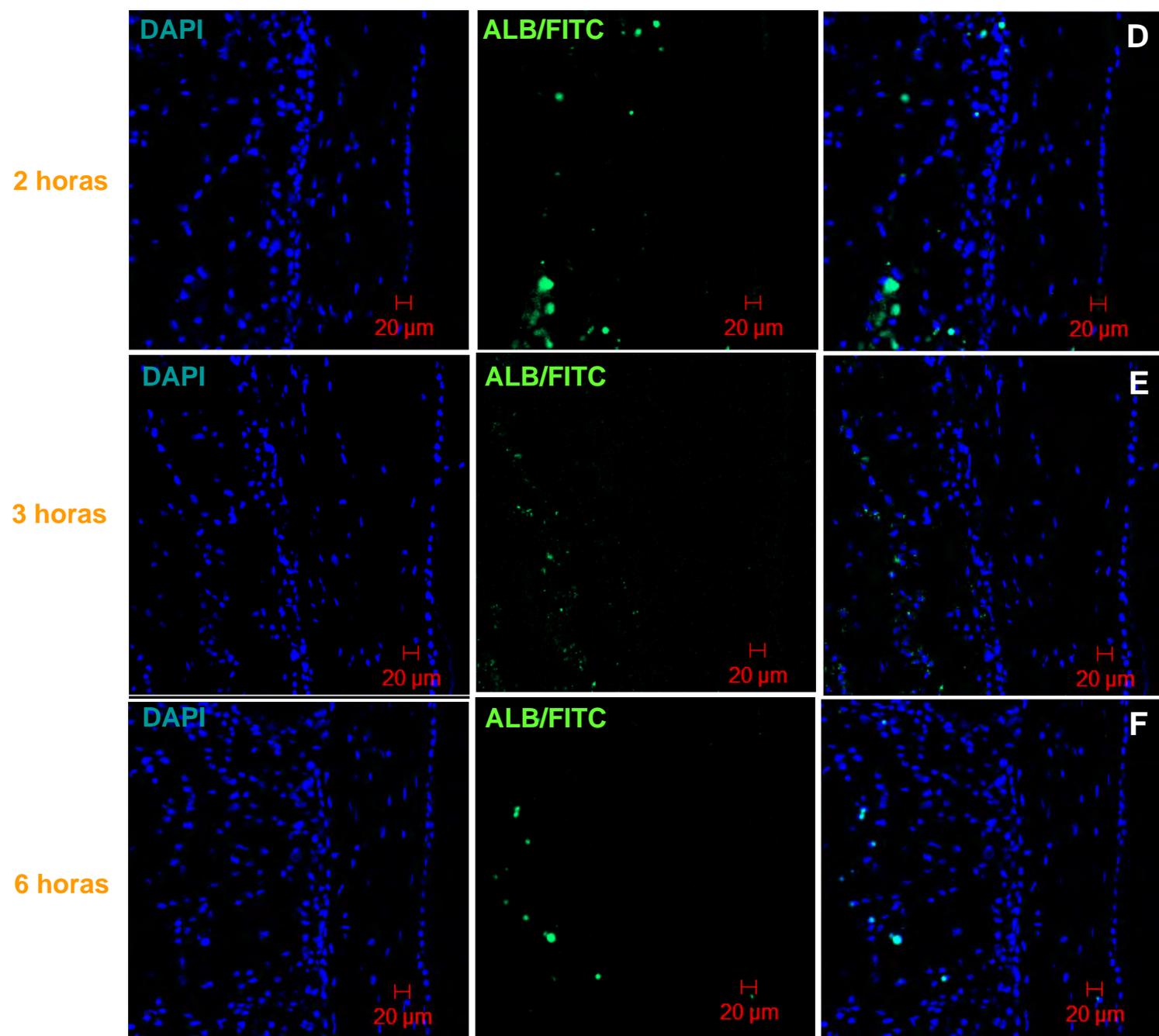


Figura 7-B. Continuación de la cinética de la translocación tisular de la albúmina a través de la MCA sin trabajo de parto.

Los colores corresponden a las señales fluorescentes de: azul, DAPI (núcleos celulares); verde ALBÚMINA/FITC. Aumento 20x, Barra 20 μm.

- D. MCA incubada con ALB/FITC por 2 horas.
- E. MCA incubada con ALB/FITC por 3 horas.
- F. MCA incubada con ALB/FITC por 6 horas.

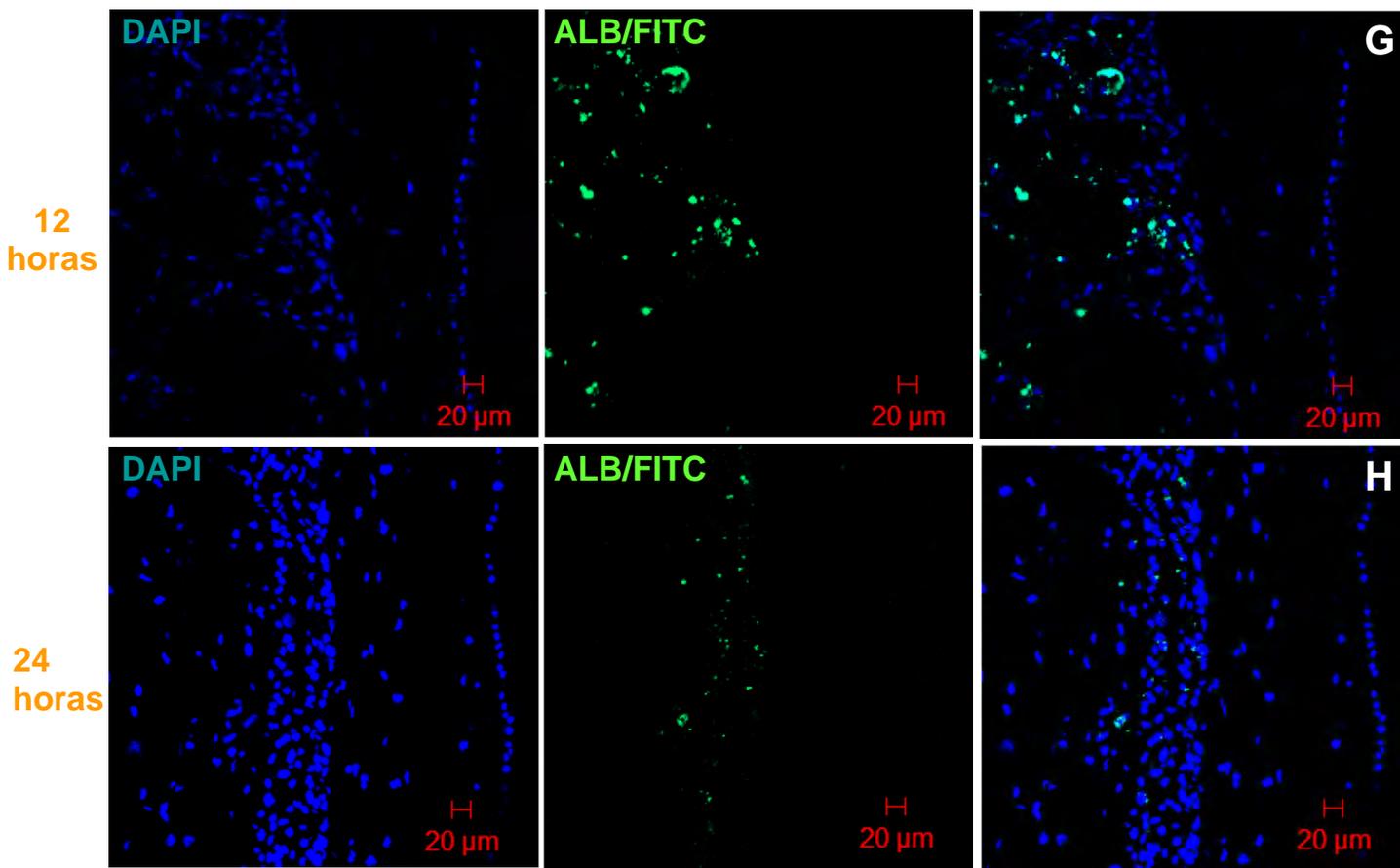


Figura 7-C. Continuación de la cinética de la translocación tisular de la albúmina a través de la MCA sin trabajo de parto.

Los colores corresponden a las señales fluorescentes de: azul, DAPI (núcleos celulares); verde ALBÚMINA/FITC. Aumento 20x, Barra 20 μm .

- G. MCA incubada con ALB/FITC por 12 horas.
- H. MCA incubada con ALB/FITC por 24 horas.

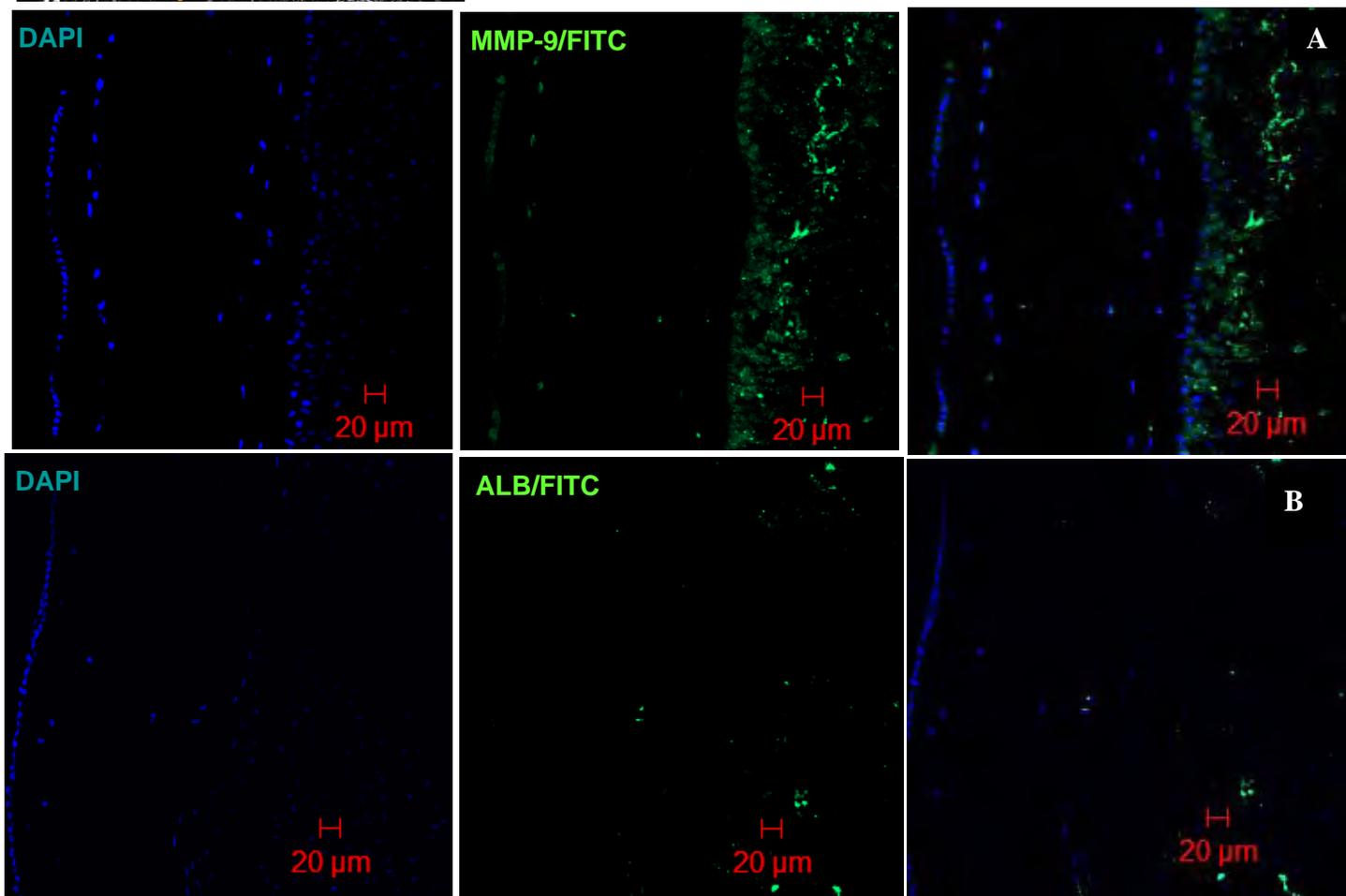
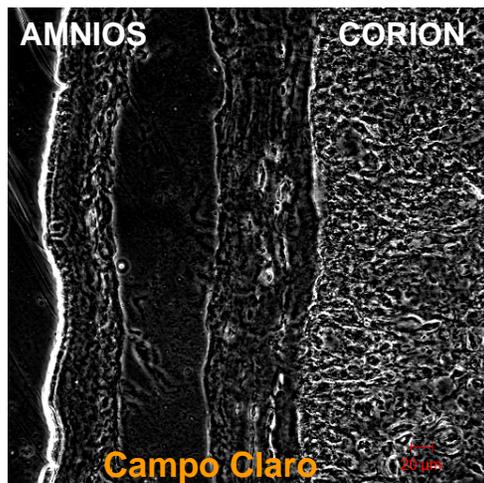


Figura 8. Translocación tisular de la MMP-9 en MCA sin trabajo de parto incubada por 24 horas.

Los colores corresponden a las señales fluorescentes de: azul, DAPI (núcleos celulares); verde, Albúmina/FITC y MMP-9/FITC respectivamente. Aumento 20x, Barra 20 μm .

A. MCA incubada con MMP-9/FITC por 24 horas.

B. MCA incubada con ALB/FITC por 24 horas.

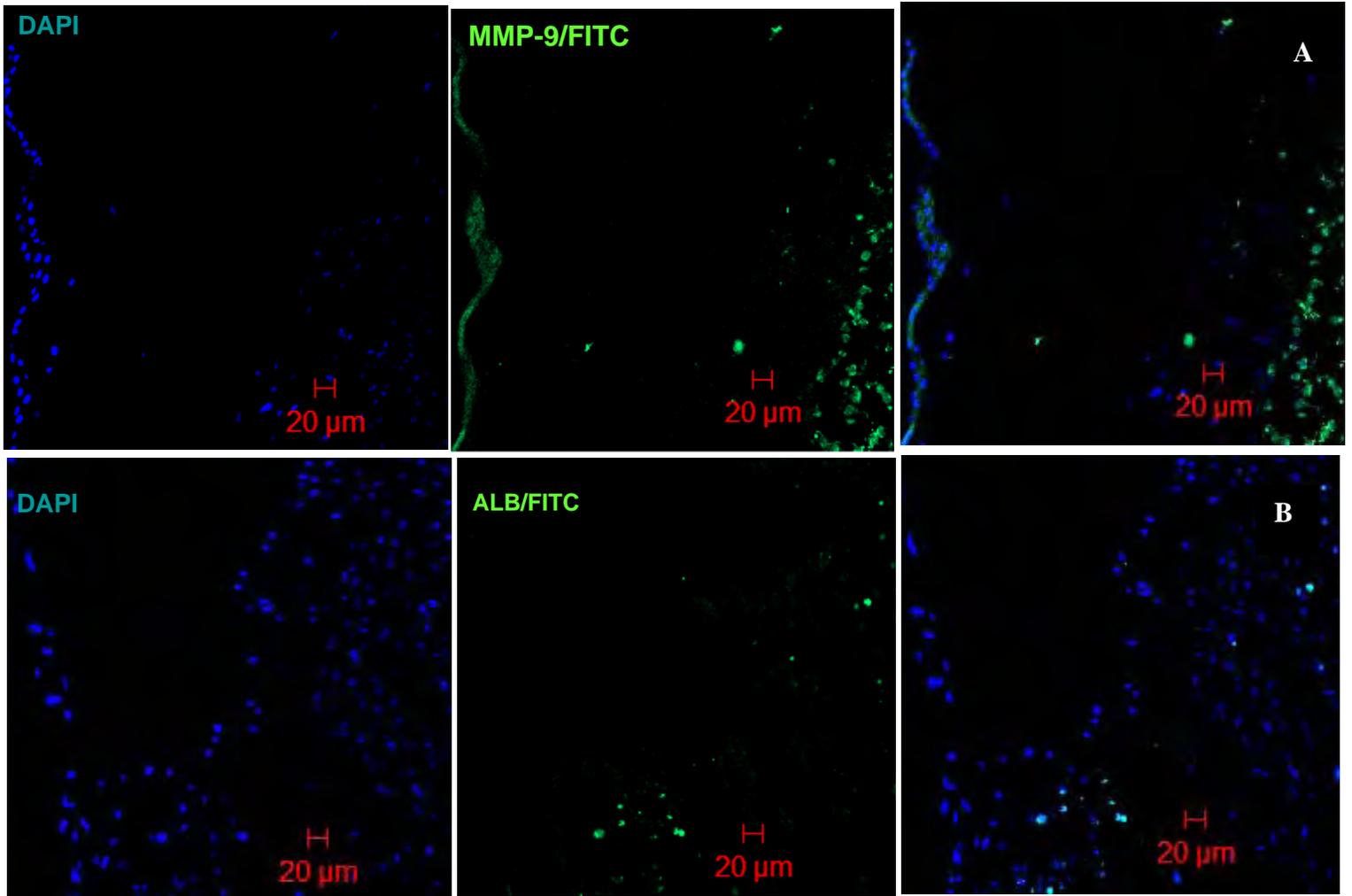
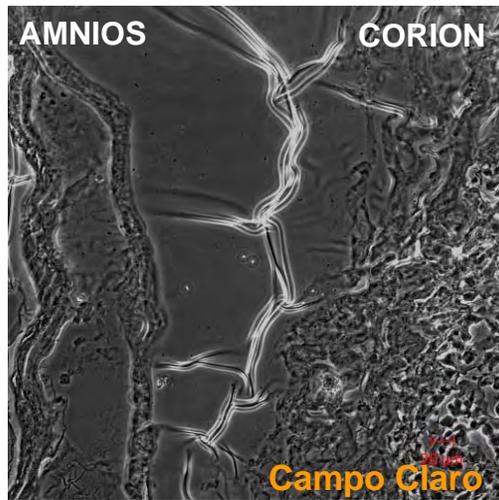


Figura 9. Translocación tisular de la MMP-9 en MCA con trabajo de parto incubada por 24 horas.

Los colores corresponden a las señales fluorescentes de: azul, DAPI (núcleos celulares); verde, Albúmina/FITC y MMP-9/FITC respectivamente. Aumento 20x, Barra 20 μm .

A. MCA incubada con MMP-9/FITC por 24 horas.

B. MCA incubada con ALB/FITC por 24 horas.

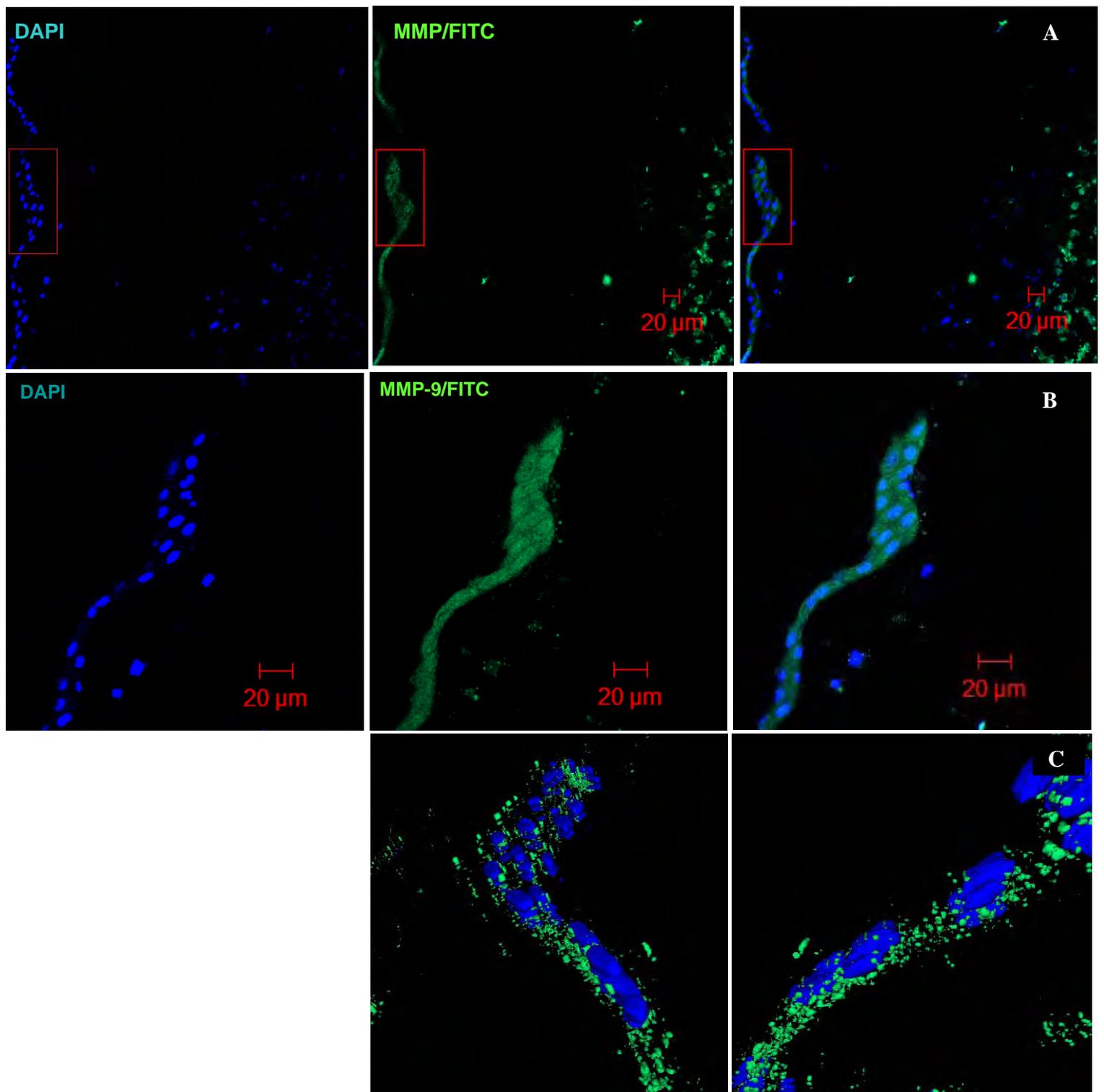


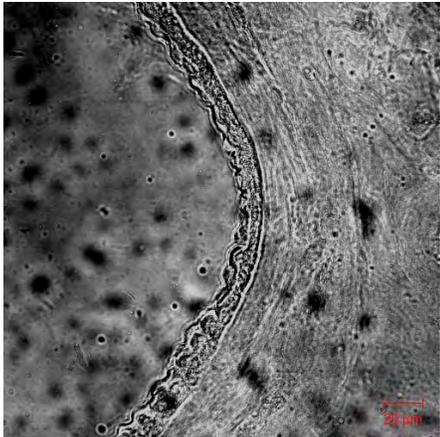
Figura 10. Análisis de la MCA con trabajo incubada por 24 horas con MMP-9/FITC.

Los colores corresponden a las señales fluorescentes de: azul, DAPI (núcleos celulares); verde, MMP-9/FITC.

A. MCA incubada con MMP-9/FITC por 24 horas. Aumento 20x, Barra 20 μm .

B. Acercamiento de amnios del campo A. Aumento 40x, Barra 20 μm .

C. Reconstrucción tridimensional del mismo campo.



Campo Claro

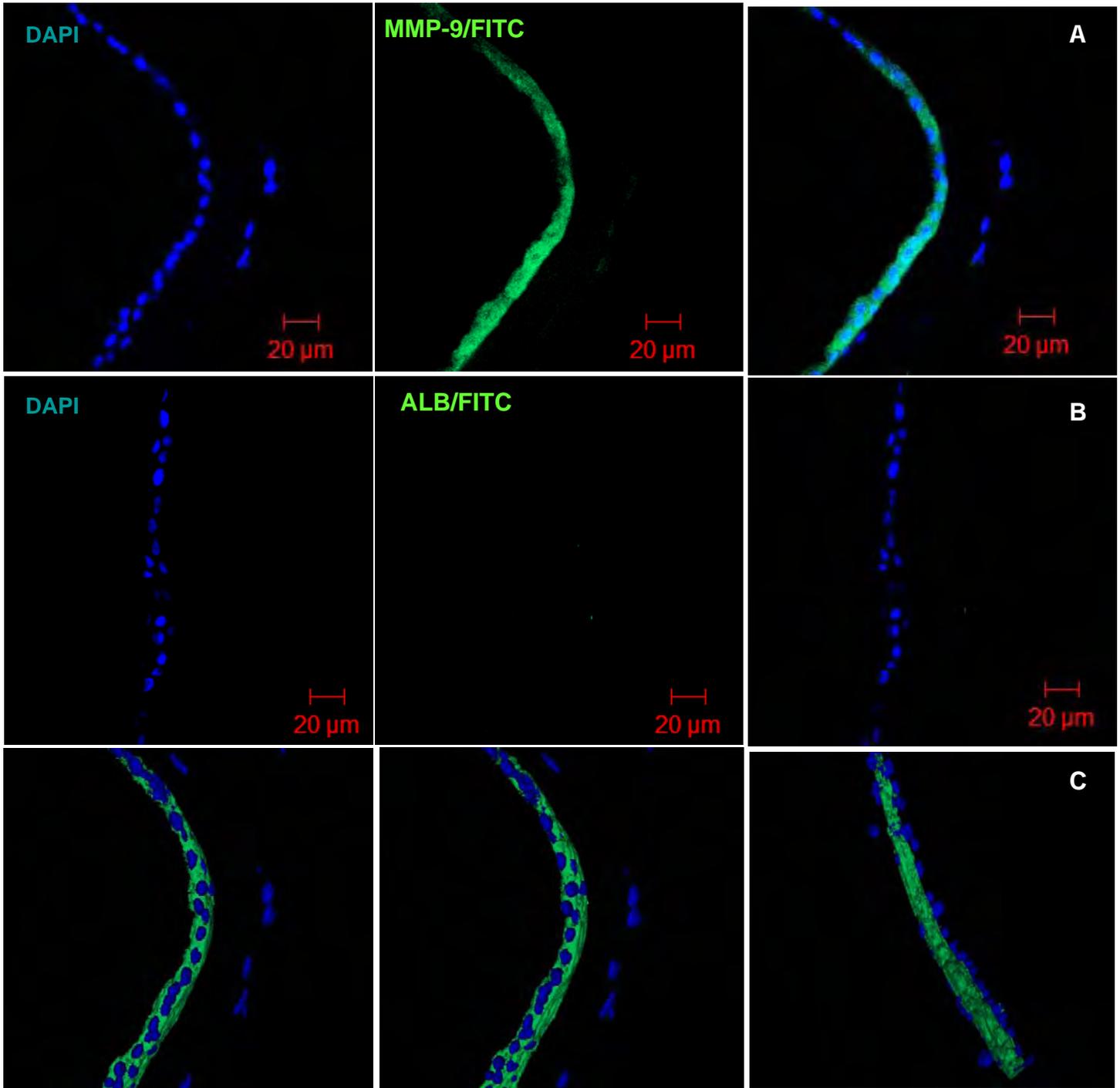


Figura 11. Localización de la MMP-9 en el epitelio amniótico proveniente de MCA con trabajo de parto. Los colores corresponden a las señales fluorescentes de: azul, DAPI (núcleos celulares); verde, MMP-9/FITC y ALB/FITC.
A. Amnios incubado con MMP-9/FITC por 24 horas.

B. Amnios incubado con ALB/FITC por 24 horas. Aumento 20X, Barra 20 μm .

C. Reconstrucción tridimensional de amnios incubado con MMP-9/FITC por 24 horas. Aumento 40X

Una vez identificado el paso transtisular de la MMP-9/FITC y su localización en el epitelio amniótico, fue necesario documentar que la proteína fluorescente identificada, en realidad correspondía a la MMP-9 y contar con algún tipo de evidencia directa de su presencia en el amnios, posterior a su incubación. Para documentar lo anterior, se realizaron extractos de las MCA incubadas con MMP-9/FITC por 24 horas y se realizó electroforesis de estos extractos en geles de poliacrilamida al 8% con SDS (n=4). La electroforesis mostró que la MMP-9/FITC está presente en el extracto de corion y del amnios; lo que confirma que existe el paso transtisular de esta proteasa. Por otro lado, la MMP-9/FITC que atraviesa la MCA se encuentra formando un complejo de alto peso molecular tanto en el corion como en el amnios ya que se observaron bandas de un peso molecular de aproximadamente de 200 kDa (*Figura 12*).

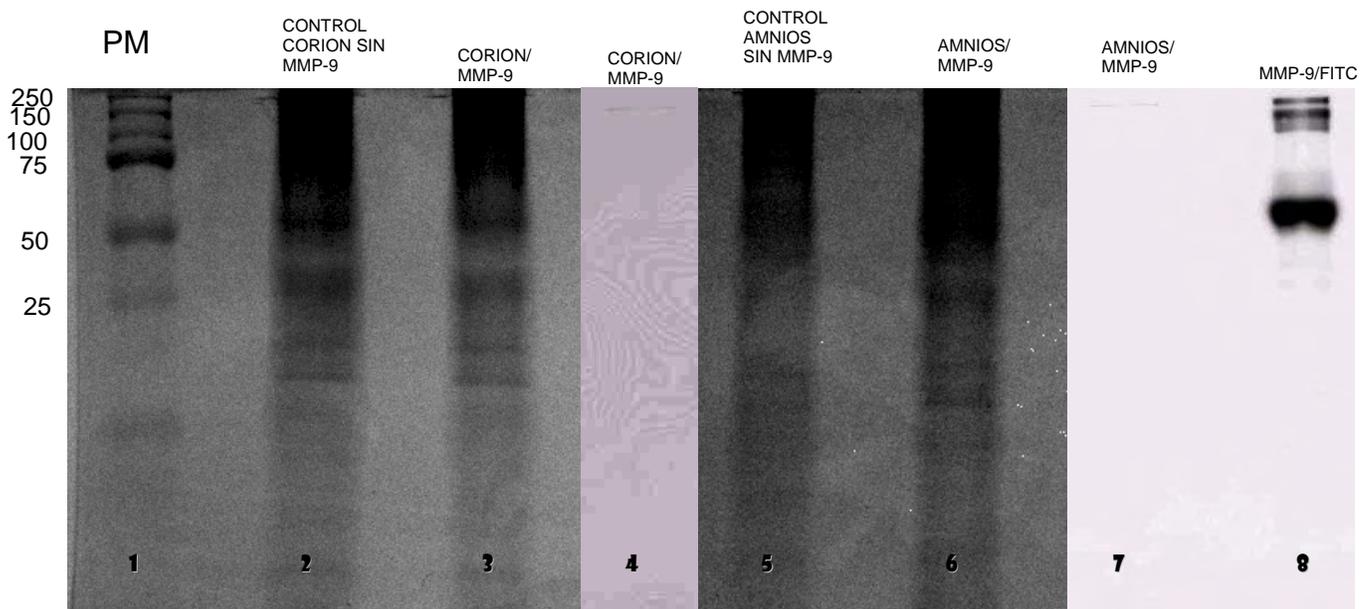


Figura 12. Identificación de MMP-9/FITC en extractos proteicos de MCA con trabajo de parto incubada con MMP-9/FITC por 24 horas. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% con SDS.

Carril 1: Marcador de peso molecular. Tinción con Azul de Coomasie.

Carril 2: Control: corion incubado sin MMP-9/FITC. Tinción con Azul de Coomasie.

Carril 3: Corion incubado con MMP-9/FITC. Tinción con Azul de Coomasie.

Carril 4: Corion Incubado con MMP-9/FITC. Imagen con analizador de luminiscencia Typhoon Láser 488nm.

Carril 5: Control: amnios incubado sin MMP-9/FITC. Tinción con Azul de Coomasie.

Carril 6: Amnios incubado con MMP-9/FITC. Tinción con Azul de Coomasie.

Carril 7: Amnios incubado con MMP-9/FITC. Imagen con analizador de luminiscencia Typhoon Láser 488nm.

Carril 8: Patrón de corrimiento de MMP-9/FITC. Imagen con analizador de luminiscencia Typhoon Láser 488nm.

Conociendo la existencia del paso transtisular de la MMP-9/FITC desde el corion hacia el amnios, su localización dentro de las células del amnios, y la formación de un complejo de alto peso molecular, se estandarizó un modelo *in vitro* para el inicio de la caracterización del posible mecanismo (s) que puede tener el epitelio amniótico para incorporar a la MMP-9/FITC.

Se incubaron explantes de amnios provenientes de mujeres sin trabajo de parto con la MMP-9/FITC por tiempos cortos (0h, 3h, 6h y 12h) (n=3). Se observó que a partir de las 3 horas la MMP-9/FITC comenzó a localizarse dentro del epitelio amniótico, sin embargo, es desde las 6 horas hasta las 12 horas de incubación cuando la incorporación de MMP-9/FITC dentro del amniocito es aparentemente mayor. Se establecieron los tiempos de incubación por 3 horas y 6 horas como los tiempos ideales para la caracterización del posible mecanismo(s) responsable del paso de la MMP-9 al ambiente citoplasmático de éstos (*Figura 13*).

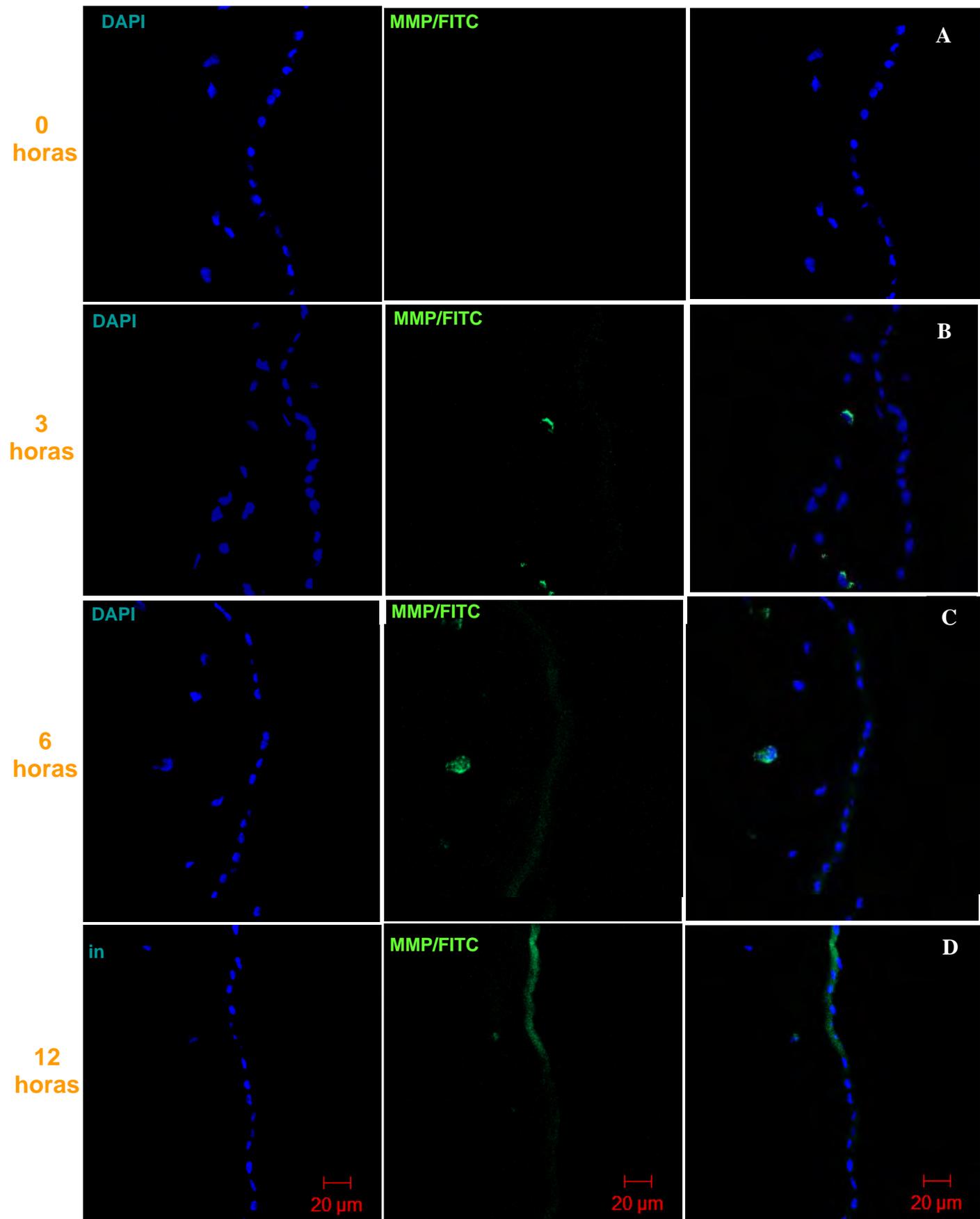


Figura 13. Cinética del paso de la MMP-9 hacia en interior del epitelio amniótico proveniente de MCA sin trabajo de parto. Los colores corresponden a las señales fluorescentes de: azul, DAPI (núcleos celulares); verde, MMP-

9/FITC **A.** Amnios incubado con MMP-9 por 0 horas (control). **B.** Amnios incubado con MMP-9/FITC por 3 horas. **C.** Amnios incubado con MMP-9/FITC por 6 horas. **D.** Amnios incubado con MMP-9/FITC por 12 horas. Aumento 20X

Se evaluó un modelo *in vitro* para analizar el paso de la MMP-9/FITC al interior del amniocito (n=2) y en una primera fase, se exploró la posible participación de receptores membranales involucrados en su paso selectivo. Se incubaron explantes de amnios provenientes de mujeres con trabajo de parto y se trataron con tripsina/EDTA por diferentes tiempos (1, 2, 3, y 5 minutos) con el fin de eliminar temporalmente estructuras de superficie celular que pudieran estar involucradas con el paso de la MMP-9/FITC al interior del epitelio amniótico y posteriormente se agregó un pulso de MMP-9/FITC.

Se observó que el epitelio amniótico que fue tratado con tripsina/EDTA uno y dos minutos e incubado por 3 horas en contacto directo con la MMP-9/FITC, no mostró disminución aparente en la incorporación de MMP-9 dentro de él. Sin embargo, el epitelio amniótico que fue tratado por 3 minutos y 5 minutos con tripsina/EDTA y posteriormente incubado por 3 horas mostró una gran disminución en la incorporación de la MMP-9/FITC. Se observó que con 5 minutos de tratamiento con tripsina/EDTA se eliminó completamente la incorporación de MMP-9 dentro del epitelio amniótico (*Figura 14*).

Por otro lado, se observó el mismo fenómeno en el epitelio amniótico que fue tratado con tripsina/EDTA e incubado por 6 horas con el pulso de MMP-9/FITC. El epitelio amniótico que fue tratado uno y dos minutos con tripsina/EDTA no mostró una disminución aparente en la incorporación de MMP-9 dentro de éste. Sin embargo, el epitelio que fue tratado 3 y 5 minutos con tripsina/EDTA muestra una disminución evidente en la incorporación de MMP-9/FITC (*Figura 15*).

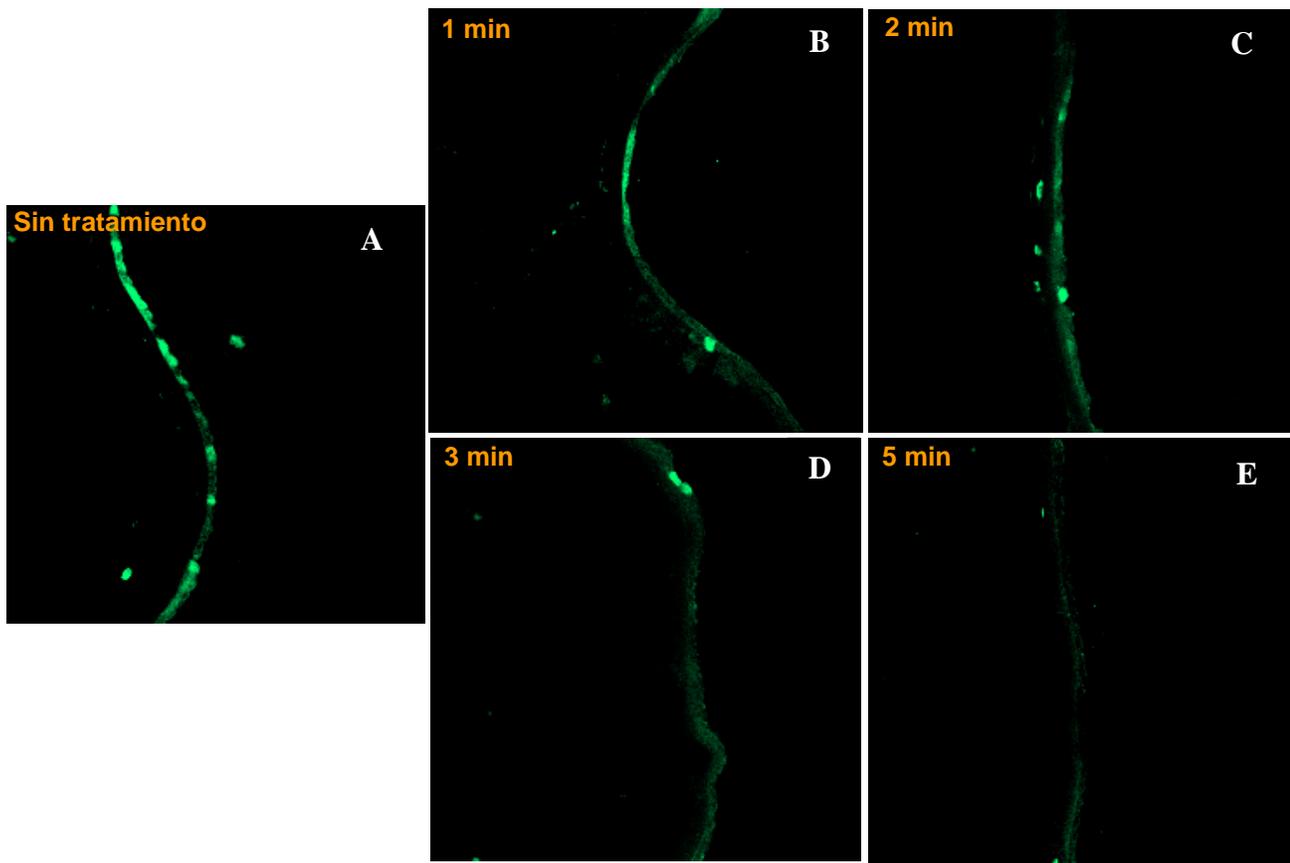


Figura 14. Inhibición con tripsina/EDTA de la incorporación de MMP-9 en el amnios después de 3 horas de cultivo. La membrana amniótica se trató a diferentes tiempos con tripsina/EDTA, antes de cultivarla con MMP-9/FITC. Los colores corresponden a las señales fluorescentes de: verde, MMP-9/FITC. Aumento 20X.

- A. Amnios sin tratamiento con tripsina/EDTA (control).
- B. Amnios tratado con tripsina/EDTA por 1 min.
- C. Amnios tratado con tripsina/EDTA por 2 min.
- D. Amnios tratado con tripsina/EDTA por 3 min.
- E. Amnios tratado con tripsina/EDTA por 5 min.

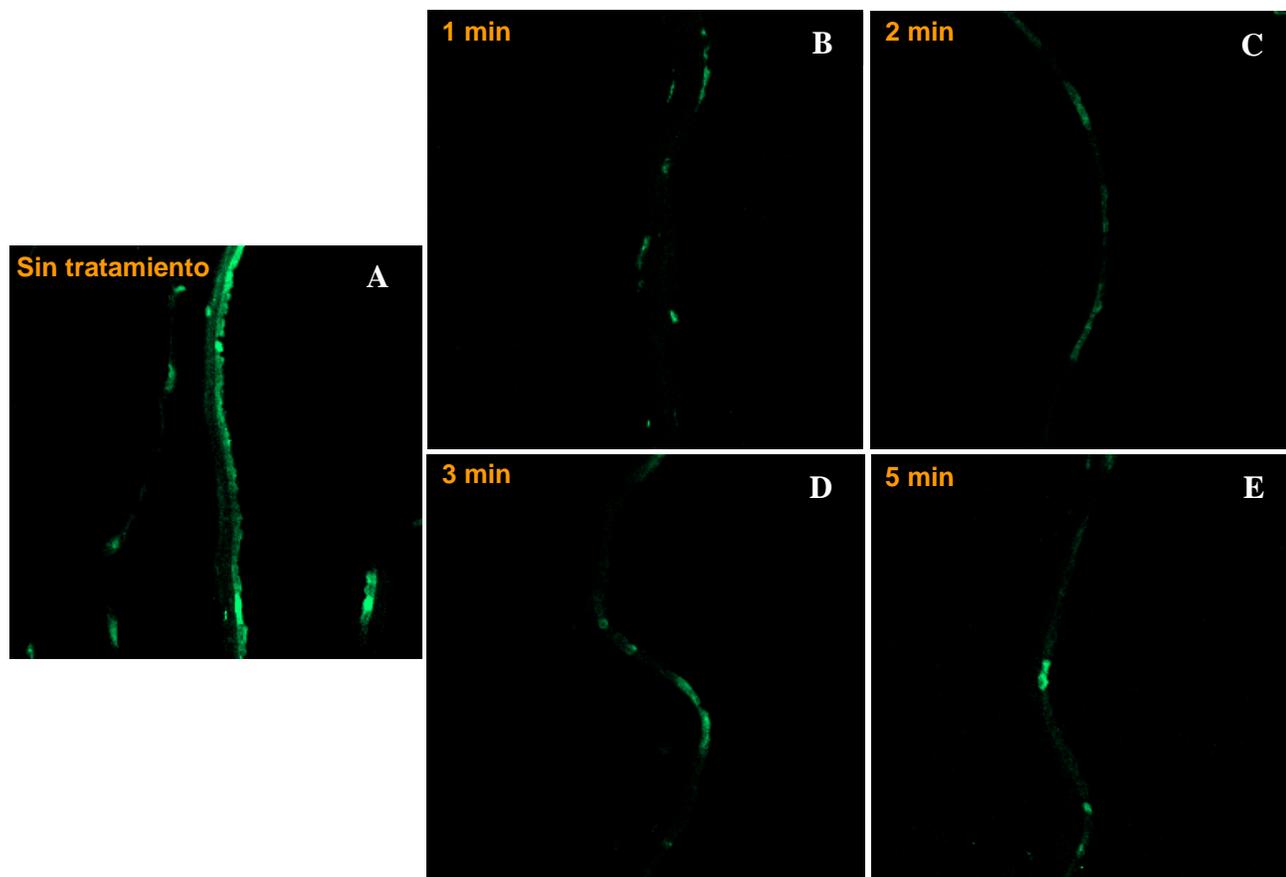


Figura 15. Inhibición con tripsina/EDTA de la incorporación de MMP-9 en el amnios después de 6 horas de cultivo. La membrana amniótica se trató a diferentes tiempos con tripsina/EDTA, antes de cultivarla con MMP-9/FITC. Los colores corresponden a las señales fluorescentes de: verde, MMP-9/FITC. Aumento 20X.

A. Amnios sin tratamiento con tripsina/EDTA (control).

B. Amnios tratado con tripsina /EDTA por 1 min.

C. Amnios tratado con tripsina/EDTA por 2 min.

D. Amnios tratado con tripsina/EDTA por 3 min.

E. Amnios tratado con tripsina/EDTA por 5 min.

DISCUSIÓN

Las membranas corioamnióticas delimitan el ambiente del feto y le permiten su desarrollo durante la gestación. Estas estructuras, son tejidos multilaminares integrados por dos principales capas: el amnios y el corion. Ambas capas histológicas, están formadas en su mayor parte por tejido conectivo, cuya matriz incluye a diferentes tipos de colágena incluyendo los tipos I, III, IV, V y VI (Xu y col, 2002; Lei y col, 1999; Parry y Straus, 1998). La colágena en las membranas corioamnióticas provee el soporte estructural y la fuerza tensil al tejido, lo que permite que soporten la presión intramniótica a lo largo de la gestación. El principal esqueleto de las membranas fetales es la capa compacta del amnios, ya que en esta zona reside el 75% de la fuerza tensil y mecánica durante el desarrollo fetal. La capa compacta está compuesta exclusivamente por un arreglo de fibras de colágena de tipo I y III, que forman uniones paralelas las cuales son estabilizadas por fibras de colágena tipo V y VI, lo que le proporciona una estructura organizada y con mayor fuerza (Vadillo-Ortega y Estrada-Gutiérrez, 2005).

Al final del desarrollo gestacional el útero se contrae, el cérvix se dilata y las membranas corioamnióticas se rompen dando como resultado la expulsión del feto. A esta serie de eventos sincronizados se le denomina trabajo de parto y sucede entre las 37 y 40 semanas de gestación (Bryant-Greenwood y Millar, 2000; Garfield y Maner, 2007).

Durante la fase tardía del trabajo de parto normal se favorece la ruptura de las membranas corioamnióticas, que generalmente coincide con la dilatación avanzada del cuello uterino. La ruptura fisiológica de las membranas corioamnióticas implica un proceso de debilitamiento estructural de la matriz extracelular del tejido fetal. Las metaloproteasas de matriz extracelular una familia de enzimas que tienen como sustrato a los distintos componentes las membranas fetales, participan

activamente en la degradación de las membranas corioamnióticas al momento del trabajo de parto (Van den Steen y col, 2002).

Se ha postulado que diferentes estímulos que afectan a las poblaciones celulares de las membranas, desencadenan la secreción de estas enzimas, que inician la degradación de la matriz extracelular y con ello se pierde la estructura lo que favorece la ruptura de las membranas fetales. El mecanismo propuesto para explicar la ruptura de estos tejidos consiste en el ataque enzimático a las capas histológicas ricas en tejido conectivo, en específico a la capa compacta del amnios, llevando a la pérdida de la estructura lo que disminuye de su resistencia lo que eventualmente aparece como la ruptura de las membranas corioamnióticas (Estrada-Gutiérrez G y col, 2005).

Estudios previos mostraron que la MMP-9 es la metaloproteasas de matriz más relacionada al trabajo de parto, ya que se incrementa su expresión y actividad en las membranas corioamnióticas hacia el final de la gestación. Un incremento en la cantidad y la actividad de la MMP-9 está asociado a la ruptura de las membranas corioamnióticas tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Lei y col, 1996; Parry and Strauss, 1998; Vadillo-Ortega y col, 1995). La MMP-9 es sintetizada por diferentes tipos celulares que en su mayoría se localizan en el corion, el lado opuesto de la capa compacta. Por lo cual, es esperable que exista un mecanismo de tránsito transmembranal para que la MMP-9 pueda cruzar desde la coriodecidua hasta las capas del amnios ricas en tejido conectivo, y así provocar el debilitamiento estructural de las membranas fetales durante el trabajo de parto.

Se ha documentado que las membranas corioamnióticas son tejidos que permiten el paso de moléculas desde el compartimiento amniótico, hasta la circulación sanguínea local. Los estudios centrados en el análisis del transporte de compuestos en esta zona, han podido demostrar que el paso de compuestos pequeños se realiza por difusión simple que hace suponer la existencia de rutas

transmembranales para el transporte de solutos de bajo peso molecular (Hardy y col, 1989; Guier-Bara y Bara, 1984; King, 1985).

En este trabajo diseñamos y estandarizamos un modelo *in vitro* en el que aplicamos la metodología de pulso/caza, utilizando a la MMP-9 conjugada con isotiocianato de fluoresceína y posteriormente colocándola del lado del corion del tejido fetal con el fin de analizar su cinética de paso a través de los diferentes estratos del tejido. Con esta metodología se identificó el paso transmembranal de la MMP-9 desde el corion hasta el amnios. El tiempo que transcurrió desde que se adicionó la MMP-9 hasta aparecer en el extremo opuesto de las membranas y el cruce ordenado a través de los diferentes estratos de las membranas y su localización específica en ciertas regiones del amnios, permite suponer que se trata de un mecanismo de transporte específico.

La metodología empleada demostró que la MMP-9 que se adicionó del lado del corion de las membranas, se incorporó gradualmente conforme aumentaba el tiempo de incubación en las diferentes capas histológicas hasta arribar al amnios. Este tránsito fue evidente desde la primera hora hasta las 24 horas de incubación tanto en membranas provenientes de mujeres que tuvieron trabajo de parto y MCA de mujeres sin trabajo de parto. A las 24 horas de incubación se observó mayor incorporación de la MMP-9 en ambos grupos de membranas.

Se observaron diferencias en la translocación intratisular de la MMP-9 entre membranas provenientes de mujeres con y sin trabajo de parto, siendo en las primeras más evidente sin considerar los distintos tiempos de incubación. Por lo que se puede interpretar que el tránsito tisular de esta proteasa es más eficiente en el tejido que proviene de mujeres con trabajo de parto siendo un mecanismo para favorecer la ruptura de los tejidos fetales al momento del trabajo de parto.

Al hacer una comparación entre la incorporación de la MMP-9 en los diferentes estratos de las MCA provenientes de mujeres con y sin trabajo de parto, se observó que en las MCA que tuvieron trabajo de parto la MMP-9 se localiza principalmente en el interior de las células del corion y en el interior de las células del amnios. En contraste con las membranas que no tuvieron trabajo de parto, la MMP-9 se situó afuera y adentro de las células del corion y en menor proporción en las células del amnios. Estas diferencias pueden deberse a que las membranas con trabajo de parto son tejidos presentan cambios funcionales ligados al desarrollo del trabajo de parto, aunque aún no conocemos ninguno de estos detalles. Adicionalmente cambios bioquímicos como la activación de enzimas colagenolíticas (Estrada-Gutierrez G, 2005), mayor flujo de calcio extracelular proveniente del endometrio, el incremento en la producción de prostaglandinas (Prostaglandina E₂) en el amnios y otros mediadores de la inflamación como la prostaglandina deshidrogenasa (PGDH) y la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en el corion son alteraciones que facilitan la ruptura de las membranas corioamnióticas durante el trabajo de parto (Smith R, 2007).

La existencia del paso transtisular de la MMP-9 a través de la organización estructural del tejido conectivo que brinda soporte a las membranas corioamnióticas, obligó al análisis de su especificidad. Para ello se utilizó a la albúmina conjugada con FITC como un control negativo. La albúmina es una proteína de menor peso molecular (60 kDa) que la MMP-9 (92 kDa), con estructura globular y abundante en el ser humano. La albúmina mostró no tener paso a través de los diferentes estratos de las MCA. Tampoco existieron diferencias en el comportamiento de la albúmina en membranas provenientes de mujeres con y sin trabajo de parto; lo que hace al tránsito tisular específico para MMPs.

Estudios de inmunolocalización han descrito que tanto células del corion como el epitelio amniótico son capaces de secretar MMP-9 durante el trabajo de parto, sin embargo, la metodología utilizada por otros autores solo detecta a la MMP-9 que se encuentra localizada en un sitio específico y no es capaz de distinguir si es enzima producida en forma local ó de otro origen. Al analizar el movimiento de la MMP-9 a través de las membranas corioamnióticas durante tiempos específicos sugieren la existencia de un paso tisular gradual y progresivo de esta enzima que puede tener un papel trascendental en la ruptura de las membranas fetales.

La MMP-9 que se translocó en las membranas corioamnióticas se encontró como homodímero o heterodímero con un peso molecular de aproximadamente 200 kDa. Esta forma estructural de la MMP-9 ha sido descrita por otros autores, y corresponde a una forma funcional activa.

La caracterización del tránsito transtisular de la MMP-9 mostró que la enzima al arribar al tejido amniótico es capaz de introducirse al epitelio amniótico; localizándose en el ambiente citoplasmático de éste y no necesariamente en la matriz extracelular como se ha propuesto anteriormente. El depósito de la MMP-9 en el citoplasma celular del amniocito puede ser un mecanismo de almacenaje para la liberación oportuna para la degradación del tejido conectivo que brinda soporte a la membrana corioamniótica, permitiendo así la ruptura de ésta durante el trabajo de parto.

Por otro lado, se inició la descripción del probable mecanismo por el cuál el epitelio amniótico está almacenando a la MMP-9. Al eliminar temporalmente las estructuras de la superficie celular del amniocito, se observó una importante disminución en su almacenamiento. Por lo que se puede inferir que mecanismo por el cual las células del epitelio amniótico pudieran estar incorporando la MMP-9

que se ha translocado desde el corion hasta este epitelio, podría estar mediado por transportadores localizados en la superficie celular del epitelio amniótico (Figura 16).

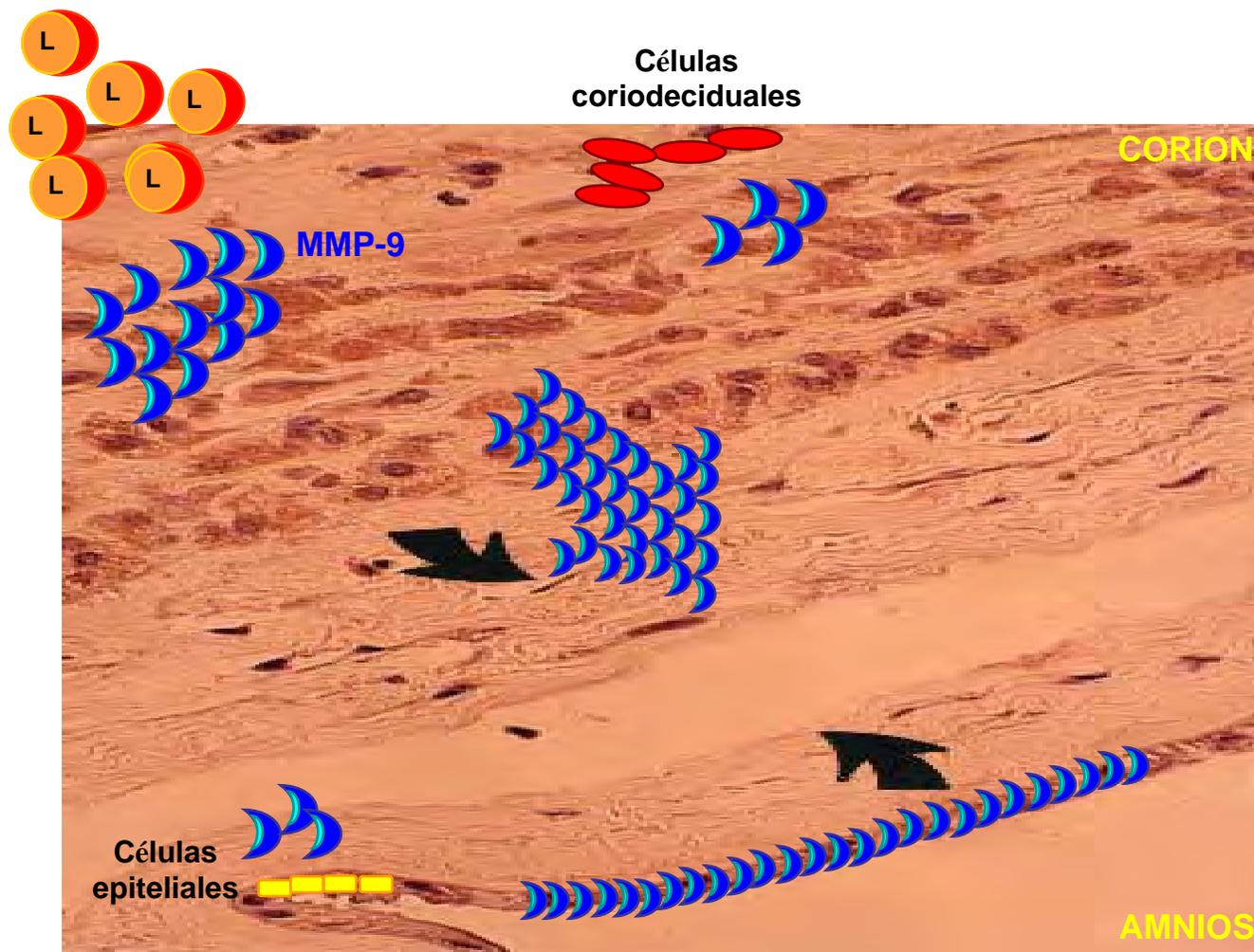


Figura 16. Modelo propuesto de translocación tisular de la MMP-9 en las membranas corioamnióticas humanas. L= leucocitos, MMP-9 = azul. Las células coriodeciduales, epiteliales y las inmunológicas infiltradas producen MMP-9 en diferente concentración. Sin embargo, las células que la producen en mayor proporción se localizan en la coriodecidua por lo que la MMP-9 existe un mecanismo por el cual cruza desde la coriodecidua hasta el amnios donde se localiza su principal sustrato. Una vez en el amnios, la MMP-9 es capaz de incorporarse dentro del epitelio amniótico mediante estructuras de superficie de membrana de dicho epitelio.

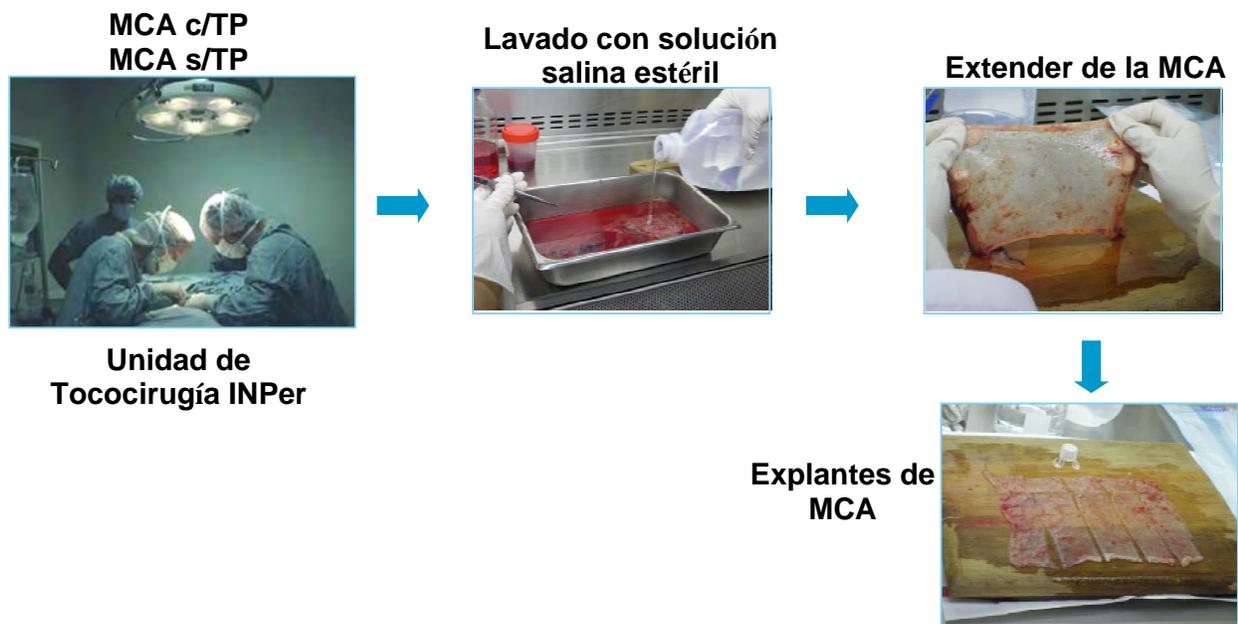
La comprensión adecuada de los mecanismos que operan bajo condiciones normales para desencadenar la ruptura de las membranas corioamnióticas es indispensable para entender la patología de la ruptura prematura de membranas. Por lo que los resultados obtenidos en este trabajo llevan a deducir la existencia de un mecanismo específico de translocación tisular para MMP-9, que regula selectivamente su paso a través de las capas histológicas del corioamnios, su depósito en el compartimento cercano a su sitio de acción y su probable latencia consecuente participando selectivamente en la ruptura de las membranas corioamnióticas en condiciones del trabajo de parto normal. Este trabajo aporta información en el entendimiento de los probables mecanismos mediante los cuales las MMPs pudieran estar realizando o regulando su función y permite la mejor comprensión del proceso de la ruptura de las membranas corioamnióticas.

CONCLUSIONES

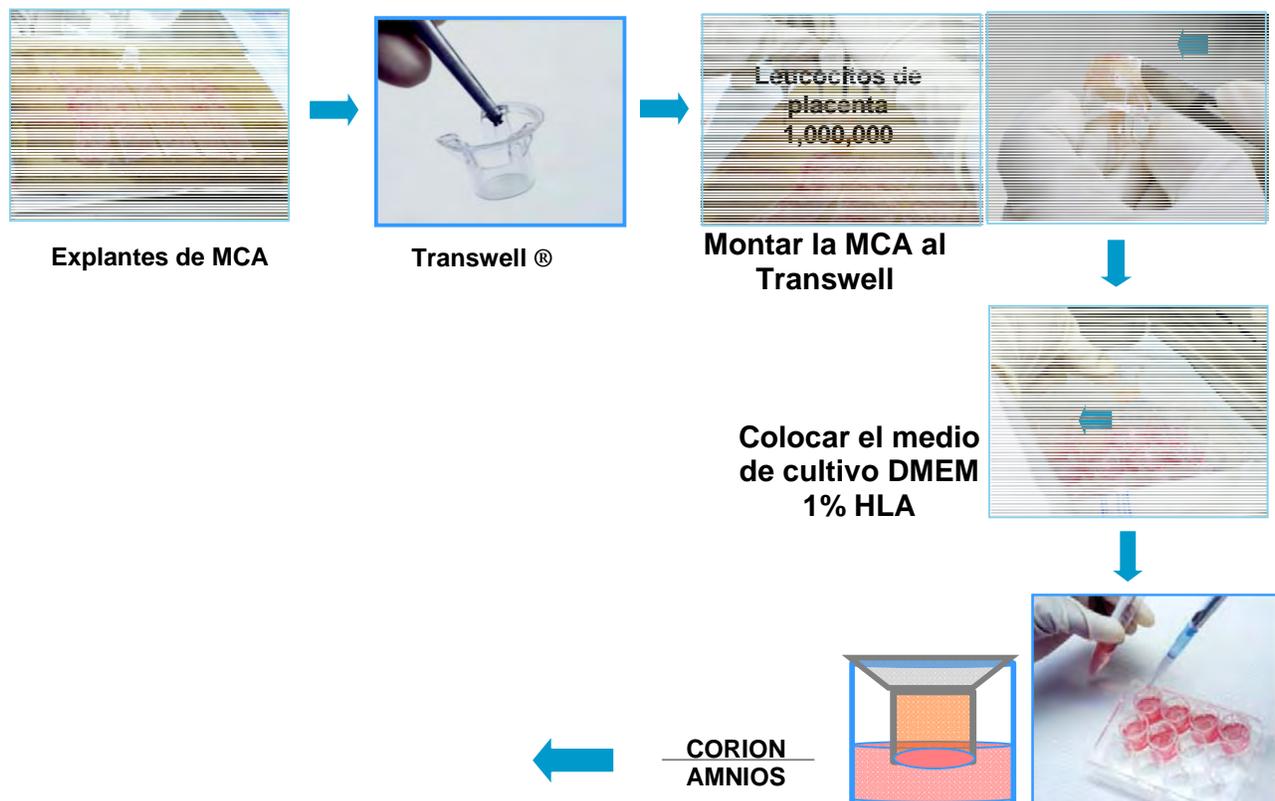
- Mediante un modelo *in vitro*, se identificó la translocación tisular de la MMP-9 dentro de los diferentes estratos histológicos de las MCA. Este proceso se lleva a cabo desde las la primera hora hasta las 24 horas de incubación.
- En MCA que provinieron de mujeres sin trabajo de parto, la MMP-9 se localiza principalmente en el interior de las células del corion y en el interior de las células del amnios.
- En MCA que no tuvieron trabajo de parto, la MMP-9 se situó afuera y adentro de las células del corion y en menor proporción en las células del amnios.
- Es posible extraer MMP-9 en estado nativo de los tejidos en el que se translocó.
- La MMP-9 se documentó localizada dentro del ambiente citoplasmático del epitelio amniótico.
- El mecanismo de captura de la MMP-9 dentro del amniocito está probablemente mediado por receptores localizados en la superficie celular del epitelio amniótico.

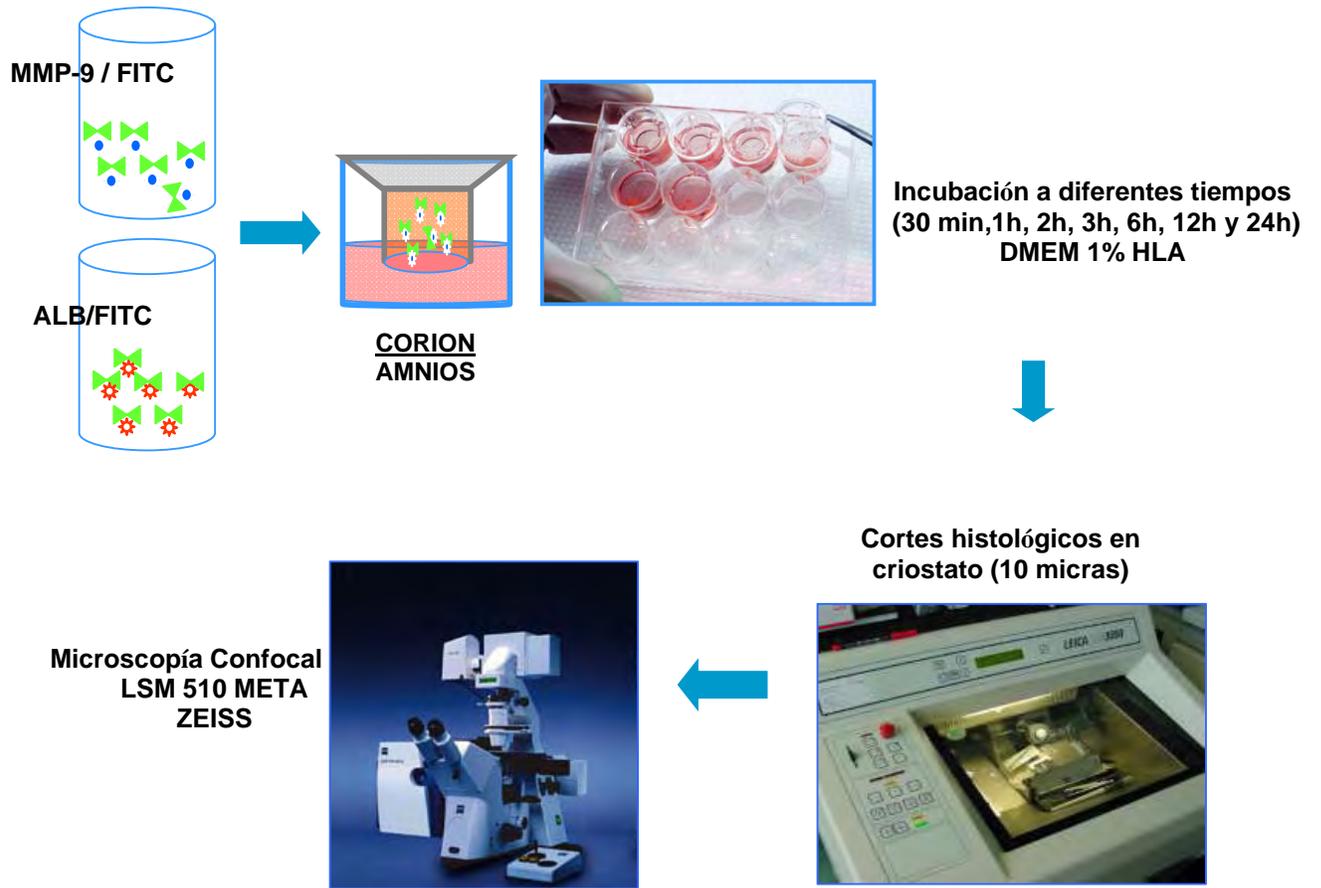
ANEXOS

1. Diagrama para la obtención de explantes de MCA



2. Diagrama de cultivo de MCA con MMP-9/FITC ó ALB/FITC





REFERENCIAS

1. Allan JA, Docherty AJ, Barker PJ, Huskinsson NS, Reynolds JJ, Murphy G. Binding gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. *Biochem J*, 309, 299-306, (1995).
2. Baneyx G, Ferril N, Gomez I, Wilson C L, Raines E W. A novel fluorescence-based approach to study pericellular regulation of MMP-9 activation. University of Washington, University of Milan.
3. Bell SC Malak TM. Structural and cellular biology of the fetal membranes. En Elder MG, Romero R , Lamont RF. *Preterm Labor*. Churchill Livingstone, New York, 401-428 (1997).
4. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev*, 4, 197-250 (1993).
5. Bryant-Greenwood G D, Millar L K. Minireview Human Fetal Membranes: Their Preterm Premature Rupture. *Biol Reprod*. 63, 1575-1579 (2000).
6. Bryant-Greenwood G D. The Extracellular Matrix of the Human Fetal Membranes: Structure and Function. *Placenta* 19, 1-11 (1998).
7. Champlaud MF, Lunstrum GP, Rousselle P, Nishiyama T, Keene DR, Burgeson RE. Human amnion contains a novel laminin variant, laminin 7, which like laminin 6, covalently associates with laminin 5 to promote stable epithelial-stromal attachment. *J Cell Biol* 132, 1189-1198 (1996).
8. Cuzner ML, Opdenakker G. Plasminogen activators and matrix metalloproteinases, mediators of extracellular proteolysis in inflammatory demyelination of the central nervous system. *J Neuroimmunol*, 94, 1-14 (1999).
9. Estrada-Gutierrez G, Zaga V, Gonzalez-Jimenez M A, Beltran-Montoya J, Maida-Claros R, Giono-Cerezo S, Vadillo-Ortega F. Inicial Characterization of the microenvironment that regulates connective tissue degradation in amnionchorion during normal labor. *Matrix Biology* 24, 306-312 (2005).
10. Fisher SJ, Cui T-Y, Zhang L, Hartman I, Grahl K, Zhang G-Y, Tarpey J, Damsky CH. Adhesive and degradative properties of human placental cytotrophoblast cell in vitro. *J Cell Biol*. 109, 891-902 (1989).
11. Garfield R E, Maner W L. Physiology and electrical activity of uterine contractions. *Semin Cell Dev Biol*. 18, 289-295 (2007).
12. Germain AM, Smith J, MacDonald PC, Casey ML. Human fetal membrane contribution to the prevention of parturition: uterotonina degradation. *J Clin Endocrinol Metab*. 78, 463-470 (1994).
13. Guet-Bara A, Bara Michel. Cellular and shunt conductance of human isolated amnion. Part 1. Effects of ouabain, DNP, miloride and fructose. *Bioelectrochem Bionerg*. 13, 39-47 (1984).
14. Hardy MA, Leonard RT, Scheide JI. Cellular permeation pathways in a leaky epithelium: the human amniochorion. *Biol Cell*. 66, 149-153 (1989).

15. Hieber AD, Corcino D, Motosue J, Sandberg LB, Roos PJ, Yu SY, Csiszar K, Kagan HM, Boyd CD, Bryant-Greenwood GD. The detection of elastin in the human fetal membranes: proposed molecular basis for elasticity. *Placenta*, 18, 301-312 (1997).
16. Kearns M, Lala PK. Characterization of hematogenous cellular constituents of the murine decidua: a surface marker study. *J Reprod Immunol* 1985;8:213-34
17. Keelan JA, Blumenstein M, Helliwell RJA, Sato TA, Marvin KW, Mithcell MD. Cytocines, Prostaglandins and Partuition-A Review. *Placenta*, 24, Supplement A, Trophoblast Research, Vol. 17, S33-S46 (2003).
18. Kent ASH, Sullivan MHF, Elder MG. Transfer of cytokines thorough human fetal membranes. *Journal Of Reproduction and fertility* 100, 81-84 (1994).
19. King BF. Distribution and characterization of anionic sites in the basal lamina of developing human amniotic epithelium. *Anat Rec.* 212, 57-62 (1985).
20. Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengelow H, Borregaard N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with uman neutrophil gelatinase. *J Biol Chem*, 268, 10425-10432 (1993).
21. Lacraz S, Isler P, Vey E, Welgus HG, Dayer JM. Direct contact between T lymphocytes and monocytes is a major pathway for induction of metalloproteinase expression. *J Biol Chem*, 259, 22027-22033 (1994).
22. Lei H, Kalluri R, Furth E E, Baker A H, Straus III J F. Rat amnion type IV collagen composition and metabolism: implications for membrane breakdown. *Biol Reprod.* 60, 176-182(1999).
23. Lockwood CJ, Senyei AE, Dische MR, Casal D, Shah K, Thung SN, Jones L, Deligdish L, Garite TJ. Fetal fibronectin in cervical and vaginal secretions as a predictor of preterm delivery. *N Engl J Med.*, 325, 669-674 (1991).
24. Malak TM, Ockleford CD, Bell SC Dalglish R, Bright N, MacVicar J. Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term fetal membranes. *Placenta* 305-406 (1993).
25. Malak TM, Sizmur F, Bell SC, Taylor DJ. Fetal fibronectin in cervicovaginal secretions as a predictor of preterm birth. *Br J Obstet Gynecol*, 103, 648-653 (1996).
26. Malik N, Greenfield BW, Wahl AF, Kiener PA. Activation of human monocytes through CD40 induces matrix metalloproteinases. *J Immunol*, 156, 3952-3960 (1996).
27. Meraz-Cruz N, Molina-Delgado G, 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.* 55 (1):36-42 (2003).
28. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 69, 652-573 (2006).

- 29.** Nakatani S, Ikura M, Yamamoto S, Nishita Y, Itadani S, Habashita H, Sugiura T, Ogawa K, Ohno H, Takahashi K, Nakai H, Toda M. Design and synthesis of novel metalloproteinase inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 14, 5402-5422 (2006).
- 30.** Parry S, Straus III J. Premature Rupture of the Fetal Membranes. In *Mecanism of Disease.* 338 (10) 663-670 (1998).
- 31.** Reyna-Villasmil E, Torres-Montilla M, Reyna-Villasmil R, Mejias-Montilla. Estructura y función de la matriz extracelular de las membranas fetales humanas. *Rev Obstet Ginecol Venez.* 63 (1), 19-30, (2003).
- 32.** Shimamori Y, Watanabe Y, Fujimoto Y. Caracterización of gelatinases in human placenta. *Biochem Mol Med,* 56, 84-86 (1995).
- 33.** Smith R. Parturition. *Mechanisms of Disease.* *N Engl J Med.* 356:271-83 (2007).
- 34.** Vadillo Ortega F, Córdoba K, Quezada A, Beltrán Montoya J, Gutiérrezz-Corchado S, Menocal-Tobías G. Evaluación de la fibronectina oncofetal y de la gelatinasa de 92 kDa (MMP-9) como marcadores bioquímicos del progreso de trabajo de parto. *Perinatol Reprod Hum* 16:108- 112, (2002).
- 35.** Vadillo Ortega, F, Hernandez Miranda A, Bermejo Martinez L, Beltran Montoya J, Gonzalez Avila G, Transicion de la forma enzimática latente a activa como un modelo de regulacion de la degradación de matriz extracelular en el corioamnios durante el trabajo de parto humano. *Ginecol Obstet Mex,* 63: 166-72. (1995)
- 36.** Vadillo-Ortega F, Beltran-Montoya J, Zaga-Clavelina V. Infección intrauterina y nacimiento pretérmino. *Rev Invest Clin.* 56 (1):93-102 (2004).
- 37.** Vadillo-Ortega F, Bermejo-Mártinez L, Pfeffer F. Ruptura prematura de membranas: Mecanismos de la enfermedad. *Perinatol Reprod Hum.* 8 (4): 180-9 (1994).
- 38.** Vadillo-Ortega F, Estrada-Gutiérrez G. Role of matrix metalloproteinases in preterm labour. *BJOG* 112(1): 19-22 (2005).
- 39.** Vadillo-Ortega F, Gonzalez G, Furth E, Lei H, Muschel R, Stetler-Stevenson W, Strauss JF. 92-kDa type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) activity in human amniochorion increases with labor. *Am. J. Pathol.* 146, 148-156 (1995).
- 40.** Vadillo-Ortega F, Gonzalez-Avila G, Karchmer S, Cruz NM, Ayala-Ruiz A, Lama MS. Collagen metabolism in premature rupture of amniotic membranes. *Obstet Gynecol.* 75(1):84-8. (1990).
- 41.** Van den Steen PE, Opendakker G, Wormald MR, Dwek RA, Rudd PM. Matrix remodeling enzymes, the protease cascade and glycosylation. *Biochim Biophys Acta.* 1578, 61-73 (2001).
- 42.** Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci USA,* 87, 5578-5582 (1990).

43. Vega-Sánchez R, Estrada-Gutierrez G, Cébulo-Vázquez A, Beltrán-Montoy J, Vadillo-Ortega F. Caracterización del espacio coriodecidual como un microambiente rico en moléculas efectoras que inducen la rotura de las membranas corioamnióticas durante el trabajo de parto. *Ginecol Obstet Mex* 72: 593-601 (2004).
44. Wang T, Schneider J. Location of anions in human amnion: evidence for a non-placental route for the transfer of proteins into amniotic fluid. *Arch Gynecol* 231:269-277 (1982).
45. Werb Z, Ashkenas J, Macaulay A, Weisen JF. Extracellular matrix remodeling as a regulator of stromal-epithelial interactions during mammary gland development, involution and carcinogenesis. *Braz J Med Biol Res.* 29, 1087-1097 (1996).
46. Woessner JF, Nagase H, MMP Sequences. En: *Matrix Metalloproteinases and TIMPs*. Oxford University Press, 1a. Ed. 11-40 (2000).
47. Xu Ping, Alfaidy N, Challis J R G. 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 Metab.* 87(3):1353-1361 (2002).
48. Yamada KM. Fibronectin and other interactive glycoproteins. En: *Cell Biology of Extracellular Matrix*. 2a Edición. New York & London: Plenum Press. 111-139 (1991).
49. Zaga V, Estrada-Gutierrez G, Beltran-Monroy J, Maida-Claros R, Lopez-Vancell R, Vadillo-Ortega F. Secretions of interleucin-1 β and tumor necrosis factor α by whole fetal membranes depend on inicial interactions of amnion of choriodecidual with lipopolysaccharides or group B streptococci. *Biol Reprod.* 71, 1296-1302 (2004).
50. Zaga-Clavelina CV, López- Vacell R, Maida-Claros R, Beltran-Montoya J, Vadillo-Ortega F. Desarrollo de un modelo experimental para la caracterización de la respuesta funcional del corioamnios humano. *Perinatol Reprod Hum* 18, 162-171 (2004).

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS Y CONGRESOS DERIVADOS DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

- **Marzo 2008 Society for Gynecologic Investigation 55th Annual Scientific Meeting, San Diego, Ca. USA.**
Presentación en poster del trabajo "Expression, Tissue Traffic and Activation of MMP-9 in Human Fetal Membranes during Labor"
- **Octubre 2007 58° Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia, Monterrey, N.L. Federación Mexicana de Ginecología y Obstetricia A.C.**
2° Lugar en el concurso "Dr. Eliseo Ramírez" de Investigación Básica con el trabajo "*Análisis Tridimensional de la estructura de las membranas corioamnióticas humanas a término de la gestación*".
- **Octubre 2007 Participación en el XII Encuentro Nacional de Investigadores**
Exposición oral del trabajo "*Expresión, tránsito intratisular y activación de la MMP-9 en las membranas corioamnióticas humanas durante el trabajo de parto*", Instituto Nacional de Perinatología.
Coordinación General de los Institutos Nacionales de Salud, Secretaría de Salud.