

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**PARTICIPACIÓN DE CÉLULAS INMUNOLÓGICAS CORIODECIDUALES EN
LA RUPTURA FISIOLÓGICA Y PATOLÓGICA DE LAS MEMBRANAS
CORIOAMNIÓTICAS HUMANAS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

L. N. RODRIGO VEGA SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. FELIPE VADILLO ORTEGA

COMITÉ TUTORAL: DRA. MERCEDES PERUSQUÍA NAVA

DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

MÉXICO D.F.

2009



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. HORACIO MERCHANT LARIOS

SECRETARIO: DR. FELIPE VADILLO ORTEGA

VOCAL: DR. JAVIER CABIEDES CONTRERAS

VOCAL: DR. JESÚS CHIMAL MONROY

VOCAL: DR. MOISÉS SELMAN LAMA

El trabajo experimental de esta tesis se llevó a cabo en el laboratorio de la Dirección de Investigación del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes como parte de mis estudios de posgrado en el Doctorado de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Mis estudios de Doctorado fueron posibles gracias al apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca número 181447, y por la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) de la UNAM a través de la matrícula número 504006841.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Mi más sincero y profundo agradecimiento al Dr. Felipe Vadillo Ortega por iniciarme en el mundo de la investigación, por permitirme ser parte de su grupo y por todo su apoyo y enseñanza.

Agradezco a Lupita Estrada y a Vero Zaga por su paciencia y dedicación al enseñarme el trabajo de laboratorio.

Gracias a la Dra. Mercedes Perusquía y al Dr. Alejandro Zentella por su confianza, afecto e invaluable orientación durante mi proyecto de doctorado.

Agradezco especialmente a los miembros de mi comité de sinodales, cuyos comentarios y sugerencias enriquecieron enormemente la tesis.

Esta tesis está dedicada a Pimpi... por todo!

CONTENIDO

Índice de tablas.....	7
Índice de figuras	7
RESUMEN	8
ANTECEDENTES	12
Fisiopatología del trabajo de parto.....	12
Activación del miometrio.....	13
Maduración cervical	17
Ruptura de las membranas corioamnióticas.....	20
El trabajo de parto como un proceso de tipo inflamatorio.....	23
Citocinas y quimiocinas	24
Moléculas de adhesión celular	27
Infiltrado leucocitario.....	29
JUSTIFICACIÓN.....	31
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	31
HIPÓTESIS	32
OBJETIVOS	33
Objetivo general	33
Objetivos particulares.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
Pacientes y material biológico	34
Pacientes	34
Sangre periférica materna.....	35
Sangre placentaria.....	35
Aislamiento de leucocitos.....	35
Fenotipificación de subpoblaciones de leucocitos.....	36
Caracterización funcional de leucocitos	39
Expresión basal de citocinas y <i>MMP9</i>	39
Cultivo celular y estimulación con lipopolisacárido	41
Expresión de moléculas de adhesión celular en leucocitos.....	43

Análisis estadísticos	44
RESULTADOS	45
La proporción de monocitos y linfocitos T es diferente en sangre placentaria	45
Los leucocitos placentarios muestran un perfil de expresión proinflamatorio y colagenolítico	47
Los leucocitos placentarios secretan cantidades diferentes de citocinas y MMP-9 ante el estímulo con LPS.....	49
Los leucocitos placentarios aumentan su expresión de <i>ITGAM</i> durante el trabajo de parto	53
DISCUSIÓN.....	55
CONCLUSIONES	60
PERSPECTIVAS.....	61
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS DEL PRESENTE TRABAJO	70

Índice de tablas

Tabla 1. Citocinas y quimiocinas que aumentan en la interfase materno-fetal humana con el trabajo de parto.	25
Tabla 2. Porcentajes de subpoblaciones de leucocitos en sangre periférica y sangre placentaria al término de la gestación.	46

Índice de figuras

Figura 1. Imagen representativa de las regiones establecidas y los parámetros utilizados para el análisis de citometría de flujo.	38
Figura 2. Expresión génica basal de citocinas por leucocitos periféricos y placentarios al término de la gestación.	48
Figura 3. Cuantificación de citocinas después de la estimulación con LPS.	51
Figura 4. Cuantificación de MMP-9 total y activa después de la estimulación con LPS.	52
Figura 5. Expresión génica de <i>ITGAL</i> e <i>ITGAM</i> por leucocitos periféricos y placentarios al término de la gestación.	54

RESUMEN

La ruptura de las membranas fetales durante el trabajo de parto humano está asociada con un proceso de tipo inflamatorio localizado en la interfase materno-fetal. Existen evidencias de que subpoblaciones específicas de leucocitos son atraídas a la coriodecidua, las cuales al establecerse en este espacio condicionan el microambiente inflamatorio local y probablemente participan en la ruptura de las membranas.

En este trabajo nuestro objetivo fue analizar la composición celular y algunas características funcionales de los leucocitos placentarios antes y durante el trabajo de parto, concretamente su perfil de expresión y secreción de marcadores proinflamatorios, colagenolíticos y de adhesión celular.

Observamos que la proporción de monocitos CD14⁺ y de linfocitos T CD3⁺ es diferente en la circulación placentaria en comparación con la periférica materna, lo que sugiere el reclutamiento específico y participación de estas células en el proceso del trabajo de parto.

Durante el trabajo de parto, los leucocitos placentarios muestran un perfil de expresión proinflamatorio distinto al de los leucocitos periféricos, específicamente en cuanto a IL-1 y su antagonista IL-1RN. Además, los leucocitos placentarios muestran una mayor secreción de las citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 y IL-6 en respuesta a un estímulo externo como LPS.

Los leucocitos placentarios, al igual que los periféricos, incrementan su expresión y secreción del marcador colagenolítico MMP-9 durante el trabajo de parto, en cantidades muy superiores a lo que producen los tejidos locales.

Adicionalmente, los leucocitos placentarios incrementan su expresión de la integrina Mac-1 durante el trabajo de parto, lo que favorecería su permanencia en la interfase materno-fetal al interactuar con la ICAM-1 expresada por los tejidos gestacionales.

En conjunto nuestros resultados soportan la hipótesis de que al término de la gestación se reclutan subpoblaciones específicas de leucocitos a la interfase materno-fetal, principalmente monocitos y linfocitos T, cuya permanencia en este espacio está mediada por la expresión local de moléculas de adhesión celular específicas.

El perfil de expresión y secreción de citocinas proinflamatorias y MMPs que muestran los leucocitos placentarios, así como su capacidad de respuesta a estímulos externos, les permitiría modular el microambiente inflamatorio y colagenolítico local que se genera en los tejidos gestacionales durante el trabajo de parto humano, contribuyendo además de forma significativa a la degradación y ruptura de las membranas fetales.

ABSTRACT

Rupture of the fetal membranes during human labor is associated with an inflammatory process localized to the maternal-fetal interface. Evidences show that specific subsets of leukocytes are attracted to the choriodecidua and after homing they condition a local inflammatory microenvironment and may participate in the rupture of the membranes.

In this study our aim was to analyze the cellular composition and some functional characteristics of placental leukocytes before and after labor, especially their expression and secretion patterns of pro-inflammatory, collagenolytic and adhesion markers.

We found that the proportion of CD14⁺ monocytes and CD3⁺ T lymphocytes is different in placental circulation compared to maternal periphery, suggesting a specific recruitment and participation of these cells in labor.

During labor, placental leukocytes show a distinct pro-inflammatory expression pattern than peripheral leukocytes, mainly regarding IL-1 and its antagonist IL-1RN. Moreover, placental leukocytes show a differential secretion of pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 and IL-6 in response to an external stimulus such as LPS.

Placental leukocytes, as those from periphery, increase their expression and secretion of the collagenolytic marker MMP-9 during labor, in much higher amounts than those produced by the local tissues.

Additionally, placental leukocytes increase their expression of the integrin Mac-1 during labor, which could allow their homing in the maternal fetal-interface by interacting with ICAM-1 expressed by gestational tissues.

Altogether, our results support the hypothesis that at term gestation a specific subset of leukocytes is recruited to the maternal-fetal interface, including monocytes and T lymphocytes, whose homing is mediated by the local expression of specific cell adhesion molecules.

The expression and secretion patterns of pro-inflammatory cytokines and MMPs shown placental leukocytes, together with their increased response to external stimulus would allow them to modulate the inflammatory and collagenolytic microenvironment that is characteristic of gestational tissues during human labor, and to further contribute to the degradation and rupture of the fetal membranes.

ANTECEDENTES

Fisiopatología del trabajo de parto

En el ser humano, el trabajo de parto normal a término se define como aquel que se presenta entre la semana 37 y la 40 de gestación, tomando como referencia la fecha de la última menstruación (Grupo-Mexicano-de-Consenso 2007). Este evento se caracteriza de manera terminal por tres procesos: 1. La activación del miometrio que lleva a contracciones uterinas; 2. La maduración cervical que culmina con el borramiento y dilatación del cuello uterino y 3. La ruptura de las membranas corioamnióticas con salida de líquido amniótico transvaginal. En condiciones fisiológicas estos eventos se presentan en forma sincronizada en cualquier momento después de la semana 37 de gestación, dando como resultado el trabajo de parto normal. Sin embargo, en ocasiones alguno de estos mecanismos puede activarse de forma aislada antes de que la gestación llegue a término. En estos casos se pueden presentar distintas patologías obstétricas, como la amenaza de parto pretérmino, la incompetencia cervical o la ruptura prematura de membranas, que explican el síndrome conocido como nacimiento pretérmino (Grupo-Mexicano-de-Consenso 2007).

A pesar de que en los años recientes se ha incrementado mucho el conocimiento de los mecanismos fisiopatogénicos del nacimiento pretérmino, aún no se ha resuelto de manera satisfactoria la interrogante de si el nacimiento pretérmino consiste, en lo general, en la activación temprana de los mecanismos que

conducen al trabajo de parto normal a término. Algunas evidencias señalan que aunque existen rutas que podrían ser propias del nacimiento pretérmino, las vías finales son las mismas en ambas condiciones. A continuación se describen brevemente algunos de los mecanismos a nivel celular y molecular que mejor se han caracterizado y que se han asociado al desarrollo del trabajo de parto.

Activación del miometrio

Durante el embarazo, el útero experimenta cambios bioquímicos y morfológicos que tienen por objeto la adaptación del tejido muscular a las necesidades de la gestación y finalmente a su preparación para el momento del parto. Estos cambios resultan de la respuesta de las células del miometrio a señales mecánicas y endocrinas, que llevan a la activación de distintas vías de señalización intracelular, que inducen cambios estructurales y de función en dichas células y en sus interacciones con el tejido conectivo y con otras células.

Los cambios en la morfología, función y expresión génica de las células miometriales a lo largo de la gestación han llevado a proponer un modelo que distingue cuatro fases en el fenotipo de estas células, llamado "Modelo de programación del miometrio" (Lye *et al.* 2005). En la primera fase, llamada proliferativa, se observa expresión elevada del factor de crecimiento similar a insulina (IGF) y las proteínas de unión a IGF (IGFBP), así como de la molécula antiapoptótica Bcl-2 (Shynlova *et al.* 2007a). La segunda fase, de síntesis, se asocia al incremento en las concentraciones de progesterona, así como de la distensión miometrial. Se caracteriza por hipertrofia de las células y elaboración de

proteínas de matriz extracelular (MEC). En consecuencia, se observan cambios en la interacción de las células con la MEC gracias a la remodelación de las adhesiones focales (Shynlova *et al.* 2007b). El paso de la primera a la segunda fase parece estar dado por la activación parcial de las vías intracelulares que llevan a la muerte celular programada (apoptosis), en respuesta al estiramiento mecánico del tejido y a la hipoxia (Shynlova *et al.* 2009, Shynlova *et al.* 2006). La tercera fase se ha llamado contráctil y se observa un cambio drástico en la síntesis de MEC, favoreciéndose la síntesis de componentes de la membrana basal, específicamente laminina y colágena tipo IV. Asimismo, aumenta la expresión de proteínas directamente involucradas en la contractilidad del músculo, como son la -actina y la tropomiosina (Shynlova *et al.* 2004). La última fase es la del parto, donde el fenotipo de las células miométriales y su producción de moléculas efectoras se orientan a iniciar las contracciones y favorecer así la expulsión del feto. En esta fase se activan dos principales vías de transducción de señales, la vía del complejo proteico activador 1 (AP-1) y la vía de las cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK), cuyos productos finales son factores de transcripción que activan diversos genes cuya expresión se ha visto aumentada significativamente poco tiempo antes de iniciar el trabajo de parto, y que están directamente relacionados con el desarrollo de las contracciones uterinas. Entre estos genes se encuentran los receptores de estrógenos, de cortisol, de oxitocina (Ou *et al.* 1998), de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y de su receptor (Stevens *et al.* 1998), los receptores de prostaglandina E2 y F2 α (Al-

Matubsi *et al.* 2001, Myatt y Lye 2004) y de la conexina 43 que estabiliza las adhesiones focales de las células miométriales con la MEC, entre otros efectos (Macphee y Lye 2000, Mitchell y Lye 2001, Orsino *et al.* 1996, Ou *et al.* 1997).

Estas etapas de cambios se corresponden con distintas capacidades funcionales que muestra el miometrio durante la gestación. La etapa más larga de este proceso es la denominada fase de quiescencia, caracterizada por poca o nula actividad contráctil del miometrio, que involucra a las primeras dos etapas y que se alarga hasta el tercer trimestre de la gestación. La progesterona es el mediador más importante en el mantenimiento de esta etapa funcional y en muchos animales, no en el humano, la caída abrupta de la concentración de esta hormona esteroide, antecede inmediatamente al inicio de la actividad uterina que acompaña al parto (Shynlova *et al.* 2004). La siguiente etapa, que se inicia de manera variable y errática en el tercer trimestre de la gestación, corresponde a la fase de maduración del miometrio, que incluye todos los cambios mencionados en la fase tres y que de manera progresiva van preparando al miometrio para el momento del trabajo de parto, esta etapa es controlada por la expresión progresiva de cantidades crecientes de hormona liberadora de corticotropinas (CRH) (Grammatopoulos y Hillhouse 1999). La última etapa funcional es la manifestación de todas las capacidades contráctiles del miometrio durante el trabajo de parto, bajo el influjo de los compuestos uterotónicos como la oxitocina y las prostaglandinas.

De forma reciente se ha propuesto que el feto podría contribuir de forma importante en la regulación de los cambios que sufre el miometrio a lo largo de la gestación. Al parecer, las señales primarias (estrógeno, cortisol) que activan al miometrio en la fase del parto parecen deberse a un aumento en la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal del feto. Se ha demostrado que el aumento en la producción de cortisol, que depende mayoritariamente del feto a lo largo de la gestación, regula la expresión placentaria de la enzima sintetasa de prostaglandina H tipo 2 (PGHS2), en forma dependiente de estrógeno (Challis *et al.* 2002). La enzima PGHS2 participa en la síntesis de prostaglandinas, lo que resulta en un aumento en las concentraciones de prostaglandina E2 (PGE2), cuya potente acción uterotónica promueve las contracciones del miometrio, característicos del trabajo de parto.

El hallazgo de la participación del feto en la inducción de las fases finales de la activación del miometrio ha traído consigo un nuevo mecanismo explicativo de la inducción del trabajo de parto pretérmino. De esta manera podemos entender que la presencia de elementos que despiertan la alarma en el feto, con liberación de CRH y el consecuente aumento en la concentración circulante de cortisol, que pasará al microambiente uterino, terminarán induciendo la actividad del tejido muscular. Una condición como ésta puede ser despertada por ejemplo, por la presencia de una infección intrauterina que estimula a las células fetales que median la respuesta inmunológica innata a liberar mediadores inflamatorios, que al actuar sobre el sistema nervioso fetal terminarán liberando CRH.

Maduración cervical

A lo largo de la gestación, el cuello uterino mantiene su integridad estructural y constituye una barrera mecánica y funcional que cierra el paso al ambiente intrauterino, sin embargo, hacia el final del embarazo se presentan una serie de cambios bioquímicos y morfológicos que lo predisponen para el momento del trabajo de parto y que se manifiestan con cambios en la longitud del canal y del orificio cervical (Carreras Moratonas y Crispi Brillas 2004). Los cambios estructurales que experimenta el cérvix al acercarse el parto, a los que en conjunto se conoce como "borramiento cervical", están dados por diversas alteraciones bioquímicas, entre ellas la modificación de la organización e integridad de las fibras de colágena, así como alteración en las concentraciones de agua, proteoglicanos y ácido hialurónico. Dichos cambios están asociados con el aumento de mediadores inflamatorios como la interleucina 1 beta (IL-1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-), que inducen aumento en la síntesis de quimiocinas, prostaglandinas y metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs), una familia de proteasas que degradan selectivamente componentes de la matriz extracelular y que juegan un papel central en la remodelación del tejido conectivo del cuello uterino (Winkler *et al.* 1998a, Winkler *et al.* 1998b, Winkler *et al.* 1999a, Winkler *et al.* 1999b).

Se ha demostrado que durante el trabajo de parto hay un aumento en las concentraciones cervicales de IL-1 , TNF- e IL-6, así como de IL-8, citocina que induce quimiotaxis de neutrófilos. Las principales responsables de dicho

incremento en la síntesis tanto de las citocinas como de las MMPs no parecen ser las células locales del tejido cervical, sino más bien los leucocitos que durante el trabajo de parto invaden el tejido al ser atraídos por quimiotaxis (Young *et al.* 2002).

Se ha visto que el mantenimiento de la morfología del cuello uterino parece estar relacionado con la expresión diferencial del factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF) en las células del estroma cervical. En un modelo experimental de ratón se observó que la expresión de una de las isoformas de MITF (MITF-CX) disminuye significativamente durante la maduración cervical, para recuperar sus niveles normales a las 24 horas después del parto. Lo anterior sugiere que la actividad transcripcional de MITF juega un papel importante en el mantenimiento fisiológico de la integridad del cuello uterino, así como en el evento de maduración cervical durante el trabajo de parto (Word *et al.* 2007).

Las prostaglandinas son otro mediador conocido de los cambios cervicales, ejerciendo una acción proinflamatoria y actuando de forma sinérgica con citocinas como la IL-8. La acción de las prostaglandinas parece deberse a su efecto vasodilatador, alterando la permeabilidad de los vasos sanguíneos y aumentando el flujo sanguíneo local (Kelly 1996).

Se ha propuesto que el mediador final de los mecanismos que llevan a la dilatación y borramiento cervical es el óxido nítrico (NO), que es producido por cualquiera de las tres isoformas de la enzima sintetasa de óxido nítrico (NOS) a partir del

aminoácido L-arginina y oxígeno. Las isoformas endotelial (eNOS) y neuronal (nNOS) son constitutivas y dependientes de calcio, mientras que la tercera, iNOS, es independiente de calcio e inducible por varias citocinas. Las tres isoformas de NOS se han encontrado en el tejido cervical, pero durante el trabajo de parto la isoforma endotelial aumenta significativamente. En las pacientes que presentan parto pretérmino, la concentración de los tres isómeros de NOS es significativamente mayor que en los tejidos de las pacientes en trabajo de parto a término (Tornblom *et al.* 2005). Por otro lado, se ha visto que en pacientes con amenaza de parto pretérmino existe una mayor actividad del NO a nivel cervical. Además, la aplicación local de agentes donadores de NO se ha usado para inducir cambios morfológicos similares a los que ocurren durante la maduración cervical (Bollapragada *et al.* 2009, Facchinetti *et al.* 2005).

Estas evidencias experimentales junto con hallazgos que muestran un aumento en la peroxidación de lípidos y en las concentraciones de antioxidantes (Agarwal *et al.* 2005), han llevado a proponer que un ambiente de estrés oxidativo que incluye la interacción entre citocinas, prostaglandinas y NO es el responsable de las rutas bioquímicas que llevan al borramiento y dilatación del cérvix en el parto pretérmino.

Ruptura de las membranas corioamnióticas

Las membranas corioamnióticas (MCA) humanas son el tejido extraplacentario que delimita el ambiente fetal y lo separa del útero materno. Están formadas por dos capas adyacentes, el corion y el amnios, formadas cada una por diversos tipos celulares y una gran cantidad de tejido conectivo que constituye la matriz extracelular y del cual la colágena es el principal componente (Parry y Strauss 1998).

El principal componente celular del corion son los trofoblastos, que se encuentran en contacto directo con las células de la decidua materna. Los trofoblastos son las células responsables del contacto inicial del embrión con la madre en el momento de la implantación, así como del desarrollo estructural y funcional de la placenta.

Por otro lado, el amnios está compuesto por un epitelio de células llamadas amniocitos, adosadas a una membrana basal, que tienen una importante función secretora a lo largo de la gestación.

La mayor parte de la estructura del amnios está dada por una amplia red de tejido conectivo, sintetizada principalmente por los fibroblastos locales. Dicha red está constituida principalmente por distintos tipos de colágena, lo que le confiere una gran resistencia mecánica. Se ha reportado que las colágenas tipo I y III se encuentran principalmente formando una red fibrilar en todas las capas que componen el amnios (compacta, esponjosa y reticular); se localizan también,

aunque en mucho menor medida, en la decidua cercana a los trofoblastos del corion.

Por otro lado, la colágena tipo IV es el principal componente de la membrana basal que sostiene al epitelio amniótico y de la pseudomembrana basal del corion. Se ha descrito que este tipo de colágena se encuentra también formando estructuras no fibrilares en la capa reticular del amnios, lo que ha llevado a sugerir que la colágena tipo IV sirva como soporte estructural de la red fibrilar de colágenas I y III (Malak *et al.* 1993, Modesti *et al.* 1989).

A lo largo de la gestación la estructura tridimensional de las membranas se mantiene debido a un recambio constante de su tejido conectivo a través de un equilibrio en la síntesis y degradación de colágena. Cuando este equilibrio se pierde, ya sea por una disminución en la síntesis de colágena o por mayor actividad colagenolítica, es cuando ocurre la ruptura de las membranas, ya sea en condiciones de trabajo de parto normal o cuando se presenta RPM (Vadillo-Ortega *et al.* 1990).

En este sentido, se ha visto que pacientes que desarrollaron RPM tuvieron una mayor tasa de síntesis de colágena en etapas tempranas de la gestación (Tejero *et al.* 2003). Por otro lado, se ha encontrado que una deficiencia marginal en la concentración y biodisponibilidad del ácido ascórbico (vitamina C), cofactor en la síntesis de colágena, está asociada tanto al desarrollo de RPM (Casanueva *et al.* 1991) como a un aumento en la cantidad y actividad de MMPs (Vadillo Ortega *et*

et al. 1995). Lo anterior sugiere que alteraciones en el equilibrio normal de síntesis y degradación de colágena pueden llevar a la RPM.

Diversas evidencias experimentales apuntan a que la degradación de la colágena que compone las membranas parece ser el evento central en el fenómeno de ruptura tanto fisiológica como patológica. Esta degradación está controlada por distintas MMP y sus inhibidores tisulares (TIMPs). El incremento en la expresión y activación de la MMP-9, una gelatinasa que degrada colágena tipo IV, así como la disminución en la concentración de su inhibidor específico, el TIMP-1, se asocian directamente a la ruptura de las membranas tanto en el trabajo de parto como en la RPM. De ahí que la MMP-9 se considere un marcador molecular del inicio del proceso colagenolítico en las membranas fetales (Locksmith *et al.* 2001, Vadillo-Ortega *et al.* 1995, Vadillo-Ortega *et al.* 1996).

La expresión del gene de la MMP-9 puede ser inducida por varios factores de crecimiento y citocinas proinflamatorias, especialmente IL-1 y TNF- α , a través de las vías de transducción asociadas al factor nuclear κ B (NF- κ B) y al AP-1 (Birkedal-Hansen *et al.* 1993, Borden y Heller 1997). Se sabe que todos los tipos celulares presentes en las membranas corioamnióticas (trofoblastos, fibroblastos, células epiteliales) son capaces de producir MMP-9 y que la inducción de esta enzima se da a través de un sistema autocrino y paracrino dependiente de la concentración de dichas citocinas (Arechavaleta-Velasco *et al.* 2002).

Por otro lado, se han descrito polimorfismos de los genes que codifican para la IL-1 (G+3953A) y el TNF- (G-308A) que condicionan una secreción exagerada de las correspondientes citocinas ante un estímulo infeccioso. Se ha propuesto que la presencia de estos polimorfismos en los tejidos gestacionales podría predisponer a las pacientes portadoras a que el circuito que involucra a las citocinas proinflamatorias y a las diferentes MMPs se manifieste de manera amplificada y con ello, activar de manera anormal algunos de los mecanismos del trabajo de parto, incrementando el riesgo de presentar RPM y/o parto pretérmino (Hernandez-Guerrero *et al.* 2003).

El trabajo de parto como un proceso de tipo inflamatorio

Las evidencias experimentales que ha arrojado el análisis de los mecanismos celulares y moleculares que acompañan al trabajo de parto, han llevado a proponer que este fenómeno es el resultado de un proceso de tipo inflamatorio aunque limitado al ambiente intrauterino local.

Durante un proceso inflamatorio normal el sistema inmune utiliza diversos mecanismos efectores para eliminar o al menos neutralizar a los agentes extraños (por ejemplo, un agente infeccioso). La primera línea de respuesta inmune la constituyen las células fagocíticas residentes en los tejidos periféricos, las cuales secretan citocinas y quimiocinas proinflamatorias al encontrarse con el agente extraño. Estas proteínas causan dilatación de los vasos sanguíneos locales y

cambios en las células endoteliales, mismos que facilitan el reclutamiento de más leucocitos efectores al sitio de inflamación, guiados por las quimiocinas.

Las interacciones iniciales entre los leucocitos y el endotelio vascular están mediadas por moléculas de adhesión celular (CAMs), las cuales favorecen tanto la unión inicial como la extravasación y permanencia de los leucocitos en el sitio de inflamación (Janeway *et al.* 2005).

Una vez infiltrados en el tejido, los leucocitos producen una gran variedad de moléculas efectoras, incluyendo cantidades adicionales de citocinas proinflamatorias y quimiocinas, de acuerdo con el tipo de leucocitos de que se trate y con el microambiente que se establezca en el sitio de inflamación.

En el contexto del ambiente intrauterino y especialmente en la interfase materno-fetal, diversas evidencias soportan la idea de que el trabajo de parto es un proceso de tipo inflamatorio, como se describe a continuación.

Citocinas y quimiocinas

Estudios tanto de expresión génica como de secreción proteica han mostrado que un gran número de citocinas y quimiocinas propias de la respuesta inflamatoria están presentes en los tejidos gestacionales (miometrio, cérvix, membranas y placenta) o en sus secreciones (líquido amniótico, líquido cérvico-vaginal) a lo largo de la gestación. Sin embargo, solamente algunos de estos mediadores moleculares ven

incrementada su expresión como resultado del término de la gestación y del trabajo de parto (Tabla 1).

Tabla 1. Citocinas y quimiocinas que aumentan en la interfase materno-fetal humana con el trabajo de parto.

Tejido / fluido	Citocinas	Quimiocinas
Amnios	IL-1 /	IL-8
	IL-6	GRO- / /
	IL-11	IP-10
	PBEF	MIP-1 /1
	TNF-	MIP-3
Coriodecidual	IL-1 /	IL-8
	IL-6	GRO- / /
	IL-11	MCP-1
	IL-12	MIP-1
	IL-16	MPIF-1
	PBEF	IP-10
	TNF-	
Líquido amniótico	IL-1	IL-8
	IL-2	MCP-1
	IL-6	MIP-1
	TNF-	MIF
		RANTES
Líquido cérvico-vaginal	IL-1 /	IL-8
	IL-6	MCP-1
	TNF-	

Adaptado de Mitchell y Keelan 2006.

Las citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6 activan las vías de señalización intracelulares dependientes del factor de transcripción NF- κ B, induciendo así la expresión de una segunda oleada de proteínas efectoras cuyos genes tienen sitios de respuesta a NF- κ B en la región promotora. Entre estos se han descrito CAMs (ICAM-1), diversas enzimas como la NOS, ciclo-oxigenasa 2 (COX2) y MMP-9, las mismas citocinas proinflamatorias y quimiocinas como la IL-8 (Lappas y Rice 2009).

La activación del NF- κ B durante el trabajo de parto inhibe la actividad del receptor de progesterona, lo que en conjunto con la síntesis de prostaglandinas mediada por COX2 suprime el estado de "quiescencia" en el que se mantiene el miometrio a lo largo de la gestación, dando paso al estado activado caracterizado por las contracciones uterinas (Allport *et al.* 2001).

En el caso del cérvix, tanto las citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6 como la quimiocina IL-8 han sido implicadas en el proceso del borramiento cervical. La síntesis y secreción de estas proteínas incrementa de forma importante tanto en el cérvix como en la porción inferior del útero durante el trabajo de parto, lo que se asocia con un aumento en el infiltrado de leucocitos y en las concentraciones locales de MMPs, causando alteraciones en la integridad estructural del cérvix (Mitchell y Keelan 2006).

En las membranas fetales la expresión y secreción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas también aumenta durante el trabajo de parto (Tabla 1). De manera similar al cérvix, dicho incremento está asociado con un mayor reclutamiento e infiltración de leucocitos al espacio coriodecidual, así como al incremento en la concentración y activación de MMPs, particularmente la MMP-9, lo que resulta en el debilitamiento de la estructura de colágena que compone las membranas y su consecuente ruptura (Gomez-Lopez *et al.* 2009, Vadillo Ortega y Hernández Guerrero 2007).

Finalmente, nuestro grupo demostró recientemente que las membranas corioamnióticas son capaces de inducir quimiotaxis de leucocitos durante el trabajo de parto, lo que se asocia a la producción local de quimiocinas como IL-8, MCP-1, IP-10 y MIP-1 (Gomez-Lopez *et al.* 2009).

Moléculas de adhesión celular

La presencia de moléculas de adhesión celular (CAMs) ha sido estudiada en los diversos tejidos gestacionales como parte del proceso inflamatorio asociado al trabajo de parto, debido a su función como mediadoras de la infiltración y permanencia de leucocitos en los sitios de inflamación.

La molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) ha sido la más estudiada en este contexto. Se ha visto que su expresión incrementa en las células endoteliales de la placenta (Steinborn *et al.* 1999), en el amnios (Marvin *et al.* 2000b) y en la

coriodecidua (Marvin *et al.* 1999, Osman *et al.* 2004) en presencia del trabajo de parto, e incluso se ha descrito que tiene cierto valor predictivo para parto pretérmino al medirse en el líquido cervicovaginal (Marvin *et al.* 2000a).

La expresión tanto de la molécula de adhesión endotelial leucocitaria 1 (ELAM-1) como de la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1) ha sido localizada en el segmento inferior del útero e incrementa conforme avanza la dilatación cervical (Winkler *et al.* 1998c). La expresión de VCAM-1 también se incrementa en la coriodecidua con el trabajo de parto, aunque su localización histológica parece estar limitada a los fibroblastos presentes en el tejido conectivo del corion (Osman *et al.* 2004).

Se ha observado que la molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria (PECAM) se expresa tanto en el corion como en el amnios de las membranas fetales; sin embargo, en presencia del trabajo de parto dicha expresión solamente aumenta en el endotelio vascular de la coriodecidua y en los leucocitos infiltrados (Osman *et al.* 2004).

Por otro lado, el análisis de CAMs en los leucocitos de sangre periférica materna ha mostrado también cambios relacionados al trabajo de parto. Se han estudiado la selectina L (CD62L), que participa en las primeras interacciones de los leucocitos con el endotelio vascular, y las integrinas LFA-1 (CD11a) y Mac-1 (CD11b) que son los ligandos o correceptores de la molécula ICAM-1 y por lo tanto constituyen el

complemento indispensable para el reclutamiento y permanencia de leucocitos en los sitios de inflamación (Janeway *et al.* 2005).

Los reportes del análisis de selectina L y LFA-1 no son del todo concluyentes. En un primer estudio no se encontraron diferencias en la intensidad de expresión de estas moléculas durante el trabajo de parto (Luppi *et al.* 2004), mientras que en un estudio más reciente se observó un incremento de ambas CAMs, específicamente en los neutrófilos y en los linfocitos T (Yuan *et al.* 2009).

Ambos estudios, sin embargo, concuerdan en que durante el trabajo de parto tanto el número de células positivas para Mac-1, como la intensidad en la expresión de esta molécula, aumentan tanto en los monocitos como en los granulocitos de sangre periférica materna (Luppi *et al.* 2004, Yuan *et al.* 2009).

Infiltrado leucocitario

Finalmente, diversos estudios histológicos de los tejidos gestacionales han mostrado un aumento en la cantidad de leucocitos infiltrados al término de la gestación y particularmente durante el trabajo de parto.

En el útero se ha observado un incremento en la infiltración de neutrófilos y macrófagos, principalmente en el segmento inferior, lo que se asocia con el progreso del trabajo de parto y con las concentraciones locales de quimiocinas (IL-8) y proteasas (MMP-8 y MMP-9) (Thomson *et al.* 1999, Winkler *et al.* 1999a).

Hallazgos similares se han observado en el cérvix y en las membranas fetales, tejidos donde los leucocitos infiltrados se han asociado también a la presencia de citocinas proinflamatorias y quimiocinas (Gomez-Lopez *et al.* 2009, Osman *et al.* 2003, Young *et al.* 2002).

En conjunto, las diferentes evidencias experimentales permiten considerar al trabajo de parto humano como un proceso de tipo inflamatorio agudo y limitado al ambiente intrauterino. Uno de los eventos iniciales de este proceso lo constituiría el reclutamiento de leucocitos al entorno de la coriodecidua, los cuales podrían participar en la modulación del proceso inflamatorio local, induciendo las diferentes alteraciones bioquímicas y estructurales que se presentan en los tejidos gestacionales durante el trabajo de parto.

JUSTIFICACIÓN

El conocimiento de los mecanismos fisiopatogénicos que condicionan el desarrollo de la ruptura de las membranas fetales en condiciones normales, permitirá eventualmente proponer estrategias para intervenir en el desarrollo de la ruptura prematura de membranas y así impactar en la incidencia del parto pretérmino.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Resultados preliminares de nuestro laboratorio mostraron que el plasma de sangre placentaria contiene una mayor concentración de citocinas proinflamatorias en comparación con el plasma de la sangre periférica materna (Vega Sánchez *et al.* 2004).

Además, contiene mediadores moleculares que inducen una mayor secreción de MMP-9, lo cual provoca la degradación y pérdida de estructura de las fibras de colágena que constituyen la matriz extracelular de las membranas (Estrada-Gutierrez *et al.* 2005).

A partir de estas observaciones, resulta indispensable caracterizar a los leucocitos que circulan en la sangre placentaria, tanto a nivel fenotípico como funcional, al término de la gestación y particularmente durante el trabajo de parto.

Con base en lo anterior, en el presente trabajo se plantearon las siguientes preguntas de investigación:

- ¿Los leucocitos presentes en el ambiente intrauterino o en la circulación periférica son capaces de responder a las señales de reclutamiento expresadas por las membranas fetales al término de la gestación?
- ¿La composición celular de la sangre que circula en el ambiente intrauterino es distinta de aquella de la sangre periférica materna al término de la gestación?
- ¿Los leucocitos del ambiente intrauterino son funcionalmente distintos de los que circulan en la sangre periférica materna al término de la gestación?

HIPÓTESIS

Los leucocitos circulantes en el ambiente intrauterino poseen características fenotípicas y funcionales que les permitirían modular el proceso inflamatorio local durante el trabajo de parto, sintetizando mediadores primarios como citocinas proinflamatorias y efectores secundarios como MMPs.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar a los leucocitos del entorno intrauterino como moduladores del microambiente inflamatorio y de colagenolisis que se establece en el espacio coriodecidual al término de la gestación humana.

Objetivos particulares

- Describir el fenotipo de las subpoblaciones de leucocitos placentarios al término de la gestación, en comparación con los leucocitos periféricos maternos.
- Analizar el perfil funcional de los leucocitos placentarios al término de la gestación, en cuanto a su expresión y secreción de marcadores proinflamatorios y de colagenolisis.
- Caracterizar la expresión de moléculas de adhesión celular en los leucocitos placentarios y periféricos al término de la gestación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes y material biológico

Pacientes

Los criterios de inclusión y procedimientos de toma de muestras de este proyecto fueron aprobados por los Comités de Investigación y Ética del INPer. Todas las pacientes dieron su consentimiento informado antes de la toma de las muestras.

Se incluyeron muestras provenientes de mujeres sanas con embarazos a término (≥ 37 semanas de gestación), de entre 15 y 44 años de edad. Se excluyeron aquellas pacientes con embarazos múltiples o que presentaran alguna patología, especialmente infección vaginal o intrauterina, diabetes mellitus o diabetes gestacional, preeclampsia o enfermedades autoinmunes.

Las muestras se dividieron en dos grupos:

- 1) Grupo control sin trabajo de parto: muestras provenientes de pacientes que terminaron su embarazo por cesárea electiva, sin evidencias clínicas de que hubiera iniciado el trabajo de parto.
- 2) Grupo experimental con trabajo de parto: muestras provenientes de pacientes que presentaron trabajo de parto normal (contracciones uterinas, dilatación cervical y ruptura de membranas), independientemente de la vía de resolución (cesárea o parto vaginal).

Sangre periférica materna

Las muestras de sangre periférica materna se obtuvieron durante el procedimiento obstétrico (cesárea o parto vaginal) o inmediatamente después de este. La sangre se obtuvo mediante punción venosa en el antebrazo de las pacientes y se depositó inmediatamente en tubos estériles con anticoagulante (heparina de sodio o EDTA).

Sangre placentaria

Las muestras de sangre placentaria se obtuvieron dentro de los primeros 30 minutos posteriores al alumbramiento de la placenta.

Para la obtención de estas muestras se exprimió manualmente la cara materna de los cotiledones de la placenta, y se recuperó la sangre que drenaba con pipetas estériles desechables. La sangre se depositó inmediatamente en tubos estériles con anticoagulante (heparina de sodio o EDTA).

Aislamiento de leucocitos

A partir de las muestras de sangre placentaria y periférica se aislaron los leucocitos totales por medio de gradiente de densidad, usando el reactivo Polymorphprep (Axis-Shield, Oslo, Noruega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Al formarse el gradiente se obtuvieron dos bandas de células correspondientes a los leucocitos mononucleares y a los polimorfonucleares respectivamente; en todos los casos se recuperaron ambas bandas para tener el paquete leucocitario completo.

Los eritrocitos residuales se lisaron resuspendiendo el paquete celular en un buffer de cloruro de amonio (cloruro de amonio 150mM, bicarbonato de potasio 10mM, EDTA 0.1mM) durante 10 min a temperatura ambiente; finalmente los leucocitos se lavaron con PBS estéril.

Fenotipificación de subpoblaciones de leucocitos

El primero de los objetivos particulares de este trabajo fue describir el fenotipo de las subpoblaciones de leucocitos presentes en la circulación intrauterina (representada por la sangre de placenta) en comparación con los leucocitos que circulan en la sangre periférica materna. En este caso nuestra intención era identificar subpoblaciones específicas de leucocitos que estuvieran presentes en los tejidos gestacionales alrededor del momento del parto y que por sus características pudieran contribuir al desarrollo del microambiente inflamatorio local.

Para ello se obtuvieron muestras de sangre periférica y placentaria de pacientes sin trabajo de parto (n=10) y con trabajo de parto (n=10). Las diferentes subpoblaciones de leucocitos se marcaron con anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos para su análisis por citometría de flujo, utilizando CD4-FITC para linfocitos T cooperadores, CD14-ECD para monocitos/macrófagos, CD8-PC5 para linfocitos T citotóxicos, CD3-PC7 para linfocitos T totales, CD19-FITC para linfocitos B y CD56-PE para células NK.

Se realizaron marcajes de 4 colores (CD4/CD14/CD8/CD3) o de 2 colores (CD19/CD56). Todos los anticuerpos eran de la marca Immunotech (Marseille, Francia). Para cada muestra y reacción de marcaje se incluyeron los respectivos controles sin teñir para ajustar la autofluorescencia.

Cada combinación de anticuerpos se añadió a 100 μ l de sangre total en la concentración recomendada por el fabricante (10-20 μ l) y se incubaron en la oscuridad por 15 minutos. La lisis de eritrocitos y la fijación de leucocitos se realizaron simultáneamente utilizando el reactivo OptiLyse (Beckman Coulter, Marseille, Francia). Finalmente, los leucocitos se lavaron con PBS estéril.

Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FC500 (Beckman Coulter, Miami, FL, USA). Las células CD3⁺, CD19⁺ y CD56⁺ se contaron dentro de la región de linfocitos, mientras que las células CD4⁺ y CD8⁺ se analizaron dentro de la región de células CD3⁺ (Figura 1). Se contaron cincuenta mil eventos por cada muestra con un mínimo de diez mil eventos dentro de la región de linfocitos.

Debido a que no se contaba con el número total de células de cada paciente, solamente se presentan los porcentajes relativos de cada subpoblación.

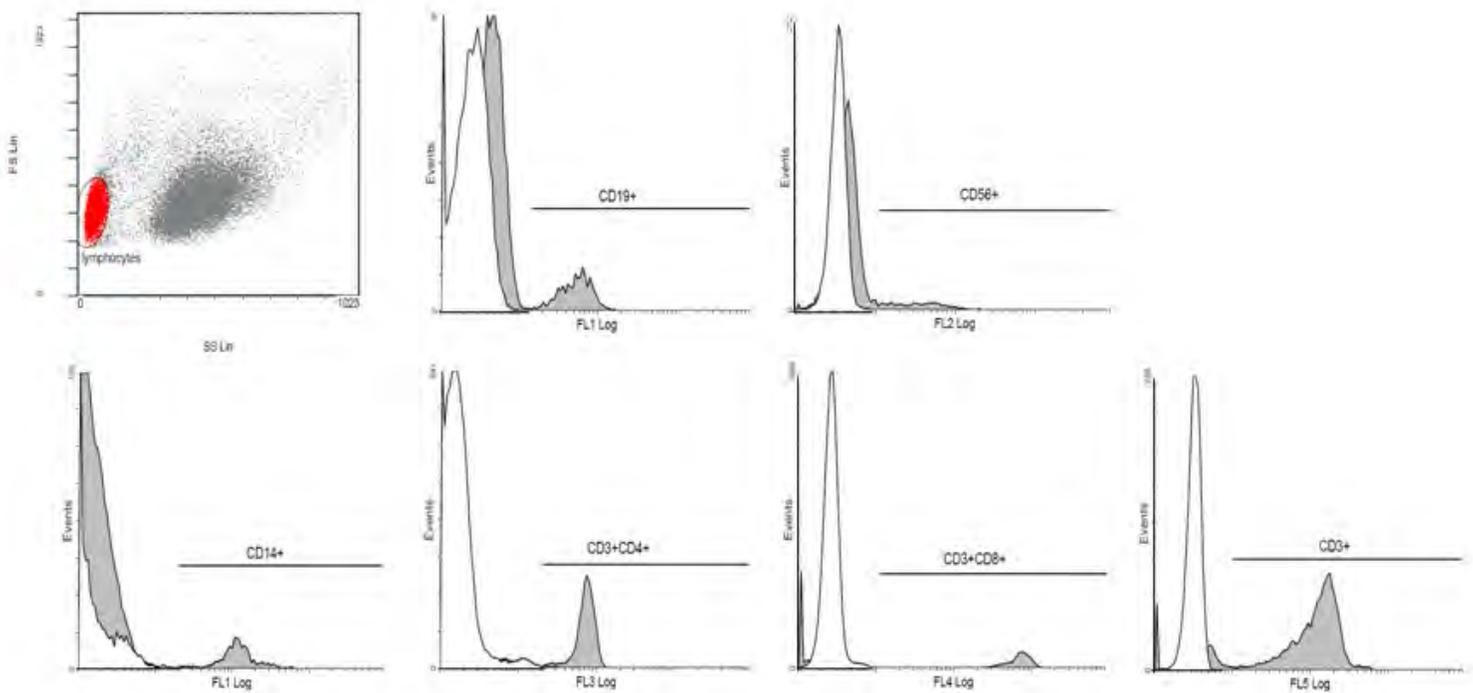


Figura 1. Imagen representativa de las regiones establecidas y los parámetros utilizados para el análisis de citometría de flujo.

La gráfica de puntos muestra la distribución de los leucocitos en cuanto a tamaño (eje vertical) y granularidad (eje horizontal); la región marcada corresponde a los linfocitos. Los histogramas muestran las intensidades de fluorescencia media en los diferentes canales de detección (ejes horizontales) por número de eventos (ejes verticales); las áreas blancas y grises corresponden a las muestras sin teñir (control de autofluorescencia) y teñidas, respectivamente.

Caracterización funcional de leucocitos

Expresión basal de citocinas y *MMP9*

De acuerdo con el segundo objetivo del trabajo, se analizaron algunas de las características funcionales de los leucocitos aislados de sangre placentaria en comparación con las células que circulan en la sangre periférica materna.

En un primer abordaje, se analizó por PCR en tiempo real la expresión basal de los genes que codifican para el factor de necrosis tumoral alfa (*TNFA*), las interleucinas IL-1 (*IL1B*) e IL-6 (*IL6*) y el antagonista del receptor de interleucina 1 (*IL1RN*) como marcadores de la capacidad inflamatoria de los leucocitos, así como la expresión de la metaloproteasa de matriz extracelular 9 (*MMP9*) como marcador de su capacidad colagenolítica.

Para estos experimentos, se extrajo el RNA total de los leucocitos aislados de sangre periférica y de sangre placentaria de pacientes sin trabajo de parto (n=14) y con trabajo de parto (n=9), utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA se precipitó con isopropanol y se lavó con etanol al 75%.

A partir del RNA total se sintetizó el DNA complementario (cDNA) con el kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania), utilizando hexámeros al azar como oligonucleótidos iniciadores (primers). Las reacciones de transcripción reversa se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Alemania) con las

siguientes condiciones: 25 °C – 10 min / 55 °C – 30 min / 85 °C – 5 min. El cDNA se almacenó a –20°C hasta su uso.

Por medio de PCR cuantitativa en tiempo real se analizó la expresión relativa de los genes mencionados, usando el gen de la beta actina (*ACTB*) como normalizador. Para las reacciones de PCR se utilizó el kit Light Cycler TaqMan Master y sondas universales TaqMan (sondas marcadas con fluorescencia) siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania).

Se diseñaron primers específicos para las secuencias de RNA mensajero de cada uno de los genes usando el software ProbeFinder disponible en www.universalprobelibrary.com (consultada en enero 2007). Todos los primers se diseñaron para que abarcaran secuencias de unión de intrones, y así evitar falsos positivos por posible contaminación residual con DNA genómico.

TNFA: forward 5'-CAGCCTCTTCTCCTTCCTGAT-3'; reverse 5'-GCCAGAGGGCTGATTAGAGA-3'; sonda 29

IL1B: forward 5'-CTGTCCTGCGTGTTGAAAGA-3'; reverse 5'-TTGGGTAATTTTTGGGATCTACA-3'; sonda 78

IL6: forward 5'-GATGAGTACAAAAGTCCTGATCCA-3'; reverse 5'-CTGCAGCCACTGGTTCTGT-3'; sonda 40

IL1RN: forward 5'-TGCCTGTCCTGTGTCAAGTC-3'; reverse 5'-TCTCGCTCAGGTCAGTGATG-3'; sonda 16

MMP9: forward 5'-GAACCAATCTCACCGACAGG-3'; reverse 5'-GCCACCCGAGTGTAACCATA-3': sonda 06

ACTB: forward 5'-ATTGGCAATGAGCGGTTC-3'; reverse 5'-GGATGCCACAGGACTCCAT-3'; sonda 11

Las reacciones de PCR en tiempo real se llevaron a cabo en un equipo Light Cycler 2.0 bajo las siguientes condiciones: un ciclo de 95 °C, 10 min; 45 ciclos de desnaturalización (95 °C, 10 seg), alineamiento (60 °C, 30 seg) y extensión (72

°C, 1 seg); en este último paso se cuantificó la fluorescencia. La expresión relativa se calculó con el programa Light Cycler Software 4 (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania).

Cultivo celular y estimulación con lipopolisacárido

Por otro lado, para caracterizar el comportamiento funcional de los leucocitos placentarios en comparación con los leucocitos periféricos, las células aisladas de ambos compartimientos se estimularon con lipopolisacárido de *E. coli* (LPS), y se cuantificó la secreción al medio de cultivo de los marcadores inflamatorios y de colagenolisis antes mencionados.

El abordaje experimental de estimulación con LPS podría reflejar la capacidad de los leucocitos placentarios de responder ante un estímulo externo, en este caso un producto bacteriano que simularía una infección intrauterina.

Experimentos similares se realizaron paralelamente con la línea celular de promielocitos humanos U937; esta línea celular se utilizó como un modelo de respuesta funcional ante la estimulación con LPS debido a su conocida capacidad de expresar citocinas proinflamatorias y MMP-9 basalmente, y de incrementar su expresión en respuesta al LPS (Lopez-Bojorquez *et al.* 2004, Tachado *et al.* 2005).

Los leucocitos aislados de sangre periférica y de sangre placentaria (1×10^6 células), así como las células U937 (ATCC, Manassas, VA, EUA), se colocaron en placas de 12 pozos con 1 ml de medio DMEM suplementado con 0.2 % de hidrolizado de

lactoalbúmina, 1 % de piruvato de sodio y 1 % de antibiótico-antimicótico (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA). Antes de los cultivos, se comprobó que la viabilidad de los leucocitos fuera $\geq 90\%$ por medio de tinción con azul de tripano.

Las células se estimularon con 1 μ g/mL de lipopolisacárido (LPS) de *E.coli* 055:B5 (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA) y se incubaron por 24 h a 37 °C con 5 % CO₂. La cantidad de LPS se determinó después de analizar la máxima secreción de citocinas por los leucocitos y las células U937 mediante una curva dosis-respuesta a diferentes tiempos.

Al final del tiempo de cultivo los sobrenadantes se recuperaron y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

La concentración de TNF- α se cuantificó en los sobrenadantes de los cultivos usando el kit TNF- α Human Biotrak Easy ELISA (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para cuantificar la IL-1 secretada se utilizó un ELISA tipo sándwich desarrollado en nuestro laboratorio, de acuerdo a lo descrito por Arechavaleta-Velasco y colaboradores (Arechavaleta-Velasco *et al.* 2002), usando reactivos R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA). Brevemente, se incubó una placa de 96 pozos (Nunc Maxisorp, Roskilde, Dinamarca) con un anticuerpo de captura monoclonal anti-IL-1 humano (500 μ g/ml) toda la noche a 37 °C. La placa se lavó tres veces con Tween 20 al 0.05% en PBS y se bloqueó con una solución de 5% de sacarosa, 1% de albúmina sérica bovina y 0.05% de azida de sodio durante 2 horas. Se

agregaron 100 μ l de las muestras o de una curva de IL-1 humana recombinante y se incubó toda la noche a 4 °C. Se lavó la placa y se incubó con un anticuerpo policlonal biotinilado anti-IL-1 humano (50 μ g/ml) a temperatura ambiente por 2 horas. Después de lavar la placa se incubó con estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina (dilución 1:5000) por 90 minutos a 37 °C. Por último se lavó la placa y se incubó con una solución de p-nitrofenilfosfato durante 30 minutos a 37 °C. Se midió la absorbancia en un lector de placas a 410 nm. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron menores al 5%.

La cuantificación de IL-6 e IL-1RN se hizo mediante los kits DuoSet ELISA Development System (R&D Systems) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las formas activas y latentes de la MMP-9 secretadas a los medios de cultivo se cuantificaron usando el kit Matrix Metalloproteinase-9 Biotrak Activity Assay System (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Expresión de moléculas de adhesión celular en leucocitos

Finalmente, el tercer objetivo consistió en analizar si las células que circulan en el ambiente intrauterino o en la periferia materna son capaces de responder a las señales de reclutamiento expresadas por las membranas corioamnióticas.

Se analizó la expresión de los genes *ITGAL* e *ITGAM* en los leucocitos periféricos y placentarios. Estos genes codifican para las cadenas alfa de las integrinas LFA-1

(CD11a/CD18) y Mac-1 (CD11b/CD18) respectivamente, cuya función en la adhesión celular se describió anteriormente.

Para estos experimentos se siguió la metodología descrita anteriormente para el aislamiento de RNA total a partir de leucocitos de sangre periférica y de sangre placentaria de pacientes sin trabajo de parto (n=6) y con trabajo de parto (n=8); se sintetizó el cDNA y se realizó PCR en tiempo real utilizando los primers y sondas que a continuación se describen. En esta serie de experimentos la expresión relativa se normalizó usando el gen que codifica para la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*).

ITGAL: forward 5'- CCACAGATGGAAGCATTG-3'; reverse 5'- GTGTTCTGGTCACACGTTTCG-3'; sonda 26

ITGAM: forward 5'- GGCATCCGCAAAGTGGTA-3'; reverse 5'- GGATCTTAAAGGCATTCTTTCG-3'; sonda 9

GAPDH: forward 5'-GCCACATCGCTCAGACAC-3', reverse 5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'; sonda 60

Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se hicieron con el programa SPSS 17.0 para Windows. Dependiendo de la distribución de las muestras se usó la prueba T de Student o la prueba de Mann-Whitney para comparar muestras independientes (leucocitos periféricos vs. leucocitos placentarios; muestras sin trabajo de parto vs. muestras con trabajo de parto), y la prueba T pareada o la prueba de Rangos de Wilcoxon para comparar muestras relacionadas (muestras antes y después del estímulo). Las diferencias con una $p \leq 0.05$ se consideraron significativas.

RESULTADOS

La proporción de monocitos y linfocitos T es diferente en sangre placentaria

Los resultados del análisis por citometría de flujo de las distintas subpoblaciones de leucocitos revelaron que la proporción de leucocitos en la circulación placentaria es diferente de la circulación periférica materna al término de la gestación, como se muestra en la Tabla 1.

Antes del trabajo de parto, el porcentaje de linfocitos CD3⁺ fue significativamente menor en la circulación placentaria, mientras que el porcentaje de monocitos CD14⁺ fue significativamente mayor en comparación con la sangre periférica (p=0.047 y 0.003 respectivamente).

Sin embargo, una vez iniciado el trabajo de parto, esta diferencia sólo se mantuvo en el caso de las células CD14⁺ (p=0.023).

No se observaron diferencias en las subpoblaciones de leucocitos en sangre periférica o placentaria al comparar las muestras sin y con trabajo de parto (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentajes de subpoblaciones de leucocitos en sangre periférica y sangre placentaria al término de la gestación.

Subpoblación	Sangre periférica	Sangre placentaria	Valor de P
SIN TRABAJO DE PARTO			
	n = 10	n = 10	
Linfocitos T totales (CD3 ⁺)	43.2 (13.6 – 80.0)	29.2 (8.4 – 58.8)	0.047
Linfocitos T CD4 ⁺	30.7 (6.6 – 63.0)	31.5 (5.0 – 73.0)	0.847
Linfocitos T CD8 ⁺	23.9 (11.0 – 62.0)	24.0 (7.5 – 61.6)	0.748
Monocitos/macrófagos (CD14 ⁺)	3.0 (2.0 – 6.7)	5.2 (3.0 – 17.5)	0.003
Células NK (CD56 ⁺)	12.3 (3.2 – 28.8)	7.4 (0.7 – 20.9)	0.300
Linfocitos B (CD19 ⁺)	3.6 (0.1 – 10.8)	4.9 (0.3 – 13.9)	0.898
CON TRABAJO DE PARTO			
	n = 10	n = 10	
Linfocitos T totales (CD3 ⁺)	39.5 (11.3 – 75.1)	29.4 (10.1 – 52.0)	0.165
Linfocitos T CD4 ⁺	40.1 (12.8 – 76.8)	28.5 (3.0 – 71.3)	0.353
Linfocitos T CD8 ⁺	38.3 (16.5 – 53.2)	23.4 (10.1 – 63.0)	0.631
Monocitos/macrófagos (CD14 ⁺)	4.4 (0.2 – 10.9)	10.8 (0.75 – 15.3)	0.023
Células NK (CD56 ⁺)	18.8 (6.9 – 51.3)	13.5 (7.8 – 25.1)	0.529
Linfocitos B (CD19 ⁺)	6.4 (2.1 – 17.7)	5.7 (0.1 – 13.4)	0.684
Diferencias entre los grupos sin trabajo de parto y con trabajo de parto (valores de P)			
Linfocitos T totales (CD3 ⁺)	0.512	0.973	
Linfocitos T CD4 ⁺	0.705	0.654	
Linfocitos T CD8 ⁺	0.223	0.918	
Monocitos/macrófagos (CD14 ⁺)	0.132	0.282	
Células NK (CD56 ⁺)	0.426	0.223	
Linfocitos B (CD19 ⁺)	0.114	0.282	

Se presentan los valores de las medianas (mínimo – máximo).

Los leucocitos placentarios muestran un perfil de expresión proinflamatorio y colagenolítico

No se observaron diferencias en la expresión de *TNFA* entre los leucocitos periféricos y los placentarios antes y durante el trabajo de parto (Figura 1).

En ausencia de trabajo de parto, los leucocitos de sangre periférica expresaron cantidades significativamente mayores de *IL1B* que los leucocitos placentarios ($p=0.046$). Sin embargo, solamente los leucocitos placentarios aumentan significativamente su expresión de esta citocina en presencia del trabajo de parto ($p=0.011$).

Observamos que el trabajo de parto induce un incremento significativo en la expresión de *IL6*, tanto en los leucocitos periféricos ($p=0.039$) como en los placentarios ($p=0.002$). No se observaron diferencias al comparar ambos compartimientos (Figura 1).

La expresión de *IL1RN* fue significativamente mayor en los leucocitos periféricos que en los placentarios en ausencia de trabajo de parto ($p=0.007$). Sin embargo, solamente en los leucocitos placentarios la expresión de esta citocina fue significativamente mayor en presencia del trabajo de parto ($p=0.039$).

Finalmente, se observó un incremento en la expresión de *MMP9* asociada al trabajo de parto en los leucocitos de ambos compartimientos, el cual sólo alcanzó significancia estadística en los leucocitos periféricos ($p=0.033$). No se observaron diferencias al comparar los dos compartimientos (Figura 1).

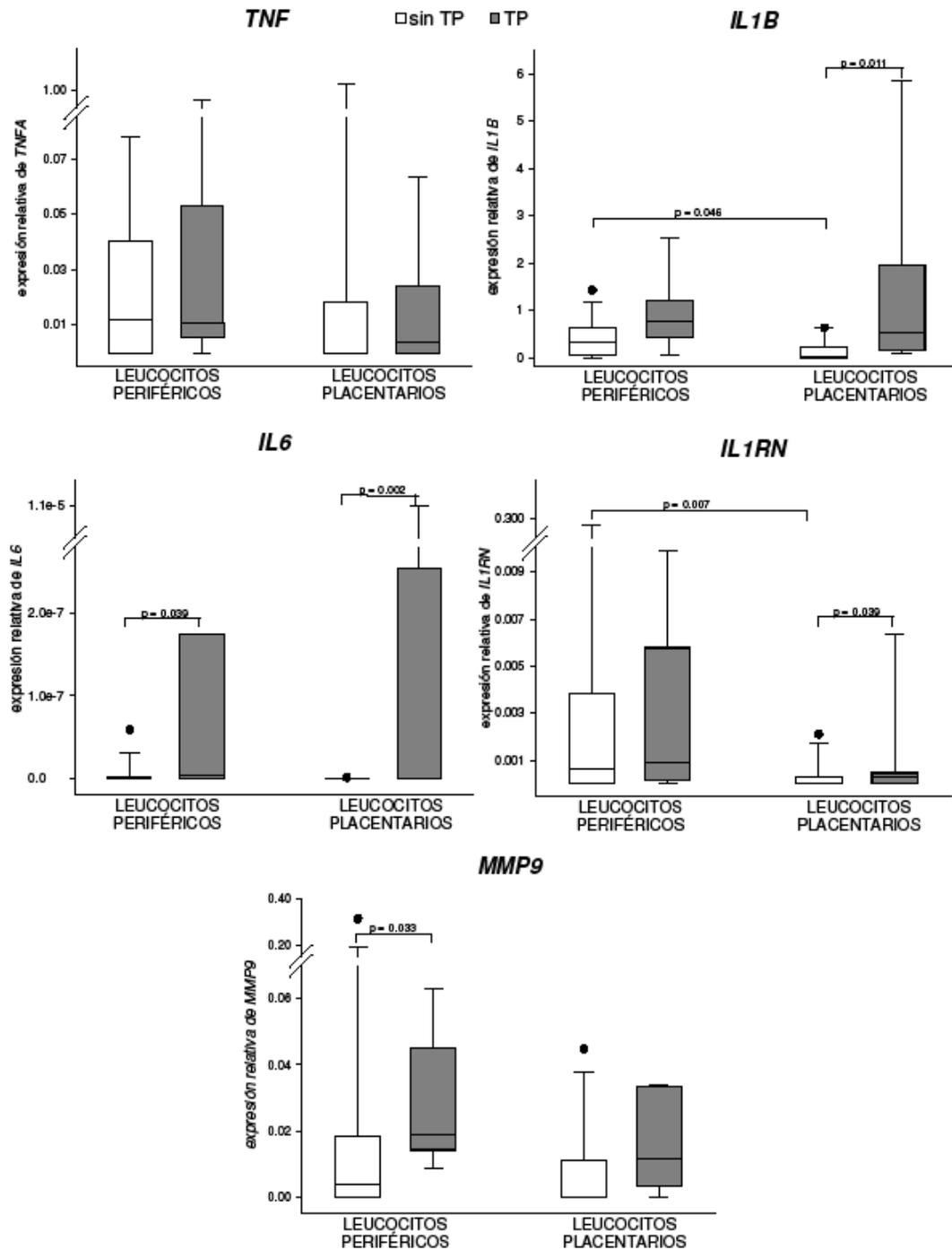


Figura 1. Expresión génica basal de citocinas por leucocitos periféricos y placentarios al término de la gestación.

Las líneas horizontales representan el valor de la mediana de expresión relativa con los percentiles 25'/75' (cajas) y percentiles 5'/95' (líneas verticales). Los círculos negros representan valores extremos. TP = trabajo de parto. N = 14 sin TP, y N = 9 con TP.

Los leucocitos placentarios secretan cantidades diferentes de citocinas y MMP-9 ante el estímulo con LPS

Después de 24 horas en cultivo, tanto los leucocitos periféricos como los placentarios produjeron cantidades similares de TNF- α , mismas que no se incrementaron con el estímulo de LPS (Figura 2). Sin embargo, los leucocitos placentarios de mujeres con trabajo de parto incrementaron notablemente su secreción de esta citocina después del estímulo, incluso en mayor medida que las células de referencia (U937). Interesantemente, la secreción basal de esta citocina por los leucocitos de ambos compartimientos fue significativamente menor cuando las células provenían de pacientes sin trabajo de parto.

No se observaron diferencias en la secreción de IL-1 β de los leucocitos placentarios ni periféricos, ya sea antes o después del trabajo de parto (Figura 2). Solamente los leucocitos placentarios mostraron una tendencia a incrementar su secreción de esta citocina después del estímulo con LPS, aunque no alcanzó significancia estadística. Esto correspondió con lo observado en las células U937, las cuales secretaron una cantidad significativamente mayor de IL-1 β al ser estimuladas con LPS ($p=0.029$).

No se observaron diferencias en la secreción de IL-6 en los cultivos de leucocitos periféricos incluso después del estímulo con LPS. En contraste, los leucocitos placentarios de pacientes sin trabajo de parto secretaron significativamente más IL-6 que los leucocitos periféricos al ser estimulados ($p=0.015$) (Figura 2).

Adicionalmente, los leucocitos placentarios provenientes de mujeres con trabajo de parto incrementaron significativamente su secreción de IL-6 después del estímulo con LPS ($p=0.007$).

En cuanto a la secreción de IL-1RN, los leucocitos placentarios sin trabajo de parto secretaron cantidades significativamente mayores de esta citocina que los leucocitos periféricos, tanto en ausencia como en presencia del estímulo de LPS ($p=0.037$ y 0.0001 respectivamente). No se observó incremento en la secreción de esta citocina en las células U937. Los leucocitos de sangre periférica tendieron a incrementar su secreción de IL-1RN solamente cuando provenían de mujeres con trabajo de parto, aunque este incremento no fue significativo (Figura 2).

Finalmente, no observamos diferencias en la secreción de MMP-9 total o de formas activas entre los leucocitos periféricos y los placentarios, independientemente del estímulo con LPS, cuando las células provenían de pacientes sin trabajo de parto (Figura 3). Sin embargo, los leucocitos de ambos compartimientos secretaron cantidades significativamente mayores de esta enzima cuando el trabajo de parto estuvo presente.

Los leucocitos placentarios mostraron una tendencia a secretar menos MMP-9, total y activa, al ser estimulados con LPS. Esto resultó en una secreción estadísticamente diferente al compararla con aquella de los leucocitos periféricos ($p=0.006$), los cuales mostraron una tendencia a incrementar su secreción de la enzima (Figura 3).

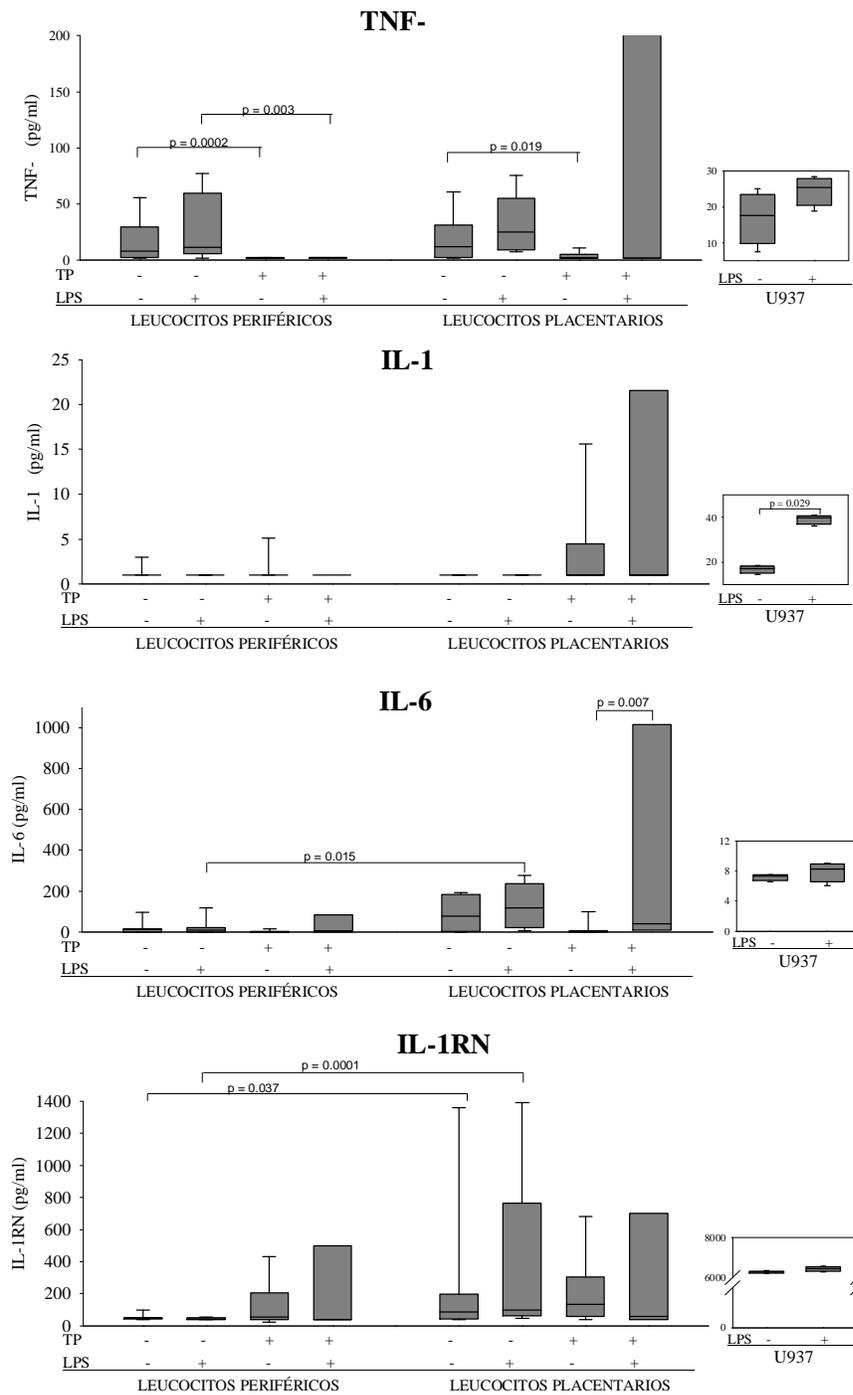
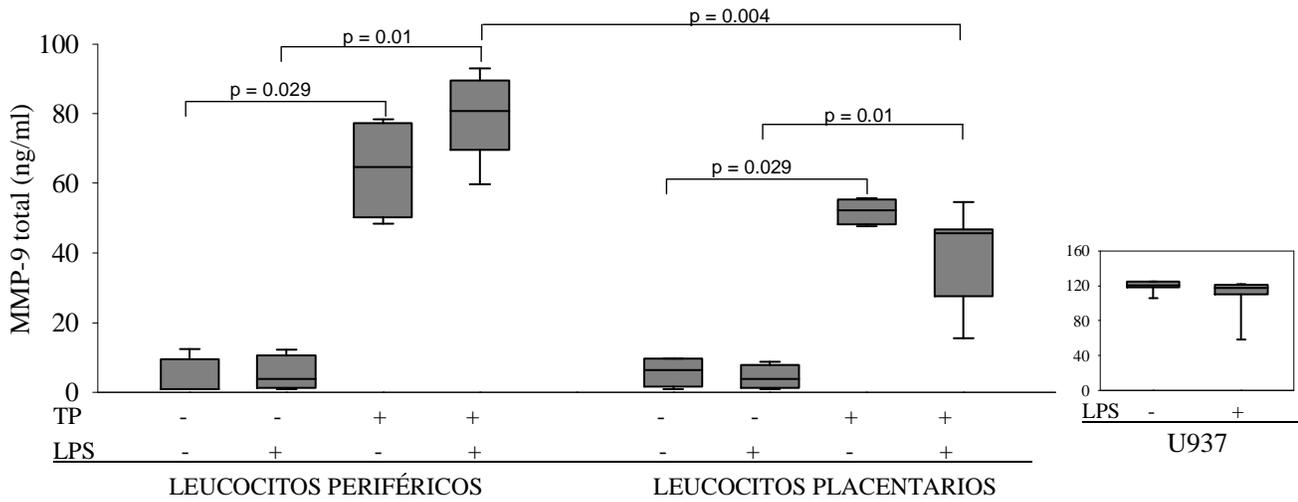


Figura 2. Cuantificación de citocinas después de la estimulación con LPS.

Las líneas horizontales representan el valor de la mediana de concentración con los percentiles 25'/75' (cajas) y percentiles 5'/95' (líneas verticales). TP = trabajo de parto. LPS = lipopolisacárido. Se realizaron 3 experimentos independientes por duplicado.

MMP-9 total



MMP-9 activa

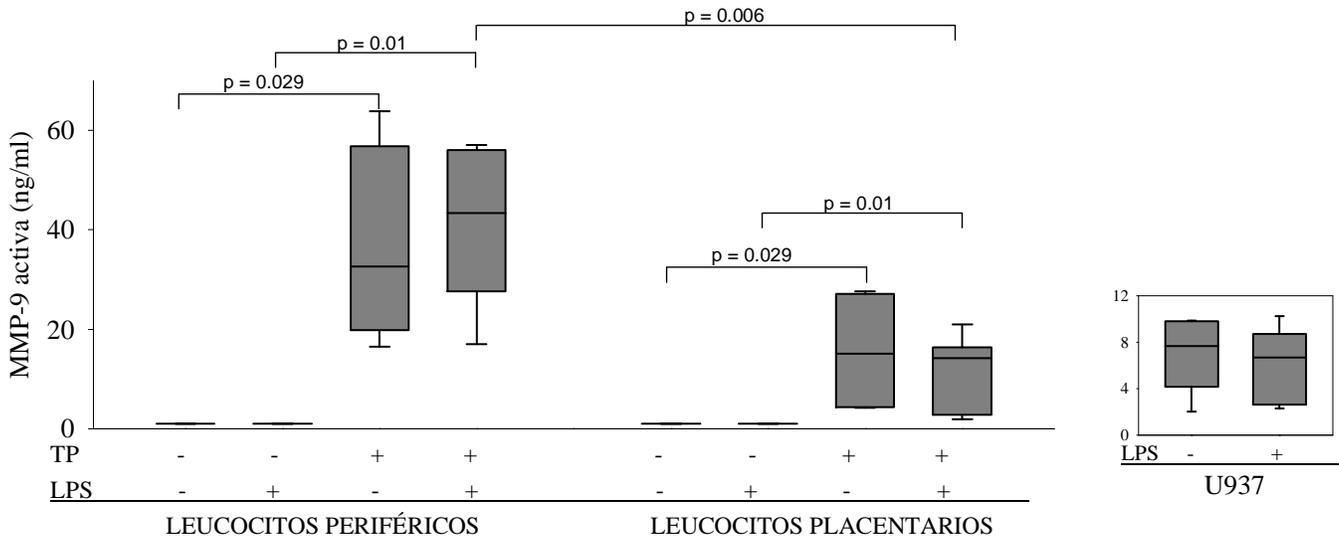


Figura 3. Cuantificación de MMP-9 total y activa después de la estimulación con LPS.

Las líneas horizontales representan el valor de la mediana de concentración con los percentiles 25'/75' (cajas) y percentiles 5'/95' (líneas verticales). TP = trabajo de parto. LPS = lipopolisacárido. Se realizaron 3 experimentos independientes por duplicado.

Los leucocitos placentarios aumentan su expresión de *ITGAM* durante el trabajo de parto

Los resultados de expresión de *ITGAL* e *ITGAM* por los leucocitos se muestran en la Figura 5.

No se observaron diferencias en la expresión de *ITGAL* al comparar los leucocitos periféricos con los placentarios, ya sea antes o durante el trabajo de parto.

Por otro lado, nuestros resultados mostraron que la expresión de *ITGAM* fue significativamente mayor en los leucocitos periféricos antes del trabajo de parto comparada con los leucocitos placentarios ($p=0.01$). Sin embargo, esta diferencia no se observó durante el trabajo de parto, debido a un incremento en la expresión de *ITGAM* en los leucocitos placentarios que, aunque fue evidente, no alcanzó significancia estadística.

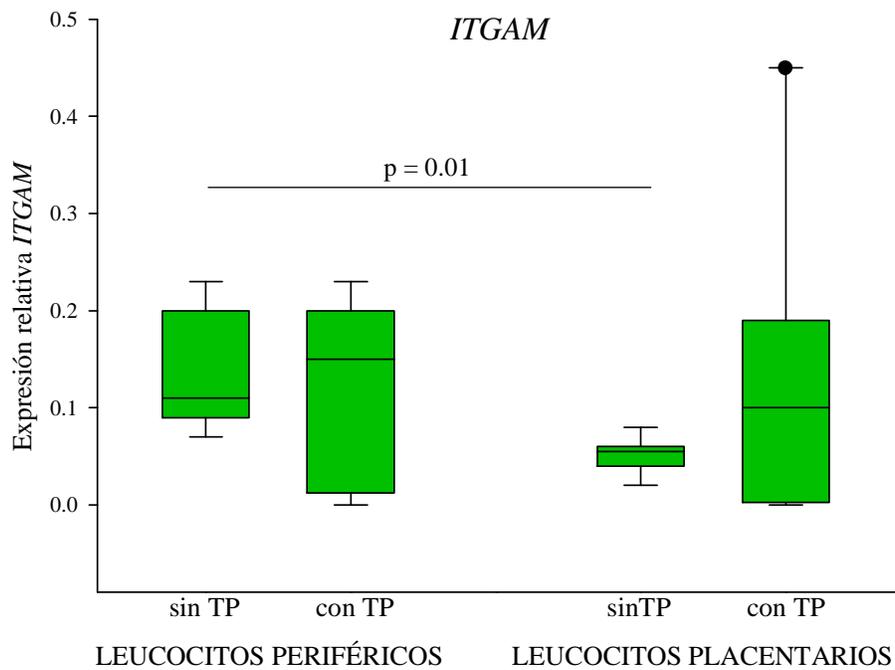
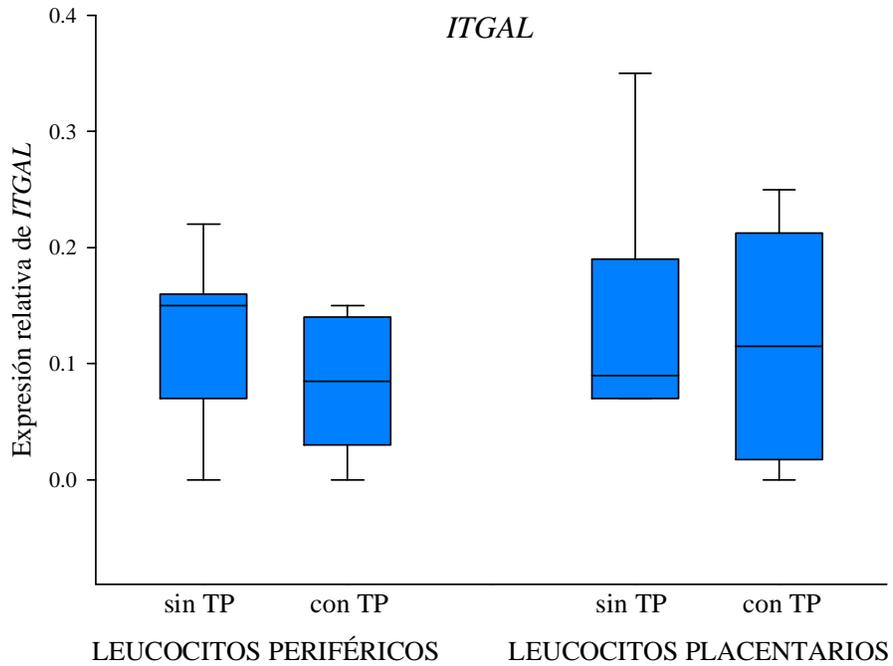


Figura 4. Expresión génica de *ITGAL* e *ITGAM* por leucocitos periféricos y placentarios al término de la gestación.

N=6 sin TP; N=8 con TP.

DISCUSIÓN

El ambiente inflamatorio que se genera en el entorno de las membranas fetales, durante el trabajo de parto humano está asociado con el reclutamiento e infiltración de leucocitos al término de la gestación (Osman *et al.* 2003, Thomson *et al.* 1999). Estas células inmunes podrían provenir de la circulación periférica materna o de la circulación local, atraídas por medio de un proceso quimiotáctico inducido por las propias membranas fetales (Gomez-Lopez *et al.* 2009).

Una vez establecidos en el espacio coriodecidual, los leucocitos podrían modular la síntesis de diversas moléculas responsables de los eventos locales que llevan al trabajo de parto. En este sentido se ha observado que el plasma de sangre placentaria contiene una mayor concentración de citocinas proinflamatorias en comparación con la sangre periférica materna, e induce una mayor secreción de MMP-9, provocando la degradación y pérdida de estructura de las fibras de colágena que constituyen la matriz extracelular de las membranas fetales (Estrada-Gutierrez *et al.* 2005, Vega Sánchez *et al.* 2004).

A partir de estas observaciones, en el presente trabajo nos dimos a la tarea de caracterizar a los leucocitos presentes en la circulación intrauterina, representados por los leucocitos de sangre placentaria, como posibles mediadores del proceso inflamatorio y colagenolítico local al término de la gestación.

El análisis de la composición celular de la sangre placentaria mostró diferencias con respecto a la sangre periférica materna, especialmente en cuanto a los monocitos y los linfocitos T.

Observamos que al término de la gestación los monocitos/macrófagos CD14⁺ se encuentran significativamente elevados en la circulación placentaria, diferencia que se acentúa con la presencia del trabajo de parto. Este hallazgo sugiere tanto un reclutamiento selectivo de células CD14⁺ hacia el ambiente intrauterino al final de la gestación, como una posible participación de monocitos/macrófagos en el establecimiento del microambiente inflamatorio local o en la activación de células efectoras como los linfocitos T.

El porcentaje de linfocitos T es significativamente menor en la circulación placentaria que en la periférica antes del trabajo de parto, lo que podría sugerir que dichas células abandonan la circulación local para infiltrar la coriodecidea como uno de los eventos iniciales en preparación para el trabajo de parto.

Esta hipótesis está sustentada tanto por hallazgos previos de nuestro laboratorio en donde se mostró que los linfocitos T son el tipo celular más abundante del infiltrado leucocitario en la coriodecidea (Gomez Lopez *et al.* 2008), así como por los hallazgos de Tilburgs y colaboradores, quienes mostraron que los linfocitos T, particularmente las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺, son más abundantes en la coriodecidea que en la circulación periférica y placentaria al término de la gestación (Tilburgs *et al.* 2006). Esta observación también concuerda con el

incremento de estas células en los tejidos gestacionales durante el trabajo de parto que se ha reportado previamente (Moore *et al.* 2003, Osman *et al.* 2003, Thomson *et al.* 1999).

Además de las diferencias observadas en la proporción de subpoblaciones de leucocitos, nuestros resultados mostraron importantes diferencias funcionales entre los leucocitos de circulación placentaria y periférica.

Durante el trabajo de parto, los leucocitos placentarios muestran un mayor perfil inflamatorio que los leucocitos periféricos, caracterizado principalmente por un incremento en la expresión de *IL1B* y una menor expresión de su inhibidor *IL1RN*. Adicionalmente, cuando los leucocitos placentarios han sido expuestos a las condiciones del trabajo de parto, responden con mayor avidez al estímulo externo del LPS, mediante una mayor secreción de TNF- α , IL-1 y IL-6.

Lo anterior sugiere que durante el trabajo de parto, y particularmente al infiltrar la coriodecidua, los leucocitos placentarios serían más susceptibles a cualquier estímulo, ya sea inflamatorio o de otro tipo, que pudieran producir las células de los tejidos locales. Además implicaría que en el caso de una infección intrauterina, los leucocitos presentes en la circulación placentaria serían más adecuados para responder a un estímulo infeccioso que los leucocitos periféricos, modulando además el microambiente inflamatorio que se genera como resultado de la exposición de los tejidos locales a componentes bacterianos al secretar moléculas antiinflamatorias como la IL-1RN (Zaga *et al.* 2004).

También observamos que tanto la expresión como la secreción de MMP-9, marcador de colagenolisis, eran significativamente mayores en los leucocitos de pacientes con trabajo de parto, lo que demuestra que la inducción de la enzima que se observa en el miometrio, cérvix y membranas fetales como consecuencia del trabajo de parto, afecta de igual manera a los leucocitos circulantes (Choi *et al.* 2007, Stygar *et al.* 2002, Vadillo-Ortega *et al.* 1995).

Un hallazgo inesperado fue que la cantidad de MMP-9 secretada por los leucocitos es mucho mayor que lo que se había observado en estudios previos de nuestro laboratorio al analizar la enzima secretada por explantes de membranas corioamnióticas (García-López *et al.* 2007, Zaga-Clavellina *et al.* 2006). En el caso de las membranas, la concentración de enzima había sido detectada en concentraciones de picogramos, mientras que en el presente trabajo la secreción de MMP-9 por los leucocitos fue 10 veces mayor, es decir, en nanogramos.

Finalmente, el análisis de la expresión de las moléculas de adhesión LFA-1 y MAC-1, ligandos de la ICAM-1 que expresan los tejidos gestacionales durante el trabajo de parto, mostró un claro incremento en la expresión del gen que codifica para Mac-1 en los leucocitos placentarios. Este incremento ha sido reportado anteriormente en los monocitos y granulocitos de sangre periférica materna al término de la gestación (Luppi *et al.* 2004, Yuan *et al.* 2009).

Nuestros resultados sugieren que mientras los leucocitos de sangre periférica materna podrían aumentar su expresión de Mac-1 como resultado del avance de la

gestación, los leucocitos que circulan en la placenta incrementan dicha expresión exclusivamente como respuesta a señales asociadas con el trabajo de parto, lo que les permitiría interactuar con las células locales que estuvieran expresando ICAM-1.

En conjunto nuestros resultados soportan la hipótesis de que al término de la gestación se reclutan subpoblaciones específicas de leucocitos a la interfase materno-fetal, principalmente monocitos y linfocitos T, cuya permanencia en este espacio está mediada por la expresión local de moléculas de adhesión específicas. El perfil de expresión y secreción de citocinas proinflamatorias y MMPs que muestran los leucocitos placentarios, así como su capacidad de respuesta a estímulos externos, les permitiría modular el microambiente inflamatorio y colagenolítico local que se genera en los tejidos gestacionales durante el trabajo de parto.

Esto abre la posibilidad de que una interacción molecular entre los leucocitos infiltrantes y las células coriodeciduals pudiera resultar en la amplificación de la red de señales que promueven el trabajo de parto, contribuyendo además de forma significativa a la degradación y ruptura de las membranas fetales.

CONCLUSIONES

En el presente estudio se demostró que una combinación específica de subpoblaciones de leucocitos está presente en la interfase materno-fetal durante el trabajo de parto humano.

Se demostró también que existen diferencias funcionales en los leucocitos placentarios en comparación con los leucocitos de sangre periférica materna al término de la gestación y particularmente durante el trabajo de parto, caracterizadas por un patrón de expresión y secreción de citocinas específico.

La permanencia de los leucocitos en la coriodecidual estaría siendo favorecida por la expresión de moléculas de adhesión celular complementarias a aquellas que expresan las membranas fetales.

Los resultados del presente trabajo en conjunto con hallazgos previos de nuestro laboratorio y de otros grupos, apoyan la hipótesis de que la inflamación local que se desarrolla en los tejidos gestacionales en asociación con el trabajo de parto es el resultado de una respuesta inmune coordinada por un grupo específico de leucocitos que son reclutados en la interfase materno-fetal al término de la gestación.

PERSPECTIVAS

Los resultados del presente trabajo plantean diversas preguntas sobre el papel que juegan los leucocitos durante el trabajo de parto humano, algunas de las cuales ya se han empezado a explorar en nuestro laboratorio.

En primer lugar, se deberá analizar cada una de las diferentes subpoblaciones de leucocitos placentarios para identificar al tipo celular que pudiera estar expresando y secretando la mayor cantidad de moléculas efectoras (citocinas, MMPs, prostaglandinas, etc.), y de esta forma modulando el microambiente coriodecidual.

Otra pregunta derivada del presente trabajo se orienta a entender cómo es que los leucocitos maternos adquieren características funcionales distintas cuando dejan la periferia y llegan al ambiente intrauterino, particularmente a la placenta. En este sentido se está desarrollando el proyecto "Caracterización del transcriptoma y proteoma de leucocitos placentarios durante el trabajo de parto" dentro del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes para analizar los genes y proteínas específicos que expresan estas células en respuesta a señales presentes en el microambiente placentario.

Una vez caracterizado con mayor detalle el perfil fenotípico y funcional de los leucocitos placentarios y periféricos, resultará indispensable compararlos con los leucocitos infiltrados en la coriodecidual, con el fin de establecer una cinética de migración y posible activación de estas células en el ambiente intrauterino.

Finalmente, la presencia de un mayor número de linfocitos T en el ambiente intrauterino durante el trabajo de parto podría sugerir un cambio en la tolerancia que el sistema inmune materno mantiene a lo largo de la gestación. Por ello, en nuestro laboratorio se ha empezado a investigar la presencia de linfocitos maternos específicos contra antígenos fetales y su posible activación al término de la gestación y particularmente durante el trabajo de parto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal A., Gupta S., Sharma R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3 28

Al-Matubsi H. Y., Eis A. L., Brodt-Eppley J., MacPhee D. J., Lye S., Myatt L. Expression and localization of the contractile prostaglandin F receptor in pregnant rat myometrium in late gestation, labor, and postpartum. *Biol Reprod* 2001; 65 (4): 1029-37

Allport V. C., Pieber D., Slater D. M., Newton R., White J. O., Bennett P. R. Human labour is associated with nuclear factor-kappaB activity which mediates cyclo-oxygenase-2 expression and is involved with the 'functional progesterone withdrawal'. *Mol Hum Reprod* 2001; 7 (6): 581-6

Arechavaleta-Velasco F., Ogando D., Parry S., Vadillo-Ortega F. Production of matrix metalloproteinase-9 in lipopolysaccharide-stimulated human amnion occurs through an autocrine and paracrine proinflammatory cytokine-dependent system. *Biol Reprod* 2002; 67 (6): 1952-8

Birkedal-Hansen H., Moore W. G., Bodden M. K., Windsor L. J., Birkedal-Hansen B., DeCarlo A., Engler J. A. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4 (2): 197-250

Bollapragada S. S., MacKenzie F., Norrie J. D., Eddama O., Petrou S., Reid M., Norman J. E. Randomised placebo-controlled trial of outpatient (at home) cervical ripening with isosorbide mononitrate (IMN) prior to induction of labour – clinical trial with analyses of efficacy and acceptability. The IMOP Study. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 2009; 116 (9): 1185-1195

Borden P., Heller R. A. Transcriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1997; 7 (1-2): 159-78

Carreras Moratonas E., Crispi Brillas F. Marcadores ecográficos de prematuridad. La longitud cervical. en: Cabero Roura L. Parto Prematuro. Editorial Médica Panamericana, Madrid 2004. Pág.

Casanueva E., Magana L., Pfeffer F., Baez A. Incidence of premature rupture of membranes in pregnant women with low leukocyte levels of vitamin C. *Eur J Clin Nutr* 1991; 45 (8): 401-5

Challis J. R., Sloboda D. M., Alfaidy N., Lye S. J., Gibb W., Patel F. A., Whittle W. L., Newnham J. P. Prostaglandins and mechanisms of preterm birth. *Reproduction* 2002; 124 (1): 1-17

Choi S. J., Oh S., Kim J. H., Roh C. R. Changes of nuclear factor kappa B (NF-kappaB), cyclooxygenase-2 (COX-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human myometrium before and during term labor. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2007; 132 (2): 182-8

Estrada-Gutierrez G., Zaga V., Gonzalez-Jimenez M. A., Beltran-Montoya J., Maida-Claros R., Giono-Cerezo S., Vadillo-Ortega F. Initial characterization of the microenvironment that regulates connective tissue degradation in amniochorion during normal human labor. *Matrix Biol* 2005; 24 (4): 306-12

Facchinetti F., Venturini P., Blasi I., Giannella L. Changes in the cervical competence in preterm labour. *BJOG* 2005; 112 Suppl 1 23-7

Garcia-Lopez G., Vadillo-Ortega F., Merchant-Larios H., Maida-Claros R., Osorio M., Soriano-Becerril D., Flores-Herrera H., Beltran-Montoya J., Garfias-Becerra Y., Zaga-Clavellina V. Evidence of in vitro differential secretion of 72 and 92 kDa type IV collagenases after selective exposure to lipopolysaccharide in human fetal membranes. *Mol Hum Reprod* 2007; 13 (6): 409-418

Gomez-Lopez N., Estrada-Gutierrez G., Jimenez-Zamudio L., Vega-Sanchez R., Vadillo-Ortega F. Fetal membranes exhibit selective leukocyte chemotactic activity during human labor. *Journal of Reproductive Immunology* 2009; 80 (1): 122-131

Gomez Lopez N. Y., Estrada-Gutierrez G., Vadillo-Perez L., Vadillo-Ortega F. Changes in Leukocyte Subpopulations in the Choriondecidua and Fetal Membranes during Human Labor. *Reproductive Sciences* 2008; 15 (2_suppl): 86A

Grammatopoulos D. K., Hillhouse E. W. Role of corticotropin-releasing hormone in onset of labour. *Lancet* 1999; 354 (9189): 1546-1549

Grupo-Mexicano-de-Consenso. Consenso sobre el manejo clínico de la amenaza de parto pretérmino. *Ginecol Obstet Mex* 2007; 75 (S1): S37-S47

Hernandez-Guerrero C., Monzon-Bordonaba F., Jimenez-Zamudio L., Ahued-Ahued R., Arechavaleta-Velasco F., Strauss J. F., 3rd, Vadillo-Ortega F. In-vitro secretion of proinflammatory cytokines by human amniochorion carrying hyper-responsive gene polymorphisms of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1beta. *Mol Hum Reprod* 2003; 9 (10): 625-9

Janeway C. A., Travers P., Walport M., Shlomchik M. J. *Innate Immunity*. en: *Immunobiology: the immune system in health and disease*. Garland Science Publishing, Nueva York 2005. Capítulo 2. Pág. 37-100.

Kelly R. W. Inflammatory mediators and parturition. *Rev Reprod* 1996; 1 (2): 89-96

Lappas M., Rice G. E. Transcriptional regulation of the processes of human labour and delivery. *Placenta* 2009; 30 Suppl A S90-5

Locksmith G. J., Clark P., Duff P., Saade G. R., Schultz G. S. Amniotic fluid concentrations of matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 during pregnancy and labor. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184 (2): 159-64

Lopez-Bojorquez L. N., Arechavaleta-Velasco F., Vadillo-Ortega F., Montes-Sanchez D., Ventura-Gallegos J. L., Zentella-Dehesa A. NF-kappaB translocation and endothelial cell activation is potentiated by macrophage-released signals co-secreted with TNF-alpha and IL-1beta. *Inflamm Res* 2004; 53 (10): 567-75

Luppi P., Irwin T. E., Simhan H., Deloia J. A. CD11b Expression on circulating leukocytes increases in preparation for parturition. *Am J Reprod Immunol* 2004; 52 (5): 323-9

Lye S. J., Tsui P., Dong X., Yu C., Mitchell J. A., Dorigin A., Challis J. R., Langille L., Shynlova O. Myometrial programming: a new concept in the control of myometrial function during pregnancy. Society for Gynecologic Investigation 52nd Annual Scientific Meeting, Vancouver, Canada 2005.

Macphee D. J., Lye S. J. Focal adhesion signaling in the rat myometrium is abruptly terminated with the onset of labor. *Endocrinology* 2000; 141 (1): 274-83

Malak T. M., Ockleford C. D., Bell S. C., Dalgleish R., Bright N., Macvicar J. Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes. *Placenta* 1993; 14 (4): 385-406

Marvin K. W., Keelan J. A., Coleman M. A., McCowan L. M., Zhou R. L., Mitchell M. D. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in cervicovaginal fluid of women presenting with preterm labor: predictive value for preterm delivery. *Am J Reprod Immunol* 2000a; 43 (5): 264-71

Marvin K. W., Keelan J. A., Sato T. A., Coleman M. A., McCowan L. M., Miller H. C., Mitchell M. D. Enhanced expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in amnion with term and preterm labour. *Placenta* 2000b; 21 (1): 115-21

Marvin K. W., Keelan J. A., Sato T. A., Coleman M. A., McCowan L. M., Mitchell M. D. Expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in choriodecidua with labour and delivery at term and preterm. *Reprod Fertil Dev* 1999; 11 (4-5): 255-62

Mitchell J. A., Lye S. J. Regulation of connexin43 expression by c-fos and c-jun in myometrial cells. *Cell Commun Adhes* 2001; 8 (4-6): 299-302

Mitchell M. D., Keelan J. A. Inflammation and normal labor. en: Peebles D. M., Myatt L. Inflammation and pregnancy. Informa Healthcare, Londres 2006. Capítulo 6. Pág. 79-93.

Modesti A., Scarpa S., D'Orazi G., Simonelli L., Caramia F. G. Localization of type IV and V collagens in the stroma of human amnion. *Prog Clin Biol Res* 1989; 296 459-63

Moore J. M., Shi Y. P., Othoro C., Nahlen B. L., Lal A. A., Udhayakumar V. Comparative flow cytometric analysis of term placental intervillous and peripheral blood from immediate postpartum women in Western Kenya. *Placenta* 2003; 24 (7): 779-85

Myatt L., Lye S. J. Expression, localization and function of prostaglandin receptors in myometrium. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004; 70 (2): 137-48

Orsino A., Taylor C. V., Lye S. J. Connexin-26 and connexin-43 are differentially expressed and regulated in the rat myometrium throughout late pregnancy and with the onset of labor. *Endocrinology* 1996; 137 (5): 1545-53

Osman I., Crawford M., Jordan F., Young A., Norman J., Thomson A. Expression and localization of cell adhesion molecules in human fetal membranes during parturition. *J Reprod Immunol* 2004; 63 (1): 11-21

Osman I., Young A., Ledingham M. A., Thomson A. J., Jordan F., Greer I. A., Norman J. E. Leukocyte density and pro-inflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term. *Mol Hum Reprod* 2003; 9 (1): 41-5

Ou C. W., Chen Z. Q., Qi S., Lye S. J. Increased expression of the rat myometrial oxytocin receptor messenger ribonucleic acid during labor requires both mechanical and hormonal signals. *Biol Reprod* 1998; 59 (5): 1055-61

Ou C. W., Orsino A., Lye S. J. Expression of connexin-43 and connexin-26 in the rat myometrium during pregnancy and labor is differentially regulated by mechanical and hormonal signals. *Endocrinology* 1997; 138 (12): 5398-407

Parry S., Strauss J. F., 3rd. Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med* 1998; 338 (10): 663-70

Shynlova O., Kwong R., Lye S. Mechanical stretch regulates hypertrophic phenotype of the myometrium during pregnancy. *Reproduction* 2009; 10.1530/rep-09-0260

Shynlova O., Mitchell J. A., Tsampalieros A., Langille B. L., Lye S. J. Progesterone and Gravity Differentially Regulate Expression of Extracellular Matrix Components in the Pregnant Rat Myometrium. *Biology of Reproduction* 2004; 70 (4): 986-992

Shynlova O., Oldenhof A., Dorogin A., Xu Q., Mu J., Nashman N., Lye S. J. Myometrial Apoptosis: Activation of the Caspase Cascade in the Pregnant Rat Myometrium at Midgestation. *Biology of Reproduction* 2006; 74 (5): 839-849

Shynlova O., Tsui P., Dorogin A., Langille B. L., Lye S. J. Insulin-like Growth Factors and Their Binding Proteins Define Specific Phases of Myometrial Differentiation During Pregnancy in the Rat. *Biology of Reproduction* 2007a; 76 (4): 571-578

Shynlova O., Williams S. J., Draper H., White B. G., MacPhee D. J., Lye S. J. Uterine Stretch Regulates Temporal and Spatial Expression of Fibronectin Protein and Its Alpha 5 Integrin Receptor in Myometrium of Unilaterally Pregnant Rats. *Biology of Reproduction* 2007b; 77 (5): 880-888

Steinborn A., Sohn C., Heger S., Niederhut A., Hildenbrand R., Kaufmann M. Labour-associated expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in placental endothelial cells indicates participation of immunological processes in parturition. *Placenta* 1999; 20 (7): 567-73

Stevens M. Y., Challis J. R., Lye S. J. Corticotropin-releasing hormone receptor subtype 1 is significantly up-regulated at the time of labor in the human myometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83 (11): 4107-15

Stygar D., Wang H., Vladic Y. S., Ekman G., Eriksson H., Sahlin L. Increased level of matrix metalloproteinases 2 and 9 in the ripening process of the human cervix. *Biol Reprod* 2002; 67 (3): 889-94

Tachado S. D., Zhang J., Zhu J., Patel N., Koziel H. HIV impairs TNF-alpha release in response to Toll-like receptor 4 stimulation in human macrophages in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 33 (6): 610-21

Tejero E., Perichart O., Pfeffer F., Casanueva E., Vadillo-Ortega F. Collagen synthesis during pregnancy, vitamin C availability, and risk of premature rupture of fetal membranes. *Int J Gynaecol Obstet* 2003; 81 (1): 29-34

Thomson A. J., Telfer J. F., Young A., Campbell S., Stewart C. J., Cameron I. T., Greer I. A., Norman J. E. Leukocytes infiltrate the myometrium during human parturition: further evidence that labour is an inflammatory process. *Hum Reprod* 1999; 14 (1): 229-36

Tilburgs T., Roelen D. L., Mast B. J. v. d., Schip J. J. v., Kleijburg C., Groot-Swings G. M. d., Kanhai H. H. H., Claas F. H. J., Scherjon S. A. Differential Distribution of CD4+CD25^{bright} and CD8+CD28^{low} T-cells in Decidua and Maternal Blood During Human Pregnancy. *Placenta* 2006; 27 47-53

Tornblom S. A., Maul H., Klimaviciute A., Garfield R. E., Bystrom B., Malmstrom A., Ekman-Ordeberg G. mRNA expression and localization of bNOS, eNOS and iNOS in human cervix at preterm and term labour. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3 33

Vadillo-Ortega F., Gonzalez-Avila G., Furth E. E., Lei H., Muschel R. J., Stetler-Stevenson W. G., Strauss J. F., 3rd. 92-kd type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) activity in human amniochorion increases with labor. *Am J Pathol* 1995; 146 (1): 148-56

Vadillo-Ortega F., Gonzalez-Avila G., Karchmer S., Cruz N. M., Ayala-Ruiz A., Lama M. S. Collagen metabolism in premature rupture of amniotic membranes. *Obstet Gynecol* 1990; 75 (1): 84-8

Vadillo-Ortega F., Hernandez A., Gonzalez-Avila G., Bermejo L., Iwata K., Strauss J. F., 3rd. Increased matrix metalloproteinase activity and reduced tissue inhibitor of metalloproteinases-1 levels in amniotic fluids from pregnancies complicated by premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174 (4): 1371-6

Vadillo Ortega F., Hernández Guerrero C. Fisiopatología de la rotura prematura de membranas. en: Cabero Roura L., Saldivar Rodríguez D., Cabrillo Rodríguez E. *Obstetricia y medicina materno-fetal*. Editorial Médica Panamericana, 2007. Pág.

Vadillo Ortega F., Pfeffer Burak F., Bermejo Martinez M. L., Hernandez Miranda M. A., Beltran Montoya J., Tejero Barrera E., Casanueva y Lopez E. Factores dieteticos y ruptura prematura de membranas. Efecto de la vitamina C en la degradacion de colagena en el corioamnios. *Ginecol Obstet Mex* 1995; 63 158-62

Vega Sánchez R., Estrada Gutiérrez G., Cébulo Vázquez A., Beltrán Montoya J., Vadillo Ortega F. Caracterización del espacio coriodesidual como un microambiente rico en moléculas efectoras que inducen la rotura de las membranas corioamnióticas durante el trabajo de parto. *Ginecol Obstet Mex* 2004; 72 593-601

Winkler M., Fischer D. C., Hlubek M., van de Leur E., Haubeck H. D., Rath W. Interleukin-1beta and interleukin-8 concentrations in the lower uterine segment during parturition at term. *Obstet Gynecol* 1998a; 91 (6): 945-9

Winkler M., Fischer D. C., Ruck P., Horny H. P., Kemp B., Rath W. [Cytokine concentrations and expression of adhesion molecules in the lower uterine segment during parturition at term: relation to cervical dilatation and duration of labor]. *Z Geburtshilfe Neonatol* 1998b; 202 (4): 172-5

Winkler M., Fischer D. C., Ruck P., Marx T., Kaiserling E., Oberpichler A., Tschesche H., Rath W. Parturition at term: parallel increases in interleukin-8 and proteinase concentrations and neutrophil count in the lower uterine segment. *Hum Reprod* 1999a; 14 (4): 1096-100

Winkler M., Oberpichler A., Tschesche H., Ruck P., Fischer D. C., Rath W. Collagenolysis in the lower uterine segment during parturition at term: correlations with stage of cervical dilatation and duration of labor. *Am J Obstet Gynecol* 1999b; 181 (1): 153-8

Winkler M., Ruck P., Horny H. P., Wehrmann M., Kemp B., Kaiserling E., Rath W. Expression of cell adhesion molecules by endothelium in the human lower uterine segment during parturition at term. *Am J Obstet Gynecol* 1998c; 178 (3): 557-61

Word R. A., Li X. H., Hnat M., Carrick K. Dynamics of cervical remodeling during pregnancy and parturition: mechanisms and current concepts. *Semin Reprod Med* 2007; 25 (1): 69-79

Young A., Thomson A. J., Ledingham M., Jordan F., Greer I. A., Norman J. E. Immunolocalization of proinflammatory cytokines in myometrium, cervix, and fetal membranes during human parturition at term. *Biol Reprod* 2002; 66 (2): 445-9

Yuan M., Jordan F., McInnes I. B., Harnett M. M., Norman J. E. Leukocytes are primed in peripheral blood for activation during term and preterm labour. *Mol. Hum. Reprod.* 2009; 15 (11): 713-724

Zaga-Clavellina V., Merchant-Larios H., Garcia-Lopez G., Maida-Claros R., Vadillo-Ortega F. Differential secretion of matrix metalloproteinase-2 and -9 after selective infection with group B streptococci in human fetal membranes. *J Soc Gynecol Investig* 2006; 13 (4): 271-9

Zaga V., Estrada-Gutierrez G., Beltran-Montoya J., Maida-Claros R., Lopez-Vancell R., Vadillo-Ortega F. Secretions of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha by whole fetal membranes depend on initial interactions of amnion or chorion with lipopolysaccharides or group B streptococci. *Biol Reprod* 2004; 71 (4): 1296-302

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS DEL PRESENTE TRABAJO

Vega Sánchez R., Vadillo Ortega F. Fisiopatología del nacimiento pretérmino. Ginecol Obstet Mex 2007; 75 (S1): S14-S19.

Vega-Sanchez R., Gomez-Lopez N., Flores-Pliego A., Clemente-Galvan S., Estrada-Gutierrez G., Zentella-Dehesa A., Maida-Claros R., Beltran-Montoya J., Vadillo-Ortega F. Placental blood leukocytes are functional and phenotypically different than peripheral leukocytes during human labor. J Reprod Immunol (2009), doi: 10.1016/j.jri.2009.08.002



Fisiopatología del nacimiento pretérmino

Rodrigo Vega Sánchez,* Felipe Vadillo Ortega*

En el ser humano, el trabajo de parto normal a término se define como aquel que ocurre entre la semana 37 y la 40 de la gestación, si se toma como referencia la fecha de la última menstruación.¹ Este hecho se caracteriza de manera terminal por tres procesos: 1) la activación del miometrio que lleva a contracciones uterinas; 2) la maduración cervical que culmina con el borramiento y dilatación del cuello uterino y 3) la rotura de las membranas corioamnióticas con salida de líquido amniótico transvaginal. En condiciones fisiológicas estos eventos aparecen en forma sincronizada en cualquier momento después de la semana 37 de la gestación, y dan paso al trabajo de parto normal.

Sin embargo, en ocasiones alguno de estos mecanismos puede activarse de forma aislada antes de que la gestación llegue a término. En estos casos pueden manifestarse distintos padecimientos obstétricos, como la amenaza de parto pretérmino, la incompetencia cervical o la rotura prematura de membranas, que explican el síndrome del nacimiento pretérmino.

Aunque recientemente se incrementó el conocimiento de los mecanismos fisiopatogénicos del nacimiento pretérmino, no se sabe todavía si éste consiste, en general, en la activación temprana de los mecanismos que conducen al trabajo de parto normal a término. Existen algunas pruebas que indican que aunque hay rutas que podrían ser propias del naci-

miento pretérmino, las vías finales son las mismas en ambas condiciones.

En este artículo se describen algunos de los mecanismos celulares y moleculares que mejor se han caracterizado y que son concomitantes al padecimiento del nacimiento pretérmino.

ACTIVACIÓN DEL MIOMETRIO

Durante el embarazo, el útero experimenta cambios bioquímicos y morfológicos que tienen como fin la adaptación del tejido muscular a las necesidades de la gestación y, finalmente, a su preparación para el momento del parto. Estos cambios se dan como respuesta de las células del miometrio a señales mecánicas y endocrinas, que llevan a la activación de distintas vías de señalización intracelular, que inducen cambios estructurales y de función en dichas células y en sus interacciones con el tejido conectivo y con otras células.

Los cambios en la morfología, función y expresión génica de las células miometriales a lo largo de la gestación, han llevado a proponer recientemente un modelo conocido como "Modelo de programación del miometrio",² que distingue cuatro fases en el fenotipo de estas células. En la primera fase, llamada proliferativa, hay una elevada concentración del factor de crecimiento similar a insulina (IGF) y de las proteínas de unión a IGF (IGFBP), así como de la molécula antiapoptótica Bcl-2. La segunda fase, de síntesis, se asocia con el incremento en las concentraciones de progesterona, así como de la distensión miometrial. Se caracteriza por hipertrofia de las células y elaboración de proteínas de matriz extracelular (MEC). En consecuencia, hay cambios en la interacción de las células con la matriz extracelular debido a la remodelación de las adhesiones focales. El paso de la primera a la segunda fase parece darse por la activación parcial de

* Dirección de Investigación, Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes.

Correspondencia: Dr. Felipe Vadillo Ortega. Dirección de Investigación, Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes. Montes Urales 800, Lomas Virreyes, México, DF, CP 11000. E-mail: fvadillo@servidor.inper.edu.mx

La versión completa de este artículo también está disponible en internet: www.revistasmedicasmexicanas.com.mx

las vías intracelulares que llevan a la muerte celular programada (apoptosis), en respuesta al estiramiento mecánico del tejido y a la hipoxia. La tercera fase es la contráctil, donde hay un cambio drástico en la síntesis de matriz extracelular, y se favorece la síntesis de componentes de la membrana basal, específicamente la laminina y la colágena tipo IV. Asimismo, aumenta la concentración de proteínas directamente involucradas en la contractilidad del músculo, como la γ -actina y la tropomiosina. La última fase es la del parto, donde el fenotipo de las células miometriales y su producción de moléculas efectoras se encargan de iniciar las contracciones y favorecer la expulsión del feto. En esta fase se activan dos principales vías de transducción de señales: la vía del complejo proteico activador 1 (AP-1) y la vía de las cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK), cuyos productos finales son factores de transcripción que activan diversos genes cuya concentración aumenta significativamente poco antes de iniciar el trabajo de parto, y que están directamente relacionados con la aparición de las contracciones uterinas.

Entre estos genes se encuentran los receptores de estrógenos, de cortisol, de oxitocina,³ de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y de su receptor,⁴ los receptores de prostaglandina E2 y F2 α ^{5,6} y de la conexina 43 que estabiliza las adhesiones focales de las células miometriales con la matriz extracelular,⁷⁻¹⁰ entre otros efectos.

Estos cambios se relacionan con distintas capacidades funcionales que manifiesta el miometrio durante la gestación. La etapa más larga de este proceso es la fase de quiescencia, caracterizada por poca o nula actividad contráctil del miometrio, que involucra a las primeras dos etapas y que se alarga hasta el tercer trimestre de la gestación.

La progesterona es el mediador más importante en el mantenimiento de esta etapa funcional; y en muchos animales, no en el humano, la caída abrupta de la concentración de esta hormona esteroide antecede al inicio de la actividad uterina que acompaña al parto.

La siguiente etapa, que se inicia de manera variable y errática en el tercer trimestre de la gestación, corresponde a la fase de maduración del miometrio, que incluye todos los cambios mencionados en la fase tres y que de manera progresiva prepara al mio-

metrio para el momento del trabajo de parto. Esta etapa es controlada por la concentración progresiva de cantidades crecientes de hormona liberadora de corticotropinas.

La última etapa funcional es la manifestación de todas las capacidades contráctiles del miometrio durante el trabajo de parto, bajo el influjo de los compuestos uterotónicos, como la oxitocina y las prostaglandinas.

Hace poco se propuso que el feto podría contribuir de manera importante en la regulación de los cambios que sufre el miometrio a lo largo de la gestación. Al parecer, las señales primarias (estrógeno, cortisol) que activan al miometrio en la fase del parto, se deben al aumento en la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal del feto. Se ha demostrado que el aumento en la producción de cortisol, que depende mayoritariamente del feto a lo largo de la gestación, regula la concentración placentaria de la enzima sintetasa de prostaglandina H tipo 2 (PGHS2), en forma dependiente del estrógeno.¹¹ La enzima PGHS2 participa en la síntesis de prostaglandinas, lo que aumenta las concentraciones de prostaglandina E2 (PGE2), cuya potente acción uterotónica favorece las contracciones del miometrio, características del trabajo de parto.

El hallazgo de la participación del feto en la inducción de las fases finales de la activación del miometrio contribuyó a explicar la inducción del trabajo de parto pretérmino. Así, se puede entender que la existencia de elementos que provocan la alarma en el feto, con liberación de hormona liberadora de corticotropinas y el consecuente aumento en la concentración circulante de cortisol, que pasará al microambiente uterino, inducirán la actividad del tejido muscular. Una condición como esta puede ser provocada, por ejemplo, por una infección intrauterina que estimula a las células fetales que median la respuesta inmunológica innata a liberar mediadores inflamatorios, que al actuar sobre el sistema nervioso fetal liberará hormona liberadora de corticotropinas.

MADURACIÓN CERVICAL

A lo largo de la gestación, el cuello uterino se mantiene formado y constituye una barrera mecánica y funcional que aísla el ambiente intrauterino. Pero hacia

el final del embarazo ocurren una serie de cambios bioquímicos y morfológicos que lo predisponen para el momento del trabajo de parto, como la longitud del canal y del orificio cervical.¹² Los cambios bioquímicos que experimenta el cuello uterino al acercarse el parto, consisten en: modificación de la organización e integridad de las fibras de colágena, y alteración en las concentraciones de agua, proteoglicanos y ácido hialurónico. Todos los cambios están asociados con el aumento de mediadores inflamatorios, como la interleucina-1 beta (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), que provocan incremento en la síntesis de quimiocinas, prostaglandinas y metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs), una familia de proteasas que degrada selectivamente componentes de la matriz extracelular y que juega un papel central en la remodelación del tejido conectivo del cuello uterino.

Está demostrado que durante el trabajo de parto aumentan las concentraciones cervicales de IL-1 β , TNF- α e IL-6, así como de IL-8, citocina que induce quimiotaxis de neutrófilos. Al parecer, las principales responsables del incremento en la síntesis de citocinas y de las metaloproteasas de matriz extracelular no son las células locales del tejido cervical, sino los leucocitos que durante el trabajo de parto invaden este tejido al ser atraídos por quimiotaxis.¹³

El mantenimiento de la morfología del cuello uterino podría relacionarse con la expresión diferencial del factor de transcripción relacionado con la microftalmia (MITF) en las células del estroma cervical. En un modelo experimental de ratón se observó que la concentración de una de las isoformas del factor de transcripción relacionado con la microftalmia (MITF-CX) disminuye significativamente durante la maduración cervical, para recuperar sus concentraciones normales 24 horas después del parto. Esto sugiere que la actividad transcripcional del factor de transcripción asociado a microftalmia tiene un papel importante en el mantenimiento fisiológico de la integridad del cuello uterino, así como en la maduración cervical durante el trabajo de parto.¹⁴

Las prostaglandinas son otro mediador conocido de los cambios cervicales, que ejercen una acción proinflamatoria y actúan de forma sinérgica con citocinas, como la IL-8. La acción de las prostaglandinas puede deberse a su efecto vasodilatador, que altera la

permeabilidad de los vasos sanguíneos y aumenta el flujo sanguíneo local.¹⁵

Se ha propuesto que el mediador final de los mecanismos que llevan a la dilatación y borramiento cervical es el óxido nítrico (NO), que es producido por cualquiera de las tres isoformas de la enzima sintetasa de óxido nítrico (NOS) a partir del aminoácido L-arginina y oxígeno. Las isoformas endotelial (eNOS) y neuronal (nNOS) son constitutivas y dependientes de calcio, mientras que la tercera, iNOS, es independiente de calcio e inducible por varias citocinas. Las tres isoformas de sintetasa de óxido nítrico se han encontrado en el tejido cervical, pero durante el trabajo de parto la isoforma endotelial aumenta mucho. En las pacientes que tienen parto pretérmino, la concentración de los tres isómeros de sintetasa de óxido nítrico es significativamente mayor que en los tejidos de las pacientes en trabajo de parto a término.¹⁶

En pacientes con amenaza de parto pretérmino existe mayor actividad del óxido nítrico en el cuello uterino. Además, la aplicación local de agentes donadores de óxido nítrico se ha usado para inducir cambios morfológicos similares a los que ocurren durante la maduración cervical.¹⁷

Estas pruebas experimentales, junto con los hallazgos que demuestran un aumento en la peroxidación de lípidos y en las concentraciones de antioxidantes,¹⁸ han llevado a proponer que un ambiente de estrés oxidativo que incluye la interacción entre citocinas, prostaglandinas y óxido nítrico, es el responsable de las rutas bioquímicas que llevan al borramiento y dilatación del cuello uterino en el parto pretérmino.

ROTURA PREMATURA DE MEMBRANAS (RPM)

Las membranas corioamnióticas humanas son el tejido extraplacentario que delimita el ambiente fetal y lo separa del útero materno. Están formadas por dos capas adyacentes, el corion y el amnios, constituidas a su vez por un epitelio celular y una gran cantidad de tejido conectivo que constituye la matriz extracelular y del cual la colágena es el principal componente.¹⁹ La compleja estructura tridimensional de fibras de colágena es la que provee la fuerza tensil a las membranas, y les confiere la resistencia mecánica que protege al feto.

A lo largo de la gestación, la estructura tridimensional de las membranas se mantiene debido a un cambio constante de su tejido conectivo a través del equilibrio en la síntesis y degradación de colágena. Cuando este equilibrio se pierde, por la disminución en la síntesis de colágena o por mayor actividad colagenolítica, ocurre la rotura de las membranas, ya sea en condiciones de trabajo de parto normal o cuando hay rotura prematura de membranas.²⁰

Las pacientes con rotura prematura de membranas tuvieron mayor tasa de síntesis de colágena en etapas tempranas de la gestación.²¹ Se encontró que una deficiencia marginal en la concentración y biodisponibilidad del ácido ascórbico (vitamina C), cofactor en la síntesis de colágena, está asociada tanto con la aparición de rotura prematura de membranas²² como con el aumento en la cantidad y actividad de metaloproteasas de matriz extracelular.²³ Lo anterior sugiere que las alteraciones en el equilibrio normal de síntesis y degradación pueden llevar a la rotura prematura de membranas.

Diversas pruebas experimentales indican que la degradación de la colágena que compone las membranas puede ser el evento central en el fenómeno de rotura fisiológica o patológica. Esta degradación está controlada por distintas MMP y sus inhibidores tisulares (TIMPs). El incremento en la expresión y activación de la MMP-9, una gelatinasa que degrada colágena tipo IV, así como la disminución en la concentración de su inhibidor específico, el TIMP-1, son concomitantes con la rotura de las membranas en el trabajo de parto y en la rotura prematura de membranas.^{24,25,26}

La concentración del gene de la MMP-9 puede ser inducida por varios factores de crecimiento y citocinas proinflamatorias, especialmente IL-1 β y TNF- α , a través de las vías de transducción del factor nuclear κ B (NF- κ B) y de AP-1.^{27,28} Todos los tipos celulares de membranas corioamnióticas (trofoblastos, fibroblastos, células epiteliales) son capaces de producir MMP-9, la inducción de esta enzima se da a través de un sistema autocrino y paracrino dependiente de la concentración de dichas citocinas.²⁹

Existen polimorfismos de los genes de IL-1 β y de TNF- α que condicionan la secreción exagerada de las correspondientes citocinas ante un estímulo infeccioso. Se ha propuesto que la manifestación

de estos polimorfismos en los tejidos gestacionales podría predisponer a las pacientes a que el circuito que involucra a las citocinas proinflamatorias y a las diferentes MMP-9 se manifieste de manera más grave y, con ello, activar de manera anormal algunos de los mecanismos del trabajo de parto, con lo que se incrementa el riesgo de rotura prematura de membranas, parto pretérmino, o ambas.³⁰

La infección de los tejidos gestacionales es el principal factor vinculado al parto pretérmino.³¹

En casos con infección y en aquellos con trabajo de parto normal la concentración de quimiocinas aumenta en el amnios³² y la coriodecidua,^{33,34} así como la de moléculas de adhesión celular (CAMs) en la placenta,³⁵ en las membranas³⁶ y en los leucocitos circulantes.³⁷ En este contexto, recientemente se demostró que los productos solubles de membranas a término con trabajo de parto y membranas pretérmino, son capaces de inducir quimiotaxis de leucocitos de sangre placentaria, específicamente de linfocitos T.³⁸ Estas células son capaces de inducir la degradación del tejido conectivo de las membranas a través de mayor secreción de IL-1 β , TNF- α y MMP-9.³⁹

Estos hallazgos permiten proponer que en el trabajo de parto normal y en el parto pretérmino, las membranas corioamnióticas absorben leucocitos al entorno de la coriodecidua, y que estas células inmunitarias son las que modulan el proceso de degradación del tejido conectivo de las membranas y su consecuente rotura.

CONCLUSIÓN

A pesar de los avances en la investigación de los procesos involucrados en el trabajo de parto, aún se desconocen las condiciones fisiológicas y patológicas que desencadenan este proceso. Sin embargo, las pruebas experimentales sugieren que el trabajo de parto a término o pretérmino es un proceso de tipo inflamatorio que comienza probablemente en respuesta a señales derivadas del feto y que lleva a la activación del miometrio, el borramiento del cuello uterino y la rotura de las membranas corioamnióticas.

Como respuesta a estas señales, las células de los distintos tejidos locales producen cantidades limitadas de citocinas proinflamatorias, suficientes

para inducir la síntesis de quimiocinas y moléculas de adhesión celular con el fin de permitir la infiltración y permanencia de leucocitos en dichos tejidos. Una vez establecidos, los leucocitos secretan mayor concentración de citocinas proinflamatorias, lo que produce moléculas efectoras, como prostaglandinas y metaloproteasas de matriz extracelular. La actividad de estos mediadores activará las contracciones uterinas, la remodelación y borramiento cervical y la degradación y rotura de las membranas corioamnióticas, características del trabajo de parto.

REFERENCIAS

- World Health Organization. WHO: recommended definitions, terminology and format for statistical tables related to the perinatal period and use of a new certificate for cause of Perinatal deaths. Modifications recommended by FIGO as amended. October 14, 1976. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1977;56:247-53.
- Lye SJ, Tsui P, Dong X, Yu C, et al. Myometrial programming: a new concept in the control of myometrial function during pregnancy. (Texto en preparación para su publicación. Comunicación personal).
- Ou CW, Chen ZQ, Qi S, Lye SJ. Increased expression of the rat myometrial oxytocin receptor messenger ribonucleic acid during labor requires both mechanical and hormonal signals. *Biol Reprod* 1998;59(5):1055-61.
- Stevens MY, Challis JR, Lye SJ. Corticotropin-releasing hormone receptor subtype 1 is significantly up-regulated at the time of labor in the human myometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(11):4107-15.
- Myatt L, Lye SJ. Expression, localization and function of prostaglandin receptors in myometrium. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004;70(2):137-48.
- Al-Matubsi HY, Eis AL, Brodt-Eppley J, MacPhee DJ, et al. Expression and localization of the contractile prostaglandin F receptor in pregnant rat myometrium in late gestation, labor, and postpartum. *Biol Reprod* 2001;65(4):1029-37.
- Ou CW, Orsino A, Lye SJ. Expression of connexin-43 and connexin-26 in the rat myometrium during pregnancy and labor is differentially regulated by mechanical and hormonal signals. *Endocrinology* 1997;138(12):5398-5407.
- MacPhee DJ, Lye SJ. Focal adhesion signaling in the rat myometrium is abruptly terminated with the onset of labor. *Endocrinology* 2000;141(1):274-83.
- Orsino A, Taylor CV, Lye SJ. Connexin-26 and connexin-43 are differentially expressed and regulated in the rat myometrium throughout late pregnancy and with the onset of labor. *Endocrinology* 1996;137(5):1545-53.
- Mitchell JA, Lye SJ. Regulation of connexin-43 expression by c-fos and c-jun in myometrial cells. *Cell Commun Adhes* 2001;8(4-6):299-302.
- Challis JR, Sloboda DM, Alfaidy N, Lye SJ, et al. Prostaglandins and mechanisms of preterm birth. *Reproduction* 2002;124(1):1-17.
- Carreras Moratonas E, Crispi Brillas F. Marcadores ecográficos de prematuridad. La longitud cervical. En: Cabero Roura L, editor. *Parto Prematuro*. Madrid: Médica Panamericana 2004.
- Young A, Thomson AJ, Ledingham MA, Jordan F, Greer IA, Norman JE. Immunolocalization of proinflammatory cytokines in myometrium, cervix and fetal membranes during human parturition at term. *Biol Reprod* 2002;66:445-49.
- Word A. Cervical ripening during pregnancy and parturition. SGI 1st International Summit on Preterm Birth. Siena, Italy 2005.
- Kelly RW. Inflammatory mediators and parturition. *Rev Reprod* 1996;1:89-96.
- Törnblom SA, Maul H, Klimaviciute A, Garfield RE, et al. mRNA expression and localization of bNOS, eNOS and iNOS in human cervix at preterm and term labour. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;3:33-42.
- Facchinetti F, Venturini P, Blasi I, Giannella L. Changes in the cervical competence in preterm labour. *BJOG* 2005;112 (Suppl 1):23-7.
- Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;3:28-49.
- Parry S, Strauss JF III. Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med* 1998;338:663-70.
- Vadillo Ortega F, González Ávila G, Karchmer S, Meraz N, Ayala Ruiz A, Selman M. Collagen metabolism in premature rupture of amniotic membranes. *Obstet Gynecol* 1990;75:84-88.
- Tejero E, Perichart O, Pfeffer F, Casanueva E, Vadillo Ortega F. Collagen synthesis during pregnancy, vitamin C availability, and risk of premature rupture of fetal membranes. *Int J Gynecol Obstet* 2003;81:29-34.
- Casanueva E, Pfeffer F, Magaña L, Baez A. Incidence of premature rupture of the membranes in pregnant women with low leukocyte levels of vitamin C. *Eur J Clin Nutr* 1991;45(8):401-05.
- Vadillo Ortega F, Pfeffer F, Bermejo ML, Hernández MA y col. Casanueva E. Factores dietéticos y ruptura prematura de membranas. Efecto de la vitamina C en la degradación de colágena en el corioamnios. *Ginecol Obstet Mex* 1995;63:158-62.
- Vadillo Ortega F, González Ávila G, Furth EE, Lei H, et al. 92-kd type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) activity in human amniochorion increases with labor. *Am J Pathol* 1995;146(1):148-56.
- Vadillo Ortega F, Hernández A, González Ávila G, Bermejo L, Iwata K, Strauss JF III. Increased matrix metalloproteinase activity and reduced tissue inhibitor of metalloproteinases-1 levels in amniotic fluids from pregnancies complicated by premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:1371-76.
- Locksmith GJ, Clark P, Duff P, Saade GR, Schultz GS. Amniotic fluid concentrations of matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 during pregnancy and labor. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:159-64.
- Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windson LJ, et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4(2):197-250.
- Borden P, Seller RA. Transcriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1997;7(1-2):159-78.

29. Arechavaleta Velasco F, Ogando D, Parry S, Vadillo Ortega F. Production of matrix metalloproteinase-9 in lipopolysaccharide-stimulated human amnion occurs through an autocrine and paracrine proinflammatory cytokine-dependent system. *Biol Reprod.* 2002;67:1952-58.
30. Hernández Guerrero C, Mozon Bordonaba F, Jiménez Zamudio L, Ahued Ahued R, et al. In-vitro secretion of proinflammatory cytokines by human amniochorion carrying hyper-responsive gene polymorphisms of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β . *Mol Hum Reprod* 2003;9(10):625-29.
31. Andrews WW, Haut JC, Goldenber R. Infection and preterm birth. *Am J Perinatol* 2000;17(7):357-65.
32. Keelan JA, Sato T, Mitchell MD. Interleukin (IL)-6 and IL-8 production by human amnion: regulation by cytokines, growth factors, glucocorticoids, phorbol esters, and bacterial lipopolysaccharide. *Biol Reprod* 1997;57:1438-44.
33. Kelly RW, Leask R, Calder AA. Chorionic production of interleukin-8 and mechanism of parturition. *Lancet* 1992;339:776-7.
34. Dudley DJ, Trautman MS, Mitchell MD. Inflammatory mediators regulate interleukin-8 production by cultured gestational tissues: evidence for a cytokine network at the chorio-decidual interface. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:404-10.
35. Steinborn A, Sohn C, Heger S, Niederhut A, et al. Labour-associated expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in placental endothelial cells indicates participation of immunological processes in parturition. *Placenta* 1999;20:567-73.
36. Marvin KW, Hansen WR, Miller HC, Eykholt RL, Mitchell MD. Amnion-derived cells express intercellular adhesion molecule-1: regulation by cytokines. *J Mol Endocrinol* 1999;22:193-205.
37. Luppi P, Irwin TE, Simhan H, DeLoia JA. CD11b expression on circulating leukocytes increases in preparation for parturition. *Am J Reprod Immunol* 2004;52:323-29.
38. Gómez N, Estrada Gutiérrez G, Maida R, Vadillo Ortega F. Amniochorion secretes chemotactic signals for leukocytes during human labor. (Texto en preparación para su publicación. Comunicación personal).
39. Estrada Gutiérrez G, Zaga V, González Jiménez MA, Beltrán Montoya J, et al. Initial characterization of the microenvironment that regulates connective tissue degradation in amniochorion during normal human labor. *Matrix Biol* 2005;24(4):306-12.



Placental blood leukocytes are functional and phenotypically different than peripheral leukocytes during human labor

Rodrigo Vega-Sanchez^{a,1}, Nardhy Gomez-Lopez^a, Arturo Flores-Pliego^a,
Susana Clemente-Galvan^a, Guadalupe Estrada-Gutierrez^a,
Alejandro Zentella-Dehesa^{b,c}, Rolando Maida-Claros^a,
Jorge Beltran-Montoya^a, Felipe Vadillo-Ortega^{d,*}

^a Research Direction, Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, Mexico City, Mexico

^b Department of Biochemistry, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran, Mexico City, Mexico

^c Department of Genomic Medicine and Environmental Toxicology, Instituto de Investigaciones Biológicas,
Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

^d Department of Experimental Medicine, School of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

Received 18 March 2009; received in revised form 22 July 2009; accepted 18 August 2009

Abstract

Rupture of the fetal membranes during human labor is associated with an inflammatory process localized to the maternal–fetal interface. There is evidence that specific leukocytes subsets are attracted to the choriodecidua, and that after homing they condition a local inflammatory microenvironment, possibly being directly involved in rupture of the membranes. In this study our aim was to compare the phenotypes and function of leukocytes located in the placental intervillous blood with peripheral leukocytes obtained before or after labor, including expression of modulators of inflammation in these cells. Flow cytometry revealed that the proportion of CD14⁺ cells is increased in intervillous blood, suggesting the participation of monocytes/macrophages during labor. Real time qRT-PCR showed that at term gestation and particularly during labor, placental blood leukocytes adopt a different expression pattern of pro-inflammatory cytokines than leukocytes in peripheral blood, including IL-1 β and IL-1RA. During labor, both placental and peripheral leukocytes increase their secretion of matrix metalloproteinase-9. Moreover, we showed that placental leukocytes respond differently than peripheral leukocytes to bacterial lipopolysaccharide, secreting differential amounts of TNF- α , IL-1 β and IL-6. Finally, a preliminary proteomic characterization of placental leukocytes revealed a significantly higher number of individual proteins than in peripheral leukocytes. Our results support the existence of selective subsets of leukocytes recruited to the maternal–fetal interface that may participate in the triggering of parturition.

© 2009 Published by Elsevier Ireland Ltd.

Keywords: Leukocytes; Placenta; Inflammation; Cytokines; MMP-9; Labor

* Corresponding author at: Department of Experimental Medicine, School of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., Dr. Balmis 148, Col. Doctores, México, D.F. 06720, México. Tel.: +52 55 56232663.

E-mail address: felipe.vadillo@gmail.com (F. Vadillo-Ortega).

¹ RVS is a student of the Doctorate in Biomedical Sciences at the School of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and was supported by Scholarships 181447 from CONACyT and 504006841 from DGEP-UNAM and grant SALUD 2007-69353 from CONACyT.

0165-0378/\$ – see front matter © 2009 Published by Elsevier Ireland Ltd.
doi:10.1016/j.jri.2009.08.002

Please cite this article in press as: Vega-Sanchez, R., et al., Placental blood leukocytes are functional and phenotypically different than peripheral leukocytes during human labor. *J. Reprod. Immunol.* (2009), doi:10.1016/j.jri.2009.08.002

1. Introduction

Preterm labor is a major public health problem affecting nearly 10% of pregnancies worldwide. At least 40% of preterm births occur because of premature rupture of the fetal membranes (PROM), an obstetric pathology characterized by the rupture of the membranes in the absence of labor.

Available evidence supports the hypothesis that rupture of the fetal membranes under normal or pathological conditions is associated to the activation of a signaling network in the amnion and choriodecidua. One of the consequences of the activation of this pathway is extensive degradation of connective tissue, which is the major structural component of these tissues and responsible for its tensile strength (Parry and Strauss, 1998). Degradation of extracellular matrix is linked to upregulation of several matrix metalloproteinases (MMP) including MMP-9, MMP-3, MMP-8 and MMP-1, as well as down-regulation of their specific tissue inhibitors (TIMP-1 and 2) (Vadillo-Ortega et al., 1996).

The local mechanisms that lead to induction of MMP expression and rupture of the membranes remain largely unknown. However, cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) can regulate fetal membrane production of MMP-9 and other MMPs by paracrine or autocrine mechanisms (Estrada Gutierrez et al., 2002; Arechavaleta-Velasco et al., 2002). The expression and secretion of this molecular network depends on activation of an inflammation-like process linked to the onset of labor (Osman et al., 2003; Thomson et al., 1999; Winkler et al., 1999).

Many cells in the amnion and choriodecidua, including amniotic epithelial cells, trophoblasts in the chorion and decidual cells can contribute to secretion of pro-inflammatory cytokines and MMPs (Menon et al., 1995; Keelan et al., 1999; Vadillo-Ortega et al., 1995).

Analyses of the cellular origin of TNF- α , IL-1 β and MMP-9 in gestational tissues have shown that infiltrating leukocytes may contribute to secretion of these proteins (Mitchell et al., 1993; Peltier, 2003). Neutrophils, macrophages and T lymphocytes invade the placenta, myometrium, cervix and fetal membranes at the end of pregnancy, coincidentally with the local increase of TNF- α , IL-1 β and MMP-9 (Bulmer and Sunderland, 1984; Bokstrom et al., 1997; Young et al., 2002). Previous work from our laboratory supports the notion that amnion and choriodecidua-infiltrating leukocytes may arrive from the local circulation through a chemotactic process coordinated by the fetal membranes upon activation of labor (Gomez-Lopez et al., 2009). Our hypothesis is that at the onset of labor,

a microenvironment is elicited in the choriodecidua by the selective arrival of specific subpopulations of leukocytes. In this study we seek evidence that during human labor, leukocytes circulating in the intrauterine microenvironment are enriched in subpopulations with a specific proinflammatory phenotype that is different from leukocytes circulating in the peripheral blood.

2. Materials and methods

2.1. Patients and biological samples

This project was approved by the Internal Review Board of the Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes in Mexico City (Register 212250-02151). Maternal peripheral blood and placental blood were obtained from women at term gestation (37–40 weeks) undergoing indicated cesarean section in the absence of any clinical evidence of labor. Similarly, samples also were obtained from women matched for gestational age who presented in normal spontaneous active labor and had a vaginal delivery within 8 h. Participating women gave their informed consent and did not show clinical signs of infection or other pregnancy related pathologies.

Maternal peripheral blood was obtained by venipuncture in the forearm during cesarean sections or immediately after delivery for the spontaneous labor group. Within the first 30 min after the placenta was delivered, placental blood was drained out by gravity to a sterile container and recovered with sterile transfer pipettes. All blood samples were collected in sterile 10 mL tubes with sodium heparin as anticoagulant and processed within the first hour of collection.

We aimed to characterize the placental leukocytes both phenotypically and functionally. Therefore, the first step was to analyze their immunophenotype using flow cytometry. Then their functional properties were tested by quantifying the expression of pro-inflammatory cytokines and MMP-9. In addition, analyzing the secretion of those same markers under LPS stimulation tested their *in vitro* response to an external stimulus. Finally, to further analyze possible differences between placental and peripheral leukocytes, an initial proteomic characterization was performed using bidimensional electrophoresis.

2.2. Flow cytometry for leukocyte subpopulations

In order to characterize the distinct subpopulations of maternal or placental mononuclear leukocytes, blood samples from women before ($n = 10$) and after labor ($n = 10$) were labeled with the following mon-

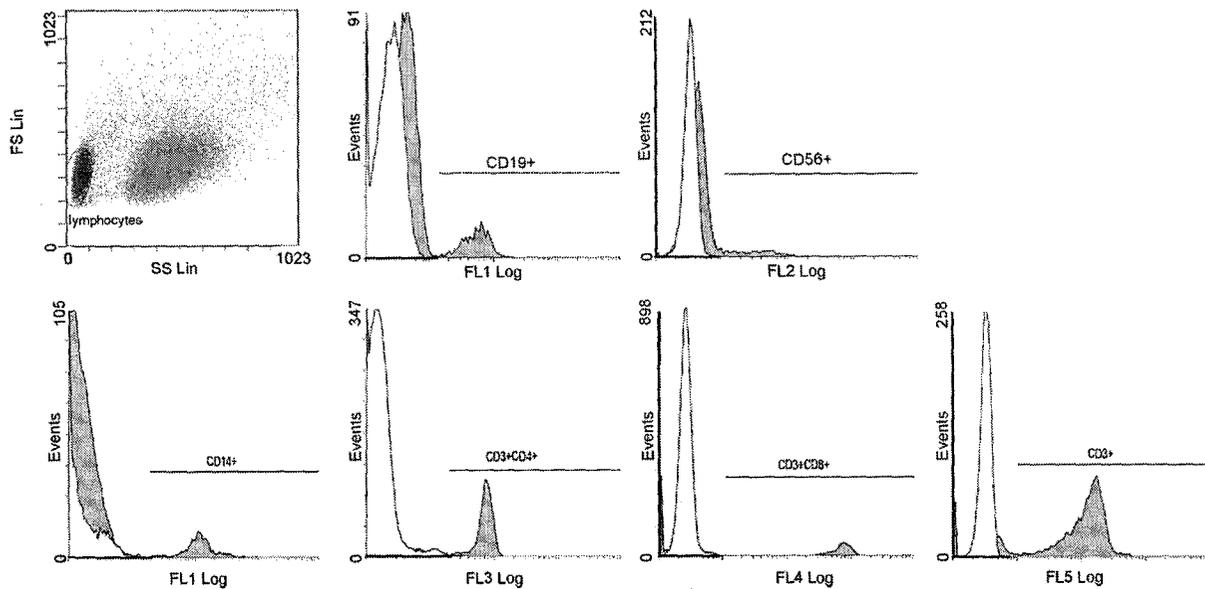


Fig. 1. Representative plot and histograms showing the gating strategy and parameters used for the flow cytometry analyses.

oclonal antibodies to perform 4-color or 2-color staining: CD4-FITC (CD4 T lymphocytes), CD14-ECD (monocytes/macrophages), CD8-PC5 (CD8 T lymphocytes), CD3-PC7 (Total T lymphocytes); CD19-FITC (B lymphocytes), CD56-PE (NK lymphocytes) (all Immunotech, Marseille, France). The appropriate unstained controls were used for each sample and staining reaction.

Each combination of antibodies was added to 100 μ L of total blood in the concentration recommended by the manufacturer and incubated in the dark for 15 min. Erythrocytes were lysed and leukocytes fixed using 500 μ L of OptiLyse (Beckman Coulter, Marseille, France) and then washed with sterile 1X PBS.

Cells were analyzed in a FC500 flow cytometer (Beckman Coulter, Miami, FL, USA). CD3⁺, CD19⁺, and CD56⁺ cells were counted within the mononuclear gate region, while CD4⁺ and CD8⁺ cells were analyzed within the CD3⁺ region. In addition, CD14⁺ cells were analyzed without any gate region. Fifty thousand events per sample were analyzed with a minimum of 10,000 events within the lymphocyte region. Representative plots showing the gating strategy and parameters used for the analyses are provided in Fig. 1. Since no cell count data of the patients were available, only relative percentages are presented.

2.3. Total RNA isolation and cDNA synthesis

For total RNA isolation, leukocytes were isolated from whole blood samples by centrifugation at 200 \times g

for 15 min, followed by erythrocyte lysis with ammonium chloride buffer (NH₄Cl 155 mM, KHCO₃ 10 mM, EDTA 0.1 mM). Isolated leukocytes were placed in RNeasy Lysis Buffer (Qiagen, Crawley, UK) in order to preserve RNA and stored at -70 °C until further processing.

Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used to isolate total RNA from leukocytes, following the manufacturer's protocol. Complementary DNA (cDNA) was synthesized with the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), using random hexamer primers. Reverse transcription reaction was carried out in a Mastercycler Gradient equipment (Eppendorf, Hamburg, Germany) at 25 °C, 10 min/55 °C, 30 min/85 °C, 5 min. cDNA was stored at -20 °C until used.

2.4. Real-time PCR for TNFA, IL-1 β , IL-6, IL-1RN and MMP-9

Quantitative real-time PCR was performed in a Light Cycler 480 instrument using Probes Master kit and TaqMan Probes (hydrolysis probes labeled with fluorescein) following the manufacturer's protocol (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Specific primers for mRNA sequences of TNFA (forward 5'-CAGCCTC-TTCTCCTCCTGAT-3'; reverse 5'-GCCAGAGGGC-TGATTAGAGA-3'), IL1B (forward 5'-CTGTCCTG-CGTGTTGAAAGA-3'; reverse 5'-TTGGGTAATTTT-TGGGATCTACA-3'), IL6 (forward 5'-GATGAGTAC-AAAAGTCTGATCCA-3'; reverse 5'-CTGCAGCCA-CTGGTTCTGT-3'), IL-1 receptor antagonist (IL1RA)

(forward 5'-TGCCTGTCCTGTGTCAAGTC-3'; reverse 5'-TCTCGCTCAGGTCAGTGATG-3') and *MMP9* (forward 5'-GAACCAATCTCACCGACAGG-3'; reverse 5'-GCCACCCGAGTGTAAACCATA-3') were designed using the ProbeFinder software accessible at www.universalprobelibrary.com. TaqMan probes #29, 78, 40, 16, 72 and 06 were used, respectively. The actin- β gene (*ACTB*) (forward 5'-ATTGGCAATGAGCGGTTC-3'; reverse 5'-GGATGCCACAGGACTCCAT-3'; probe #11) was used as reference for normalizing purposes. All primers were designed to have intron spanning sequences, to avoid false positive signals from possible residual genomic DNA.

Fourteen samples from patients without labor, and nine samples from patients with labor were included. Fifteen nanograms of sample cDNA were added to each reaction. Real-time PCR conditions were as follows: one cycle at 95 °C, 5 min; 45–65 cycles of denaturation (95 °C, 10 s), annealing (60 °C, 20 s) and extension (72 °C, 1 s).

Relative quantification of *TNFA*, *IL1B*, *IL6*, *IL1RA* and *MMP9* mRNA was calculated with the Light Cycler 480 SW 1.5 software (Roche Applied Science, Mannheim, Germany).

2.5. Cell culture and stimulation with lipopolysaccharide

Leukocytes from placental blood as well as maternal blood samples were isolated with Polymorphoprep (Axis-Shield, Oslo, Norway) following the manufacturer's protocol; both the mononuclear and polymorphonuclear bands were recovered. Remaining erythrocytes were lysed with ammonium chloride buffer and leukocytes were finally washed with sterile 1 × PBS. Before culture, we made certain that cell viability was over 90% by staining with trypan blue.

Additionally, in order to control the placental and peripheral leukocytes response to lipopolysaccharide (LPS), we included experiments using the macrophage-like cell line U937 (ATCC, Manassas, VA, USA). This cell line was used as a positive control for LPS stimulation because of its known capacity to express pro-inflammatory cytokines and MMP-9, as well as to increase such expression in response to LPS (Lopez-Bojorquez et al., 2004; Tachado et al., 2005).

Leukocytes and U937 cells (1×10^6 cells) were placed in 12-well plates in 1 mL of Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) supplemented with 0.2% lactalbumin hydrolysate, 1% sodium pyruvate and 1%

antibiotic-antimycotic (DMEM+LAH; Gibco BRL). Cells were stimulated with 1 μ g/mL of LPS from *E. coli* 055:B5 (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) and incubated for 24 h at 37 °C with 5% CO₂. The LPS amount to be used was determined after analyzing the maximum cytokine secretion by leukocytes and U937 cells when treated with increasing amounts of the stimulus (data not shown). At the end of the culture period the culture media were recovered and stored at -20 °C until used.

2.6. Quantification of cytokines

To characterize the cytokine profile secreted by leukocytes, we quantified the pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β and IL-6, as well as IL-1RA after 24 h in culture. TNF- α was quantified in the culture supernatants using the TNF- α Human Biotrak Easy ELISA (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) following the manufacturer's protocol. To quantify secreted IL-1 β a sandwich-type ELISA developed in our laboratory was used as described elsewhere (Arechavaleta-Velasco et al., 2002). All of the supplies used in this ELISA were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Both intra- and interassay coefficients of variation were less than 5%. A rigorous quality-control program, including external and internal standards is followed in our laboratory. Quantification of IL-6 and IL-1RA was made using DuoSet ELISA Development System kits (R&D Systems) following the manufacturer's instructions.

2.7. Quantification of the latent and active forms of MMP-9

MMP-9 was measured using the Matrix Metalloproteinase-9 Biotrak Activity Assay System (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) to quantify both the total amount and the active forms of MMP-9 in the culture media.

2.8. Bidimensional proteomic profile characterization

To further analyze possible differences between placental and peripheral leukocytes, an initial proteomic characterization was performed using bidimensional electrophoresis. Briefly, peripheral and placental blood leukocytes isolated from four women who presented spontaneous labor were completely lysed by being placed in hypotonic buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂) containing a protease

Table 1
Percentages of mononuclear leukocyte subpopulations in maternal peripheral blood and placental blood.

Subpopulation	Maternal blood	Placental blood	p value
No labor	<i>n</i> = 10	<i>n</i> = 10	
Total T lymphocytes (CD3 ⁺)	43.2 (13.6–80.0)	29.2 (8.4–58.8)	0.047
CD4 ⁺ T lymphocytes	30.7 (6.6–63.0)	31.5 (5.0–73.0)	0.847
CD8 ⁺ T lymphocytes	23.9 (11.0–62.0)	24.0 (7.5–61.6)	0.748
Monocytes/macrophages (CD14 ⁺)	3.0 (2.0–6.7)	5.2 (3.0–17.5)	0.003
NK cells (CD56 ⁺)	12.3 (3.2–28.8)	7.4 (0.7–20.9)	0.300
B lymphocytes (CD19 ⁺)	3.6 (0.1–10.8)	4.9 (0.3–13.9)	0.898
Labor	<i>n</i> = 10	<i>n</i> = 10	
Total T lymphocytes (CD3 ⁺)	39.5 (11.3–75.1)	29.4 (10.1–52.0)	0.165
CD4 ⁺ T lymphocytes	40.1 (12.8–76.8)	28.5 (3.0–71.3)	0.353
CD8 ⁺ T lymphocytes	38.3 (16.5–53.2)	23.4 (10.1–63.0)	0.631
Monocytes/macrophages (CD14 ⁺)	4.4 (0.2–10.9)	10.8 (0.75–15.3)	0.023
NK cells (CD56 ⁺)	18.8 (6.9–51.3)	13.5 (7.8–25.1)	0.529
B lymphocytes (CD19 ⁺)	6.4 (2.1–17.7)	5.7 (0.1–13.4)	0.684
Differences between no-labor and labor groups (p values)			
Total T lymphocytes (CD3 ⁺)	0.512	0.973	
CD4 ⁺ T lymphocytes	0.705	0.654	
CD8 ⁺ T lymphocytes	0.223	0.918	
Monocytes/macrophages (CD14 ⁺)	0.132	0.282	
NK cells (CD56 ⁺)	0.426	0.223	
B lymphocytes (CD19 ⁺)	0.114	0.282	

Median values (minimum – maximum) are reported.

inhibitor cocktail (Complete, Roche Applied Sciences, Mannheim, Germany) (100 µL of buffer for each 13 × 10⁶ cells), frozen and thawed three times (at –70 °C and 60 °C, respectively). After sodium chloride was added to a final concentration of 150 mM to restore tonicity, 1% NP40 and 1% Triton X-100 were added to solubilize any lipid-bound proteins. Samples were then clarified by centrifugation at 14,000 × g for 30 min at 4 °C, and the protein concentration were quantified in the supernatants using 2D Quant Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA).

Placental and peripheral samples were respectively pooled to a final concentration of 20 µg of total protein (5 µg from each sample) in 250 µl of rehydration solution (8 M urea, 2% CHAPS, 0.5% IPG buffer, 0.002% bromophenol blue, 0.7 mg DTT), which were then loaded into a 7 cm 3–10NL Immobiline DryStrip (Amersham Biosciences) and incubated overnight at room temperature.

Isoelectric focusing was then performed on both samples simultaneously in an Ethan IPGphor instrument following the manufacturer's protocol. Strips were stored at –70 °C until further processed. SDS-PAGE was performed using 10% polyacrylamide gels, which were then fluorescently stained with SyproRuby (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) according to manufacturer's instructions, and viewed in an imaging system (Typhoon,

Amersham Biosciences). Gel images were analyzed using Image Master Platinum 6.0 software.

To assure reproducibility, samples were processed in three independent strips and gels, which were processed simultaneously. Intra-class reproducibility was >90% as measured by total number of detected spots as well as spot area (data not shown).

2.9. Statistical analyses

All statistical analyses were carried out using SPSS 17.0 for Windows. Since most of the variables did not have a normal distribution, non-parametrical tests were applied unless indicated. The Mann–Whitney test was used to compare independent samples (with and without labor), while Wilcoxon Signed Ranks test was used for paired analyses (maternal with placental samples, and samples before and after stimulation). Differences with a $p \leq 0.05$ were considered significant.

3. Results

3.1. Phenotypic profile of the placental blood leukocytes

The flow cytometry analysis of the leukocyte subpopulations revealed that at term gestation before labor,

percentages of CD3⁺ T lymphocytes were significantly lower in placental circulation while CD14⁺ cells were significantly higher compared to peripheral blood (Table 1). However, once labor has started, this difference is only maintained in CD14⁺ cells. No differences were found in leukocyte subpopulations within peripheral or placental blood when comparing samples before and after labor.

3.2. Expression of cytokines mRNA and MMP-9 by placental and peripheral leukocytes

No differences were found in *TNFA* expression between peripheral and placental leukocytes before and during labor (Fig. 2). In the absence of labor, peripheral leukocytes expressed significantly more *IL1B* mRNA than placental leukocytes ($p=0.046$). However, placental leukocytes significantly increased expression of *IL1B* in association with labor ($p=0.011$) (Fig. 2). Both peripheral and placental leukocytes showed highly increased expression of *IL6* mRNA in association with labor ($p=0.039$ and 0.002), but this did not account for differences between compartments (Fig. 2). The expression of *IL1RA* mRNA was higher in peripheral leukocytes than in placental leukocytes, in the absence of labor ($p=0.007$). However, placental leukocytes significantly increased expression of *IL1RA* in association with labor ($p=0.039$) (Fig. 2). Finally, both peripheral and placental leukocytes showed highly increased expression of *MMP9* mRNA in association with labor. However only peripheral leukocytes significantly increased their expression during labor ($p=0.033$). We did not account for differences between compartments (Fig. 2).

3.3. LPS-induced cytokine secretion

After 24 h in culture, both peripheral and placental blood leukocytes from women at term of gestation without labor produced similar amounts of TNF- α , which did not increase with LPS stimulus (Fig. 3). However, placental blood leukocytes obtained from patients in labor increased secretion of this cytokine after LPS stimulus several times above the basal secretion and higher than reference cells (U937 cells). Interestingly, the basal secretion of this cytokine by both peripheral and placental blood leukocytes was significantly lower when cells came from patients with active labor than with cells from women at term but without labor.

There was no difference in the secretion of IL-1 β by placental or peripheral leukocytes either from patients with or without labor. Only placental blood leukocytes with labor showed a tendency to increase secretion of

this cytokine after LPS stimulus, although did not reach statistical significance. This resembled the observation in U937 cells, which secreted significantly more IL-1 β after LPS stimulus.

Secretion of IL-6 was not modified in cultures of peripheral leukocytes, even after LPS stimulus. In contrast, placental blood leukocytes without labor secreted significantly more IL-6 after being stimulated than peripheral cells, consistently to the increase in secretion by U937 cells. Moreover, placental blood leukocytes from patients with labor increased significantly their secretion of this cytokine when the LPS stimulus was present.

Regarding the secretion of IL-1RA, placental blood leukocytes from patients without labor secreted significantly more of this cytokine than peripheral leukocytes, both in the absence or presence of LPS stimulus. No increase was observed in U937 cells in the presence of the stimulus. Peripheral blood leukocytes only tended to increase their secretion of this cytokine when labor was present, although not significantly.

3.4. Secretion of total and active MMP-9

There was no difference between placental and peripheral leukocyte secretion of MMP-9, neither total nor active forms, after 24 h in culture or after being stimulated with LPS, in samples from non-laboring patients. However, leukocytes from both compartments secreted significantly more MMP-9 when labor was present (Fig. 4).

Placental blood leukocytes showed a tendency to secrete less MMP-9, both total and active, when stimulated with LPS. This resulted in a statistically different secretion when compared to peripheral leukocytes ($p=0.006$), which showed a tendency to increase their MMP-9 secretion.

3.5. Proteomic profile

Our preliminary analysis of the proteomic profile of leukocytes using 2D electrophoresis (Fig. 5) revealed a significantly higher number of protein spots ($p=0.015$) in gels from placental samples (318.33 ± 22.7) compared to gels from peripheral samples. The intensity of the spots, an indirect measure of their concentration, was also significantly higher ($p=0.024$) in placental (6141.13 ± 277.09) than in peripheral samples (5357.25 ± 276.58). Values show mean \pm S.E., *t*-test was used for statistical comparison.

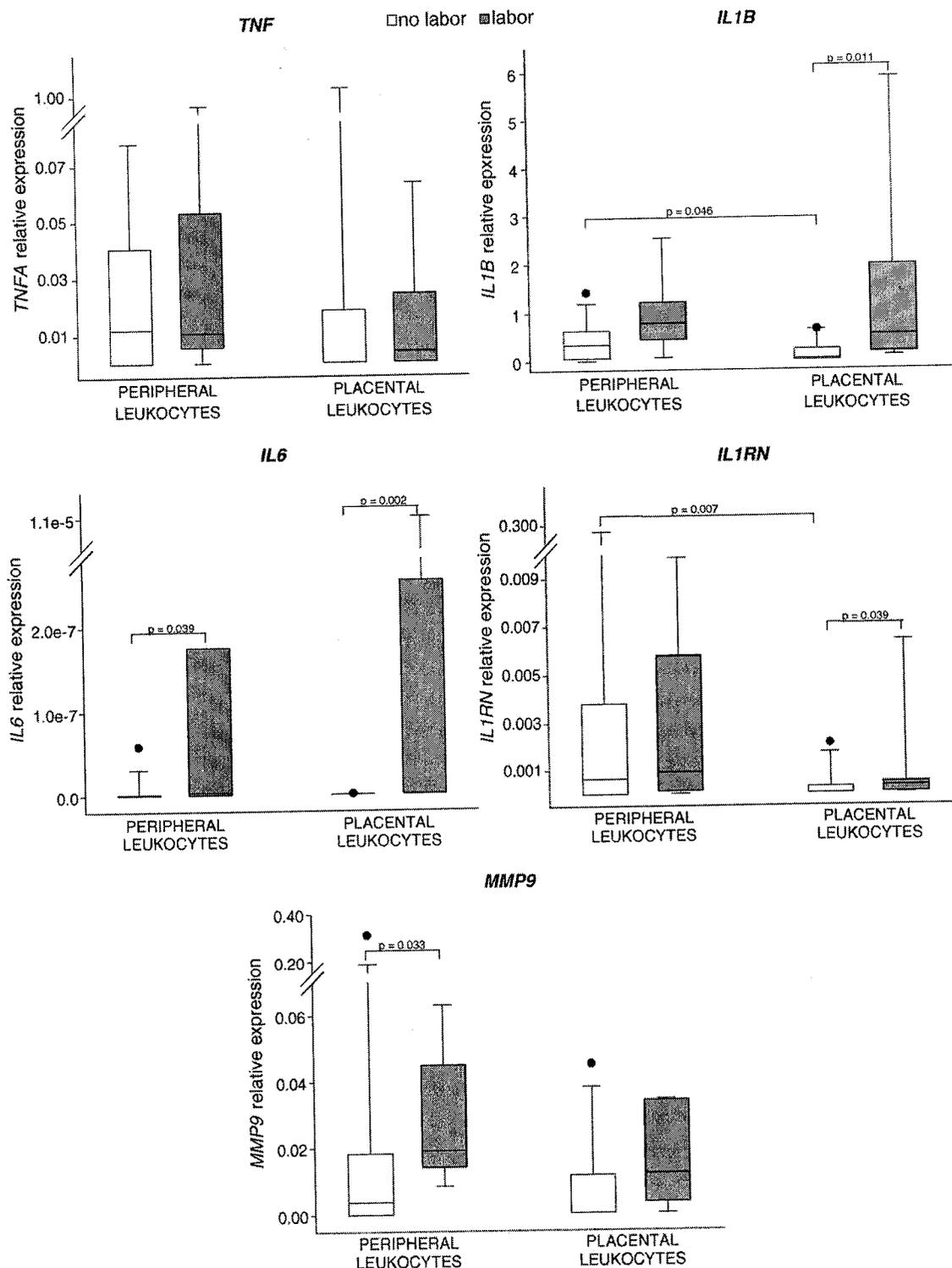


Fig. 2. Basal expression of cytokine genes *TNFA*, *IL1B*, *IL6*, *IL1RN* and *MMP9*. Boxes represent the median relative expression value with interquartile ranges. $N = 14$ samples without labor, and $N = 9$ samples with labor. NS = no significant difference.

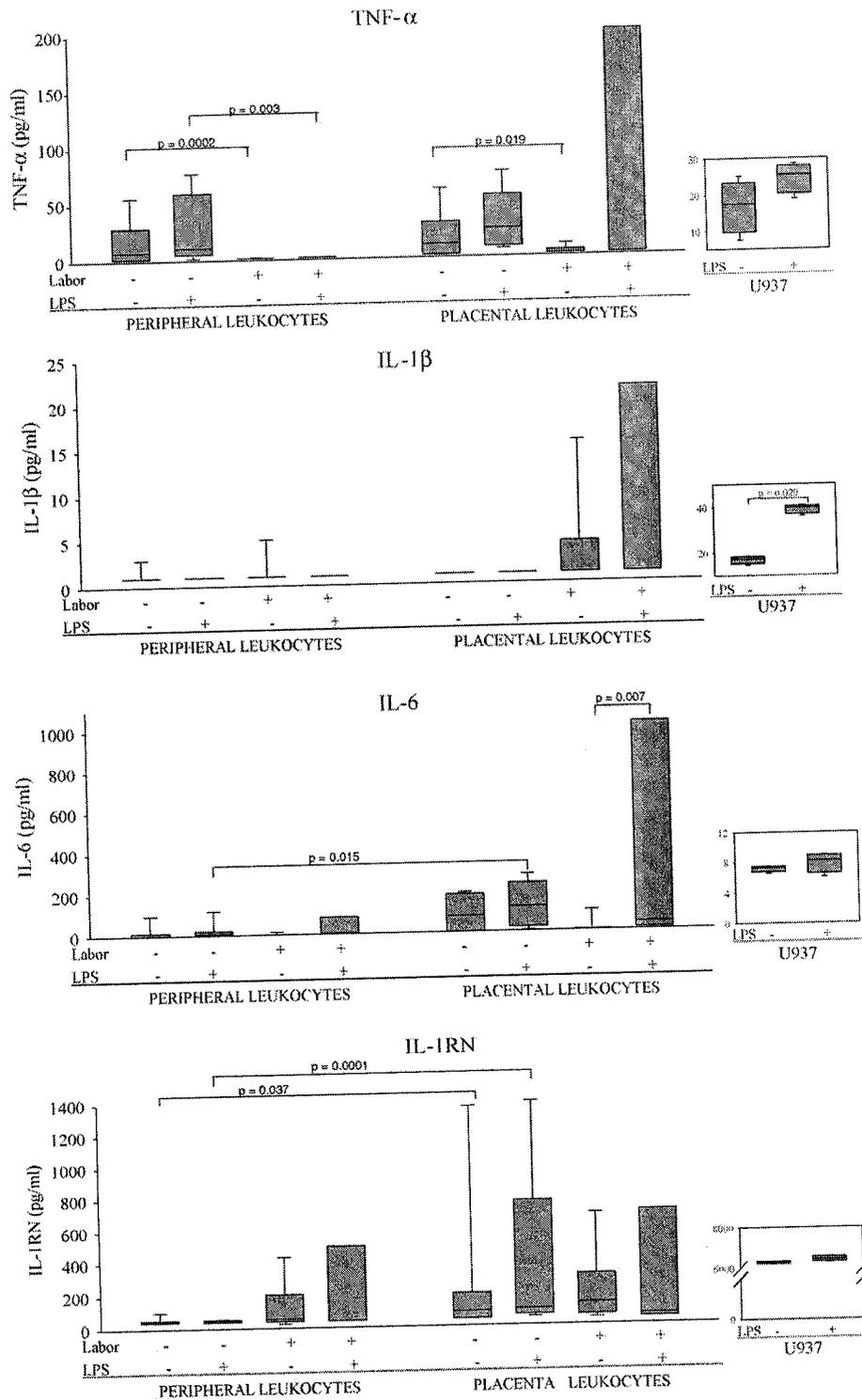


Fig. 3. Quantification of cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-1RA secreted during 24 h in culture with or without LPS stimulus. Boxes represent median concentration of secreted cytokines with interquartile ranges. $N=3$ with duplicates. P values: $a=0.0002$; $b=0.003$; $c=0.019$; $d=0.029$; $e=0.015$; $f=0.007$; $g=0.037$; $h=0.0001$. Comparisons without a P value are not significant.

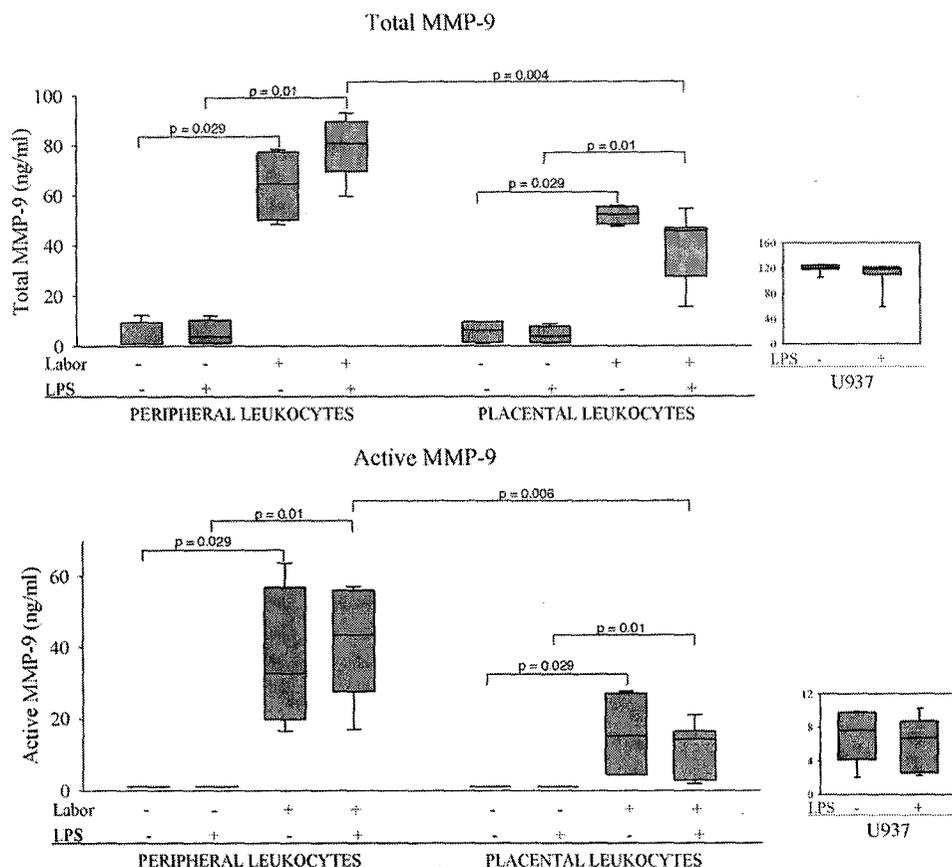


Fig. 4. Quantification of total and active MMP-9 after 24 h in culture with or without LPS stimulus. Boxes represent median concentrations of secreted enzyme with interquartile ranges. $N=3$ with duplicates. P values: $a=0.029$, $b=0.01$, $c=0.004$; $d=0.029$, $e=0.01$; $f=0.029$, $g=0.01$, $h=0.006$; $i=0.029$, $j=0.01$. Comparisons without a p value are not significant.

4. Discussion

The inflammatory environment in gestational tissues during human labor seems to be associated with the arrival and infiltration of leukocytes at the end of gestation (Osman et al., 2003; Thomson et al., 1999). These immune cells could be mediating the synthesis of distinct molecules responsible for the local events leading to labor. The specific nature of these leukocytes is still uncertain, but they may arrive from either the maternal and/or fetal circulation.

Our group has aimed to study the sequence of events that leads to leukocyte recruitment and homing to the fetal membranes and the resulting functional changes manifested as local inflammation and collagenolysis. We have previously demonstrated that fetal membranes from term pregnancies induce selective chemotaxis of T lymphocytes and monocytes (Gomez-Lopez et al., 2009). A similar process of leukocyte infiltration during labor has also been reported for myometrium and cervix, mainly

mediated by IL-8 (Winkler et al., 1999; Bokstrom et al., 1997; Young et al., 2002).

In this paper we provide evidence that leukocytes circulating in the placental blood show differential phenotypic and functional characteristics compared to those circulating in the peripheral blood of the same women and that these leukocyte subsets may potentially contribute to the conditioning of a local inflammatory microenvironment. An increased number of CD14⁺ leukocytes in placental blood was the only consistent difference found in the composition of leukocyte subsets between peripheral and placental compartments. Presence of labor reinforced this difference, suggesting the active recruitment of monocytes/macrophages to the placental milieu during labor. Our results agree with a previous report (Moore et al., 2003). However, our results further show that prior to labor placental blood indeed contains a significantly lower amount of CD3⁺ cells than peripheral blood, perhaps reflecting homing of this subset of cells to the placenta and membranes.

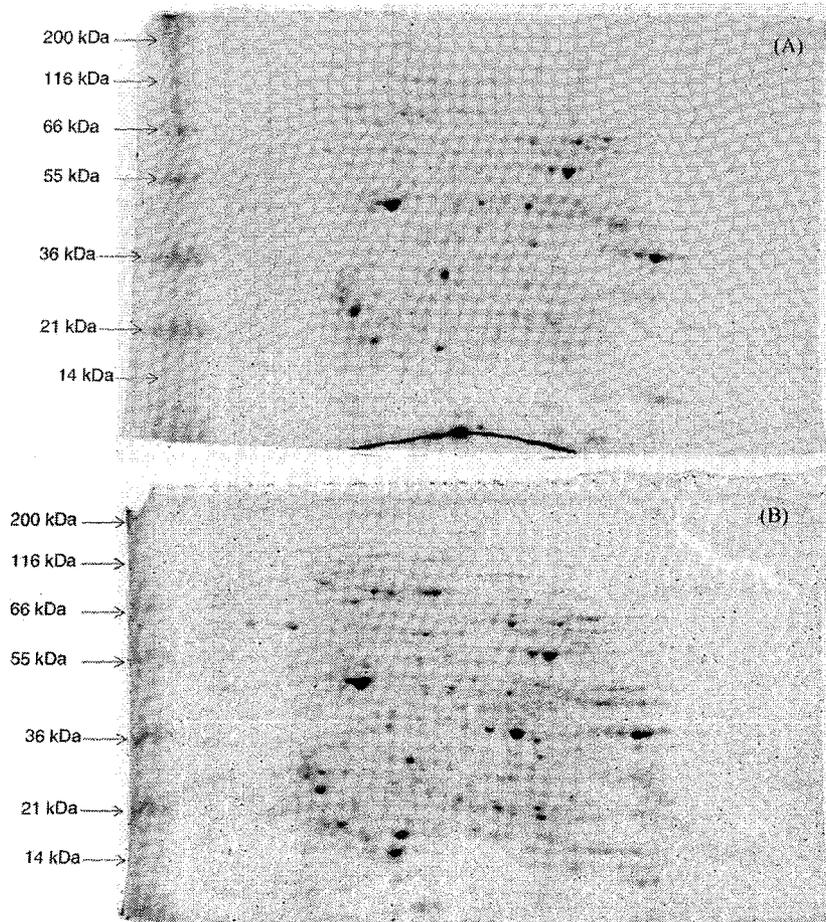


Fig. 5. Representative 2D gels showing the proteomic profile of peripheral (A) and placental (B) leukocytes during labor.

465 This interpretation is supported by other results from
466 our laboratory showing that T lymphocytes and mono-
467 cytes/macrophages are the major subsets of infiltrated
468 leukocytes in the choriodecidua in tissues that has under-
469 gone labor (Gomez Lopez et al., 2008). This observation
470 also agrees with previous reports that find increased infil-
471 tration of these cells in gestational tissues during labor
472 (Osman et al., 2003; Thomson et al., 1999).

473 Despite the absence of striking differences in the phe-
474 notype of cells circulating in the placental blood, we
475 showed major functional differences in leukocytes cir-
476 culating in this compartment. These leukocytes showed
477 increased transcription of the *IL1B* gene in associa-
478 tion with the presence of labor. In addition, these cells
479 show decreased expression of the *IL1RA* gene either in
480 the presence or absence of labor. Furthermore, leuko-
481 cytes located in the placental blood once labor has
482 started, responded secreting higher amounts of TNF-
483 α , IL-1 β and IL-6 upon LPS stimulation, compared
484 to peripheral leukocytes or the U937 control cell line.

485 All these functional differences support the notion that
486 once labor has started, specific subsets of leukocytes are
487 attracted to the placental milieu where they potentially
488 participate in the conditioning of the local microenviron-
489 ments of the reproductive tissues leading to labor and
490 delivery. This microenvironment is characterized most
491 notably by increased biological availability of IL-1 β ,
492 with increased expression of this cytokine and decreased
493 expression of its natural inhibitor. Our results are in
494 accordance with data of others researchers who local-
495 ized the pro-inflammatory cytokines mainly associated
496 to placenta-infiltrating leukocytes (Young et al., 2002;
497 Steel et al., 2005). Cytokine dispersion concentrations
498 cannot be attributed to differences in labor length as pre-
499 viously described (Cindrova-Davies et al., 2007), since
500 we controlled for this variable using cells obtained from
501 patients with homogeneous labor length. No attempt to
502 characterize the specific subsets of participating leuko-
503 cytes was carried out in this paper, however this is
504 currently under way in our laboratory.

Our LPS experiments show that placental leukocytes are more responsive to this external stimulus. This may suggest that during labor, and particularly when infiltrating the choriodecidual, this subset of cells could be more susceptible to any stimuli produced by local cells. This opens the possibility that a molecular cross-talk between arriving immune cells and fetal membrane cells may result in the local amplification of the signaling network that elicits parturition, composed by primary mediators such as IL-1 β , TNF- α and IL-6 and secondary effectors, such as MMP-9.

A preliminary proteomic characterization of placental leukocytes revealed a significantly higher number of individual proteins than in peripheral leukocytes. Although a more detailed analysis of this proteomic profile is needed, this finding further confirms the phenotypic difference of these leukocytes from peripheral cells, and clearly suggests many possibly different functional characteristics.

We also analyzed the expression of MMP9 by placental and maternal leukocytes, since this enzyme is considered a molecular marker of collagen degradation and rupture of the fetal membranes during labor (Vadillo-Ortega et al., 1996, 2002). Analysis of MMP-9 secretion showed that the amount of enzyme was significantly higher in leukocytes from patients with active labor, confirming that the induction of secretion of MMP-9 observed in fetal membranes is also reflected in circulating leukocytes at this time of human gestation (Vadillo-Ortega et al., 1995; Stygar et al., 2002; Choi et al., 2007). An unexpected finding was that the amount of MMP-9 secreted by leukocytes was far greater than what we had seen in previous studies when analyzing secretion by fetal membrane explants (Garcia-Lopez et al., 2007; Zaga-Clavellina et al., 2006). Cultured fetal membranes secrete pg/mL concentrations of the enzyme while in the present study leukocyte secretion was about 10 times greater, in the nanogram order. These results suggest that when infiltrating the choriodecidual, in addition to modulating inflammation, placental leukocytes could secrete large amounts of MMP-9 resulting in a major contribution to the enzymatic degradome of the fetal membranes during labor. Preliminary experiments in our laboratory have shown that proMMP-9 can be selectively trafficked from the choriodecidual to the connective tissue-rich compact layer of the amnion, which is the place where the major mechanical resistance is present (Vega-Sanchez et al., 2008).

In summary, we confirmed the existence of a specific combination of leukocyte subsets present at the maternal-fetal interface during human labor. We provided further evidence pointing to major functional

differences in these placental leukocytes compared to peripheral leukocytes at term gestation and particularly during labor, characterized by a distinctive expression and secretion pattern of cytokines. We have not determined if these leukocytes are specific subsets that are recruited to this region or if circulating leukocytes acquire a distinctive functional phenotype once in contact with this microenvironment.

Together, our results support the hypothesis that the local inflammation associated with labor is the result of an immune response coordinated by a set of leukocytes that are recruited to the maternal-fetal interface.

Acknowledgements

We thank Drs. Mercedes Perusquia and Veronica Zaga-Clavellina, as well as to Guadalupe Rozada MSc, for their most valuable guidance and critical comments throughout this project.

References

Parry, S., Strauss 3rd, J.F., 1998. Premature rupture of the fetal membranes. *N. Engl. J. Med.* 338 (10), 663-670.

Vadillo-Ortega, F., Hernandez, A., Gonzalez-Avila, G., Bermejo, L., Iwata, K., Strauss 3rd, J.F., 1996. Increased matrix metalloproteinase activity and reduced tissue inhibitor of metalloproteinases-1 levels in amniotic fluids from pregnancies complicated by premature rupture of membranes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 174 (4), 1371-1376.

Estrada Gutierrez, G., Vadillo-Ortega, F., Jimenez Gonzalez, M.A., Beltran Montoya, J., Giono Cerezo, S., 2002. Caracterizacion bioquimica y ultraestructural del efecto de la interleucina 1-beta como mediador de degradacion de tejido conectivo en membranas corioamnioticas humanas en cultivo. *Ginecol. Obstet. Mex.* 70, 190-195.

Arechavaleta-Velasco, F., Ogando, D., Parry, S., Vadillo-Ortega, F., 2002. Production of matrix metalloproteinase-9 in lipopolysaccharide-stimulated human amnion occurs through an autocrine and paracrine proinflammatory cytokine-dependent system. *Biol. Reprod.* 67 (6), 1952-1958.

Osman, I., Young, A., Ledingham, M.A., Thomson, A.J., Jordan, F., Greer, I.A., Norman, J.E., 2003. Leukocyte density and pro-inflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term. *Mol. Hum. Reprod.* 9 (1), 41-45.

Thomson, A.J., Telfer, J.F., Young, A., Campbell, S., Stewart, C.J., Cameron, I.T., Greer, I.A., Norman, J.E., 1999. Leukocytes infiltrate the myometrium during human parturition: further evidence that labour is an inflammatory process. *Hum. Reprod.* 14 (1), 229-236.

Winkler, M., Fischer, D.C., Ruck, P., Marx, T., Kaiserling, E., Oberpichler, A., Tschesche, H., Rath, W., 1999. Parturition at term: parallel increases in interleukin-8 and proteinase concentrations and neutrophil count in the lower uterine segment. *Hum. Reprod.* 14 (4), 1096-1100.

Menon, R., Swan, K.F., Lyden, T.W., Rote, N.S., Fortunato, S.J., 1995. Expression of inflammatory cytokines (interleukin-1 beta

- 611 and interleukin-6) in amniochorionic membranes. *Am. J. Obstet.*
612 *Gynecol.* 172 (2 Pt 1), 493-500.
- 613 Keelan, J.A., Marvin, K.W., Sato, T.A., Coleman, M., McCowan, L.M.,
614 Mitchell, M.D., 1999. Cytokine abundance in placental tissues:
615 evidence of inflammatory activation in gestational membranes with
616 term and preterm parturition. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 181 (6),
617 1530-1536.
- 618 Vadillo-Ortega, F., Gonzalez-Avila, G., Furth, E.E., Lei, H., Muschel,
619 R.J., Stetler-Stevenson, W.G., Strauss 3rd, J.F., 1995. 92-kd type IV
620 collagenase (matrix metalloproteinase-9) activity in human amnio-
621 chorion increases with labor. *Am. J. Pathol.* 146 (1), 148-156.
- 622 Mitchell, M.D., Trautman, M.S., Dudley, D.J., 1993. Cytokine net-
623 working in the placenta. *Placenta* 14 (3), 249-275.
- 624 Peltier, M.R., 2003. Immunology of term and preterm labor. *Reprod.*
625 *Biol. Endocrinol.* 1, 122.
- 626 Bulmer, J.N., Sunderland, C.A., 1984. Immunohistological character-
627 ization of lymphoid cell populations in the early human placental
628 bed. *Immunology* 52 (2), 349-357.
- 629 Bokstrom, H., Brannstrom, M., Alexandersson, M., Norstrom, A.,
630 1997. Leukocyte subpopulations in the human uterine cervical
631 stroma at early and term pregnancy. *Hum. Reprod.* 12 (3), 586-590.
- 632 Young, A., Thomson, A.J., Ledingham, M., Jordan, F., Greer, I.A., Nor-
633 man, J.E., 2002. Immunolocalization of proinflammatory cytokines
634 in myometrium, cervix, and fetal membranes during human partu-
635 rition at term. *Biol. Reprod.* 66 (2), 445-449.
- 636 Gomez-Lopez, N., Estrada-Gutierrez, G., Jimenez-Zamudio, L., Vega-
637 Sanchez, R., Vadillo-Ortega, F., 2009. Fetal membranes exhibit
638 selective leukocyte chemotactic activity during human labor. *J.*
639 *Reprod. Immunol.* 80 (1), 122-131.
- 640 Lopez-Bojorquez, L.N., Arechavaleta-Velasco, F., Vadillo-Ortega, F.,
641 Montes-Sanchez, D., Ventura-Gallegos, J.L., Zentella-Dehesa, A.,
642 2004. NF-kappaB translocation and endothelial cell activation is
643 potentiated by macrophage-released signals co-secreted with TNF-
644 alpha and IL-1beta. *Inflamm. Res.* 53 (10), 567-575.
- 645 Tachado, S.D., Zhang, J., Zhu, J., Patel, N., Koziel, H., 2005. HIV
646 impairs TNF-alpha release in response to Toll-like receptor 4 stim-
647 ulation in human macrophages in vitro. *Am. J. Respir. Cell Mol.*
648 *Biol.* 33 (6), 610-621.
- 649 Moore, J.M., Shi, Y.P., Othoro, C., Nahlen, B.L., Lal, A.A., Udhayaku-
650 mar, V., 2003. Comparative flow cytometric analysis of term
651 placental intervillous and peripheral blood from immediate post-
partum women in Western Kenya. *Placenta* 24 (7), 779-785.
- Gomez Lopez, N.Y., Estrada-Gutierrez, G., Vadillo-Perez, L., Vadillo-
Ortega, F., 2008. Changes in leukocyte subpopulations in the
choriodecidua and fetal membranes during human labor. *Reprod.*
Sci. 15 (2 Suppl.), 86A.
- Steel, J.H., O'Donoghue, K., Kennea, N.L., Sullivan, M.H., Edwards,
A.D., 2005. Maternal origin of inflammatory leukocytes in preterm
fetal membranes, shown by fluorescence in situ hybridisation. *Pla-
centa* 26 (8-9), 672-677.
- Cindrova-Davies, T., Hong-Wa, Y., Johns, J., Spasic-Boskovic, O.,
Korolchuk, S., Jauniaux, E., Burton, G.J., Charnock-Jones, D.S.,
2007. Oxidative stress, gene expression, and protein changes
induced in the human placenta during labor. *Am. J. Pathol.* 171
(4), 1168-1179.
- Vadillo-Ortega, F., Sadowsky, D.W., Haluska, G.J., Hernandez-
Guerrero, C., Guevara-Silva, R., Gravett, M.G., Novy, M.J., 2002.
Identification of matrix metalloproteinase-9 in amniotic fluid
and amniochorion in spontaneous labor and after experimental
intrauterine infection or interleukin-1 beta infusion in pregnant
rhesus monkeys. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 186 (1), 128-138.
- Stygar, D., Wang, H., Vladoic, Y.S., Ekman, G., Eriksson, H., Sahlin,
L., 2002. Increased level of matrix metalloproteinases 2 and 9 in
the ripening process of the human cervix. *Biol. Reprod.* 67 (3),
889-894.
- Choi, S.J., Oh, S., Kim, J.H., Roh, C.R., 2007. Changes of nuclear fac-
tor kappa B (NF-kappaB), cyclooxygenase-2 (COX-2) and matrix
metalloproteinase-9 (MMP-9) in human myometrium before and
during term labor. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 132 (2),
182-188.
- Garcia-Lopez, G., Vadillo-Ortega, F., Merchant-Larios, H., Maida-
Claros, R., Osorio, M., Soriano-Becerril, D., Flores-Herrera, H.,
Beltran-Montoya, J., Garfias-Becerra, Y., Zaga-Clavellina, V.,
2007. Evidence of in vitro differential secretion of 72 and 92 kDa
type IV collagenases after selective exposure to lipopolysaccharide
in human fetal membranes. *Mol. Hum. Reprod.* 13 (6), 409-418.
- Zaga-Clavellina, V., Merchant-Larios, H., Garcia-Lopez, G., Maida-
Claros, R., Vadillo-Ortega, F., 2006. Differential secretion of matrix
metalloproteinase-2 and -9 after selective infection with group B
streptococci in human fetal membranes. *J. Soc. Gynecol. Investig.*
13 (4), 271-279.
- Vega-Sanchez, R., Flores, A., Castillo, M., Gomez, N., Vadillo-Ortega,
F., 2008. Expression, tissue traffic and activation of MMP-9 in
human fetal membranes during labor. *Reprod. Sci.* 15 (1), 164.