



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

F. E. S. IZTACALA

**Evaluación de la actividad gelatinolítica
presente en membrana fetal de rata al término
de la gestación.**

T E S I S

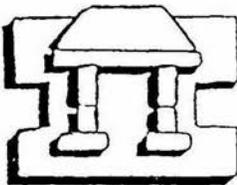
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A:

FLORES PLIEGO ARTURO ERNESTO

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. NOEMI MERAZ CRUZ



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEX.

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

A mis Padres.

Josefina y Arturo por estar con migo en todo momento, gracias por la dicha de haberme formado bajo un hogar calido y tranquilo, por darnos una familia llena de amor y comprensión de la que estoy orgulloso, gracias por su ejemplo, su dedicación, sus consejos y por haberme inculcado los valores necesarios para la vida, nuevamente gracias ya que sin ustedes esto no hubiera sido posible.

A Aurora.

Por ser una parte muy importante en mi vida, por todo tu amor, confianza y por creer en mi. Gracias por impulsarme a terminar esto, y haberme dado el regalo más grande de mi vida. Te amo.

A mis niñas.

Marijose, gracias por haberme dado un nueva ilusión y haberme enseñado esa faceta tan maravilloso que tiene la vida, gracias por tu amor.

Lupita, gracias por esos momentos tan hermosos, en los que me has demostrado tu amor, eres muy especial. Las amo.

A Gerardo y Sandy.

Gracias por su apoyo cuando más lo necesite, por el amor y consejos que siempre han sido y seran de gran valor.

A silvia y Rocío.

Por ser incondicionales, por su amor y respaldo que nunca olvidare gracias.

A mis amigos.

Aurora, Ana, Adriana, Araceli, César, Erika
Israel, Jose Luis, Liliana y Rebeca por los mometos que compartimos durante la carrera y por su amistad.

Al Clandestino

Por alojarnos, darnos un rato de distracción y dejar brotar el conocimiento bajo su influjo.

Al jurado asignado:

Dr. Arturo Baiza Gutman

M. en C. Noemi Meraz Cruz

M. en C. Guadalupe Martínez Hernández

Biol. Antonio Muñoz Torres

M. en C. Martha Salcedo Alvarez

Gracias por la atención prestada a este trabajo, por sus valiosos comentarios e interesantes aportaciones para el mismo.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de la Dirección de Investigación del Instituto Nacional de Perinatología. Bajo la dirección de la M. en C. **Noemi Meraz Cruz**.

A quien le agradezco infinitamente todos sus conocimientos brindados, la dedicación y disponibilidad mostrada.
G R A C I A S



Agradeciendo al Dr. Felipe Vadillo O. Director de investigación del Instituto Nacional de Perinatología, por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

CONTENIDO

IZT.

Resumen.	3
Introducción	5
Membranas fetales	6
Metaloproteinasas de matriz extracelular	8
Regulación transcripcional	9
Activación de proMMPs	10
Inhibición de la forma activa	12
Las MMPs en las membranas corioamnióticas	13
Obletivos	14
Metodología	15
Resultados	20
Discusión	24
Conclusiones	26
Bibliografía	28

RESUMEN.

Las membranas corioamnióticas están formadas en su mayor parte de tejido conectivo, cuya matriz incluye colágenos tipo I, III, IV y V. La colágena provee el soporte estructural y la fuerza tensil al tejido durante el desarrollo gestacional.

Existe una patología en el embarazo humano en la que las membranas corioamnióticas se rompen de modo espontáneo antes del desarrollo del trabajo de parto conocido como ruptura prematura de membranas. Se ha propuesto la participación de diferentes metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP) en la ruptura de las membranas fetales durante el trabajo de parto. En este estudio se utilizaron ratas Wistar que fueron sacrificadas para la obtención de las membranas fetales, donde se evaluó la actividad gelatinolítica y zimografía 24 horas antes del trabajo de parto (TP), 12 horas antes del TP y en TP. Se identificó a la proMMP-2 y a la MMP-2, 12 y 24 horas antes del TP y en TP. La proMMP-9 solo se observó en la etapa de trabajo de parto. La mayor cantidad de actividad gelatinolítica se presentó 12 horas antes del trabajo de parto.

ABREVIATURAS.

MEC : Matriz extracelular

MF : Membranas fetales

MMPs : Metaloproteinasas de matriz extracelular

MT-MMPs : Metaloproteinasas de matriz extracelular tipomembrana

TIMPs : Inhibidor tisular de metaloproteinasas

APMA : Acetato aminofenil mercurico

TP : Trabajo de parto

INTRODUCCIÓN.

La integración de un tejido u órgano en el que se agrupan diferentes poblaciones celulares es sostenida por una red de conexión denominada matriz extracelular (MEC), que permite el asentamiento y la comunicación entre células. La MEC además de proporcionar un soporte físico, participa en procesos de morfogénesis, guía la diferenciación celular, mantiene el fenotipo del tejido diferenciado y en las membranas fetales durante la gestación está en constante remodelación (Figura1).

Las macromoléculas que integran la MEC presentan la capacidad de asociarse entre sí, formando agregados macromoleculares caracterizándose por ser polímeros iónicos lineales, tales como: glicosaminoglicanos, proteoglicanos, glicoproteínas y proteínas¹.

Una clase de glicoproteínas que se encuentra en todas las matrices extracelulares de animales multicelulares, lo constituyen las **colágenas**. El contenido y el tipo de colágena cambia apreciablemente durante el desarrollo y morfogénesis, así como también en ciertos procesos patológicos. En los mamíferos adultos, las colágenas constituyen el 30% de las proteínas totales, son sintetizadas por fibroblastos y codificadas por diferentes genes. Su función es dar soporte estructural y fuerza tensil al tejido conectivo fibroso

MATRIZ EXTRACELULAR

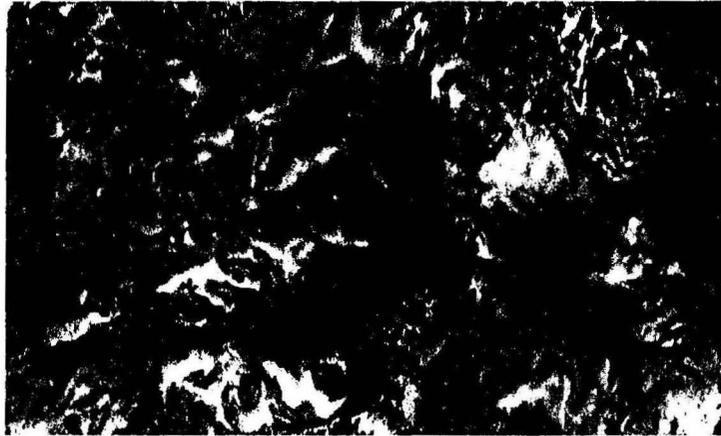


Figura 1. Vista microscópica de la matriz extracelular.

En condiciones normales el recambio de colágena es sumamente lento; dependiendo de los estados fisiológicos su vida media es larga variando de 60 a 300 días, aunque existen tejidos como el útero postparto que puede llegar a ser de 24 horas. Se ha observado que existe un equilibrio entre la síntesis y la degradación de esta molécula; y que esta dinámica está asociada con la proporción célula-colágena que es constante para cada tejido. En estados patológicos se ha visto que hay alteración de esta proporción.

En la gestación, desde el óvulo fecundado hasta el estadio fetal se ha observado la presencia de diferentes factores que determinan y regulan las variaciones cuantitativas de la colágena en el útero. Estos factores dependen de cada elemento que interviene en la biosíntesis de esta proteína². Las membranas corioamnióticas (constituídas por diferentes tipos de colágenas) surgen como la capa exterior de la placenta que además de delimitar estructuralmente el ambiente fetal, transportan productos nutritivos, producen hormonas e impiden el paso de sustancias nocivas al interior. Estas estructuras poseen diferentes tipos celulares que requieren puntos fijos de anclaje y nexos de comunicación proporcionados por la MEC³.

MEMBRANAS FETALES

Las membranas fetales (MF) y moléculas asociadas a éstas forman estructuras complejas, que dependiendo de la especie pueden consistir de: amnios, corion, elementos deciduales, saco

MEMBRANAS FETALES EN RATA

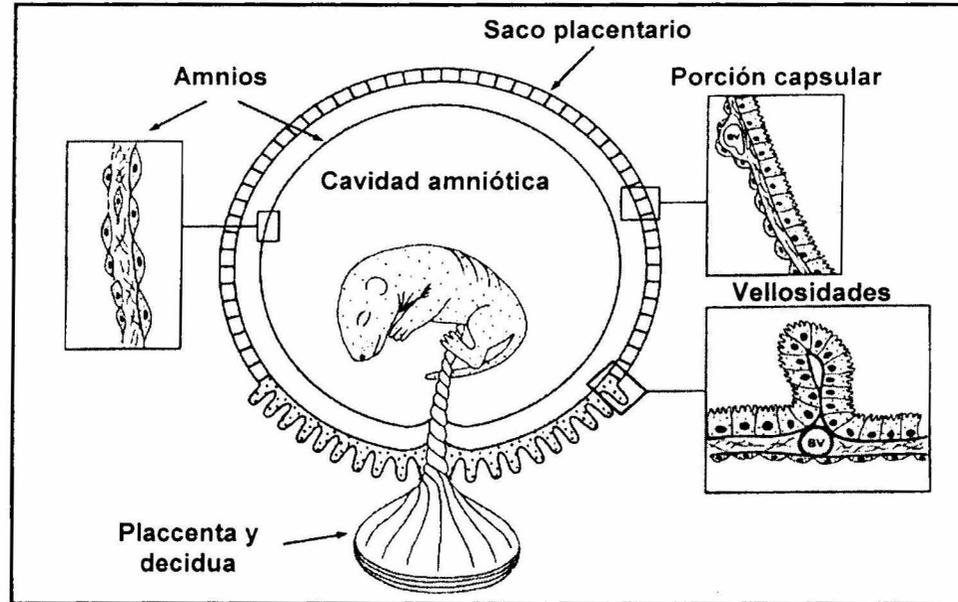


FIGURA 2. Diagrama de las membranas fetales de rata. Después del día 17 de gestación el feto de la rata está rodeado por el saco placentario y el amnios, que lo protegen para su desarrollo y adecuado mantenimiento.

placentario y/o corioalantoides (Figura 2). Cada componente desempeña una o más funciones para la sobrevivencia del feto en el útero.

Estas membranas conforman y delimitan su ambiente, lo protegen, sintetizan factores de crecimiento, hormonas, citocinas y metaloproteinasas de matriz desde el inicio de su desarrollo hasta el final de la gestación.

Composición.

Las MF están integradas básicamente por células y MEC, en la última predominan las colágenas tipo I, II, III, IV y V, se presentan en ellas cinco capas histológicas. **Capa superficial o epitelio:** monocapa celular en contacto con el líquido amniótico. **Membrana basal:** constituida por colágenas tipo IV y V. **Capa compacta:** en contacto con la membrana basal por su otro polo, constituida casi en su totalidad por matriz extracelular, fundamentalmente colágenas tipo I y II. **Capa de fibroblastos:** capa más espesa del amnios, constituida por colágenas tipo I y III. En el siguiente estrato, **capa esponjosa:** de mayor espesor y primera porción del saco visceral (corion), constituida por colágenas tipo I, III y IV (Figura 3), en ella se encuentran diferentes poblaciones celulares: fibroblastos, trofoblastos y macrófagos tisulares embebidos en la matriz extracelular⁴.

Degradación.

Estudios realizados en MF humanas y de rata han mostrado que al final de la gestación existen cambios estructurales y de organización en sus componentes como preparación a su ruptura. Señalando que cambios tan drásticos en el tejido conectivo pueden

ESTRUCTURA DE LAS MEMBRANAS FETALES

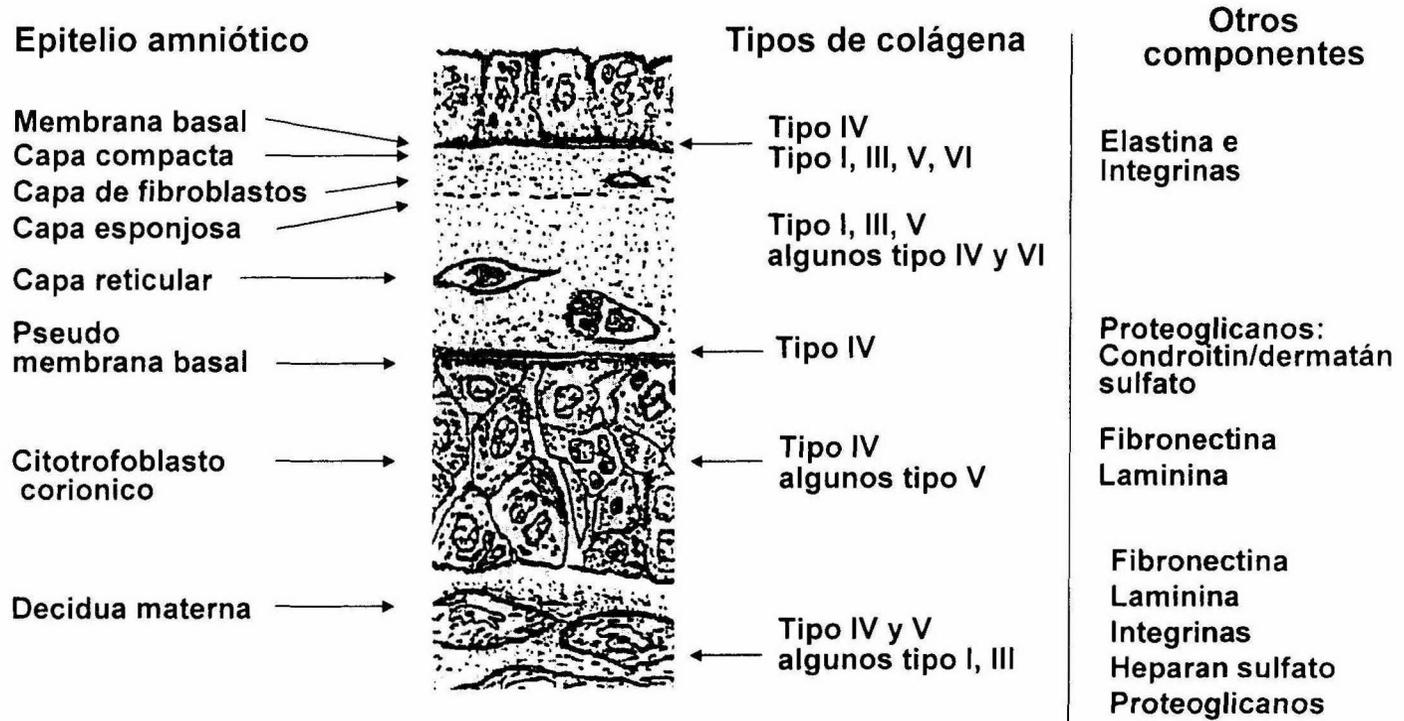


Figura 3. Distribución de los diferentes tipos de colágenas y otros componentes que integran las membranas fetales

influir en la disminución de la fuerza tensil del área donde se inicio la ruptura del tejido^{5,6}. Además existen reportes de bajos niveles en el contenido de colágena encontrados en membranas con ruptura a término, y se ha demostrado la producción de metaloproteinasas de matriz (MMPs) en membranas fetales de diferentes especies⁷.

METALOPROTEINASAS DE MATRIZ EXTRACELULAR.

Las MMPs ó matrixinas son una importante familia de endopeptidasas dependientes de iones como zinc (Zn^{+2}) y calcio (Ca^{+2}), que se han dividido en cinco subgrupos: **colagenasas**, **gelatinasas**, **estromelisin**, **metaloproteasas de matriz-tipo membrana** (MT-MMPs) y **otras MMPs** donde se encuentran enzimas que aún no han sido completamente caracterizadas⁸ (Tabla 1).

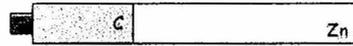
Estas enzimas han sido clasificadas de acuerdo a la especificidad de su sustrato compartiendo las siguientes características: **1**; Dominios comunes de aminoácidos-propéptido, dominio catalítico y dominio hemopexina⁹ (Figura 4) **2**; Capacidad de degradar componentes moleculares de la MEC **3**; Especificidad por su sustrato¹⁰ y **4**; Inhibición de su actividad proteolítica por: a) agentes quelantes que se unen al zinc del sitio activo (como el ácido etilendiaminotetracético EDTA)¹¹, b) moléculas inhibitorias como la α_2 -macroglobulina¹², y c) inhibidores tisulares específicos de metaloproteinasas (TIMPs). Actualmente han sido clonados cuatro miembros (TIMP-1,-2,-3,-4) de esta familia ¹³.

**Tabla 1. FAMILIA DE METALOPROTEINASAS
DE MATRIZ**

SUBGRUPOS	MMP	NOMBRE	kDa	SUSTRATO
COLAGENASAS	MMP-1 MMP-8 MMP-13	Colágena Intersticial Colágena de neutrofilo Colágena – 3	57/52 85/64 52/42	Colágena fibrilar (tipo I,II, III, VII, X), gelatina. Colágena I, II, III. Colágena II.
GELATINASAS	MMP-2 MMP-9	Gelatinasa – A Gelatinasa – B	72/66 92/80	Gelatinas, colágena IV, V, VII, X, elastina, fibronectina. Gelatina, colágena IV, V, Elastina.
ESTROMELISINAS	MMP-3 MMP-10 MMP-11	Estromelisinina – 1 Estromelisinina – 2 Estromelisinina - 3	57/45 57/44 51/44	Proteoglicanos, laminina, fibronectina, colágena III, IV, V, IX, gelatina. Proteoglicanos, fibronectina, colágena III, IV, V, gelatina. Laminina, fibronectina.
OTRAS	MMP-7 MMP-12 MMP-19 MMP-20	Matrilisinina Metaloelastasa RASI – 1 Enamelisinina	28/19 54/22 - 54/22	Proteoglicanos, laminina, fibronectina, gelatina, colágena IV, elastina. Elastina, fibronectina colágena IV. Gelatinas. Amelogenina.
METALOPROTEINASAS DE MATRIZ TIPO – MEMBRANA (MT-MMPs)	MMP-14 MMP-15 MMP-16 MMP-17	MT1-MMP MT2-MMP MT3-MMP MT4-MMP	66/54 72/62 64/53 57/53	Pro MMP-2 Desconocido Pro MMP-2 Desconocido

DOMINIOS ESTRUCTURALES DE MMPs

•Matrilisina (MMP-7)

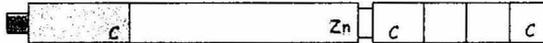


•Colagenasa (MMP-1, -8, -13, -18)

Estromelisina (MMP-3, -10)

Metaloelastasa (MMP-12)

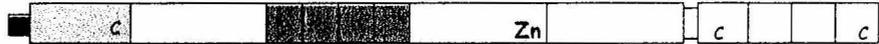
Enamelisina (MMP-20)



•Gelatinasa (MMP-2)



•Gelatinasa (MMP-9)



•Estromelisina 3 (MMP-11)



•Metaloproteasa de matriz-tipo membrana (MT-MMP)

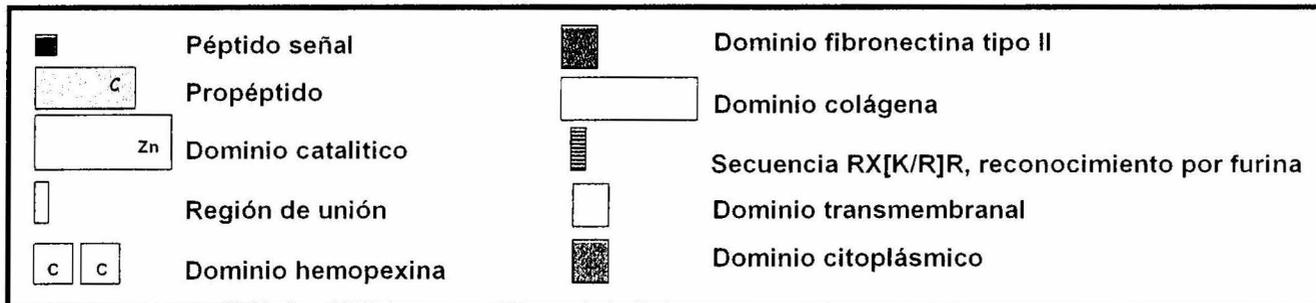
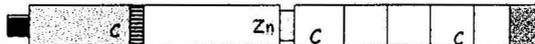


Figura 4. Organización esquemática de cada uno de los dominios que integran a las metaloproteinasas.

Síntesis y secreción.

A excepción de las MT-MMPs, que se encuentran ancladas a la membrana celular en forma de enzima activa, las MMPs son sintetizadas y secretadas al medio ambiente extracelular en estado de proenzimas, requiriendo ser activadas por diversos mecanismos. **In vitro** la activación por desnaturalizantes (SDS), agentes caotrópicos (urea), oxidación y medios químicos (compuestos mercuriales, acetato aminofenil mercurico-APMA), ocurre vía el mecanismo 'switch de cisteína'. De acuerdo a este mecanismo el único residuo de cisteína en la región propéptido de la enzima (secuencia PRCGXPD) mantiene la latencia de la misma por unirse directamente con el átomo de Zn^{2+} del sitio activo¹⁴. La interrupción de esta interacción provoca que la cisteína reaccione con un SH para evitar la reasociación de la cisteína- Zn^{2+} , de esta manera se inicia una cascada de eventos que alteran la conformación de la enzima resultando en la activación de esta y en el corte del propéptido. Otro mecanismo de activación es debido a la tripsina una proteasa no MMP, que corta a la procólagenasa en Arg36-Asn37 resultando un producto de 46 kDa¹⁵ (Figura 5).

La regulación de la actividad **in vivo** de las MMPs se lleva a cabo a nivel de la transcripción, en la activación del estado de proenzima y la inhibición de la forma activa por moléculas específicas¹⁶.

IZT.



U.N.A.M. FES
IZTACALA

REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE MMPs.

Las MMPs comparten secuencias consenso comunes, la región promotora contiene una secuencia rica en timinas y adeninas (caja

ACTIVACIÓN MMPs

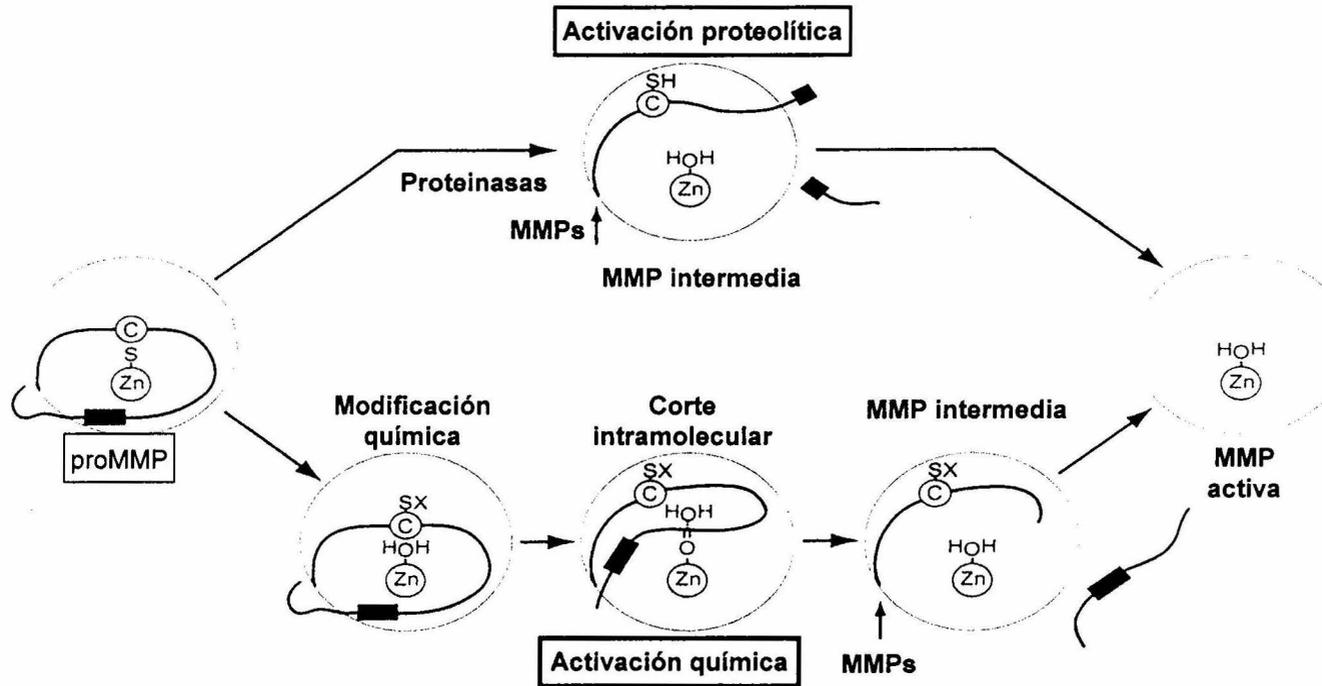


Figura 5. La activación por proteinasas es debido a que estas actúan sobre el propéptido, lo cual desestabiliza la interacción Zinc-Cisteína. Por activación química la cisteína del propéptido reacciona con un SH. En muchos casos el corte completo del propéptido es debido a la acción de MMPs activas o intermedias.

TATA), un elemento de respuesta (TRE) a ésteres de forbol y una secuencia específica para el activador de polyomavirus (PEA-3). Esta última parece colaborar con TRE acelerando la transcripción de MMP-2¹⁷. La incubación de células con citocinas (TNF α o IL-1) o 12-O-tetradecanoil forbol-13-acetato (TPA) induce la expresión de una familia de proteínas transactivadoras (AP-1) que se unen a el TRE e inician la transcripción, así TPA induce la expresión de colagenasas y estromelisin¹⁸.

TGF- β suprime la expresión del RNAm de colagenasas y estromelisin¹ por unirse a un elemento inhibitorio del promotor, conocido como el elemento inhibitorio TGF- β (TIE). Así mismo TGF- β ₁ incrementa los niveles del RNAm de pro-gelatinasa A en diferentes tipos celulares^{19, 20}.

ACTIVACIÓN DE proMMPs.

En la literatura se ha reportado la existencia de cuatro diferentes mecanismos in vivo por los cuáles las MMPs pueden pasar de su estado de proenzima a enzima activa:

1) Activación extracelular por otras proteínas (no MMPs). Este fue el primer mecanismo identificado mediador de la activación de procolagenasas, como progelatinasa B (MMP-9), proestromelisin¹ (MMP-3) y proestromelisin² (MMP-10). Este mecanismo ocurre cuando el plasminógeno (precursor o zimogeno) es convertido a plasmina, una proteasa de serina activa, por la acción de alguno de

los dos activadores de plasminógeno, el activador de plasminógeno tipo-uroquinasa (uPA) o por el activador de plasminógeno tipo-tejido (tPA).

El tPA puede directamente interactuar con componentes de la matriz extracelular. Una vez convertido el plasminógeno a plasmina, esta rompe un segmento de 84 aminoácidos de la pro-estromelina de fibroblastos y otro de 81 aminoácidos de la colagena intersticial, resultando en enzimas totalmente activas²¹ (Figura 6).

2) Activación extracelular por otras MMPs. La activación de una MMP puede ser iniciada por acción de otra MMP. Se tienen datos que la matrilisina (MMP-7) puede actuar sobre la región propéptido de la proestromelina-1 (MMP-3) y pro-gelatinasa B (MMP-9) activando a ambas MMPs²². La activación de estromelina-1 por matrilisina es similar a la mediada por el APMA y 100 % eficiente. La activación de progelatinasa B (MMP-9) por la matrilisina (MMP-7) es eficiente en un 50%, sin embargo la activación de pro-gelatinasa B puede ser mediada también por pro-gelatinasa A²³, ya que esta última corta en Glu⁴⁰ – Met⁴¹ de la Gelatinasa B, generando una enzima con un peso molecular de 86 kDa²⁴

3) Activación intracelular de MT-MMPs por furina . La activación de MMPs por furina es el único mecanismo por el que las MMPs son activadas antes de la secreción de la enzima. La furina es una proteasa de serina que reconoce proteínas con una secuencia RXKR. La estromelina 3 (MMP-11) y miembros de las MT-MMPs como MT1 y MT2 son los que tienen un sitio sensible a furina entre el propéptido y el dominio catalítico²⁵.

ACTIVACIÓN DE MMPs POR PLASMINA

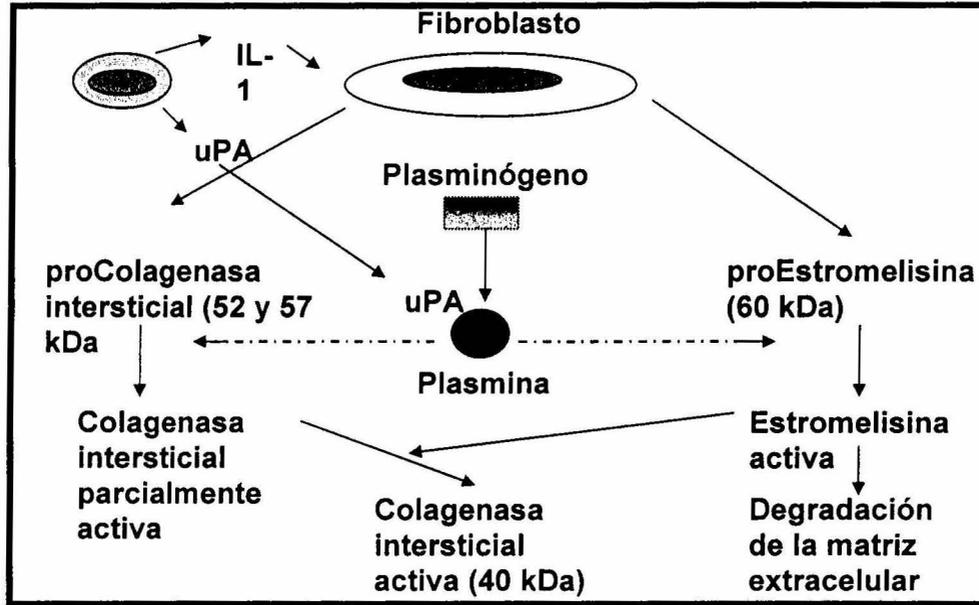


Figura 6. Activación de estromelisina-1 y colagenasa intersticial mediada por plasmina. El plasminógeno del suero es convertido a plasmina por el uPA del keratinocito, así la plasmina subsecuentemente corta el dominio amino terminal de pro-estromelisina y pro-colagenasa intersticial.

4) Activación de MMP-2 por MT-MMPs. Este mecanismo ocurre en la superficie celular. La asociación con membranas y un intacto dominio transmembranal de la MT-MMP es necesario para la activación de la progelatinasa-A (MMP-2). La activación de progelatinasa A por MT-MMPs es debido a que estas últimas cortan la secuencia propéptido de la pro-gelatinasa A resultando una activación autocatalítica y generando la gelatinasa A activa²⁶ (Figura 7).

INHIBICIÓN DE LA FORMA ACTIVA.

Una proteína que se encuentra en el suero humano capaz de inhibir todas las colagenasas investigadas a la fecha de los vertebrados es la α_2 -macroglobulina.

Debido a su gran tamaño y a su mecanismo de inhibición irreversible tiene un papel limitado a la inhibición de proteasas que hayan llegado al flujo sanguíneo y no a la regulación de la colagenolisis en el intersticio del tejido conectivo²⁷.

Un factor que desempeña un papel decisivo en la actividad de las MMP está constituido por los TIMPs, esta familia está integrada por cuatro distintos miembros: TIMP-1 de 20.6 kDa, TIMP-2 de 21.5 kDa, TIMP-3 de 21.6 kDa y TIMP-4 de 22.3 kDa, los cuales son glicoproteínas de bajo peso molecular que se comportan como inhibidores específicos de las MMPs. Las características principales que poseen son: presentar 12 residuos de cisteína que forman 6 bandas unidas por puentes disulfuro en una región altamente conservada; un dominio N-terminal de \approx 125 aminoácidos con secuencia consenso: VIRAK importante para la actividad inhibitoria

ACTIVACIÓN DE MMP-2 POR MT-MMPs

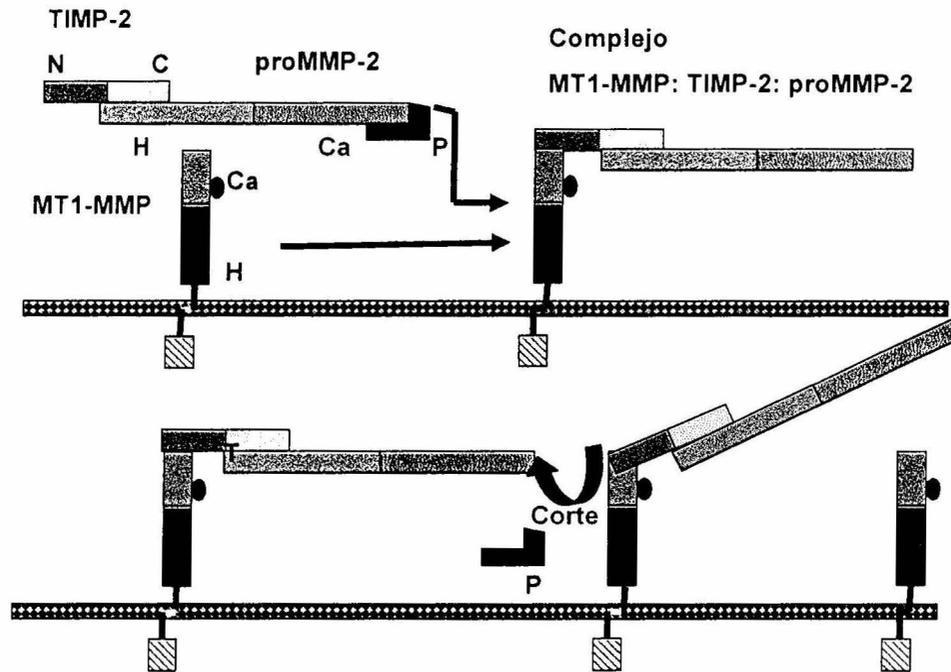


Figura 7. Activación de MMP-2 por MT-MMPs. El complejo TIMP-2 y proMMP-2 se unen a MT1-MMP (A). MT1-MMP es capaz de cortar el propéptido de la proMMP-2 (B), resultando en la activación de la enzima (C). Abreviaturas: C=región carboxilo terminal de TIMP-2; Ca=dominio catalítico de MMP-2 y MT1-MMP; HP=dominio a hemopexina de MMP-2 y MT1-MMP; N=región amino terminal de TIMP-2; P=propéptido de MMP-2.

hacia MMP y un C-terminal de ≈ 65 aminoácidos. Constituyen el tercer mecanismo de regulación mediante la unión de un TIMP a una MMP activa. La familia de los TIMPs inhiben a las MMPs por unirse con estequiometría 1:1 para formar complejos no covalentes.

Los TIMP son importantes por establecer un equilibrio entre la síntesis y la degradación de la MEC causada por MMPs, la mayoría se unen a la región catalítica de las MMP y bloquean su acción²⁸.

LAS MMPS EN LAS MEMBRANAS CORIOAMNIÓTICAS.

Estudios realizados en humanos muestran la participación de MMPs en el desarrollo embrionario, migración, proliferación celular, morfogénesis, reparación tisular y apoptosis. Actualmente estas enzimas se han relacionado con enfermedades humanas, como son la aterosclerosis, artritis reumatoide, cáncer y en el área reproductiva: ovulación, dilatación cervical y endometriosis²⁹.

La expresión de diferentes MMPs en membranas fetales humanas al final de la gestación es lo que ha sugerido a diferentes autores, proponerlas como responsables de la degradación del tejido conectivo, evento que es asociado con la ruptura de las membranas fetales humanas tanto espontánea como prematuramente^{30, 31}.

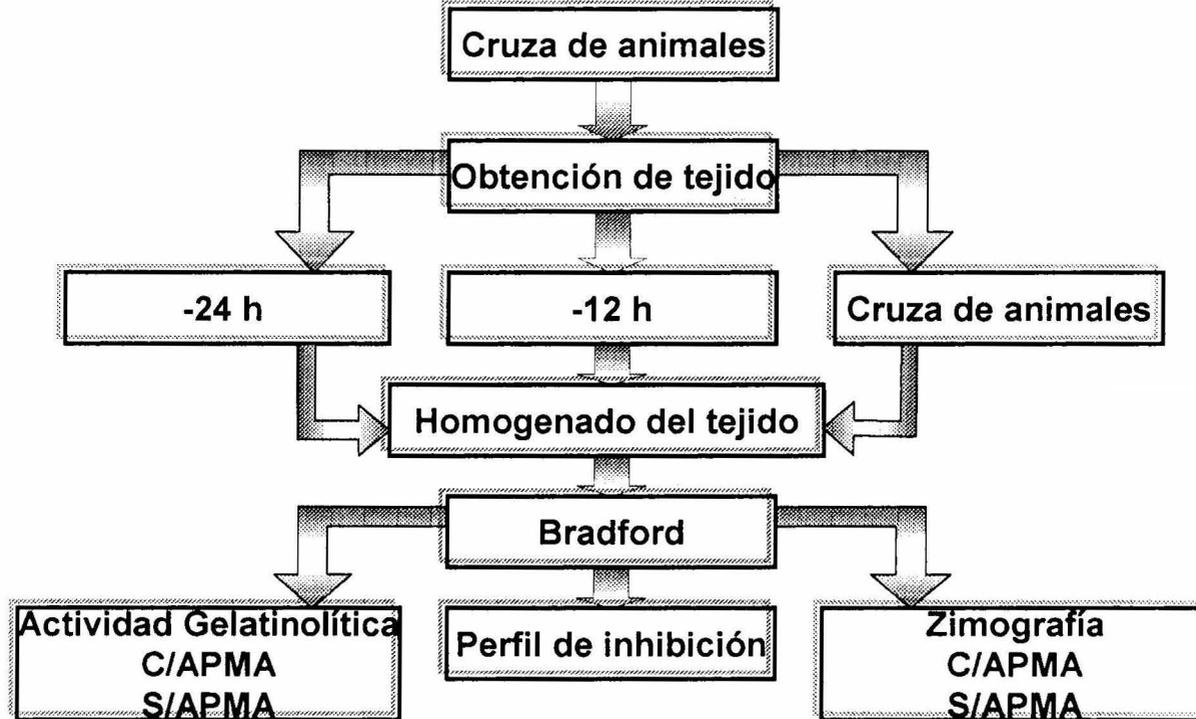
Los estudios sobre ruptura de membranas son de vital importancia, ya que si este evento se produce antes del término de la gestación se convierte en problema de salud pública a nivel mundial. El tratamiento de esta complicación del embarazo sigue siendo empírico y sin resultados satisfactorios. Por otro lado y debido a la misma razón del desconocimiento de su etiopatogenia, no existe

medida alguna que permita prevenir su desarrollo. Por ello utilizando un modelo experimental desarrollado en rata, se propone analizar la actividad de proteasas que se manifiestan en la fase final de la gestación, localizando el momento en el cuál sea probable modular su actividad. Ha llamado la atención que en diversos estudios, reportan la participación de distintas MMPs en membranas a término, pero en su estado de proenzima. Tales reportes hacen necesario investigar que acontecimientos se están llevando a cabo en torno al momento de la ruptura del tejido. Ya que la enzima obligatoriamente debe estar en su forma activa para poder llevar a cabo la degradación de la membrana y consecuentemente su ruptura para la salida del producto.

OBJETIVOS.

1. Evaluar la actividad gelatinolítica presente en las membranas fetales de la rata en la etapa preparto (-24 h y -12 h antes del trabajo de parto) y durante el trabajo de parto (TP).
2. Evaluar la cantidad de enzima en estado latente presente en las etapas estudiadas.
3. Identificar a las metaloproteinasas responsables de la actividad gelatinolítica en la membrana fetal de la rata al final de la gestación.

METODOLOGÍA



METODOLOGÍA.

LUGAR DONDE SE REALIZÓ EL ESTUDIO.

Bioterio y Laboratorio de la Dirección de Investigación. Torre de Investigación 5º Piso, Instituto Nacional de Perinatología (INPer).

MUESTRAS BIOLÓGICAS.

COLECTA DE MUESTRAS.

Se utilizaron ratas hembras de 250 gramos de peso promedio de la cepa Wistar que fueron sincronizadas con ciclos de luz obscuridad 12/12, lo que permitió tener animales con 21 días de gestación. Se formaron 5 grupos, cada uno de 4 ratas hembras por un macho, los cuáles se colocaron juntos durante 12 horas. Al momento de retirar el macho se tomó citología vaginal y las ratas con espermatozoides positivos se contaron en el día 1 de gestación. La toma de muestras se hizo a tres tiempos: se sacrificaron ratas en el día 20 (24 horas antes de TP), día 21 por la mañana (12 horas antes de TP) y día 21 por la noche (en TP). Una vez sacrificadas, se procedió a coleccionar las membranas fetales.

PREPARACIÓN DEL TEJIDO

Las membranas fetales colectadas, fueron lavadas con solución fisiológica para retirar el exceso de sangre. Posteriormente fueron cortadas en fragmentos y colocadas en amortiguador Tris 50mM pH 7.4, NaCl 150 mM, CaCl₂ 50 mM y azida de sodio 0.02% para ser homogenizadas. El homogenado se realizó en un volumen aproximado de 500 µl por 650 mg de tejido con un Politrón (Brinkmann-Homogenizer, Switzerland) a 4°C. Después el homogenado fue centrifugado a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante fue colectado y almacenado a -70°C hasta su análisis.

CUANTIFICACION DE PROTEÍNAS.

La concentración de proteína de los sobrenadantes fue determinada por el método de Bradford (micrométodo)³², usando albúmina bovina como estándar de referencia.

ACTIVIDAD GELATINOLÍTICA.

Los sobrenadantes de los homogenados de membranas fetales se valoraron en su capacidad para degradar un sustrato general de proteasas (gelatina marcada con 3H) según el método de Sunada³³, que consiste en incubar 10 µg de proteína de cada una de las muestras incubadas con 20 µg de sustrato tritiado (actividad

especifica 1.5×10^6 dpm/mg), en amortiguador Tris 50 mM pH 7.4, con NaCl 150mM, CaCl_2 20mM y azida de sodio 0.02% a 37°C por 24 horas, al término de la incubación la reacción se detuvo con ortofenantrolina, los productos de degradación enzimática se separaron precipitando con dioxano:metanol (4:1), en virtud que la colágena nativa precipita, mientras que la colágena degradada permanece soluble. Se centrifugó y se determinó radioactividad al sobrenadante en un contador de centelleo Minaxi B Tri-carb (United Technologies Packard) Todos los ensayos fueron valorados por triplicado. La actividad gelatinolítica se expresó como μg de gelatina degradada/mg de proteína incubada en 24 horas/37 °C. Se incluyeron tubos a los que se adicionó 1-10 ortofenantrolina para actividad basal.

PERFÍL DE INHIBICIÓN.

Muestras de extractos de membranas fetales 10 μg , fueron incubados con 20 μg de gelatina tritiada, en amortiguador Tris 50 mM pH 7.4, con NaCl 150 mM, CaCl_2 20 mM y azida de sodio 0.02% en presencia de diferentes inhibidores de proteinasas: pepstatina A 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (PEP) y N-etilmaleimida 20 mM (NEM) que inhiben específicamente proteasas ácidas que contengan aminoácidos con residuos de cisteína; fluoruro de fenilmetilsulfonilo 10 mM (PMSF) y aprotinina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (AP), son inhibidores específicos para proteasas de serina; ácido etilendiaminotetracético 20 mM (EDTA) y 1-10 ortofenantrolina 80 mM (OF), que inhiben proteasas que contienen metal por 24 h a 37 °C.

ACTIVACIÓN DE proMMPs.

Alicuotas de extractos de membranas fetales fueron tratadas con APMA a concentración final de 1 mM durante 24 horas a 37°C, para revelar la presencia de MMPs latentes en las muestras.

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

ZIMOGRAFÍA.

Con el objeto de identificar las diferentes actividades enzimáticas presentes en las extracciones realizadas, alícuotas de extractos de tejido fueron procesadas mediante la técnica de geles/sustrato³⁴. Esta técnica consistió en la elaboración de un gel con matriz de poliacrilamida al 10% conteniendo SDS más la incorporación de gelatina de piel de cerdo (Sigma Chemical Co.) y la aplicación de 10 μ g de proteína a cada carril.

Las muestras se corrieron a 10 mA por gel durante 2 horas aproximadamente, para lo que se utilizó un sistema con formato de mini-gel (Bio-Rad, Richmond, CA). El SDS fue eliminado con dos incubaciones en Tritón X-100 al 2.5% por 10 minutos cada una, posteriormente se enjuagaron con agua bi destilada y se mantuvieron por 24 horas a 37°C en un amortiguador de Tris 50 mM pH 7.4 con NaCl 150 mM, CaCl₂ 20 mM, geles idénticos fueron

incubados en presencia de 1,10-ortofenantrolina 80 mM. Al final de la incubación los geles fueron teñidos con azul brillante de Comassie R-250 y destañidos con ácido acético 7.5% y metanol 5%.

En cada una de las corridas se incluyeron una alícuota del marcador de peso molecular preteñido con rango de 14 a 200 kDa (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) y una alícuota con marcador de actividad conocida: sobrenadante de células U937 el cuál presenta 2 bandas de migración correspondientes a MMP9 y MMP2 en estado de proenzima³⁵. Con esta técnica se pudieren apreciar a las enzimas que presentan actividad gelatinolítica como bandas de lisis contra un fondo de sustrato no degradado.

ACTIVACIÓN CON APMA

Alicuotas de 10 µg de de proteína de los extractos de MF fueron incubadas con APMA, durante 4 horas a 37 °C. Posteriormente estas muestras fueron sometidas a su análisis bajo la técnica de zimografía.

RESULTADOS.

1. ACTIVIDAD GELATINOLÍTICA EN HOMOGENADOS DE MF

La actividad enzimática de las muestras obtenidas 24 horas antes del trabajo de parto fue 84.2 ± 24 μg de gelatina degradada/mg de proteína incubada, para 12 horas antes del trabajo de parto fue de 202.35 ± 60.10 μg de gelatina degradada/mg de proteína incubada y en las muestras obtenidas en TP fue de 350 ± 38 ($p < 0.001$). Se observó de esta manera mayor actividad gelatinolítica en los extractos de MF en el momento del TP (Figura 8).

2. PERFIL DE INHIBICIÓN DE PROTEASAS

La actividad gelatinolítica basal de muestras obtenidas al momento del TP fue: 310.60 ± 25.40 μg de gelatina degradada/mg de proteína incubada, al tratarse las muestras con los diferentes inhibidores se obtuvieron los siguientes valores y % de inhibición:

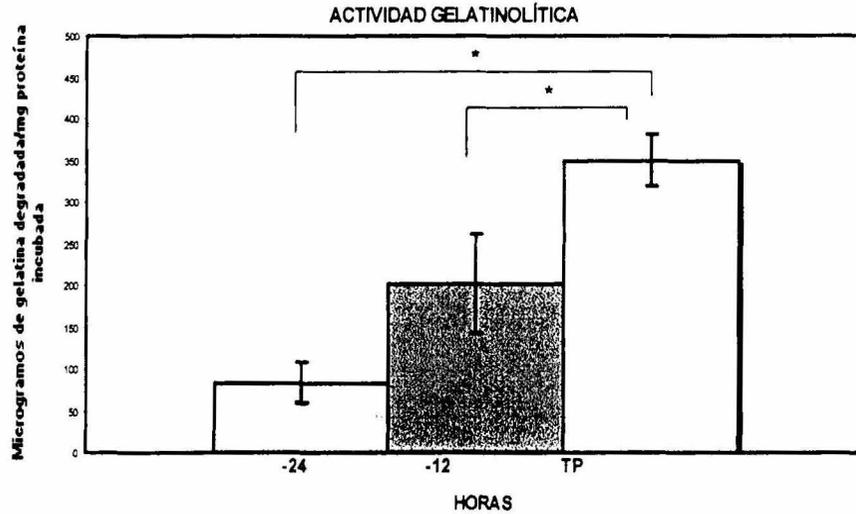


Figura 8. Actividad específica de los extractos tisulares obtenidos 24 horas antes del trabajo de parto (TP), 12 horas antes de TP y en TP. La mayor actividad gelatinolítica encontrada fue para las muestras obtenidas en TP. significativas entre cada uno de los grupos de muestras analizados. El asterisco (*) señala la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$) entre cada uno de los grupos de muestras analizados.

Inhibidor	μg de gelatina degradada/mg proteina incubada	% de inhibición
pepstatina A	292 ± 27	6.4
N-etilmaleimida	301 ± 18	3.4
fluoruro de fenilmetilsulfonilo	227 ± 9	27.1
aprotinina	236 ± 11	25.7
ácido etilendiaminotetracético	51 ± 8	84.4
ortofenantrolina	28 ± 6	91.1

Se encontró que la menor actividad enzimática se obtuvo al tratar las alícuotas con OF y EDTA (Figura 9)

Este perfil de inhibición fue indistinguible al compararlo con el perfil de muestras obtenidas 12 h antes del trabajo de parto.

Como se muestra al analizar los porcentajes de inhibición de la actividad específica para cada familia de proteasas, la actividad enzimática presente en las muestras esta dada en su mayoría por metaloproteasas, existe también actividad de proteasas de serina aunque en menor proporción con respecto a la familia anterior y la mínima actividad encontrada fue dada por proteasas ácidas y proteasas de cisteína

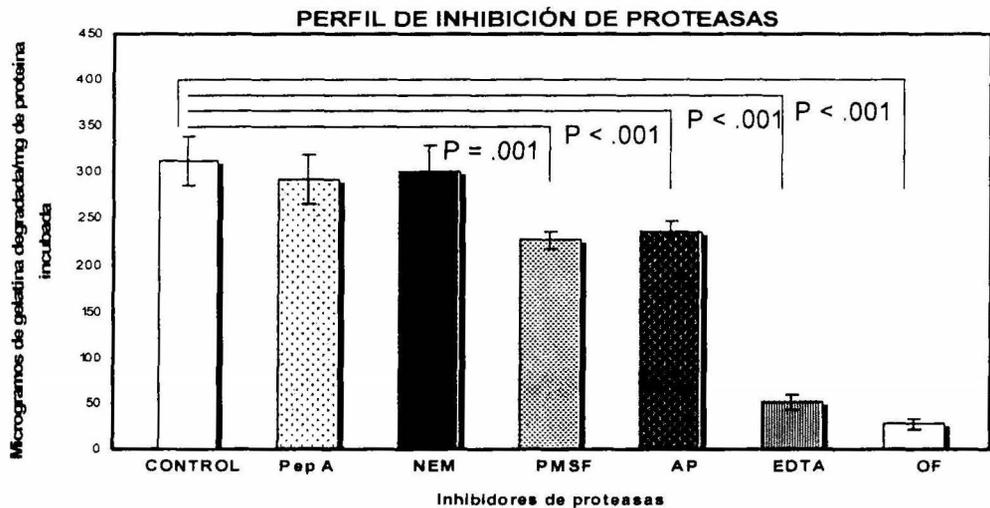


Figura 9. Se muestra el perfil de inhibición de las proteasas presentes en extractos de tejido obtenidos en el día 21 de la gestación de la rata, con los siguientes inhibidores: pepstatina A (Pep A), N-etilmaleimida (NEM), fluoruro sulfonil fenilmercúrico (PMSF), aprotinina (AP), ácido etilendiaminotetra acético (EDTA) y ortofenantrolina (OF).

3. ACTIVACIÓN DE HOMOGENADOS DE MF CON APMA.

Los resultados obtenidos con el sustrato marcado, al ser incubadas las muestras de tejido con APMA revelaron actividad de gelatinasa latente.

En los extractos de 24 horas antes del trabajo de parto se obtuvo un valor de: 84.2 ± 24 μg de gelatina degradada/mg de proteína incubada aumentando este valor cuando se incubo con APMA a 100 ± 41.8 μg de gelatina degradada/mg de proteína incubada; 12 horas antes del trabajo de parto se obtuvo 202.35 ± 60.10 μg de gelatina degradada/mg de proteína incubada, aumentando significativamente ($p < 0.05$) con APMA a 455.4 ± 118.22 μg de gelatina degradada/mg de proteína incubada y en TP el valor obtenido fue 350 ± 38 μg de gelatina degradada/mg de proteína incubada, incrementandose con APMA a: 380 ± 62 μg de gelatina degradada/mg de proteína.

Esto reveló que 12 h antes del trabajo de parto se observa la mayor cantidad de enzima latente presente en el tejido. Con respecto a las muestras de 24 horas antes del trabajo de parto y en trabajo de parto la actividad gelatinolítica no se vio modificada significativamente (Figura 10).

4. CARACTERIZACIÓN DE METALOPROTEASAS

El corrimiento de las muestras con la técnica de geles sustrato mostró que 24 horas antes del trabajo de parto, aparecieron dos bandas de lisis con peso molecular estimado de 65 kDa y 72 kDa que se mantienen hasta el trabajo de parto. Sin embargo, 12 horas antes del trabajo de parto se observa una banda de 92 kDa junto con las

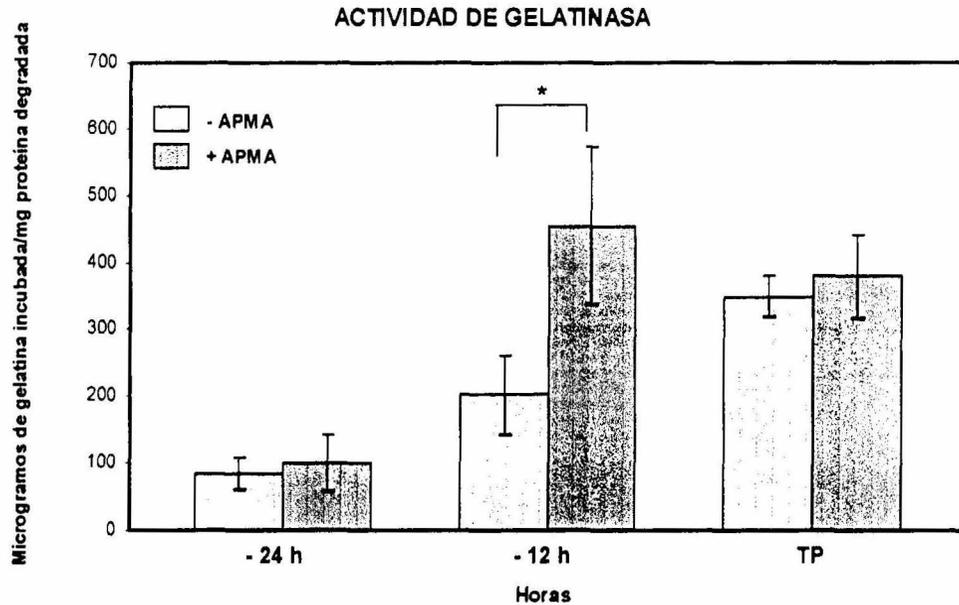


Figura 10. Actividad Gelatinolítica de los extractos tisulares después de ser incubados en presencia del organomercurial (+ APMA). El asterisco (*) señala la existencia de diferencia significativa ($p < 0.05$) en las muestras obtenidas 12 horas antes de trabajo de parto.

dos ya existentes. De acuerdo a sus pesos moleculares y al marcador de actividad (sobrenadante de la línea U-937) estas bandas corresponden ordenándolas de menor a mayor peso a MMP-2, proMMP-2 y proMMP-9 respectivamente.

La banda correspondiente a la proMMP-9 en TP mostró un incremento del 34.43% con respecto a la intensidad observada 12 horas antes del trabajo de parto (Figura 11).

Geles idénticos que incubados en presencia de 1-10 ortofenantrolina, no revelaron actividad proteolítica, confirmando su identidad de metaloproteinasas.

5. ACTIVACIÓN CON APMA POR ZIMOGRAFIA.

El patrón de actividad en la zimografía, se modificó después de la incubación con el organomercurial APMA, aumentando considerablemente las bandas de lisis de las metaloproteinasas antes descritas. Llamando la atención que la muestra obtenida 12 h antes del trabajo de parto reveló nuevas bandas de lisis con alto peso molecular, además de las ya existentes, Para efecto de observar con claridad los pesos moleculares de cada una de estas bandas, se realizó una dilución 1:10 y fue corrida nuevamente en gel, de tal manera que logramos observar bandas desde los 89 kDa de peso molecular hasta los 200 kDa. (Figura 12). Este resultado reafirmó los datos obtenidos para actividad latente mostrados en la figura 10.

ZIMOGRAMA

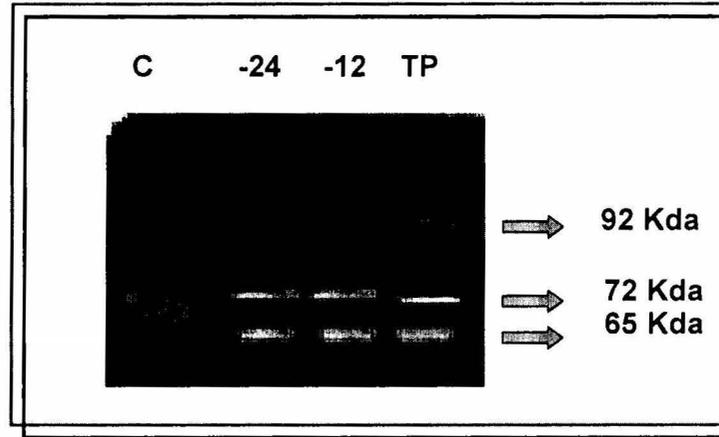


Figura 11. Actividad gelatinolítica presente en extractos de tejido obtenida por zimografía.
Carril 1: **C** control de actividad obtenido de la línea celular monocítica U-937(proMMP-9 =92 kDa y proMMP-2 =72 kDa). Carril 2 y 3: muestras obtenidas **24** y **12** horas antes del trabajo de parto. Carril 4: **TP** representa trabajo de parto, observando la aparición de tres bandas de lisis a partir de -12 y en TP proMMP-9 (92kDa), proMMP-2 (72kDa) y MMP-2 (65kDa).

ZIMOGRAMA

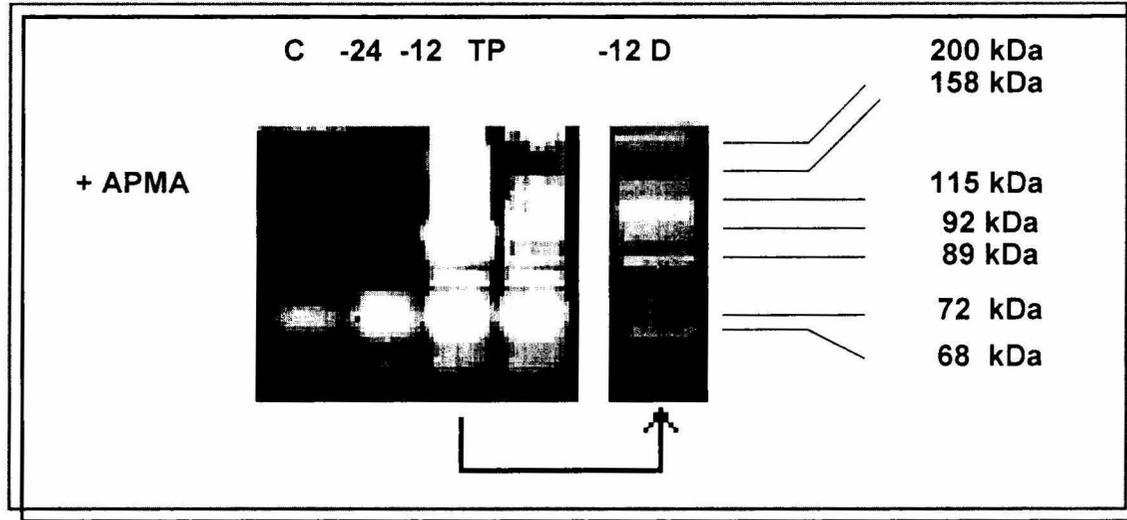


Figura 12. Actividad gelatinolítica de los extractos tisulares después de ser incubados con APMA. Carril 1: control de actividad obtenido de la línea celular U-937 que contiene proMMP-9 (92 kDa) y pro MMP-2 (72 kDa). Carril 2: -24 horas antes del trabajo de parto (TP). Carril 3: -12 horas antes de TP. Carril 4: muestra obtenida en TP. Carril 5: dilución 1:10 de la muestra obtenida -12h antes de TP.

DISCUSIÓN.

Durante la gestación las membranas fetales delimitan el ambiente del feto, lo protegen y tienen funciones que le permiten su desarrollo hasta el momento del trabajo de parto⁵. Estas membranas dependiendo de la especie pueden recibir diferentes nombres, sin embargo al analizar su estructura observamos que la composición es semejante, existiendo estudios donde se muestra que hacia la etapa final de la gestación sufren cambios en la organización del tejido epitelial y conectivo, sugiriendo que hay modificaciones que conducen a las membranas fetales a romperse durante este período^{6, 36}. El modelo desarrollado en la rata permitió abordar en la fase final de la gestación, el análisis bioquímico de los cambios que están ocurriendo en las membranas. Además de ser reproducible y económico el estudio no podría ser posible en el humano por la toma de muestras de manera secuencial al final del embarazo.

Datos en la literatura muestran que tanto en la rata como en el humano hay pérdida de colágena en el período inmediato antes del trabajo de parto, paralelo a la disminución de la fuerza tensil de las membranas fetales³⁷. Esta observación ha hecho que diferentes autores lo asocien al aumento en la expresión de distintas MMPs momentos antes de iniciar el trabajo de parto³⁸. El uso de este modelo permitió mostrar que la membrana fetal de la rata cuenta con un sistema de degradación de tejido conectivo finamente regulado, caracterizado por el aumento de las actividades enzimáticas en las

horas previas al desarrollo del trabajo de parto. Estas enzimas son en su mayoría metaloproteinasas detectables en las membranas. Cabe hacer notar que 12 horas antes del trabajo de parto es cuando se presentó la mayor parte de la actividad proteolítica al activar a las proenzimas con APMA. Por datos obtenidos en el laboratorio se sabe que esta actividad también se vio aumentada en el líquido amniótico de la misma edad gestacional. Sin embargo nunca alcanzó los valores por nosotros obtenidos. Mostrando que las enzimas se concentran en el compartimiento donde ejercerán su actividad catabólica, que resultará en la degradación de tejido conectivo y la ruptura de la membrana. El perfil de proteasas y sustratos demostró que la mayor parte de las enzimas que aumentan al acercarse el parto, son gelatinasas dependientes de Zn^{+2} , es decir metaloproteinasas y nos permite proponer la posible composición de familias de proteasas que se encuentran presentes en la membrana fetal al final de la gestación (Figura 10). La identificación por zimografía de estas metaloproteinasas en solución condujo a identificar a la MMP-2 y MMP-9 como las enzimas más abundantes. La actividad enzimática de la MMP-2 se mantuvo constante durante la etapa preparto (24 horas y 12 horas antes del TP) y en la etapa de TP y confirmamos hallazgos de otros autores que han señalado que esta enzima pareciera ser expresada de modo constitutivo y ser la responsable de mantener el recambio de la matriz extracelular de la membrana durante la gestación³⁰. Es posible que estos hallazgos puedan ser explicados por la inhibición selectiva de la MMP-2 por su inhibidor específico TIMP-2 que a diferencia del TIMP-1, no se modifica hacia el final de la gestación³⁹. Por otro lado, la pro MMP-9, apenas fue detectable en algunas muestras obtenidas 24 horas antes del trabajo de parto, pero siempre estuvo presente al acercarse el final de la

gestación (12 horas antes del trabajo de parto). Estos datos concuerdan con lo ya citado en la literatura, en donde hay aumento de la expresión del gene de la MMP-9 al final de la gestación³⁰. Lo anterior permite reforzar la idea de que la MMP-9 al actuar en conjunto con la MMP-2, serían las responsables de las alteraciones que sufren las membranas como prólogo a su ruptura. Es preciso reconocer que aunque no fueron identificadas en este estudio, existen otras enzimas involucradas en el proceso que pueden pertenecer a cualquiera de las familias ya mencionadas (Figura 13).

Una primer interrogante de los resultados presentados es la observación de que no se demostró la forma activa de la MMP-9 dato que concuerda con un gran número de trabajos realizados donde generalmente reportan a esta enzima con peso molecular de 92 kDa²⁹.³⁵. Sin embargo, tal y como lo demostraron los ensayos con APMA, es posible revelar la latencia de la enzima con un pico 12 horas antes del trabajo de parto.

CONCLUSIÓN.

Con base en lo anterior podemos concluir que a pesar de existir reportes que observan aumento en la expresión de la MMP-9 por datos de "Western blot"⁴⁰ zimografía y activación con APMA, la regulación de su actividad catalítica se ejerce a nivel de la activación de la proenzima.

Dentro de los posibles mecanismos que podrían ser responsables de la latencia de la enzima, se pensó en la interacción de la enzima con su inhibidor específico, sabiendo que las membranas amnióticas

MODELO HIPOTÉTICO DE PROTEASAS

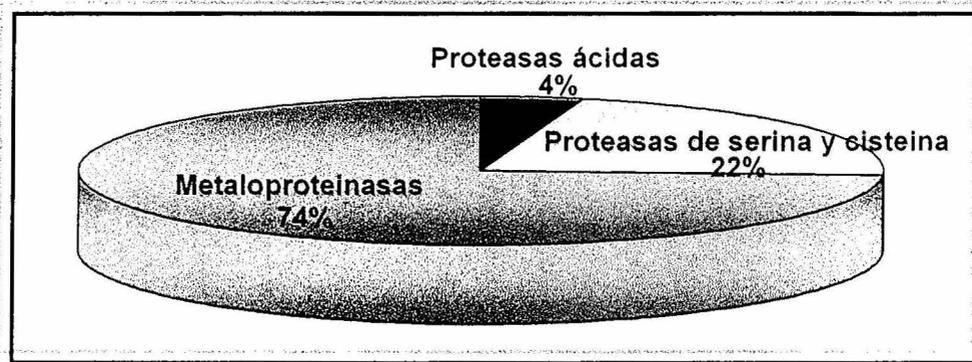


Figura 13. Representación hipotética de el porcentaje de proteasas encontradas en los extractos tisulares (MF).

producen TIMP-1⁴¹. No obstante por resultados obtenidos también en el laboratorio, se ha observado que TIMP-1 se encuentra disminuido al final de la gestación.

Existen estudios donde se ha señalado a MMP-2 actuar como activador de la pro MMP-9⁴², por lo que la presencia de esta enzima en la etapa final de la gestación, podría estar relacionada con la activación de la proenzima que aparece en el momento adecuado para ejecutar su función, de tal manera que degrade y produzca la ruptura de la membrana.

Sin embargo en los últimos experimentos realizados, enfocados en las muestras obtenidas doce horas antes del trabajo de parto sugieren que en la activación de la pro MMP-9 participan más de una MMP, además de cofactores para desencadenar su acción, lo que marca el inicio del mecanismo de activación de esta enzima momentos antes del trabajo de parto.

IZT.



BIBLIOGRAFÍA.

- ¹ Woessner J F. Introduction to serial reviews: the extracellular matrix . FASEB J. 1993. 7:735-736
- ² Prockop D J, Kivirikko K I. Collagens: molecular biology, diseases and potentials for therapy. Annual Rev Biochem. 1995. 64: 403-434.
- ³ Malak T M, Ockleford C D, Bell S C, Dalgleish R, Bright N, McVicar J. Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term fetal membranes. Placenta. 1993. 385-406.
- ⁴ Greenwood B. The extracellular matrix of the human fetal membranes : structure and function. Placenta. 1998. 19:1-11.
- ⁵ LarMen J, Malak T M, Bell S C. Structural characteristics of term human fetal membranes prior to labour: identification of an area of altered morphology overling the cervix. Hum Reprod. 1999. 14: 237-141.
- ⁶ Paavola L G, Furth E E, Delgado V, Boyd C O, Jacobs C C, Lei H, Strauss J F III. Striking changes in the structure and organization of rat fetal membranes precede parturition. Biol Reprod. 1995. 53: 321-338.
- ⁷ Lei H, Furth E E, Kalluri R, Wakenel P, Kallen C B, Jeffrey J J, Leboy P S, Strauss J F. III. Induccion of matrix metalloproteinases and collagenolysis in chick embryonic membranes before hatching. Biol Reprod. 1999. 60: 183-189.
- ⁸ McCawley L J, Matrisian L M. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore. Current Opinion in cell biology. 2001. 13: 534-540.
- ⁹ De Souza A P, Peres L S. The biology of matrix metalloproteinases. Rev. FOB. 2002. 10 (1): 1-6.
- ¹⁰ Woessner J F. and Nagase H. Matrix metalloproteinases and TIMPs. Oxford University. 2000. New York
- ¹¹ Woessner J. F. Matrix Metalloproteinase inhibition from the jurassic to the third millennium. Ann N Y Acad Sci. 1999. 878: 388-403.
- ¹² Nagase H, Itoh Y, Binner S. Interaction of alpha 2-macroglobulin with matrix metalloproteinases and its use for identification of their active form. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1994. 723: 294-302
- ¹³ Bode W, Fernandez-Catalan C, Tsechesche H, Grams F, Nagase H, Maskos K. Structural properties of matrix metalloproteinases. Cell. Mol. Life. Sci. 1999. 55: 639-652.
- ¹⁴ Van Wart H, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. Proct Natl Acad Sci. 1990. 87: 5578-5582.
- ¹⁵ Ferrans V J. New insights into the world of matrix metalloproteinases. Circulation. 2002. 105 (4): 405-407.

- ¹⁶ Parsons S L. Watson S A. Brown P D. Collins H M. Steele R J C. Matrix metalloproteinases. *Br J Surg.* 1997. 84 (2): 160-167.
- ¹⁷ Yeung O. Hurta R A. Phorbol ester tumour promoter mediated altered expression and regulation of matrix metalloproteinases-2 in H-ras transformed cell line capable of benign tumour formation. *Mol Cell Biochem.* 2001. 220 (1-2): 39-48.
- ¹⁸ Frisch S. Morisaki J H. Positive and negative transcriptional elements of the human type IV collagenase gene. *Mol Cell Biol.* 1991. 10: 6524-6532.
- ¹⁹ Delany A M. Brinckerhoff C E. Post-transcriptional regulation of collagenase and stromelysin gene expression by epidermal growth factor and dexamethasone in cultured human fibroblast. *J Cell Biochem.* 1992. 50: 400-410.
- ²⁰ Sehgal I. Thompson T C. Novel regulation of type IV collagenase (matrix metalloproteinases-9 and -2) activities by transforming growth factor- β 1 in human prostate cancer cell lines. *Mol Biol Cell.* 1999. 10: 407-416.
- ²¹ Visse R. Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry. *Circ Res.* 2003. 92:827-839.
- ²² Imai k. Yokohama Y. Nakanishi I. Ohuchi E. Fujii Y. Nakai N. Okada Y :Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) from human rectal carcinoma cells. Activation of the precursor, interaction with other matrix metalloproteinases and enzymic properties. *J Biol Chem.* 1995. 270: 6691-6697.
- ²³ Murphy G. Stanton H. Cowell S. Butler G. Knäuper V. Atkinson S. Gavrilovic J. Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *APMIS.* 1999. 107: 38-44.
- ²⁴ Fridman R. Toth M. Peña D. Mobashery S. Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2). *Cancer Res.* 1995. 55: 2548-2555.
- ²⁵ Motoharu S. Membrane-type matrix metalloproteinases. *APMIS.* 1999. 107: 137-143
- ²⁶ Corcoran M L. Hewitt R E. Kleiner D E. Stetler-Stevenson W G. MMP-2: expression, activation and inhibition. *Enzyme protein.* 1996. 49: 7-19
- ²⁷ Woessner J F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 1991.2.:145
- ²⁸ Gómez D. E. Alonso D. F. Yoshiji H., Thorgeirsson U. P.. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol.* 1997. 74: 111-122.
- ²⁹ McDonnelli S. Morgan M. Linch C. Role of matrix metalloproteinases in normal and disease processes. *Biochem Soc Trans.* 1999. 24 part 4:734-740.
- ³⁰ Xu P. Alfaidy N. and Challis G. Expression de matrix metalloproreinas (MMP-2 and MMP-9) in human placenta and Fetal membranes in relation to preterm and term labor. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002. 87: 1353-1361.
- ³¹ McLaren J. Taylor D J. Bell S C. Increased concentration of pro-matrix metalloproteinase 9 in term fetal membranes overlying the cervix before labor:

Implications for membrane remodeling and rupture. *Am J Obstet Gynecol.* 2000. 182: 409-416.

³² Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976. 72: 248-254.

³³ Sunada H. Nagai Y. A rapid micro-assay method for gelatinolytic activity using tritium-label heat-denatured polymeric collagen as a substrate and its application to the detection of enzymes involved in collagen metabolism. *J Biochem.* 1980. 87(6): 1765-1771.

³⁴ Kleiner, D. E; Stetler-Stevenson, W. G. 1984. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem.* 218:325-329.

³⁵ Watanabe H. Nakanishi I. Yamashita K. Hayakawa and Okada Y. Matrix metalloproteinase-9 (92 kDa gelatinase/type IV collagenase) from U937 monoblastoid cell: correlation with cellular invasion. *J Cell Sci.* 1993. 104(4): 991-999.

³⁶ Lei H. Vadillo-Ortega F. Paavola L G. Strauss J F III. 92 kDa gelatinase (matrix metalloproteinase-9) is induced in rat amnion immediately prior to parturition. *Biol Reprod.* 1995. 53: 339-344.

³⁷ Lei H. Kalluri R. Furth E E. Baker A. Strauss J F III. Rat amnion type IV collagen composition and metabolism: implications for membrane breakdown. *Biol Reprod.* 1999. 60: 176-182.

³⁸ Vadillo-Ortega F. González-Ávila G. Furth E E. Lei H. Muschel R. Stetler-Stevenson W G. Strauss J F III. 92-kD type collagenase (matrix metalloproteinase-9) activity in human amniochorion increases with labor. *Am J Pathol* 1995. 146: 148-156.

³⁹ Fortunato S J. Menon R. Lombardi S J. Collagenolytic enzymes (gelatinases) and their inhibitors in human amniochorionic membrane. *J Obstet Gynecol.* 1997. 177: 731-741.

⁴⁰ Espejel-Núñez A. Comunicación personal.

⁴¹ Rowe T F. King L A. MacDonald P C. Casey M L. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in human amnion mesenchymal and epithelial cells. *Am J Obstet Gynecol.* 1997. 176: 915-921.

⁴² Friedman R. Coth M. Pena D. Mobashery S. Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2). *Cancer Res.* 1995. 55 (12): 2548-2555.