



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE
MOLÉCULAS PROAPOPTÓTICAS, EL ÍNDICE
APOPTÓTICO Y LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD *IN*
SITU DE LA MMP-9 EN POBLACIONES
CELULARES DEL CORIOAMNIO HUMANO
ESTIMULADO DIFERENCIALMENTE CON
Streptococcus agalactiae

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

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

P R E S E N T A

Q.F.B. GUADALUPE GARCÍA LÓPEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. EN C. CLAUDIA VERÓNICA ZAGA
CLAVELLINA

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El trabajo de investigación de esta tesis se realizó en el laboratorio de la Dirección de investigación del Instituto Nacional de Perinatología como parte de mis estudios de posgrado en la Maestría en ciencias Biológicas de la Facultad de medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Dios no nos hubiera dado la capacidad de soñar sin darnos también la posibilidad de convertir nuestros sueños en realidad."

Hector Tassinari.

Todo mi agradecimiento al Dr. Felipe Vadillo Ortega por haberme permitido trabajar en su laboratorio.

Gracias por su apoyo.

Agradezco enormemente a la Dra. Claudia Verónica Zaga Clavellina por el deseo de enseñarme y enseñarme de corazón y por haberme permitido trabajar a su lado, gracias por guiar mi trabajo y por otorgarme el privilegio de crecer personal y académicamente a su lado.

Infinitamente gracias.

"La ciencia se compone de errores, que a su vez, son los pasos hacia la verdad."

Julio Verne.

Con agradecimiento especial:

A la M. en C. Cándida María Cristina Lemini Guzmán quién siempre estuvo dispuesta a disipar mi dudas, agradezco su amabilidad y disposición.

Al Dr. Luís Arturo Baiza Gutman quién con sus comentarios enriqueció enormemente mi trabajo.

Al Dr. Yonathan Garfias Becerra quién para poder desarrollar mi trabajo me abrió las puertas de su laboratorio de investigación del Instituto de oftalmología Conde de Valenciana.

A la Dra. Rosa María Bigueras quién me permitió utilizar equipo de su laboratorio de morfología del Instituto Nacional de Pediatría.

A Magdalena Beltrán Zúñiga y Diana Soriano por su colaboración con la metodología microbiológica.

Mi reconocimiento y agradecimiento a el Señor Pedro Balderas Flores por su invaluable colaboración en el procesamiento histológico de los tejidos.

Agradezco a los médicos Rolando Maida Claros y Mauricio Osorio por su colaboración en la toma de muestras dentro del área tocoquirúrgica del INPer.

Agradezco al Q.F.B. Hector, a la Biol. Maricela, al Méd. David, a la Méd. Martha, a la Q.B.P. Margarita, a la Dra. Herlinda, a la Dra. Maria del carmen, y al Dr. Zenteno del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana por su amable disposición.

Agradezco a mis compañeros Arturo, Aurora, Toñita, Roberto, Hector, Pili, Martha, Rafa y a la Sra. Flor por hacer grata mi estancia en el Laboratorio de Investigación del INPer.

Agradezco al Biol. Alfonso Martínez por brindarme su amistad sincera.

Dedico este trabajo

A mi abuelita Carlota Montiel Fernández.

A mis padres Catalina López y José Leonides García por brindarme su amor, apoyo y confianza.

A mis Hermanos Julia Silvia, Elia, Juan, Esmeralda y Lourdes por brindarme su amor incondicional.

A mis sobrinos Alondra, Mariana, Jaan Martín, Jaan Cruz, Katherine, Joana, Felipe, y Ángel que alegran mi vida.

A Martín Reyes Flores, Araceli Castillo, Ignacio Carrera y Julio Velázquez por dar cariño y protección a mis seres más queridos.

	ÍNDICE	Página
1. RESUMEN		1
2. ABSTRACT		3
3. INTRODUCCIÓN		
3.1. MEMBRANAS CORIOAMNIÓTICAS HUMANAS		5
3.2. RUPTURA PREMATURA DE MEMBRANAS		8
3.3. METALOPROTEINASAS DE MATRIZ		9
3.4. MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS		11
4. ANTECEDENTES		
4.1. RUPTURA PREMATURA DE MEMBRANAS		14
5. OBJETIVO GENERAL		23
5.1. OBJETIVOS PARTICULARES		24
6. HIPÓTESIS DE TRABAJO		25
7. MATERIAL Y MÉTODOS		26
7.1. MATERIAL BIOLÓGICO		26
7.2. PROCESOS EXPERIMENTALES		26
7.2.1. COLECTA DE MUESTRAS Y CONTROL MICROBIOLÓGICO		26
7.2.2. CULTIVO DE MCH EN “TRANSWELL®”		27
7.3. PRUEBAS DE VALIDACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL		29
7.3.1. VIABILIDAD DE LOS EXPLANTES		29
7.3.2. SECRECIÓN DE MMP-9		30
7.3.3. INMUNOHISTOQUÍMICA DE MMP-9, p53, Bax Y Bcl-2		31
7.3.4. FRAGMENTACIÓN DE DNA GENÓMICO		32
8. ESTIMULACIÓN DE LAS MCH CON <i>Streptococcus agalactiae</i> EN CULTIVO		33
8.1. ANÁLISIS POSTRATAMIENTO		35

8.1.1.	INMUNOHISTOQUÍMICA DE MMP-9	35
8.1.2.	DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE MMP-9 ACTIVA	35
8.1.3.	DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE APOPTÓTICO	36
8.1.3.1.	ANÁLISIS POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	36
8.1.3.2.	ANÁLISIS POR MICROSCOPIA DE LUZ	37
8.1.4.	FRAGMENTACIÓN DE DNA GENÓMICO	38
8.1.5.	INMUNOLOCALIZACIÓN DE p53, Bax Y Bcl-2	39
8.1.6.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE mRNA p53 Y bcl-2	39
8.1.6.1.	CULTIVO DE MEMBRANAS CORIOAMNIÓTICAS	39
8.1.6.2.	EXTRACCIÓN DE mRNA	40
8.1.6.3.	SÍNTESIS DE cDNA	42
8.1.6.4.	PCR PARA GADPH, p53 Y Bcl-2	42
8.2.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
9.	RESULTADOS	47
9.1.	VALIDACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL	47
9.1.1.	VIABILIDAD	47
9.1.2.	PATRÓN DE SECRESIÓN DE MMP-9	48
9.1.3.	INMUNOHISTOQUÍMICA DE MMP-9	49
9.1.4.	INMUNOHISTOQUÍMICA DE p53	50
9.1.5.	INMUNOHISTOQUÍMICA DE Bax	51
9.1.6.	INMUNOHISTOQUÍMICA DE Bcl-2	52
9.1.7.	FRAGMENTACIÓN DE DNA GENÓMICO	53
9.2.	ESTIMULACIÓN CON <i>Streptococcus agalactiae</i>	54
9.2.1.	SECRESIÓN Y ACTIVIDAD GELATINOLITICA DE LA FORMA PRO-ENZIMATICA Y ACTIVA DE MMP-9 DESPUÉS DE LA ESTIMULACIÓN CON <i>Streptococcus agalactiae</i>	54
9.2.2.	DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LAS FORMAS PRO-ENZIMÁTICA Y ACTIVA DE MMP-9	56
9.2.3.	INMUNOHISTOQUÍMICA DE MMP-9	57
9.2.4.	DETERMINACIÓN DE LA MUERTE POR APOPTOSIS (TUNEL)	58
9.2.5.	PATRÓN DE FRAGMENTACIÓN	59
9.2.6.	INMUNOHISTOQUÍMICA DE p53	60
9.2.7.	INMUNOHISTOQUÍMICA DE Bax	61
9.2.8.	INMUNOHISTOQUÍMICA DE Bcl-2	62
9.2.9.	VIABILIDAD POSTRATAMIENTO CON <i>Streptococcus agalactiae</i>	63

9.2.10. PCR GADPH, p53 Y bcl-2	64
10. DISCUSIÓN	66
11. CONCLUSIONES	73
12. BIBLIOGRAFÍA	75
13. ABREVIATURAS	91
14. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS DEL TRABAJO EXPERIMENTAL	92

1. RESUMEN

La ruptura prematura de las membranas (RPM) es una patología obstétrica que está asociada con el 40% de los casos de parto prematuro. La fisiopatogenia que condiciona el desarrollo de la RPM es multifactorial, sin embargo, del 30-40% de los casos están asociados con el desarrollo y complicación de un proceso infeccioso en la cavidad intrauterina.

La degradación masiva de la matriz extracelular (MEC) y la disminución en el número de células viables por apoptosis son dos de los mecanismos fisiopatogénicos que han sido asociados al desarrollo de la RPM; sin embargo, no es claro cómo y en que magnitud contribuyen cada una de las poblaciones celulares que constituyen el corioamnios humano en la respuesta ante un proceso infeccioso.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del *Streptococcus agalactiae* sobre los procesos de degradación de la MEC vía la síntesis y secreción de la metaloproteinasa de matriz 9 (MMP-9), así como algunos mecanismos apoptóticos dirigidos por p53, Bax y Bcl-2 en las poblaciones celulares que conforman a las membranas corioamnióticas humanas (MCH). En este protocolo se utilizó un modelo experimental que permite reproducir *in vitro* diferentes escenarios clínicos entre el patógeno y MCH.

Se utilizaron MCH de 37-40 semanas de gestación, sin trabajo de parto ni antecedentes clínicos o microbiológicos de infección intrauterina; las MCH se montaron en un "Transwell®" que forma una sistema de cultivo de dos cámaras independientes; delimitada una por el amnios y otra por la coriodecidua. Las MCH se estimularon selectivamente en una o ambas regiones (amnios/coriodecidua) con 1×10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) de *S.*

agalactiae por 24 h. La secreción y actividad gelatinolítica de la forma proenzimática y activa de la MMP-9 se evaluó por inmunohistoquímica, zimografía y ELISA. Los marcadores apoptóticos se evaluaron por inmunohistoquímica y RT PCR.

La estimulación con *S. agalactiae* permitió caracterizar el papel activo que juegan ambas regiones en la síntesis y secreción de MMP-9, enzima que si bien fue secretada tanto por el amnios como por la coriodecidua, fue esta última la que desplegó el mayor incremento, ya que respondió tanto al estímulo directo como a las señales enviadas por el amnios cuando éste fue estimulado.

Los resultados indicaron que la estimulación de las MCH con *S. agalactiae* incrementa en forma importante la síntesis tanto de las moléculas pro-apotóticas (p53, Bax) como de la anti-apotótica (Bcl2), lo que coincide con que el índice apoptótico no cambie significativamente en ninguna de las poblaciones celulares del corioamnios después de la estimulación con la bacteria.

Nuestros resultados en conjunto permiten suponer que el mecanismo de daño de *S. agalactiae* sobre las MCH parece estar dirigido hacia el incremento en la degradación de diferentes elementos de la MEC vía la síntesis y actividad de la MMP-9 y no a través del aumento en la muerte apoptótica ni en la disminución de la celularidad de las distintas poblaciones celulares del corioamnios humano.

2. ABSTRACT

The premature rupture of membranes (PROM) is an obstetric pathology that is associated with 40% of the cases of premature delivery. The physiopathologic mechanism that determine the development of the PROM is multifactorial, however, from 30-40% of the cases are associate with the development and complication of an infectious process in the intrauterine cavity.

The massive degradation of the extracellular matrix (ECM) and the decrease in the number of viable cells by apoptosis death are two of the physiopathologic mechanisms that it has been associated with development of PROM, however, it is not clear how and in which magnitude contribute each one of the cells population that constitute the human chorioamnion in the response to an infectious process.

The aim of this work was evaluate the effect of *Streptococcus agalactiae* upon the process of degradation of the ECM through the synthesis and secretion of MMP-9; as well as apoptotic mechanism mediated by p53, Bax and Bcl-2 in the cellular populations constituent of the human chorioamniotic membranes (HCM). We used an experimental model that allowed to reproduce *in vitro* different clinic scene between the *S. agalactiae* and the HCM.

We use HCM of 37-40 gestation weeks, without labour signals neither microbiologic nor clinic antecedent of intrauterine infection; the membranes were mounted in Transwell® devices, that permit us form a system of culture with two independents chambers in which the choriondecidua faces to upper chamber and the amnion faces the lower chamber.

The membranes were stimulated selectively in one or both regions with 1×10^6 colonies forming unit (CFU) of *S. agalactiae* by 24 h. The secretion and gelatinolytic activity of the pro-enzymatic and active form of MMP-9 were evaluated by immunohistochemistry, zymography and enzyme-linked immunosorbent assay. The apoptotic markers were evaluated by immunohistochemistry and RT PCR.

The stimulation with *S. agalactiae* allowed to characterize the active role of both regions in the synthesis and secretion of MMP-9; enzyme that was secreted for amnion and choriodecidua regions; however, was the choriodecidua the principal source of this enzyme.

The results indicated that the stimulation of the HCM with *the S. agalactiae* increase the synthesis of the pro-apoptotic molecules (p53, Bax), as the anti-apoptotic (Bcl-2), which might explain the no alteration in the apoptotic index in these cellular populations after infection.

Our results permit us suppose that the mechanisms by which the *S. agalactiae* alter the integrity of the HCM is throughout of the increase of ECM degradation via the significant increases of synthesis and activity of MMP-9.

The no change in the cellularity index put the apoptosis as a secondary mechanism in the damage by an infection process with *S. agalactiae*.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 MEMBRANAS CORIOAMNIÓTICAS HUMANAS

Durante el embarazo, el inicio del trabajo de parto normal es el resultado de la sincronización de eventos fisiológicos que incluyen contractilidad miométrial, maduración y dilatación cervical y en las etapas más avanzadas del trabajo de parto, la ruptura de las membranas corioamnióticas, que a precede la expulsión del producto al medio extra uterino (Challis y Cols., 2000, Romero y Cols. 1994, 2004).

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

Las MCH que delimitan la cavidad amniótica, están constituidas por dos capas histológicas adosadas: el amnios y el corion (Figura 1), cada una de las cuales está formada por diferentes tipos celulares embebidos en una prominente MEC cuyo principal componente es la colágena. La fuerza tensil de las MCH depende de la colágena y así como de su estructura y variedad, al menos 5 de los 12 tipos de colágena están en el corioamnios que se distribuyen de acuerdo a la función estructural que cumplen en las distintas capas del mismo (Malak y Cols., 1993).

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

El amnios humano carece de vasos sanguíneos y de inervación, los nutrientes que requiere provienen del líquido amniótico; la capa más interna y cercana al producto es el epitelio amniótico (Figura 1) constituido por células cuboides ciliadas, las cuales secretan colágena tipo III y IV y glicoproteínas como laminina, nidógeno y fibronectina, las cuales constituyen y enriquecen a la membrana basal; adyacente a ésta, se encuentra la capa compacta, formada por tejido conectivo que forma un tipo de esqueleto fibroso constituido principalmente por colágena tipo I, III, V y VI y fibronectina; todos estos componentes, en conjunto, tienen como función mantener la integridad mecánica y funcional del amnios. La siguiente capa está formada por fibroblastos, células mesenquimatosas (las cuales secretan las colágenas intersticiales I y III de la capa compacta) y macrófagos, estos últimos rodeados de una MEC constituida básicamente por colágenas I, III y VI que forman una red con gránulos de glicoproteínas (Malak y Cols., 1993, Menon y Cols., 2004) (Figura 1).

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

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

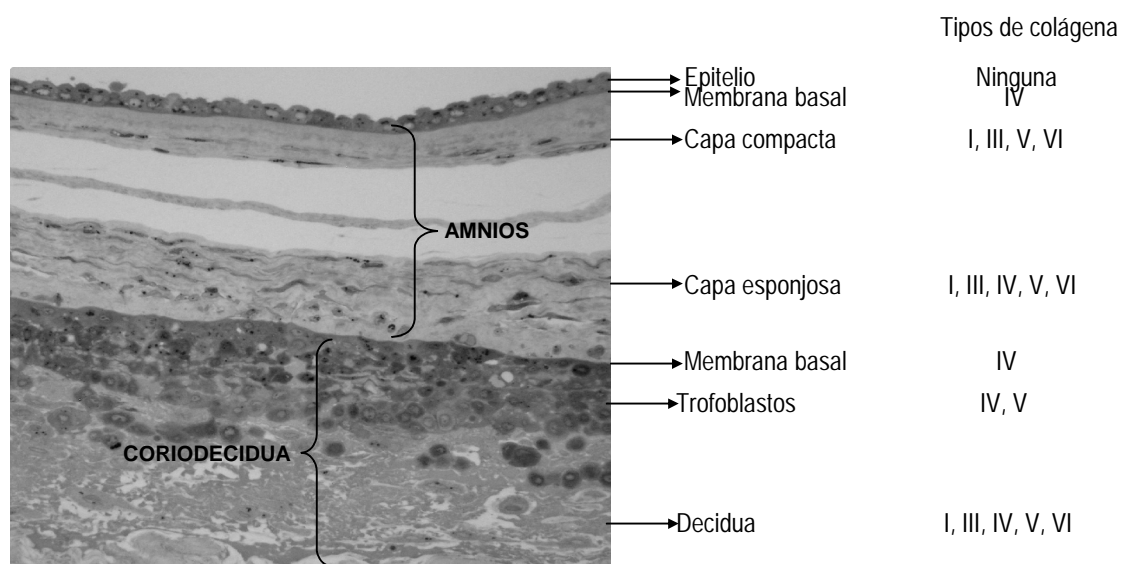


Figura 1. Corte semifino ($1\mu\text{m}$) de una de una membrana corioamniótica humana de 40 semanas de gestación obtenida mediante cesárea programada incluida en EPON y teñida con azul de toluidina al 0.5%. Corte transversal (20X) en la que se distinguen las dos regiones adosadas que la constituyen: amnios y coriodecidua (Menon y Cols., 2004).

3.2 RUPTURA PREMATURA DE MEMBRANAS

Las membranas fetales se mantienen integra y funcionales en las etapas tempranas del trabajo de parto normal, pero hasta en el 17% del total de los embarazos, las membranas se rompen espontáneamente en ausencia de trabajo de parto, condición patológica que se denomina Ruptura Prematura de Membranas (RPM) (Parry y Strauss, 1998).

La RPM es una de las complicaciones más comunes del embarazo y explica el 40% de todos los partos pretérmino (Asrat, 2001). Diferentes evidencias clínicas y experimentales permiten suponer que parte del mecanismo fisiopatogenico que condiciona la RPM descansa en el aumento de la tasa de degradación de los distintos elementos que constituyen a la MEC, explicado en parte por el incremento en la síntesis y actividad de distintas MMPs como la MMP-9, la MMP-2, la MMP-1 y la MMP-3 (Vadillo-Ortega y cols., 1998a; Fortunato y Cols., 1997; 1999). Este desequilibrio esta asociado a las alteraciones estructurales/tisulares descritas en las membranas que se rompen prematuramente (Malak y Cols., 1994; Malak y Bell, 1994).

3.3 METALOPROTEINASAS DE MATRIZ

Las MMPs, también llamadas matrixinas, son proteinasas que participan en la degradación específica de distintos elementos de la MEC; bajo condiciones

fisiológicas normales, la actividad de las MMPs es regulada a distintos niveles, que incluyen la síntesis, secreción del zimógeno, así como su interacción con sus inhibidores titulares específicos (TIMPs). Una pérdida en el control de su actividad puede resultar en enfermedades tales como artritis, cáncer, arteroesclerosis, aneurisma, nefritis, úlceras tisulares y fibrosis (Visse y Nagase, 2003).

Las MMPs son enzimas que muestran dominios funcionales (Figura 2) y mecanismos de activación comunes; son endopeptidasas dependientes de Zn^{+} y Ca^{+} que son activas a pH neutro. Son secretadas como proenzimas y procesadas a una forma activa por la eliminación del propéptido amino terminal. El propéptido confiere latencia a la enzima mediante la interacción de un residuo de cisteína con un ión zinc en el sitio activo de la enzima, la disrupción de esta interacción dispara el mecanismo denominado “switch de cisteína” y la enzima es activada. La familia de las MMPs degradan una gran variedad de elementos de la MEC, hasta la fecha han sido caracterizados 28 miembros, los cuales se han agrupado dependiendo de la especificidad del sustrato en: Colagenasas, Estromelinas, Gelatinasas, Matrilisinas y, MMPs tipo membrana (MT-MMPs) (Tabla 1) (Visse y Nagase, 2003).

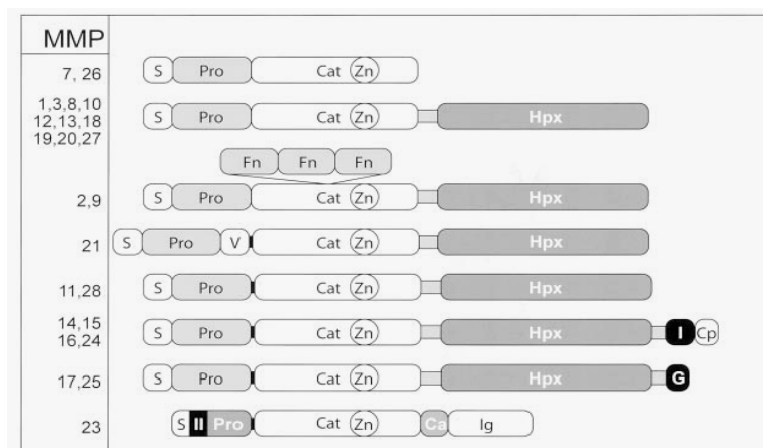


Figura 2. Estructura de las MMPs. Organización de las MMPs en dominios: S; péptido señal; Pro, propéptido; Cat, dominio catalítico; Zn sitio activo de zinc; Hpx, dominio de hemopecina; Fn, dominio de fibronectina; V, inserto de vitronectina; I, dominio transmembrana tipo I; II, dominio transmembrana tipo II; G, anclaje de GPI; Cp, dominio citoplasmático; Ca, región del arreglo de cisteína; e Ig, dominio de inmunoglobulina. Un sitio de corte de furina es mostrado como una banda negra entre el dominio propéptido y catalítico (Visse y Nagase 2003).

Enzima	MMP	Sustrato	Cromosoma Humano
Colagenasas			
Colagenasa Interstitial; collagenasa 1	MMP-1	Colágena fibrilar I, II, III, VII, X; gelatina proteoglicanos, pro-MMP-2,-9.	11q22-q23
Colagenasa de neutrofilos	MMP-8	Colágena I, II, III; gelatina y proteoglicanos.	11q21-q22
Collagenase 2 Colagenasa 3	MMP-13	Colágena I, II, III, IX; gelatina, proteoglicanos, fibronectina y tenasina	11q22.3
Colagenasa 4 (<i>Xenopus</i>)	MMP-18	Colágena I, II, III, IX; gelatina, proteoglicanos, fibronectina y tenasina	NA
Gelatinasas			
Gelatinasa A	MMP-2	Colágena IV, V, VII, XI; gelatina, elastina, fibronectina, laminina; pro-MMP-9, -13.	16q13
Gelatinasa B	MMP-9	Colágena I, IV, VII; gelatina, elastina, fibronectina.	20q11.2-q13.1
Estromelisinás			
Estromelisin 1	MMP-3	Colágena II, III, IV, IX, X, XI; gelatina, proteoglicanos, elastina, fibronectina.	11q23
Estromelisin 2	MMP-10	Colágena III, IV, gelatina, elastina, fibronectina.	11q22.3-q23
Estromelisin 3	MMP-11	Laminina, fibronectina.	22q11.2
Matrilisinás			
Matrilisin 1	MMP-7	Fibronectina, laminina, gelatina y elastina.	11q21-q22
Matrilisin 2	MMP-26		11p15
MMPs transmembrana tipo membrana			
MT1-MMP	MMP-14	Colágena I, II, III; gelatina, proteoglicanos, elastina, fibronectina, vitronectina, tenascina, pro-MMP-9 -13.	14q11-q12
MT2-MMP	MMP-15	Gelatina, fibronectina, tenascina, pro-MMP-2.	15q13-q21
MT3-MMP	MMP-16	Colágena III, fibronectina, pro-MMP-2.	8q21
MT5-MMP	MMP-24	Pro-MMP-2.	20q11.2
Ancladas a GPI			
MT4-MMP	MMP-17		12q24.3
MT6-MMP	MMP-25		16p13.3
Otras			
Elastasa de macrofago	MMP-12	Elastina.	11q22.2-q22.3
Nombre no trivial	MMP-19		12q14
Enamelisina	MMP-20	Amelogenina.	11q22.3
XMMP (<i>Xenopus</i>)	MMP-21		ND
CA-MMP	MMP-23		1p36.3
CMMP (<i>Gallus</i>)	MMP-27		11q24
Epilisina	MMP-28		17q21.1

Tabla 1. Clasificación y características de las MMPs (Tomado de Visse y Nagase 2003).

3.4 MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS

La muerte celular programada o apoptosis es parte fundamental e intrínseca del desarrollo de todos los organismos multicelulares, juega un papel esencial en la morfogénesis y en los procesos de auto organización funcional que favorece la maduración de los diferentes órganos y sistemas. En los últimos años se ha demostrado que la muerte celular programada juega un papel importante en procesos como la homeostasis, regulación del número celular mediante la eliminación de células anormales o dañadas y en defensa contra agentes infecciosos, sin embargo, las desregulación de este proceso participa en la patogénesis de diversas enfermedades (Locksmith y Cols., 1999).

La apoptosis se ha clasificado como tipo I (clásica) y tipo II (no clásica); la primera se caracteriza por rasgos morfológicos que incluyen la condensación rápida del citoplasma y de la cromatina nuclear, lo que resulta en la fragmentación del DNA así como en el plegamiento de la superficie celular. Esta secuencia es seguida por la fragmentación de las células apoptóticas, fagocitosis y degradación lisosomal secundaria de los diferentes fragmentos por células fagocíticas o vecinas.

La apoptosis no clásica se reconoce por la condensación y fragmentación tardía de la cromatina en el núcleo, la primera señal morfológica de este tipo de muerte celular es la expansión del sistema lisosomal, mientras que el núcleo parece intacto e imperturbado. Las vacuolas autofágicas remueven selectivamente

organelos celulares específicos y eventualmente consumen el contenido citoplasmático; posteriormente el núcleo se condensa, se fragmenta y hay liberación de unidades nucleosomales, sin embargo, esto no ocurre hasta que el contenido citoplasmático se encuentra reducido (Spencer y Cols., 1996).

El proceso de apoptosis se inicia por señales internas y externas, cuya transducción o transmisión ocurren en puntos de control intracelular o de membrana, en los que las moléculas de regulación involucradas en la transmisión de los diferentes mensajes de muerte ejecutan el programa. A este respecto se han caracterizado diversas vías de señalización y control, por ejemplo: Fas, un receptor de superficie celular del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) media diversos procesos apoptóticos en células blanco después de unirse con su ligando (FasL). Aunque la función de Fas/FasL fue originalmente descrita en el contexto de la apoptosis mediada por linfocitos, datos recientes indican que el sistema de señalización de Fas/FasL puede promover dicho proceso en diferentes tejidos y tipos celulares, incluyendo a las membranas corioamnióticas humanas de diferentes periodos de gestación (Tilly y Cols., 1991, Kawakami y Cols., 1996; Runic y Cols., 1998).

El efecto de TNF- α está mediado por la unión a receptores sobre células blanco. Los receptores p55 (TNF-R1) y p75 (TNF-R2) han sido caracterizados, ambos receptores están relacionados y se expresan sobre la superficie de la mayoría de los tipos celulares. La activación de TNF-R1 media la mayoría de los efectos inducidos por TNF- α , incluyendo citotoxicidad, mientras que TNF-R2 ha

sido asociado con la estimulación de la proliferación y supervivencia celular (Yuan, 1997). En MCH ambos receptores ya han sido caracterizados (Arechavaleta-Velasco y Cols., 2002(b); Fortunato y Cols., 2001).

La muerte celular programada requiere de la activación de diversas proteasas citoplasmáticas, regulada por los productos proteicos del gen supresor de tumores p53 y de la familia de genes de bcl-2 y bax, estas últimas son dos proteínas homólogas que coordinan las vías apoptóticas y que a su vez regulan funciones mitocondriales, el homodímero bcl-2 inhibe la muerte y promueve la proliferación celular, mientras que el homodímero bax promueve la apoptosis; el balance entre estas dos proteínas determina el destino de las células. En las membranas fetales humanas, ambas proteínas están involucradas en la regulación de la apoptosis (Oltvai y Cols., 1993; Reed, 1994; Fortunato y Cols., 2001).

4. ANTECEDENTES

4.1 RUPTURA PREMATURA DE MEMBRANAS

La infección intrauterina es reconocida como el principal factor etiológico en cerca del 30% de mujeres con parto pretérmino y en una tercera parte de los pacientes con RPM (Asrat, 2001). Sin embargo y a pesar de la alta prevalencia de ambas patologías y de las evidencias clínicas y epidemiológicas que apoyan la hipótesis de una asociación causal entre un cuadro infeccioso de esta naturaleza y el desarrollo de estos padecimientos, el mecanismo fisiopatológico que las condiciona no ha sido enteramente descrito (Romero y Cols. 1988, Greig, 1998).

Entre los microorganismos más comúnmente considerados como agentes causales encontramos: *S. agalactiae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomona vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium* sp., *Lactobacillus* sp., *Gardnerella vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, y *Mycoplasma hominis* (Gómez y Cols., 1997; Greig, 1998, Eschenbach, 1998; Yoon y Cols., 1998, Athayde y Cols., 2000).

Las teorías actuales que vinculan la infección intrauterina con la RPM, proponen que las manifestaciones clínicas sean: efecto directo de los productos bacterianos, consecuencia de la respuesta inmune o una mezcla de ambos,

siendo esta última la teoría más completa y probable. (Schoonmaker y Cols., 1989).

Se ha propuesto un modelo general que pretende explicar cómo una infección cérvico-vaginal puede predisponer a una mujer a desarrollar RPM y/o parto pretérmino. En primera instancia, el desarrollo de vaginosis bacteriana (disminución de lactobacilos y establecimiento de anaerobios facultativos), junto con una excesiva proliferación de la flora normal permitiría, eventualmente, que los microorganismos patógenos se abran paso en una vía ascendente a través del cervix, hasta establecerse y proliferar en la región coriodesidual produciendo coriodesiduitis; esta etapa precede al paso de estos patógenos a través de las membranas con la posterior e inmediata infección del líquido amniótico (corioamnionitis) (Figura3) (Romero y Cols., 1988; Heddleston y Cols., 1993).

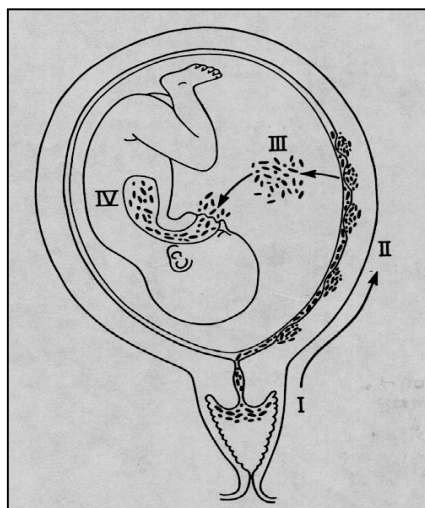


Figura 3. Ruta ascendente de la infección intrauterina. (I) Infección vaginal, (II) infección de las membranas fetales, (III) invasión microbiana de la cavidad amniótica (Romero y cols., 1988).

Por esta razón, se ha propuesto que la vaginosis bacteriana más que la causa directa de la infección, refleja una condición del microambiente cérvico-vaginal que permite la colonización e infección por otros gérmenes. Un cuadro infeccioso de esta naturaleza puede predisponer a las mujeres a través de varios mecanismos, cada uno de los cuales en forma individual o concertada puede inducir de forma directa o indirecta la degradación de la MEC de las membranas corioamnióticas (Creatsas y Cols., 1981; Sbarra y Cols., 1985; Newton y Clark, 1988; Alger y Cols., 1988; McDonald y Cols., 1994; McGregor y Cols., 1995, 2000).

La respuesta inflamatoria desplegada por diferentes tipos celulares y por los distintos tejidos involucrados en el contacto con el o los patógenos responsables de la infección, es referencia básica para diagnosticar y caracterizar la presencia de una infección a nivel intrauterino, a este respecto existen actualmente una serie de evidencias que indican que citocinas constituyen parte fundamental del microambiente inmunológico que caracteriza una infección de ésta naturaleza (Casey y Cols., 1988; Mitchel y Cols., 1991; Gómez y Cols., 1997, Hersh y Cols., 1998; Svanborg y Cols., 1999).

Entre las principales evidencias encontramos que la infección intra-amniótica y el parto pretérmino se encuentran asociados con un incremento tanto de citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF- α) como de prostaglandinas (Athayde y Cols., 2000; Romero y Cols., 1990; 1992; Menon y Cols, 1995; Reisenberger y Cols., 1997; Yoon y Cols., 1998; Hsu y Cols., 1998).

En primates no humanos después de una inoculación de microorganismos patógenos en el líquido amniótico, se incrementa la concentración de TNF- α , seguido de IL- β e IL-6, esta producción de citocinas proinflamatorias está en estrecha relación con el incremento en la síntesis de prostaglandinas PGE2 y PGF2 α . (Gravett y Cols., 1994, McGregor y Cols., 1992).

En membranas corioamnióticas en cultivo tratadas con bacterias o productos bacterianos como los lipopolisacáridos (LPS) induce un aumento significativo de citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-8 (Schoonmaker y Cols., 1989; Reisenberger y Cols., 1997; 1998; Tashima y Cols., 1999).

La decidua, ante el estímulo infeccioso produce principalmente IL-1 α e IL-1 β . (Romero y Cols., 1989; 1990; Casey y Cols., 1996; Steiborn y Cols., 1998). En una línea de células cervicales humanas además de IL-1 β , el TNF- α también se encuentra significativamente incrementado cuando existe estímulo con LPS (Watari y Cols., 2000).

La producción de citocinas y la síntesis de prostaglandinas son solo parte de la amplia respuesta que se despliega ante el estímulo infeccioso, la alteración estructural que caracteriza a las membranas que se rompen prematuramente, se ha explicado por el incremento en la síntesis y actividad de diferentes MMPs, siendo las citocinas, mediadoras importantes de este incremento (Katsura y Cols., 1989; So y Cols., 1992).

En forma general, el incremento en la actividad de distintas metaloproteínas que pueden actuar directamente sobre la MEC y membrana basal de las membranas corioamnióticas, junto con el efecto uterotónico inducido por las prostaglandinas producidas, se traduce en el debilitamiento de la fuerza ténsil de las mismas. A este respecto entre las principales evidencias que permiten establecer una relación entre la síntesis de diversas enzimas cuyos sustratos son los diferentes elementos de la MEC y un proceso infeccioso a nivel intrauterino destacan las siguientes:

Membranas corioamnióticas en cultivo expuestas a endotoxinas de diferente naturaleza incrementan la síntesis y actividad de metaloproteínas con actividad gelatinolítica como MMP-2, MMP-9 (Fortunato y Cols., 2000a), estromelisin 1 y 3 (Fortunato y Cols., 1999; So y Cols., 1992) y catepsina S (enzima que degrada elastina) en células cervicales humanas (Watari y Cols., 2000). Estas enzimas también son detectables en líquido amniótico de pacientes con infección cérvico-vaginal y RPM (Fortunato y Cols., 1999; Locksmith y Cols., 1999).

Además proteasas de origen bacteriano producidas por distintos microorganismos causantes de infecciones cérvico-vaginales son capaces de degradar la MEC, provocando reducción en la fuerza y elasticidad de las membranas (McGregor y Cols., 1986; Schoonmaker y Cols., 1989; Katsura y Cols., 1989; Draper y Cols., 1995).

Se ha propuesto que las alteraciones estructurales en el corioamnios están asociadas con el debilitamiento progresivo del tejido y la reducción en la celularidad lo que favorece su ruptura tanto en condiciones normales como patológicas (Bou-Resli y Cols., 1981, Malak y Bell, 1994, Runic y Cols., 1998; Vadillo y Cols., 1998b).

Existen evidencias que muestran a la apoptosis como la responsable de la reducción regional en la celularidad (cantidad de células por un área determinada) en las capas citotrofoblásticas y decidual (McLaren y Cols., 1999), en la región de ruptura que se encuentra sobre el cervix antes del inicio del trabajo de parto

Amnios y corion obtenidos de MCH a término con RPM presentan una gran cantidad de células apoptóticas en áreas adyacentes al sitio de ruptura y menor número en las áreas periféricas del mismo (Leppert y Cols., 1996).

El grado de apoptosis es significativamente más alto en membranas fetales con RPM que en membranas de cesárea programada (Vadillo y Cols., 1998b; Maymon y Cols., 2000; Sagol y Cols., 2002).

El aumento en la apoptosis en células del amnios durante el parto de rata se ha correlacionado con la expresión de MMP-1 (Lei y Cols., 1996) y MCH obtenidas durante diferentes etapas de la gestación, con trabajo de parto y/o RPM

además de expresar las enzimas MMP-9 y MMP-2 presentan células apoptóticas y expresan Fas, FasL y (Runic y Cols., 1998; Vadillo y Cols., 1998b).

La apoptosis y la actividad de la MMP-9 y MMP-1 están asociadas en el proceso de ruptura normal (Lei y cols., 1996) y patológica (Arechavaleta y cols., 2002a y b). Existe asociación entre procesos apoptóticos en células epiteliales del amnios en membranas fetales de rata en trabajo de parto con procesos de degradación de MEC (Lei y Cols., 1996).

En las poblaciones celulares de las membranas con RPM se presentan eventos apoptóticos como fragmentación del DNA, incremento de los niveles de expresión de p53 y bax, dos proteínas proapoptóticas, lo que coincide con la disminución en los niveles de bcl-2. En este ambiente, p53 regula la inducción de la gelatinasa MMP-2 y disminución de su inhibidor tisular TIMP-2 (Fortunato y Cols., 2000b).

Durante la RPM, las membranas corioamnióticas presentan procesos apoptóticos con características propias de la apoptosis tipo II, que coinciden con el incremento simultáneo de la expresión de la MMP-9. Ambos eventos son el resultado de la interacción de TNF- α con su receptor TNF-R1 el cual abunda en membranas de parto normal y muy abundantes en las que presentan RPM. A diferencia de las membranas de cesárea que tiene una mayor expresión del receptor TNF-R2 (Arechavaleta y Cols., 2002b).

Existen diversos antecedentes experimentales que soportan la existencia de una relación entre el proceso inflamatorio/infeccioso a nivel cérvico-vaginal y/o intrauterino con el aumento de la tasa de muerte celular por apoptosis; de estas evidencias destacan las siguientes:

En casos de corioamnionitis, células epiteliales del amnios desarrollan procesos típicamente apoptóticos (Espinoza y Cols., 2003).

El TNF- α en membranas fetales activa la apoptosis a través de su interacción con TNF-R1 que induce el incremento en la síntesis de MMP-9 cuyo efecto directo sobre la MEC de las membranas es degradar y debilitar la membrana basal rica en colágena tipo IV (Arechavaleta y Cols., 2002b, Fortunato y Cols., 1994; Fortunato y Cols., 2002).

La estimulación de las MCH con concentraciones de TNF- α y LPS similares a las encontradas en líquido amniótico de mujeres con infección intramniótica (50 ng/mL de cada uno) se traduce en la inducción de varios genes proapoptóticos. TNF- α induce la expresión de 3 caspasas iniciadoras, la 2, 8 y 10; mientras que la

estimulación con LPS induce la expresión de las caspasas efectoras 3, 6, 7 y 9 (Fortunato y Cols., 2001).

5.0 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del *Streptococcus agalactiae* sobre la secreción y actividad de la MMP-9 y la distribución tisular de las proteínas p53, Bax y Bcl-2 en las distintas poblaciones celulares del corioamnios humano.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- 5.1.1 Estandarizar y validar el modelo experimental de membranas corioamnióticas humanas en cultivo para cada uno de los marcadores funcionales que incluyen: la síntesis, secreción y actividad de MMP-9, así como la inmuno-reactividad de las proteínas p53, Bax y Bcl-2.
- 5.1.2 Analizar el patrón de expresión de las proteínas p53, Bax y Bcl-2 en las diferentes regiones del corioamnios después de ser infectadas selectivamente con *Streptococcus agalactiae*.
- 5.1.3 Medir el índice apoptótico en cada una de las poblaciones celulares que conforman al corioamnios humano después de la estimulación con 1×10^6 unidades formadoras de colonias de *Streptococcus agalactiae*.
- 5.1.4 Medir los niveles y actividad gelatinolítica de la MMP-9 en las distintas poblaciones celulares del corioamnios humano después de la estimulación selectiva con *Streptococcus agalactiae*.

6.0 HIPÓTESIS DE TRABAJO

LA SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE MMP-9 Y LA DISTRIBUCIÓN TISULAR DE LOS MARCADORES APÓPTOTICOS p53, Bax Y Bcl-2 EN LAS DIFERENTES POBLACIONES CELULARES DEL CORIOAMNIOS HUMANO, SERÁN MODIFICADAS DESPUÉS DE LA ESTIMULACIÓN DIFERENCIAL CON *Streptococcus agalactiae*.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 MATERIAL BIOLÓGICO

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

Este proyecto de investigación fue aprobado por el Comité interno de investigación y Ética del INPerIER (código 212250-06101).

7.2 PROCESOS EXPERIMENTALES

7.2.1 *Colecta de Muestras y control microbiológico*

En la unidad tocoquirúrgica y momentos después del nacimiento, las membranas fueron separadas de la placenta, colocadas en medio DMEM estéril (Gibco, Bethesda, USA) y transportadas al laboratorio.

Al momento de la toma de muestra se hizo un frotis en las diferentes regiones de las membranas corioamnióticas para hacer un análisis bacteriológico cuyo espectro abarcó tanto anaeróbicos asociados a infecciones cérvico-vaginales, incluidos *S. agalactiae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus* sp, *Klebsella* sp.

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

7.2.2. Cultivo de MCH en “Transwell®”

En condiciones de esterilidad, las membranas se lavaron con solución salina estéril para remover los coágulos adheridos, posteriormente se cortaron manualmente en discos de 18 mm de diámetro que se colocaron sobre una pieza de “transwell®” (Figura 4) (Costar, Acton, USA) de 12 mm de diámetro, en donde fueron sujetadas con una liga de silicón estéril; con este sistema se formaron dos cámaras independientes en donde la decidua quedó hacia la cara interna y el amnios hacia la externa, lo que permitió estimular y analizar en forma selectiva la respuesta en ambos lados de la membrana (Figura 4) (Zaga y Cols., 2004).

En cada una de las dos cámaras se colocó 1ml de medio DMEM suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), piruvato de sodio 1mM,

100 U/mL de penicilina, 100ug/mL de estreptomicina y 0.25ug/mL de anfotericina B (Gibco, Bethesda, U.S.A.).

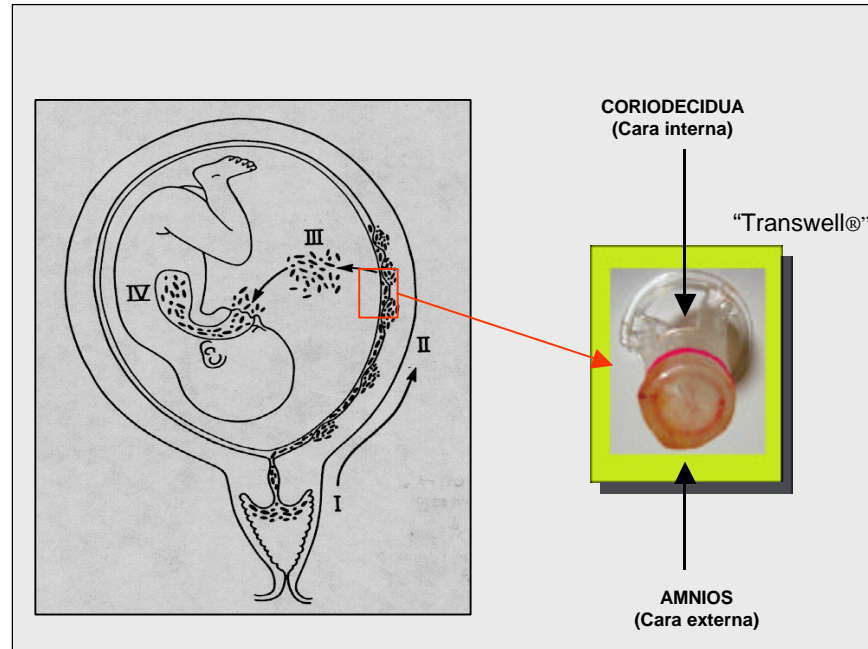


Figura 4. Modelo experimental de cultivo de membranas corioamnióticas humanas montadas en "Transwell®". El sistema mantiene dos compartimentos independientes, delimitados uno por la coriodecidua y otro por el amnios (Zaga y cols., 2004).

Los explantes se incubaron con medio DMEM suplementado con SFB, a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ (Figura 5).

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

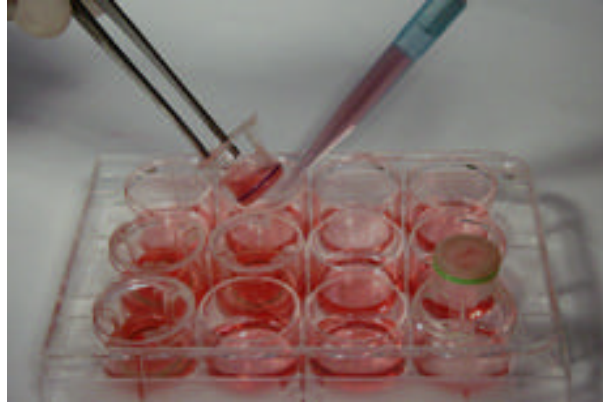


Figura 5. Membrana corioamniótica montada en “Transwell®”, sistema de cultivo en caja de 12 pozos.

7.3 Pruebas de validación del modelo experimental

Con el objetivo de validar el sistema de cultivo de las MCH en el “Transwell®”, se realizaron pruebas de viabilidad y medición de marcadores; MMP-9, bcl-2, p53 y Bax, patrón de fragmentación de DNA y apoptosis por el método de TUNEL.

7.3.1 Viabilidad de los explantes

La viabilidad de los explantes se determinó con una prueba colorimétrica basada en la oxidación de la sal amarilla de tetrazolio XTT (sodio 3´-[1-(fenilamina-carbonil) 3,4, tetrazolium]-bis (4-metroxy-6-nitro) benceno hidrato ácido sulfónico) a una sal de formazán de color naranja, mediante una reacción catalizada por una deshidrogenada mitocondrial; esta conversión solo puede ser

hecha por células metabólicamente activas (Boehringer, Mannheim Alemania)(Gerlier y Cols., 1986). Al medio de cultivo se le agregaron 200 μ L de la mezcla del reactivo (atrapador de electrones – sal de XTT 1:50) y se incubaron por un periodo de 1 h, el cambio de color se cuantificó por espectrofotometría a 475 nm; las pruebas se hicieron en ambas caras de las membranas (coriodesidua y amnios) montadas en “Transwell®” en periodos de 0, 24, 48, 72 y 96 h de cultivo.

7.3.2 Secreción de MMP-9

Para analizar el patrón de secreción de MMP-9 en membranas a lo largo de 96 h de cultivo, se tomo medio de cultivo tanto de la cara coriodesidual como de la cara amniótica en periodos de 0, 24, 48, 72 y 96 h. Para determinar la forma proenzimática y activa de la MMP-9 se realizaron zimogramas en gel, para ello: acrilamida al 8% se copolimerizaron con gelatina porcina a 1 mg/mL. La electroforesis se corrió a 10 mA por gel en condiciones no reductoras; se usó 1.0 μ L de proteína (Bradford 1976) por muestra. En cada gel se incluyó un estándar de actividad para MMP-9 obtenido de una línea celular U-937 de promielocitos (ATCC, Rockville, MD.U.S.A.). Los geles se lavaron con una solución de tritón X-100 al 2.5% por 30 minutos y se incubaron en un amortiguador de actividad a pH 7 (Tris base 50 mM, NaCl 0.15 mM, CaCl₂ 20 mM y NaN₃ 0.02%) durante 18

h a 37°C. Los geles se tiñeron con azul de Coomasie R-250 (Boehringer Mannheim, IN, USA).

Para cuantificar la actividad gelatinolítica de cada una de las muestras, a cada gel se le realizó un análisis de densitometría con el software UVP BioImaging Systems la actividad lítica se estimó como el área de cada banda.

7.3.3 Inmunohistoquímica de MMP-9, p53, Bax y Bcl-2

Para analizar el patrón de expresión y distribución tisular de MMP-9, p53, Bax y Bcl-2 en las MCH a lo largo del cultivo, fragmentos de cada una de las muestras (0, 24, 48, 72 y 96 h de cultivo) fueron fijados en paraformaldehído al 4% y posteriormente incluidas en parafina.

Para la inmunohistoquímica, los cortes de las membranas se desparafinaron a 60°C durante 30min, posteriormente se sumergieron en xileno, xileno-etanol (5 minutos), y se rehidrataron con diluciones decrecientes de etanol (100, 90, 70, 50 y 30%), finalmente se lavaron con solución salina amortiguada de fosfatos (PBS). La actividad de peroxidasa endógena se bloqueó por pretratamiento con peróxido de hidrógeno 0.3% en metanol.

Los tejidos se lavaron tres veces con PBS, para la inmunolocalización de cada una de las proteínas se utilizó el Kit ABC (Vector Burlingame, U.S. A.); este

kit emplea un anticuerpo primario no marcado, seguido de un anticuerpo secundario biotinilado y finalmente un complejo macromolecular formado por Avidina y peroxidasa “horseradish” biotinilada

Los tejidos se incubaron con el anticuerpo primario a detectar; MMP-9, bcl-2, p53 y Bax (Calbiochem, Burlingame, USA), utilizando una dilución 1:50. Posteriormente los tejidos se lavaron tres veces con PBS, se bloquearon e incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado por 1h a TA, seguidos de un lavado y una incubación con el complejo peroxidasa-biotina avidina durante 15 minutos. Después del lavado final, las proteínas inmunoreactivas se visualizaron con la adición de 3-3'diaminobencidina (Sigma) por 10 min. El tejido se contratiñó con hematoxilina, y se deshidratado con concentraciones crecientes de etanol (30, 50, 70, 90 y 100%), finalmente con xileno-etanol y xileno, el tejido se montó en resina y se analizó por microscopía de luz.

7.3.4 Fragmentación de DNA genómico

Para analizar el patrón de fragmentación de DNA se tomaron explantes de MCH con tiempos de cultivo de 0, 24, 48, 72 y 96 h. Se extrajo el DNA con DNAzol Reagent (GIBCO BRL, U.S.A.). Se tomaron de 25 a 50 mg de tejido y se colocaron en tubos de ensayo estériles, se les agregó 1mL del DNAzol y se homogenizaron en un politron® a 14000 rpm, se transfirieron a tubos Eppendorf de 1.5 mL y se centrifugaron por 10 minutos a 10,000 x g a 4°C, se transfirió el

sobrenadante a otros tubos, posteriormente se precipitó el DNA adicionando 0.5 mL etanol al 100%, se centrifugó a 4000 x g por 2 minutos a 4°C, se retiró el etanol al 100% y se realizaron dos lavados con etanol al 75%, en cada lavado el DNA se suspendió utilizando vortex, posteriormente se dejó secar 10 minutos, se resuspendió con NaOH 8 mM. Se realizó una dilución 1:100 para cuantificar el DNA por espectrofotometría.

Se realizaron geles de agarosa al 1.8% para observar la fragmentación de DNA, utilizando 0.9 g de agarosa disueltos en 50 mL de amortiguador TBE (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM), se utilizaron 10 µg de DNA y el gel se corrió en presencia de TBE con una corriente de 100 V durante una hora, posteriormente, el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio 0.5 µg/mL durante 30 minutos. El DNA se visualizó con luz ultravioleta y la imagen fue capturada para su registro y análisis mediante un equipo UVP Mitsubishi.

8 ESTIMULACIÓN DE MCH CON *Streptococcus agalactiae* EN CULTIVO

Con el fin de estabilizar el tejido después de la manipulación y antes de la estimulación, los explantes se preincubaron por 24 h con DMEM-SFB. Al segundo día, las membranas se lavaron con solución salina estéril y el medio se cambió a DMEM-LAH y se procedió a la estimulación con 1×10^6 UFC/mL de *S. agalactiae*, serotipo III (para la estimulación fueron utilizados cultivos bacterianos de 24 h de crecimiento en placas de agar-sangre de carnero al 5%)

aislado de exudado vaginal (código INPer 9710860), esta concentración es efectiva para inducir parto pretérmino (Gravett y cols., 1994).

Cada experimento montado en sistema de Transwell® incluyó las siguientes modalidades de estimulación por duplicado: Basal: membranas control en las que la coriodecidua y amnios se trataron únicamente con 100 μ L de solución salina (vehículo del *S. agalactiae*); Ambos: la estimulación se realizó simultáneamente en los dos compartimentos; Coriodecidua: el estímulo se agregó únicamente a la cara coriodecidual; Amnios: el estímulo se agregó únicamente al compartimiento en contacto con el amnios.

Los medios de cultivo se recuperaron y guardaron a -70°C hasta su uso; la concentración de proteínas en todas las muestras se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

El tejido se recuperó y almacenó según su uso posterior. Inmunohistoquímica. El tejido se fijó en paraformaldehído al 4%, posteriormente se embebió en parafina, y finalmente se cortó y pegó en laminillas.

Extracción de DNA. El tejido se almacenó en 2 mL de medio DMEM-LAH (hidrolizado de lactoalbúmina) a -70°C .

8.1 ANÁLISIS POSTRATAMIENTO

8.1.1 *Inmunohistoquímica de MMP-9*

Para el análisis inmunohistoquímico de MMP-9 en MCH después del tratamiento con *S. agalactiae*, se utilizó el Kit ABC Vector. El anticuerpo utilizado fue Anti-MMP-9, Mouse mAb (Calbiochem, U.S.A.), se realizó el mismo procedimiento mencionado con anterioridad (Página 31).

8.1.2 *Determinación cuantitativa de MMP-9 activa*

La cuantificación de la forma activa de la MMP-9 se hizo utilizando un kit (Amersham Biosciences, USA) que está diseñado para la cuantificación de la forma activa de la enzima. Adicionalmente con este kit se pudo cuantificar la cantidad total de enzima en el medio mediante la activación artificial de la pro MMP-9 por un evento autocatalítico inducido por el acetato p-aminofenilmercúrico (APMA); la proporción de la enzima latente en cada muestra fue el resultado de restar la cantidad de enzima activa de la total. La curva estándar fue de 0.5-16 ng/mL con sensibilidad de 0.5 ng/mL. La reacción colorimétrica se leyó a 410 nm.

8.1.3 Determinación del índice apoptótico

La prueba de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase deoxy-UTP-nick end labeling*) (Roche, USA) nos sirvió para poder visualizar las células con DNA fragmentado en MCH después del estímulo diferencial con *S. agalactiae*. La prueba se basa en la polimerización del DNA fragmentado en el extremo 3´OH con nucleótidos marcados con fluoresceína, a los cuales se les agrega un anticuerpo anti-fluoresceína conjugado con fosfatasa alcalina (AP) y finalmente se revelan con el sustrato para la enzima (Alkaline Phosphatase substrate Kit I, vector, USA).

Las células con DNA fragmentado se visualizaron de color verde fluorescente, mientras que las células con DNA no fragmentado se observaron de color verde. Para determinar el índice apoptótico se realizó una relación entre el número de células con DNA fragmentado y el número de células totales. Las células se contaron por dos observadores en tres campos distintos utilizando el objetivo 40X.

8.1.3.1 Análisis por microscopía de fluorescencia

Cortes de MCH de RPM (control negativo), cesárea sin trabajo de parto (control positivo) y de 0, 24, 48, 72 y 96 h de cultivo (muestras), se desparafinaron a 60°C durante 30 minutos y rehidratados con lavados de etanol

(100, 96, 70, 50 y 30%), agua y PBS (5 minutos por lavado). Los tejidos se permeabilizaron con una solución de proteinasa K 20 µg/mL en Tris/HCl 10 mM, pH 7.4 libre de nucleasas, posteriormente al control negativo se le agregaron 50 µL de la solución de marcaje (sin la transferasa terminal), el control positivo fue incubado con DNasa I, grado I (3 U/mL en Tris-HCl 50mM, pH 7.5, MgCl₂ 10 mM y BSA 1 mg/mL) por 10 minutos a temperatura ambiente.

Tanto a controles como a muestras se les agregaron 50 µL de la mezcla de reacción TUNEL (50 µL de solución enzimática en 450 µL solución de marcaje), para iniciar la polimerización de nucleótidos marcados con fluoresceína al extremo 3'OH del DNA fragmentado con la ayuda de la desoxinucleotidil transferasa terminal. Los tejidos de distintos tiempos y controles se incubaron en oscuridad por 60 minutos a 37°C en una atmósfera humedad. Una vez transcurrido el tiempo de incubación los tejidos se lavaron con PBS 1X y se les agregó medio de montaje para fluorescencia. Las muestras se analizaron por microscopía de fluorescencia.

8.1.3.2 Análisis por microscopía de luz

Los tejidos se trataron igual que los analizados por microscopía de fluorescencia solo que después de la incubación con la mezcla de reacción, se lavaron tres veces con PBS 1X y se agregó 50 µL de l anticuerpo anti-fluoresceína (solución convertidora), posteriormente se incubaron con 100 µL de

la solución sustrato (Alkaline Phosphatase substrate Kit I, vector, USA) por 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se lavaron tres veces con PBS 1X, se contratiñeron con hematoxilina durante 30 segundos y se lavaron inmediatamente con agua, finalmente se deshidrataron con etanol (30, 50, 70, 90, y 100%), etanol-xilol (1:1), xilol y se montaron con resina. Se analizaron por microscopía de luz.

Los núcleos apoptóticos se tiñeron de color rojo y los núcleos no apoptóticos de color morado-azul, los primeros se contaron en las capas del amnios, trofoblastos y decidua por dos individuos, usando el objetivo 40X. Se contaron tres campos diferentes por muestra.

Por otra parte membranas obtenidas después de la estimulación fueron teñidas con hematoxilina y los núcleos condensados se contaron por dos personas usando el objetivo 100X en cinco campos diferentes.

8.1.4 Fragmentación de DNA genómico

Para el análisis del DNA fragmentado de MCH estimuladas con *S. agalactiae* se procedió a la extracción de DNA con DNAzol® Reagent (Gibco BRL, U.S.A.) y se realizó electroforesis, como previamente se describió en la página 32.

8.1.5 Inmunolocalización de p53, Bax y Bcl-2

Para el análisis inmunohistoquímico de p53, Bax y Bcl-2 se utilizó el Kit comercial. Kit ABC Vector (Burlingame USA), este kit emplea un anticuerpo primario no marcado, seguido de un anticuerpo secundario biotinilado y finalmente un complejo macromolecular formado por Avidina y peroxidasa “horseradish” biotinilada. Los anticuerpos para localización de cada una de las proteínas se utilizaron en una dilución 1:50; siguiendo la metodología antes mencionada en la página 31.

8.1.6 Análisis de la expresión de mRNA de p53 y bcl-2 en MCH

8.1.6.1 Cultivo de membranas corioamnióticas

Para el análisis de expresión génica de p53 y bcl-2 se realizó el cultivo de MCH. En condiciones de esterilidad, las membranas se lavaron con solución salina estéril (Figura 6-A) y se cortaron utilizando un horador con un diámetro de 1.5 cm (Figura 6-B). Los explantes (Figura 6-C) se colocaron en cajas de 12 pozos con 1 mL DMEM-SFB (Figura 6-D) y se incubaron a 37°C con una atmósfera húmeda de 36.7% y 5% de CO₂. Se incluyeron las siguientes modalidades de estimulación por duplicado: basal: a la membrana se le agregaron únicamente 100 µL de solución salina (vehículo del *S. agalactiae*) (Figura 6-D-a). Estimulación: se estimularon con 10 ng/mL de TNF-α (Figura 6-

D-b), con 100 ng/ mL de TNF-á. (Figura 6-D-c), y con 1×10^6 UFC de *S. agalactiae* (Figura 6-D-d). Transcurridas 24 h con el estímulo, las membranas se procesaron inmediatamente para la extracción de RNA.

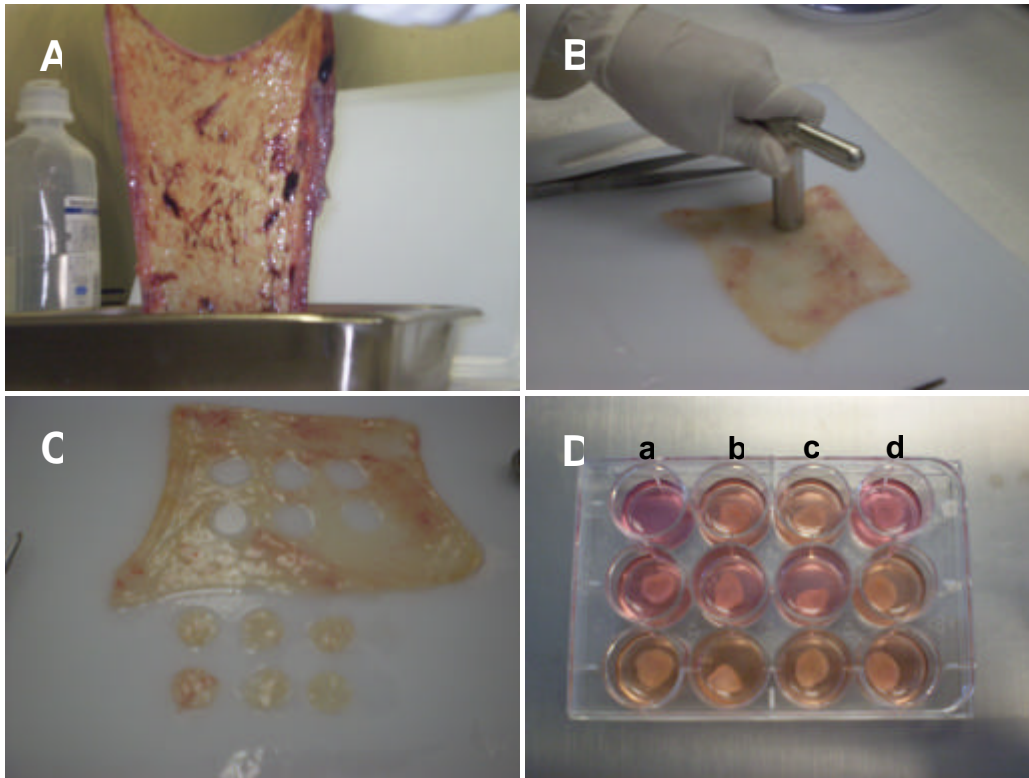


Figura 6. Cultivo de explantes de membranas corioamnióticas humanas. A, lavado de membranas con solución salina. B, corte de los explantes de membranas utilizando un horador. C, explantes de membranas corioamnióticas. D, cultivo de explantes de membranas en medio DMEN; a-d (modalidad de estímulo); a, explantes control (sin estímulo); b, membranas tratadas con 10 ng de TNF-á; c, membranas tratadas con 100 ng de TNF-á; d, membranas tratadas con 1×10^6 UFC de *S. agalactiae*.

8.1.6.2 Extracción de mRNA

Para la extracción de mRNA se utilizó un kit comercial, Kit de aislamiento de mRNA (Miltenyi Bistec, USA) el cuál está desarrollado para el aislamiento directo del mRNA sin preparación previa de RNA total. El aislamiento es realizado utilizando micro cuentas de Oligos (dT), las cuales son adicionadas al

preparado lisado de células o tejido. El mRNA marcado magnéticamente es aislado en las microcolumnas.

Cada uno de los tejidos se colocaron en cajas de Petri, agregando 1mL de PBS, posteriormente se colocaron en un tubo Eppendorf y se centrifugaron a 6000 rpm durante 3 minutos, se les retiró el PBS y se procedió a la extracción de mRNA utilizando un kit comercial (Tecnología MACS® para el aislamiento de mRNA), a las pastillas se les agregó 1ml de amortiguador de lisis (Lysis/Binding), posteriormente se les dio un choque térmico ultra congelando 5 minutos a -70°C y calentando a 37°C durante 5 minutos, se agitaron con ayuda de un vortex y se repitió el choque térmico, finalmente se centrifugaron a 3000 rpm durante 3 minutos.

Los sobrenadantes se colocaron en una columna (LysateClear Column) montada en tubos de centrifugación, y se centrifugaron a 13000 rpm por tres minutos.

A los lisados contenidos en los tubos para centrifugación se les adicionaron 50µl de Oligo (dT) MicroBeads) y se procedió a la separación magnética.

La columna se preparó enjuagando con 100 µl de amortiguador (Lysis/Binding). Los lisados se colocaron en cada una de las columnas en donde el mRNA marcado magnéticamente fue retenido. Posteriormente la columna se enjuagó dos veces con 200 µl de buffer "Lysis/Binding" para remover las proteínas y el DNA, finalmente la columna se enjuagó cuatro veces con 100 µL

de amortiguador de lavado, para remover rRNA y DNA, reteniendo el mRNA en las columnas para la síntesis de cDNA.

8.1.6.3 Síntesis de cDNA

Se utilizó el kit comercial, cDNA synthesis Kit (Miltenyi Bistec, USA). La reacción de mRNA a cDNA se realizó en una columna utilizando una mezcla de Transcriptasa reversa altamente activa combinada con la síntesis de oligo iniciador (dT), el cDNA sintetizado se eluyó con un amortiguador.

8.1.6.4 PCR para GADPH, p53 y bcl-2

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica para amplificar DNA, los componentes necesarios para el proceso de amplificación incluyen solución amortiguadora de pH que consiste de $MgCl_2$, KCl y Tris, además de los iniciadores, bases de nucleótidos, DNA polimerasa estable al calor y una muestra de DNA. La reacción se basa en tres pasos: la desnaturalización, alineación y elongación.

Para el análisis de la expresión de mRNA de p53 y bcl-2 se utilizaron un par de iniciadores para cada una de las proteínas.

Los iniciadores para la amplificación de GADPH usada como gen constitutivo fueron proporcionados por el Dr. Yonathan Garfías Becerra jefe del departamento de Genética del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana; el peso del producto a obtener después de la amplificación para GADPH fue de 200 pb y el peso del producto a obtener para la amplificación de p53 y bcl-2 se muestran en las figuras 7 y 8.

GADPH F 5' CATTGTGGAAGGGCTCATGA 3'

GADPH R 5' GGAAGGCCATGCCAGTGAGC 3'

p53ex5 F 5' CCCTGCCCTCAACAAGATGTTT 3'

p53ex8 R 5' AGCTGTTCCGTCCCAGTAGATTA 3'

bcl2_F 5' CGTGGGCCCTCCAGATAGC 3'

bcl2_R 5' AAGTATCAATCTTAAAAAGAGCCATG 3'

Figura 7. Alineamiento de los cebadores para p53; peso del producto a obtener: 427 pb

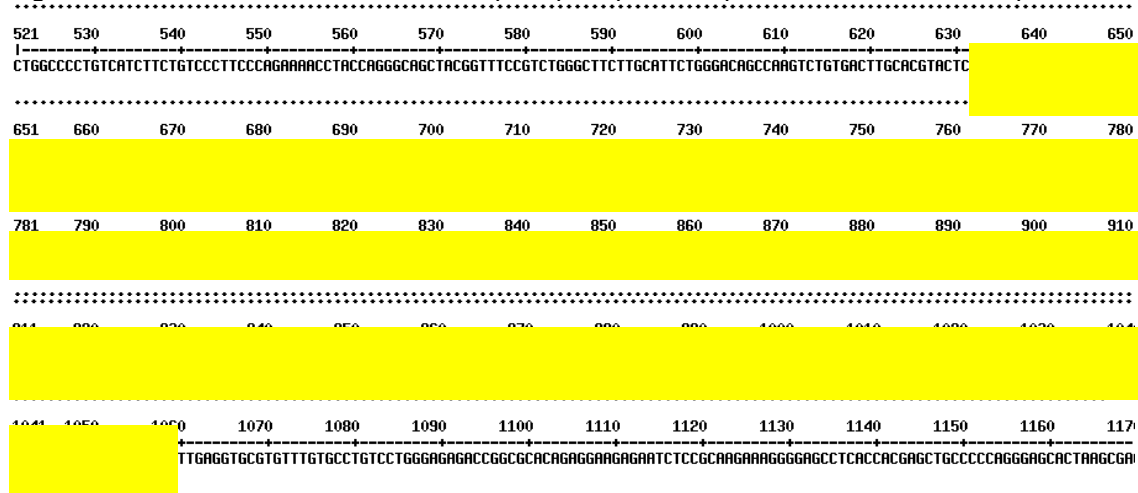


Figura 8. Alineamiento de los cebadores para bcl-2; peso del producto a obtener: 282pb

```

5851 5860 5870 5880 5890 5900 5910 5920 5930 5940 5950 5960 5970 5980
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
GCATACCAGCTGAGCACAGAGATGGGACACACGCTGGTGGAGGATGGAAAGGCTCGCTCAATCAGAAATCTGAGACTATTATAAATAGACTGTAGTGTAGATACGAGTAATCCATGCACCTAA
.....
5981 5990 6000 6010 6020 6030 6040 6050 6060 6070 6080 6090 6100 6110
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CCTTTTGGAAATCTGC
.....
6111 6120 6130 6140 6150 6160 6170 6180 6190 6200 6210 6220 6230 6240
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
.....
6241 6250 6260 6270 6280 6290 6300 6310 6320 6330 6340 6350 6360 6370
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TTAAGAGGTGGCTGATATTCTGCACACTGTACACATAAAAATACGGTAAGGACTTTACATGGTTAAGGTAAGTAACTCCAGTT
.....
6371 6380 6390 6400 6410 6420 6430 6440 6450 6460 6470 6480 64892
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
GGCCACCATAGCTATAATGGCATTGTGTTGTTGTTGGAAARAGTCACATTGCCATTAACTTTCCTGTCTGTCTAGTTAATATTGTGAGAGAAATTAAGTACAGTGTGAGACTCTG

```

Para la amplificación se realizó una mezcla de 5 μ L de cDNA, 25 ng/mL iniciadores (MOLBIOL, U.S.A.) y 1.5 U de HotStarTaq® Master Mix kit (QIAGEN, GmbH) y agua estéril libre de RNAsa para un total de 25 μ L. La HotStarTaq Master Mix contiene HotStarTaq DNA polimerasa, solución amortiguadora para PCR única de QIAGEN y dNTPs. El programa para la amplificación de cada fragmento se muestra en la tabla 2.

	Programa para GADPH	Programa para p53	Programa para bcl-2
	94° C 15min	94° C 15min	94° C 15min
Desnaturalización	94° C 50seg	94° C 45seg	94° C 45seg
Alineamiento	55° C 50seg	58° C 1 min	58° C 1min
Elongación	72° C 50seg	72° C 45seg	72° C 45seg
	72° C 10min	72° C 10min	72° C 10min
	4° C á	4° C á	4° C á

Tabla 2. Programa de amplificación para cada uno de los fragmentos.

Una vez terminada la amplificación de cada fragmento (GADPH, p53 y bcl-2), se realizó una separación por electroforesis para verificar la amplificación

del producto esperado. Se cargaron 10 μ l de cada uno de los fragmentos amplificados (GADPH, p53 y bcl-2), completando 30 μ l por muestra (control, tratamiento con 10 ng de TNF- α , tratamiento con 100 ng de TNF- α y tratamiento con 1×10^6 UFC de *S. agalactiae*).

8.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La comparación entre los diferentes grupos se hizo mediante una prueba no paramétrica, ANOVA/Kruskal-Wallis en las que una $p < 0.05$ se consideró significativa. Las regiones amniótica y coriodecidual estimuladas se compararon contra las regiones amniótica y coriodecidual control. La expresión gráfica de los resultados muestra los promedios \pm desviación estándar.

9. RESULTADOS

9.1 VALIDACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL

9.1.1 VIABILIDAD

Con el objetivo de garantizar que las MCH no experimentaban cambios significativos en la viabilidad derivados de la manipulación y del cultivo, que pudieran alterar cuantitativa o cualitativamente la respuesta al estímulo con *Streptococcus agalactiae*, se realizaron distintas pruebas de validación del modelo experimental.

La prueba de viabilidad mostró, que la coriodecidua no experimenta disminución estadísticamente significativa durante las 96 h de cultivo (Figura 9-A). El amnios mostró cambio estadísticamente significativo ($p < 0.05$) al segundo día de cultivo, el cual se mantuvo estable hasta las 96 h de cultivo (Figura 9-B).

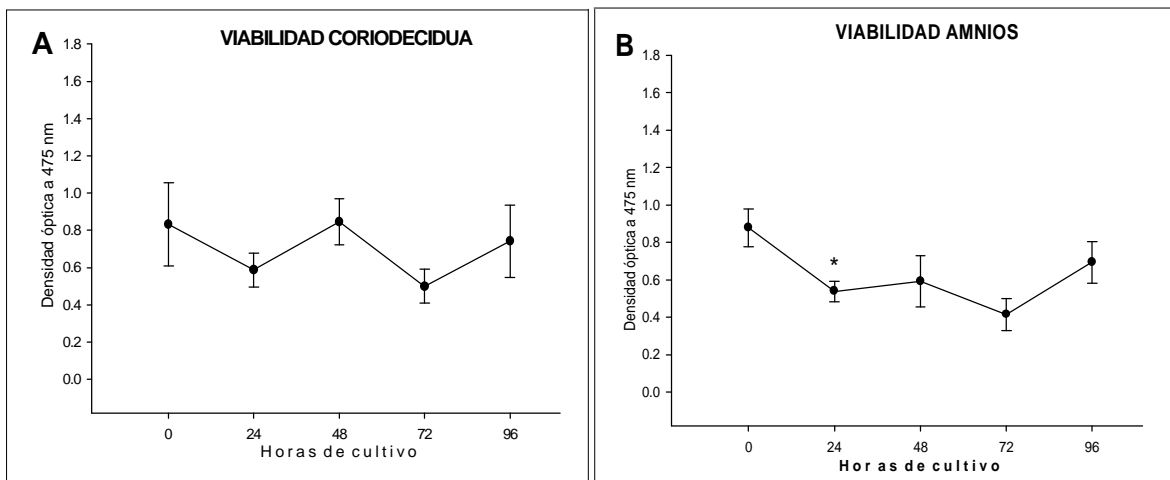


Figura 9. Viabilidad celular de membranas corioamnióticas humanas durante 96 h de cultivo; A, coriodecidua; B, amnios (n=4; *P<0.05 en relación a 0 h).

9.1.2 PATRÓN DE SECRECIÓN DE MMP-9

Durante el periodo de 96 h de cultivo de MCH se analizó el patrón de secreción de la MMP-9 en los dos compartimentos (coriodecidua y amnios); la zimografía (Figura 10-A) mostró, que esta enzima fue secretada tanto por la cara coriodecidual como por la amniótica desde el tiempo 0 h, el análisis densitométrico y experimentaron aumento a partir de las 72 h, se realizó análisis densitométrico y fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$) a las 96 h de cultivo (Figura 10-B).

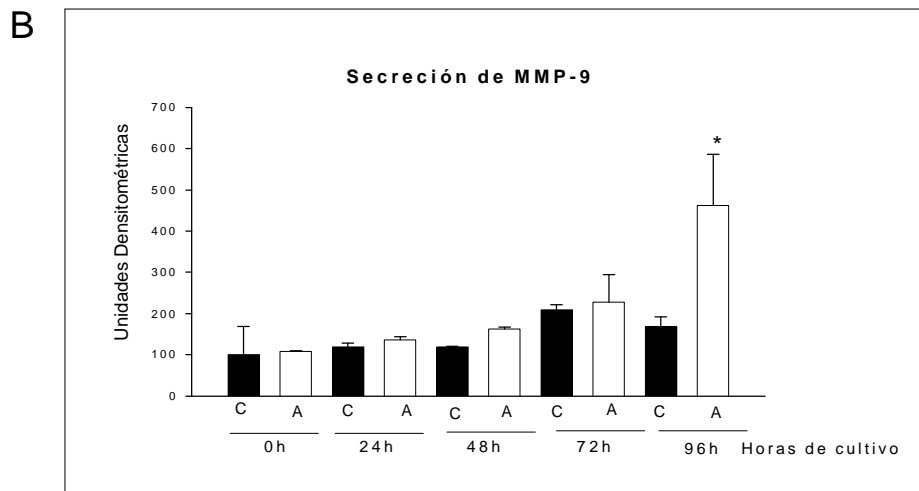
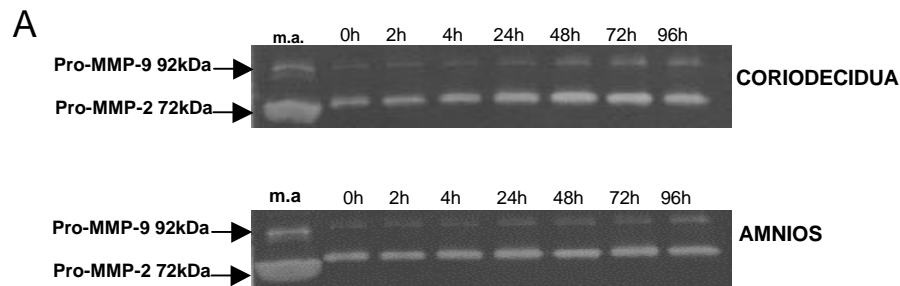


Figura 10. **A**; zimograma representativo de la secreción de MMP-9 por membranas corioamnióticas durante 96 h de cultivo. **B**; análisis semi-cuantitativo de secreción de MMP-9 en membranas corioamnióticas durante 96 h de cultivo. ($n=3$; $*p < 0.05$ vs 0 h). C, coriodecidua; A, amnios; m.a. marcador de actividad.

9.1.3 INMUNOHISTOQUÍMICA DE MMP-9

La MMP-9 esta involucrada en la degradación de los elementos de la matriz extracelular de las MCH y el modelo de cultivo permitió analizar la inmunoreactividad de MMP-9 en MCH durante 96 h de cultivo, la prueba mostró que tanto la coriodecidua como el amnios muestran inmunoreactividad para esta proteína a partir del tiempo 0 h, mostrando un incremento a las 96 h de cultivo, se incluyó un control negativo de MCH con ruptura prematura (Figura 11).

MMP-9

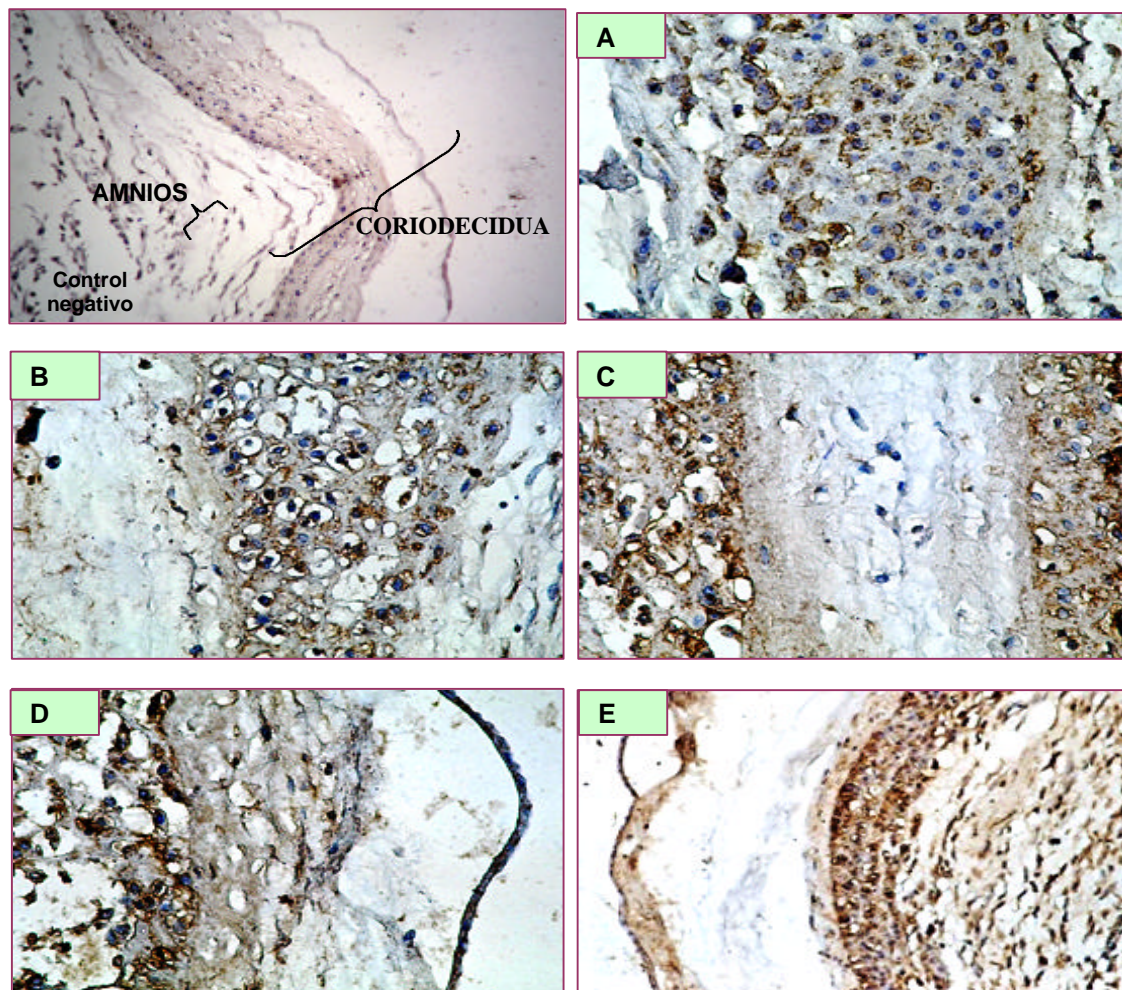


Figura 11. Inmunolocalización de MMP-9 en MCH durante 96 h de cultivo. A, 0 h; B, 24 h; C, 48 h; D, 72 h; E, 96 h de cultivo (40X), control negativo (sin anticuerpo primario) (20X), control negativo de MCH con ruptura prematura, la inmunoreactividad positiva se muestra en color café contrateñida con hematoxilina (morado).

9.1.4 INMUNOHISTOQUÍMICA DE p53

La proteína pro-apoptótica p53, involucrada en la muerte celular por apoptosis fue analizada en MCH durante 96 h de cultivo por inmunohistoquímica, la prueba mostró que tanto coriodecidua como amnios muestran inmunoreactividad para esta proteína a partir del tiempo 0 h, mostrando un incremento a las 96 h de cultivo en ambas regiones de las MCH, se incluyó un control negativo de MCH con ruptura prematura (Figura 12).

p53

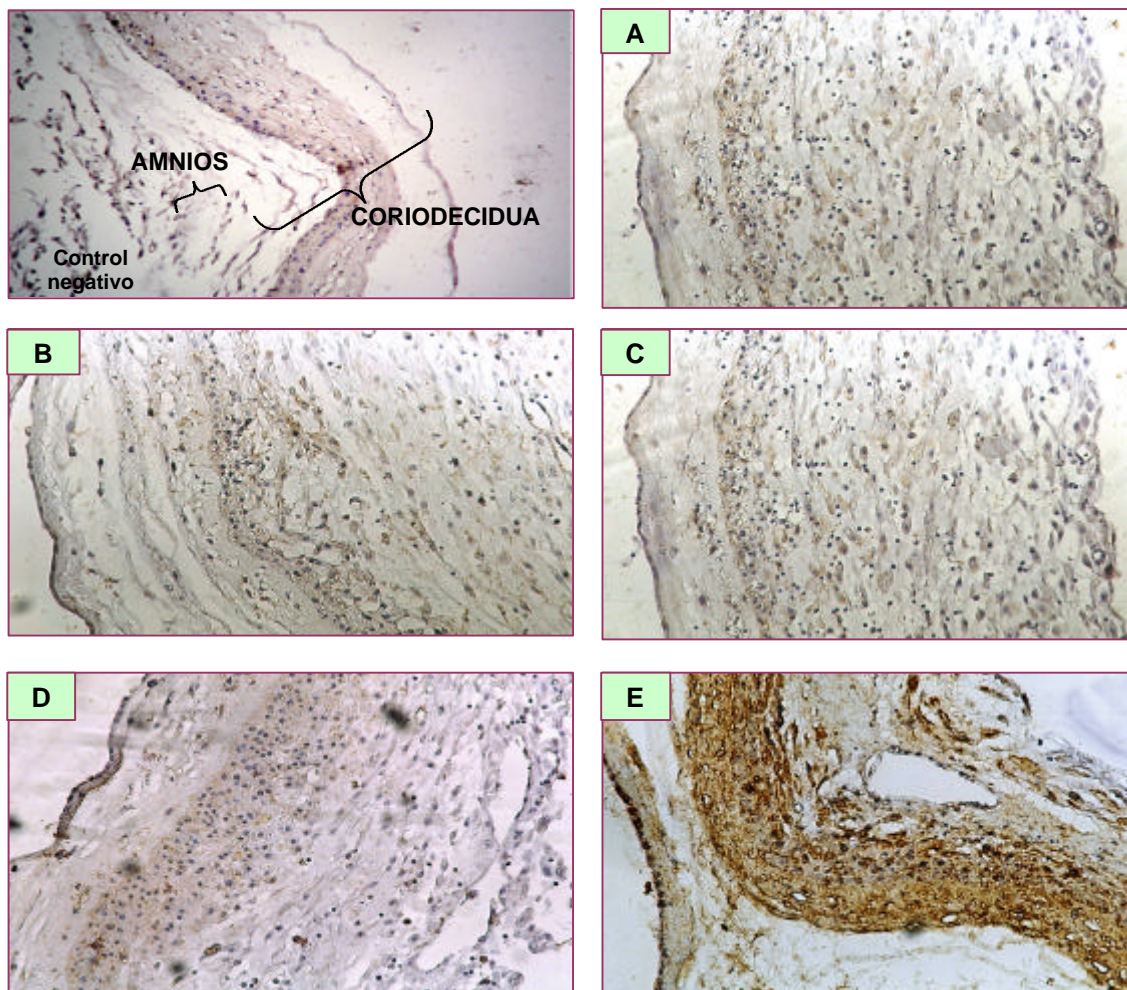


Figura 12. Inmunolocalización de p53 en membrana corioamniótica humana. A; 0 h. B; 24 h. C; 48 h. D; 72 h. E; 96 h de cultivo (20X), control negativo (sin anticuerpo primario) (20X), la inmunoreactividad positiva se muestra en color café contrateñida con hematoxilina (morado).

9.1.5 INMUNOHISTOQUÍMICA DE Bax

La proteína pro-apoptótica Bax también fue analizada en MCH durante 96 h de cultivo por inmunohistoquímica, la prueba mostró, que tanto coriodecidua como amnios muestran inmunoreactividad para esta proteína a partir del tiempo 0 h, mostrando un aumento a 72 h en ambas regiones, se incluyó un control negativo de MCH con ruptura prematura (Figura 13).

Bax

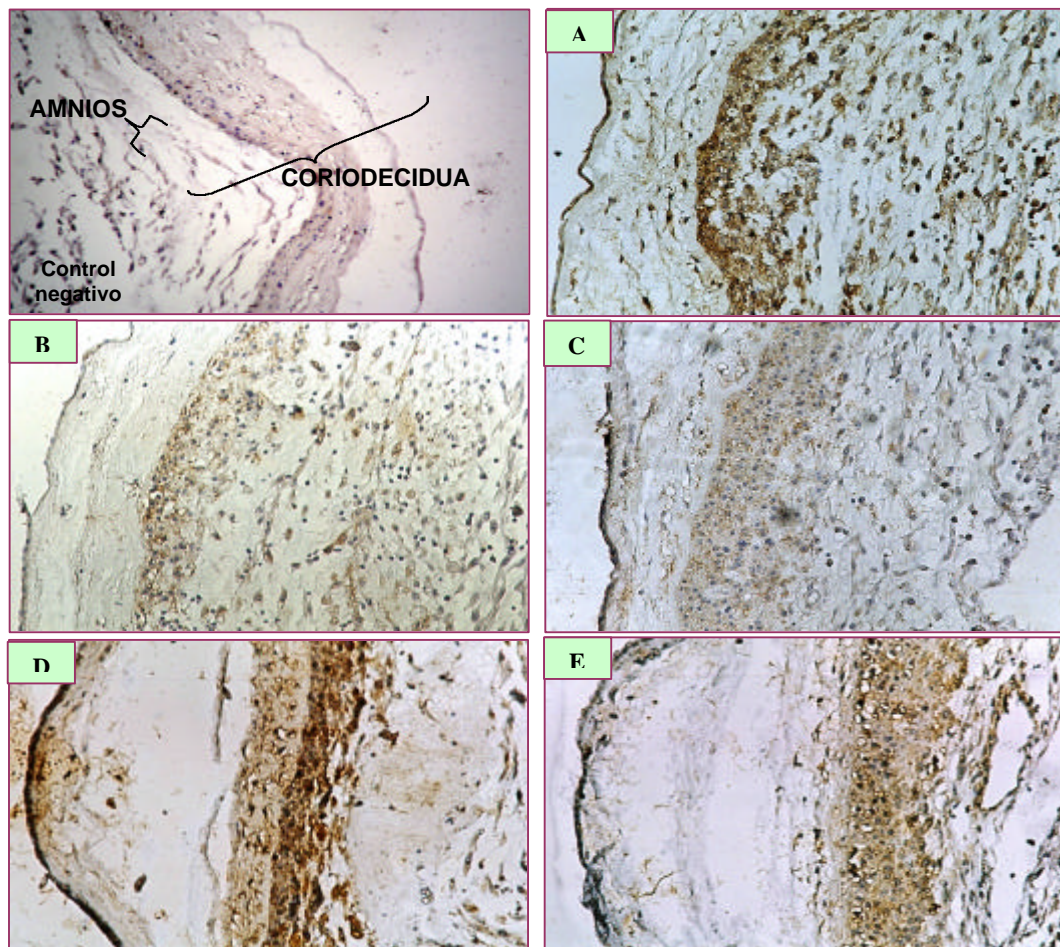


Figura 13. Inmunolocalización de Bax en membrana corioamniótica humana. A; 0 h B; 24 h. C; 48 h. D; 72 h. E; 96 h de cultivo (20X), control negativo (sin anticuerpo primario) (20X), la inmunoreactividad positiva se muestra en color café contrateñida con hematoxilina (morado).

9.1.6 INMUNOHISTOQUÍMICA DE Bcl-2

La proteína anti-apoptótica Bcl-2 fue analizada en MCH por inmunohistoquímica durante 96 h de cultivo, la prueba mostró, que tanto coriodecidua como amnios muestran inmunoreactividad para esta proteína a partir del tiempo 0 h, mostrando un incremento a las 72 h, se incluyó un control negativo de MCH con ruptura prematura.

Bcl-2

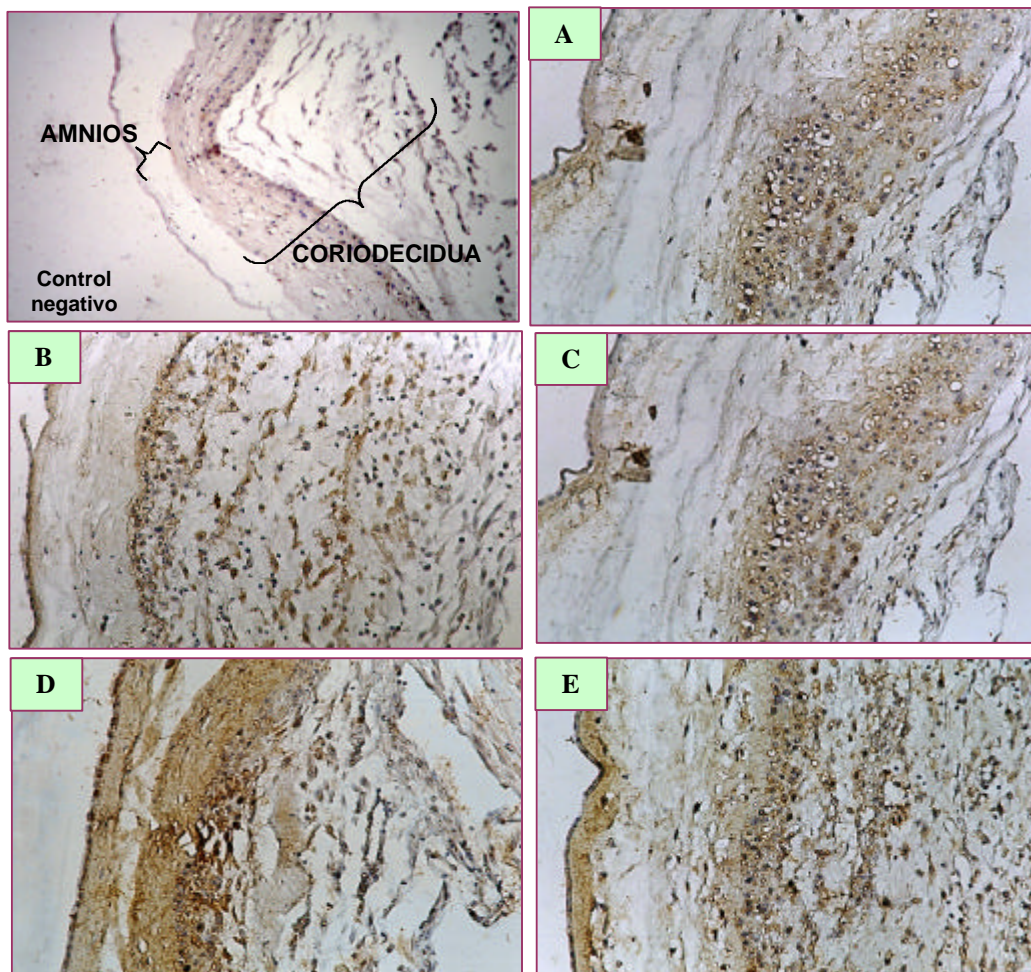


Figura 14. Inmunolocalización de Bcl-2 en membrana corioamniótica humana. A; 0.h B; 24 h. C; 48 h. D; 72 h. E; 96 h de cultivo (20X), control negativo (sin anticuerpo primario) (20X), la inmunoreactividad positiva se muestra en color café contrateñida con hematoxilina (morado).

9.1.7 FRAGMENTACIÓN DE DNA GENÓMICO

Se analizó la fragmentación de DNA en MCH durante 96 h de cultivo por electroforesis, la prueba mostró que las MCH no muestran fragmentación de DNA a lo largo de las 96 h de cultivo.

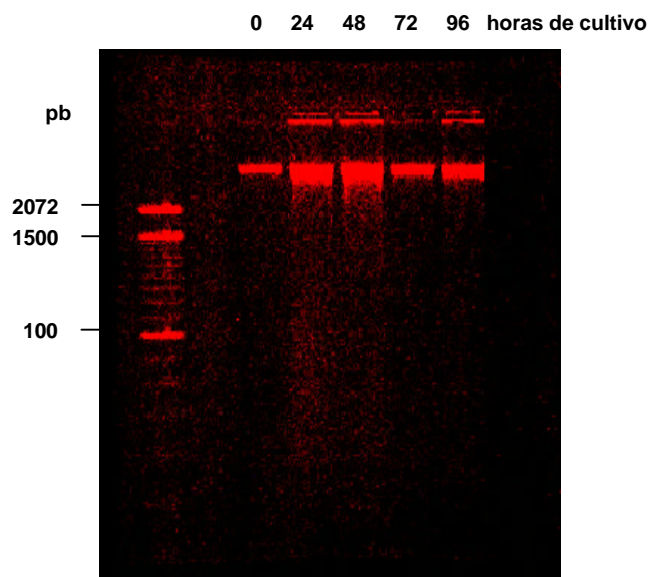


Figura 15. Patrón de corrimiento del DNA genómico de MCH a distintas horas de cultivo.

9.2 ESTIMULACIÓN DE MCH CON *Streptococcus agalactiae*

9.2.1 Secreción y actividad gelatinolítica de la MMP-9 en MCH después de la estimulación con *Streptococcus agalactiae*

Se realizó zimografía para evaluar los patrones de secreción y actividad gelatinolítica de la forma proenzimática y activa de la MMP-9 en MCH estimuladas diferencialmente con *S. agalactiae* (Figura 16).

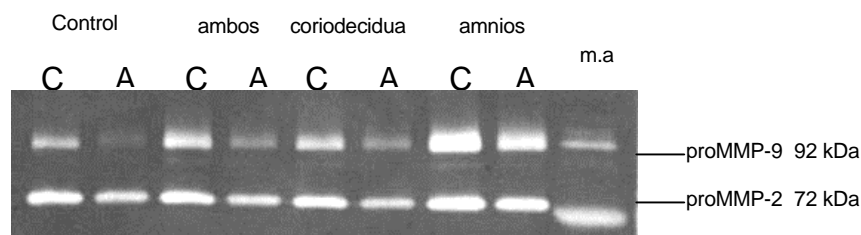


Figura 16. Zimograma representativo que muestra el patrón de secreción y actividad gelatinolítica de MMP-9 después de la estimulación selectiva con *S. agalactiae* por 24 h. C. Coriodecidua; A. Amnios; m.a. marcador de actividad (U937).

El análisis densitométrico de los diferentes zimogramas mostró que en las tres modalidades de estimulación con *S. agalactiae*, la coriodecidual y el amnios sintetizan MMP9, siendo la coriodecidual la que responde al estímulo sintetizando mayor cantidad de MMP-9, independientemente de la zona de estimulación. El amnios sintetiza mayor cantidad de MMP-9 cuando ambos lados son estimulados (Figura 17).

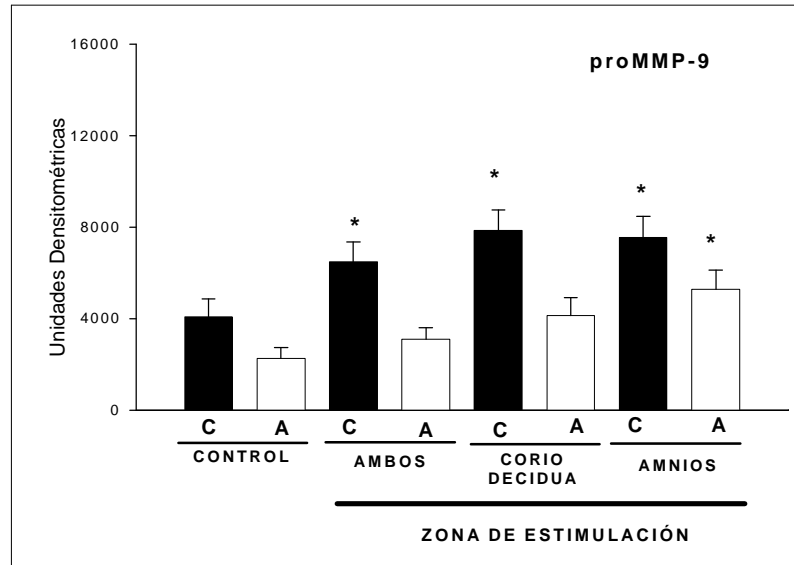


Figura 17. Análisis densitométrico de la pro-MMP-9 secretada al medio de cultivo por las diferentes regiones de las membranas después del tratamiento con *S. agalactiae* por 24 h. C, coriodecidual; A, amnios. (n=11, *p<0.05, tratados vs control).

9.2.2 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LAS FORMAS PROENZIMÁTICA Y ACTIVA DE MMP-9

La determinación cuantitativa de las formas latente y activa de la MMP-9 mostró que después del tratamiento con *S. agalactiae*, la secreción de la pro-MMP-9 se incrementó tanto en la coriodecidua como en el amnios en comparación con los datos de síntesis basal en cada una de las regiones, éste incremento fue independiente del sitio de contacto inicial con el *S. agalactiae*.

La comparación de la concentración de la forma activa de la MMP-9 secretados por la coriodecidua y el amnios antes y después del estímulo no muestran cambio significativo ($p < 0.05$) (Figura 18).

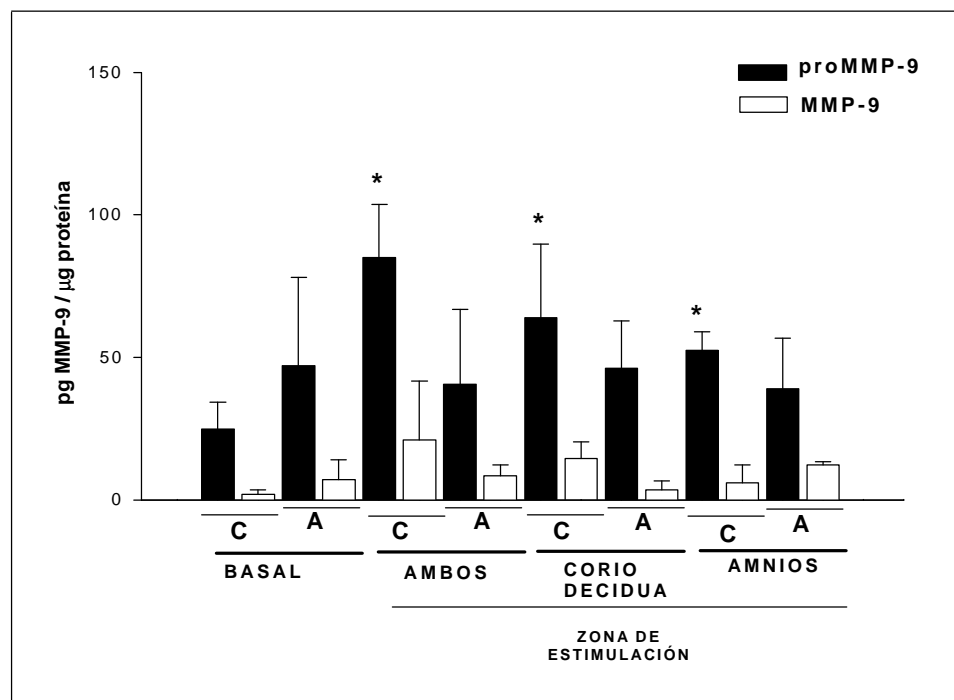


Figura 18. Secreción de la forma latente y activa de la MMP-9 después del tratamiento selectivo con 1×10^6 UFC de *S. agalactiae*. C. Coriodecidua; A. Amnios. $n=4$. * $p < 0.05$.

9.2.3 INMUNOHISTOQUÍMICA DE MMP-9

Después de la estimulación selectiva de las MCH con *S. agalactiae*, se observó que independientemente del sitio de contacto, la MMP-9 es inmunolocalizada tanto en coriodecidua como en amnios.

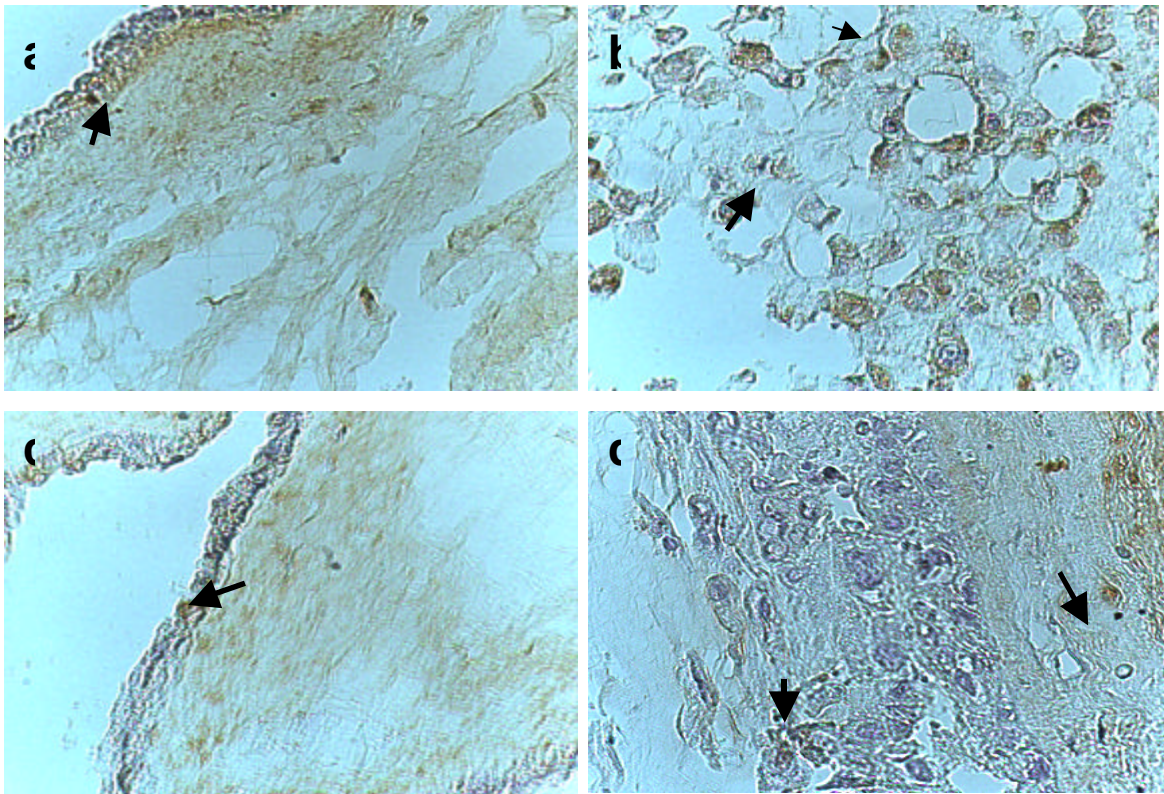


Figura 19. Inmunolocalización de MMP-9 en membrana corioamniótica después de la estimulación en ambas regiones de la membrana (corion y amnios) con *S. agalactiae*. A, B, 40X; inmunoreactividad muy marcada en las células del corion, membranas basales y zona compacta del amnios, C, D, 40X.

9.2.4 Determinación de la muerte por apoptosis (TUNEL)

La fragmentación de DNA es una característica de la apoptosis, esta se pudo analizar en MCH después de la estimulación diferencial con *S. agalactiae*, mediante el método de TUNEL; esta técnica esta diseñada para agregar nucleótidos marcados con fluoresceína a los extremos 3'OH que se encuentran libres, la prueba mostró que las membranas contenían extremos 3'OH libres después del estímulo diferencial con *S. agalactiae* (Figura 20).

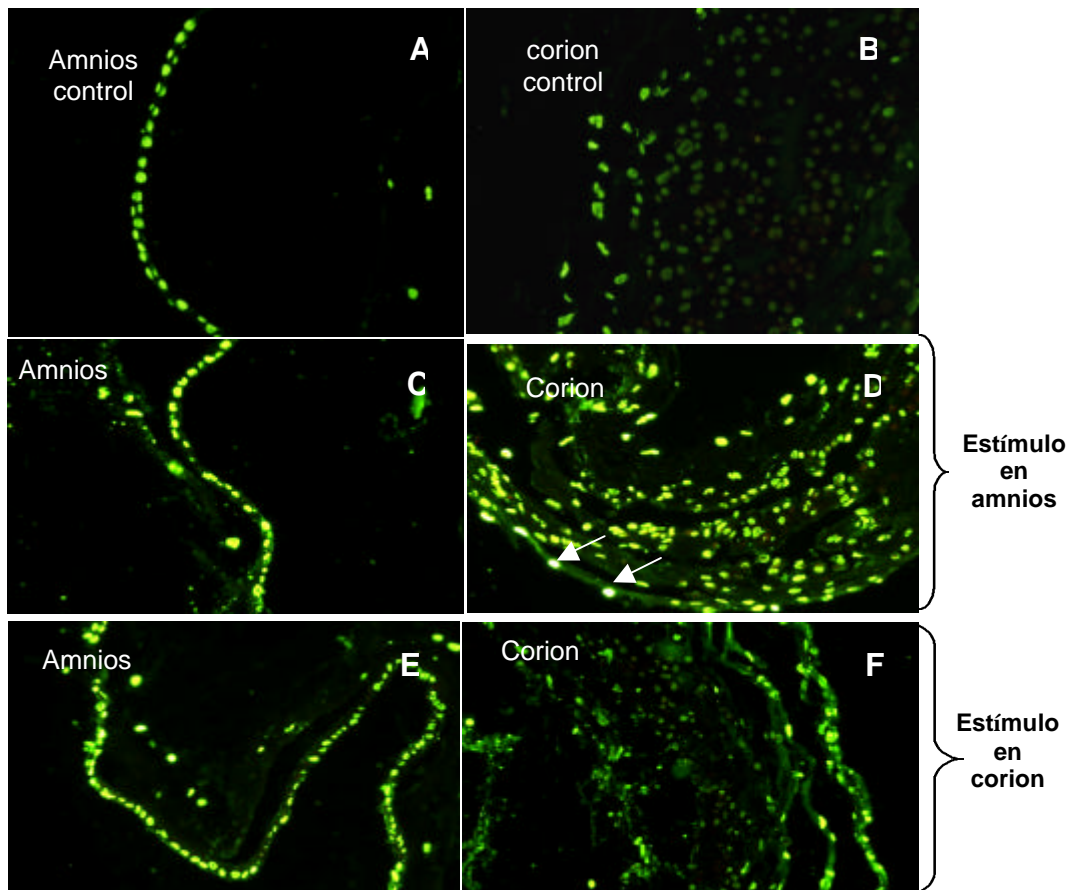


Figura 20 Inmunomarcado de extremos 3'OH libres de DNA en células de amnios y corion de MCH por el método de TUNEL. A, B, amnios y corion de MCH de cesárea en cultivo sin ningún estímulo; C, D, MCH estimuladas por el amnios y E, F, MCH estimuladas por el corion con 1×10^6 UFC de *S. agalactiae*. Las células positivas se muestran con una flecha blanca.

9.2.5 Patrón de fragmentación

La fragmentación del DNA es la segmentación del núcleo, en la cual se rompe el DNA cromosomal en oligómeros de 180-200 pb. El patrón de fragmentación se analizó en MCH después del estímulo diferencial con *S. agalactiae*, la prueba mostró que ni amnios ni coriodecidua muestran fragmentación de DNA (Figura 21).

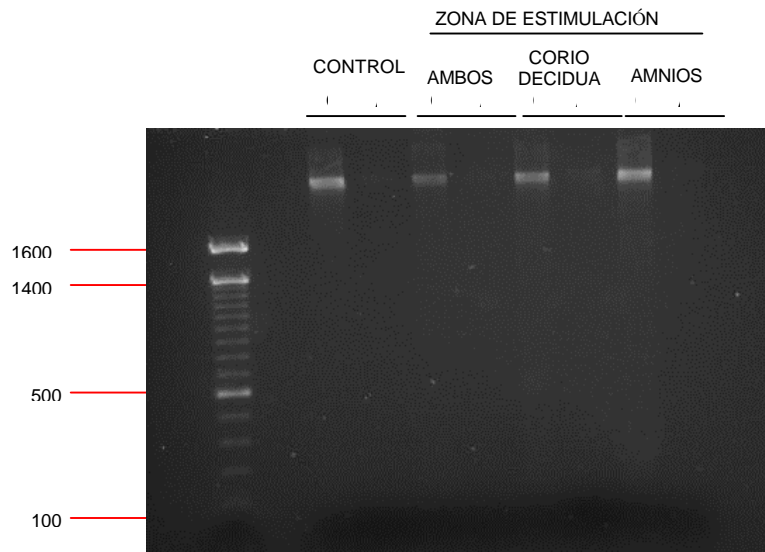


Figura 21. Patrón de fragmentación de DNA después de la estimulación diferencial de MCH con 1×10^6 UFC de *S. agalactiae*. C, coriodecidua; A, amnios.

9.2.6 Inmunohistoquímica para p53

Se analizó la proteína pro-apoptótica p53 en MCH después del estímulo diferencial con *S. agalactiae* por inmunohistoquímica. Tanto coriodecidua como amnios mostraron inmunoreactividad para p53 en todas las modalidades de estimulación, comparadas con el control (membrana sin estímulo), además se incluyó un control negativo de MCH con ruptura prematura (sin anticuerpo primario) (Figura 22).

P53

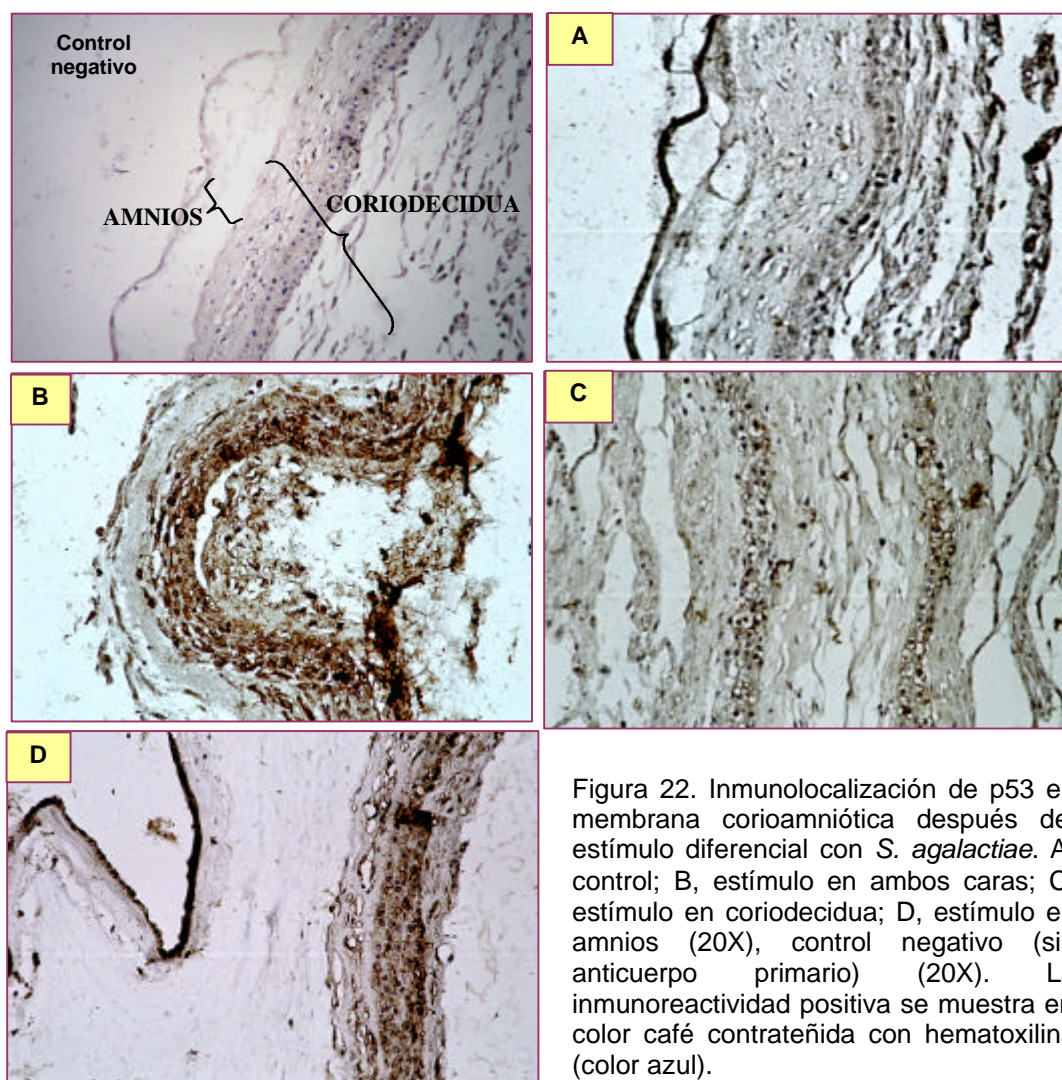


Figura 22. Inmunolocalización de p53 en membrana corioamniótica después del estímulo diferencial con *S. agalactiae*. A, control; B, estímulo en ambos caras; C, estímulo en coriodecidua; D, estímulo en amnios (20X), control negativo (sin anticuerpo primario) (20X). La inmunoreactividad positiva se muestra en color café contrateñida con hematoxilina (color azul).

9.2.7 Inmunohistoquímica para Bax

Se analizó la proteína pro-apoptótico Bax en MCH después del estímulo diferencial con *S. agalactiae* por inmunohistoquímica. Tanto coriodecidua como amnios mostraron inmunoreactividad para Bax en todas las modalidades de estimulación comparadas con el control (membrana sin estímulo), además se incluyó un control negativo de MCH con ruptura prematura (sin anticuerpo primario) (Figura 23).

Bax

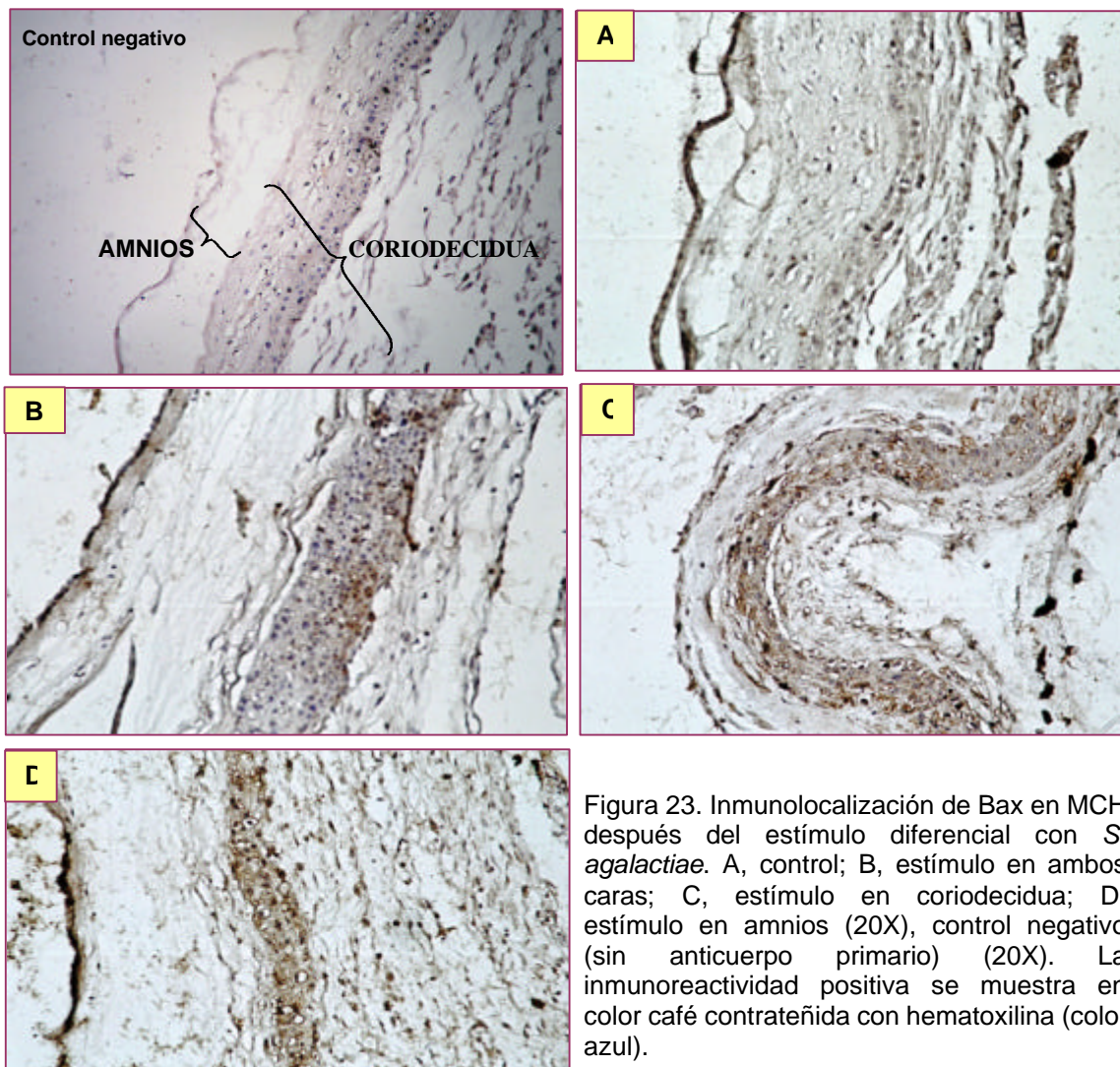


Figura 23. Inmunolocalización de Bax en MCH después del estímulo diferencial con *S. agalactiae*. A, control; B, estímulo en ambas caras; C, estímulo en coriodecidua; D, estímulo en amnios (20X), control negativo (sin anticuerpo primario) (20X). La inmunoreactividad positiva se muestra en color café contrateñida con hematoxilina (color azul).

9.2.8 Inmunohistoquímica para Bcl-2

Se analizó la proteína anti-apoptótica Bcl-2 en MCH después del estímulo diferencial con *S. agalactiae* por inmunohistoquímica. Tanto coriodecidua como amnios mostraron inmunoreactividad para Bcl-2 en todas las modalidades de estimulación comparadas con el control (membranas sin estímulo), además se incluyó un control negativo MCH con ruptura prematura (sin anticuerpo primario) (Figura 24).

Bcl-2

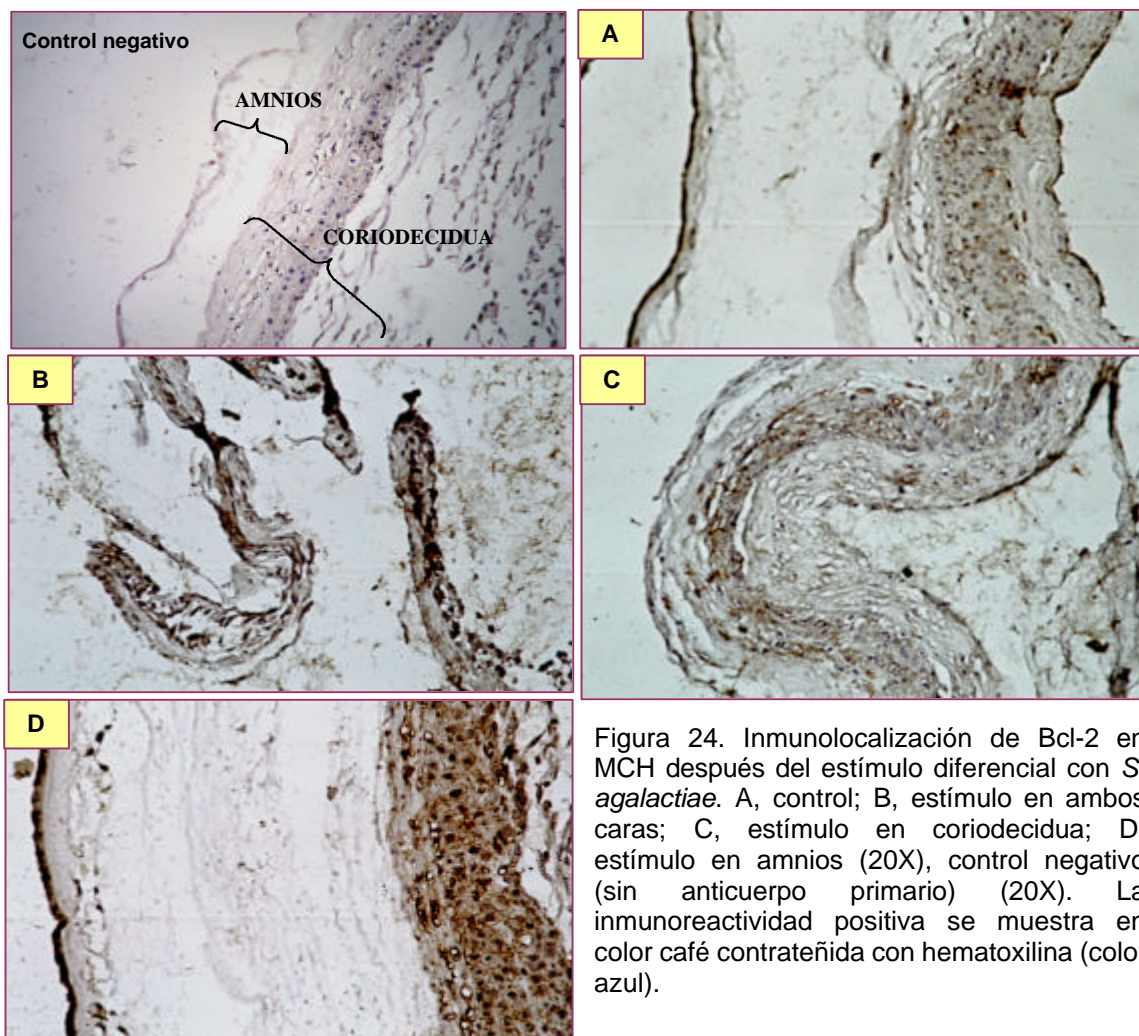


Figura 24. Inmunolocalización de Bcl-2 en MCH después del estímulo diferencial con *S. agalactiae*. A, control; B, estímulo en ambas caras; C, estímulo en coriodecidua; D, estímulo en amnios (20X), control negativo (sin anticuerpo primario) (20X). La inmunoreactividad positiva se muestra en color café contrateñida con hematoxilina (color azul).

9.2.9 Viabilidad postratamiento con *Streptococcus agalactiae*

Después de la estimulación diferencial de MCH con el *S. agalactiae* se determinó la viabilidad de MCH. Se observó que no hay cambio en la viabilidad de las membranas después del estímulo diferencial con *S. agalactiae* (Figura 25).

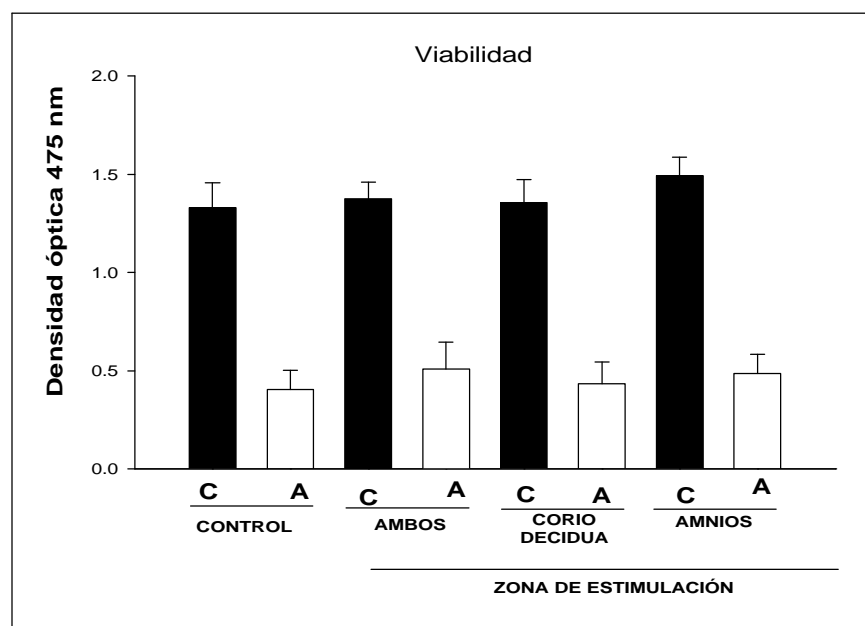


Figura 25. Viabilidad de MCH después del estímulo diferencial con *S. agalactiae* (n=4). C, corio-decidua; A, Amnios.

9.2.10 PCR GADPH, p53 y bcl-2

Una vez terminada la amplificación, se realizó una separación por electroforesis para verificar la amplificación del producto esperado. Se cargaron 10 μ l de cada una de las muestras (Figura 26).

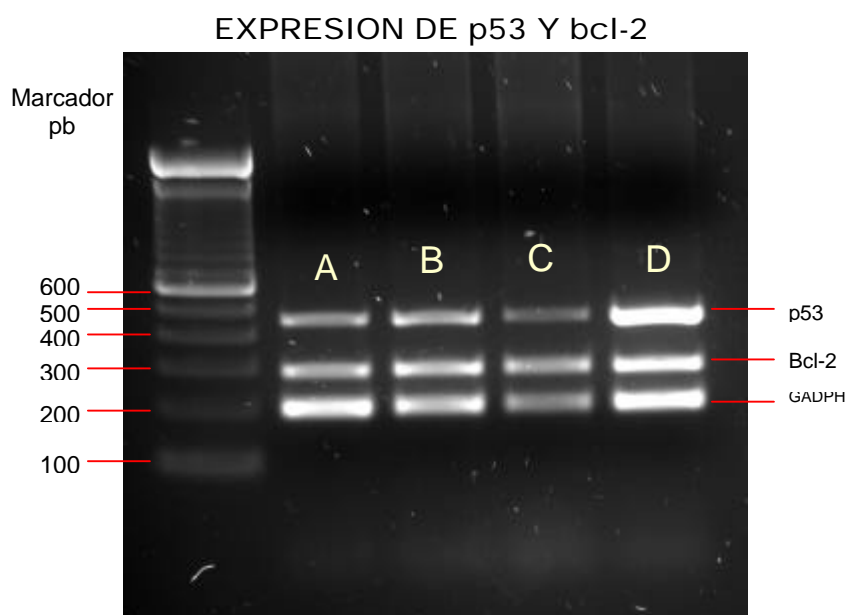


Figura 26. Expresión de genes pro-apoptótico (p53) y anti-apoptótico (bcl-2) en explantes de MCH después de la estimulación con distintos tratamientos; A, control; B, tratamiento con 10 ng de TNF- α ; C, tratamiento con 100 ng de TNF- α ; D, tratamiento con 1×10^6 UFC de *S. agalactiae*.

Se realizó un análisis densitométrico de las bandas obtenidas por electroforesis, las cuales fueron corregidas con las bandas de GADPH. Tanto la expresión de p53 como la de bcl-2 en MCH estimuladas con TNF- α y 10×10^6 UFC de *S. agalactiae* no muestra diferencia significativa (Figura 27).

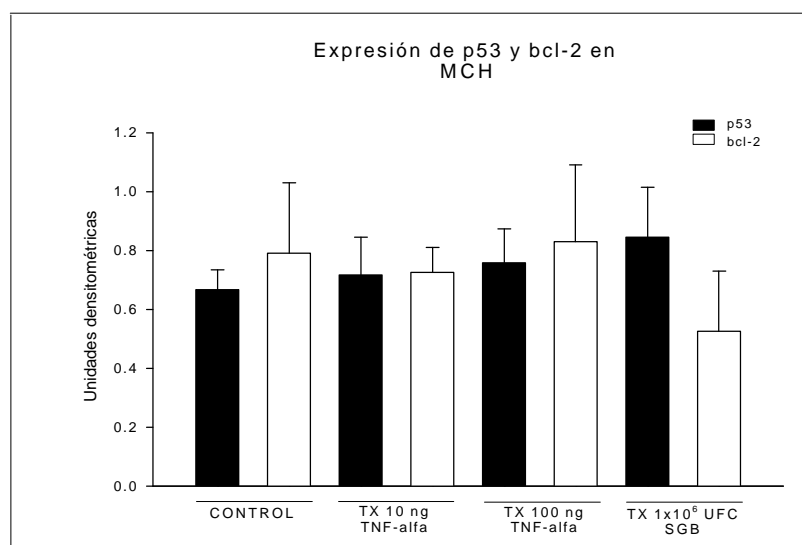


Figura 27. Análisis densitométrico de la expresión de p53 (n=6) y bcl-2 (n=2) en MCH estimuladas con 10 ng de TNF- α , 100 ng de TNF- α y 1×10^6 UFC de *S. agalactiae*.

10 DISCUSIÓN

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

Existen una serie de datos clínicos y experimentales que soportan la hipótesis de que una infección que comienza en el área cérvico-vaginal, puede ganar acceso hasta la cavidad intrauterina mediante una invasión ascendente que progresa a través del cérvix hasta alcanzar la coriodecidual materna y las membranas corioamnióticas (Romero y Cols., 1988).

El objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto que tiene la estimulación selectiva de las MCH con *Streptococcus agalactiae*, microorganismo patógeno de mayor prevalencia asociado al desarrollo de procesos infecciosos a nivel cérvico-vaginal y/o intrauterino.

Dos marcadores funcionales relacionados con el mecanismo fisiopatogénico de la RPM fueron estudiados: a) la secreción y actividad de la MMP-9, enzima cuya secreción y actividad se incrementa significativamente justo antes del inicio del trabajo de parto en el humano y que está asociada con

el incremento en la degradación de MEC en las MCH (Vadillo y Cols., 1995) y b) la síntesis y localización celular de, tres proteínas reguladoras de la muerte celular por apoptosis p53, Bcl-2 y Bax (Sagol y Cols., 2002).

Para poder abordar en forma integral nuestro objetivo utilizamos un modelo experimental previamente validado en nuestro laboratorio, el cual nos permite estimular diferencialmente las distintas regiones de las MCH y estudiar la respuesta individual del amnios y del corion en función de distintos marcadores funcionales.

Si bien este modelo ha sido ya previamente validado para distintos marcadores proinflamatorios (Zaga y Cols., 2004), para el desarrollo del presente proyecto fue necesario validarlo en función de la síntesis e inmunolocalización de p53, Bax y Bcl-2 así como de la síntesis, secreción y actividad de la MMP-9 y determinar el momento adecuado para estimular las MCH con la bacteria.

Para garantizar la viabilidad del tejido utilizado en el modelo, desarrollamos una prueba de función metabólica (XTT) que demostró que las membranas requieren de 24 h para estabilizarse en el cultivo, después de este periodo tanto la coriodecidea como el epitelio amniótico se mantienen sin cambios significativos hasta por 96 h.

Una prueba ampliamente utilizada para observar la magnitud en el daño a nivel nuclear, es la fragmentación en escalera del DNA genómico, esta prueba mostró que dicha fragmentación no se presenta a lo largo de las 96 h de cultivo. La evaluación de estos resultados indicó que el tiempo ideal para estimular a las membranas es de 24 h de cultivo, lo que significó un cambio metodológico importante; ya que de esta manera podemos garantizar que trabajamos un tejido estable, viable y funcional.

En este estudio se incluyeron tres diferentes condiciones de estimulación en las membranas con *Streptococcus agalactiae*; las cuales semejan distintos escenarios clínicos: (1) los microorganismos arriban a la coriodecidua a través de la colonización ascendente (infección en la coriodecidua); (2) el microorganismo llega al amnios por introducción iatrogénica durante amniocentesis (infección en el amnios); (3) el microorganismo esta en contacto con ambos lados de las membranas en las etapas finales de la colonización, el cual es capaz de atravesar las membranas (infección en coriodecidua y amnios).

La MMP-9 y la MMP-2 son dos enzimas a las que se les han atribuido papeles claves en el mecanismo fisiopatogénico de la RPM y del trabajo de parto normal y fisiológico. El aumento en la síntesis, secreción y actividad de estas enzimas esta asociado con el incremento en los procesos degradativos de los distintos elementos de la MEC que conforman a las membranas fetales. La pérdida en la continuidad estructural de las membranas parece ser un

prerrequisito para su ruptura (Zaga y Cols., 2006), adicionalmente ha sido asociada con el debilitamiento y disminución de la elasticidad en MCH infectadas (Fortunato y Cols., 2000b; Vadillo-Ortega y Cols., 2002).

Existe controversia sobre si el incremento de estas gelatinasas se encuentra asociado con la disminución en la concentración de sus inhibidores tisulares TIMP-1 y TIMP-2, (Fortunato y Cols., 2000b), sin embargo, una constante en estos estudios es la perdida del equilibrio estequiométrico entre MMPs y TIMPs (Fortunato y Cols., 1999), que inclina la balanza hacia una degradación aumentada de la MEC (Garcia-Lopez y Cols., 2007).

Nuestros resultados muestran que la estimulación con *Streptococcus agalactiae* permitió caracterizar el papel activo que juegan ambas regiones en la síntesis y secreción de MMP-9, enzima que si bien fue secretada tanto por la cara fetal como materna, fue en esta última la que desplegó el mayor incremento; ya que respondió tanto al estímulo directo, como a las señales enviadas por el amnios cuando éste fue estimulado; lo que puede tener un sentido fisiológico importante ya que la coriodecicua es la primera región que entra en contacto con la bacteria que asciende desde el cervix.

Por otro lado, los ensayos de ELISA no permitieron identificar la existencia de cambios significativos en los niveles de enzima activa en el medio de cultivo; sin embargo, es claro un daño tisular masivo, lo que únicamente

puede ser resultado de la acción de la forma activa de esta enzima. Una explicación posible tiene que ver con la alta afinidad que la MMP-9 tiene por su sustrato, lo que implicaría que la forma activa de la MMP-9 estuviese en estrecha asociación con el tejido y este hecho explicaría por que no encontrarla secretada en el medio, fenómeno que ha sido ya demostrado después del estímulo de MCH con Lipopolisacarido (Garcia-Lopez y Cols., 2007).

Existen antecedentes que postulan que el incremento de la muerte celular por apoptosis puede contribuir a la reducción en la celularidad, mediada y acelerada en gran parte por los diferentes reguladores proinflamatorios que son producidos en respuesta a la infección (Menon y Cols., 2002; Fortunato y Memon, 2003). El amnios y el corion humanos obtenidos de membranas a término con RPM tienen más células apoptóticas en las áreas adyacente del sitio de ruptura que en otras áreas de las membranas (Leppert, 1996, McLaren y Cols., 1999, Vadillo y Cols., 1998b).

En este trabajo utilizando el método de TUNEL pudimos observar que tanto el amnios como la coriodecidua mostraban muy poco inmunomarcaje de DNA con extremos 3´OH después de la estimulación diferencial con *S. agalactiae* (Figura 20), sin embargo no fue posible correlacionar en forma consistente y significativa este incremento, observaciones similares han sido reportadas previamente por otros grupos de investigación (Yasuda y Cols., 1995, Kraupp y Cols., 1995).

La familia del gene supresor de tumores p53 y la familia del gene bcl-2 juegan un papel importante en la regulación de la apoptosis. La familia de bcl-2 consiste de tres genes (bcl-2, bax y bcl-x). bcl-2 es un prooncogene y específicamente inhibe la apoptosis, mientras que bax la acelera al igual que p53 (Spencer, 1996).

Nuestros resultados muestran que la estimulación de las MCH con la bacteria incrementa en forma importante la inmunolocalización tanto de las moléculas pro-apotóticas (p53, Bax) como la anti-apotóticas (Bcl2), esta aparente compensación pudiera explicar el hecho de que el índice apoptótico antes y después del tratamiento no cambiara en forma significativa. Otros indicios de que la infección no modificó en forma importante la viabilidad del tejido los tuvimos después de los estudios histológicos, que si bien mostraban una pérdida en la continuidad estructural por la degradación de matriz extracelular, no fue posible identificar una disminución sensible en la celularidad ni del epitelio amniótico ni en la población del trofoblasto del corion. Adicionalmente el patrón de corrimiento de DNA genómico fue prácticamente idéntico al de el DNA proveniente de tejido control.

Estos resultados parecen contraponerse con varios reportes que indican que la apoptosis es un mecanismo que contribuye a la ruptura de las MCH tanto en condiciones fisiológicas (Arechavaleta-Velasco y cols., 2002a; Fortunato y cols., 2001) como patológicas (Arechavaleta-Velasco y Cols., 2002b; Menon y

Cols., 2002, 1995); sin embargo, nosotros suponemos que en el caso específico del *Streptococcus agalactiae* el daño sobre el corioamnios descansa mayoritariamente sobre la degradación de distintos elementos de la MEC y no sobre una disminución importante en el número de células viables.

De estos resultados es difícil concluir categóricamente que la apoptosis no juega un papel clave en un proceso infeccioso de esta naturaleza, por lo que el siguiente paso debería ser el análisis de la regulación de la expresión génica de estos marcadores (p53, Bax y bcl-2). Con el objetivo de aportar pruebas con mayor valor cuantitativo que pongan en su justo contexto la contribución de la apoptosis en el mecanismo fisiopatogénico de la infección en un tejido como las MCH, cuya correcta función y viabilidad es clave para el mantenimiento del privilegio inmunológico y endocrinológico del que goza el producto durante toda la gestación.

11 CONCLUSIONES

- ⇒ LA MMP-9 ES PARTE DE LA MAQUINARIA ENZIMÁTICA RESPONSABLE DE LA DEGRADACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR ASOCIADA AL DEBILITAMIENTO ESTRUCTURAL DE LAS MEMBRANAS CORIOAMNIÓTICAS HUMANAS ESTIMULADAS DIFERENCIALMENTE CON *Streptococcus agalactiae*.

- ⇒ INDEPENDIENTEMENTE DE LA ZONA INICIAL DE CONTACTO CON LA BACTERIA, LA ZONA CORIODECIDUAL ES LA MÁS ACTIVA EN LA SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE LA MMP-9.

- ⇒ LA EXPOSICIÓN CON EL *Streptococcus agalactiae* SE TRADUCE EN LA DEGRADACIÓN MASIVA DE LA ZONA COMPACTA DEL AMNIO QUE PROVOCA UNA DISCONTINUIDAD ESTRUCTURAL ENTRE ESTA ZONA Y LA CAPA DE TROFOBLASTOS DEL CORION.

- ⇒ LAS MCH INCREMENTAN SU INMUNOREACTIVIDAD PARA p53, Bax y Bcl-2) DESPUÉS DE LA ESTIMULACIÓN DIFERENCIAL CON *Streptococcus agalactiae*, SIN EMBARGO, ESTO NO SE TRADUCE EN EL INCREMENTO SIGNIFICATIVO DEL ÍNDICE APOPTÓTICO NI EN EL DAÑO A NIVEL DE DNA GENOMICO.

⇒ EL MECANISMO DE DAÑO DEL *Streptococcus agalactiae* SOBRE LAS MCH PARECE ESTAR DIRIGIDO HACIA EL INCREMENTO EN LA TASA DE DEGRADACIÓN DE LOS DISTINTOS ELEMENTOS DE LA MEC Y NO HACIA UNA DISMINUCIÓN EN LA CELULARIDAD DEL AMNIOS O DE LA CORIODECIDUA.

12 BIBLIOGRAFÍA

- Alger L.S., Lovchik J.C., Heber J.R., Blackmon L.R., Crenshaw C.: The association of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, and streptococci with preterm rupture of the membranes and pregnancy outcome. Am J Obstet Gynecol 1988; 159:397-404.
- Arechavaleta-Velasco F., Mayon-González J., González-Jimenez M., Hernández-Guerrero C., Vadillo-Ortega F. Association of type II apoptosis and 92-kDa type IV collagenase expression in human amniochorion in prematurely ruptured membranes with tumor necrosis factor receptor-1 expression. J Soc Gynecol Investig 2002b; 9:60-67.
- Arechavaleta-Velasco F., Ogando D., Parry S., Vadillo-Ortega F.: Production of matrix metalloproteinase-9 in lipopolysaccharide stimulated human amnion occurs through an autocrine and paracrine proinflammatory cytokine-dependent system. Biol Reprod 2002a; 67:1952-1958.
- Asrat T. Intra-amniotic infection in patients with preterm labor rupture of membranes. Pathophysiology, detection and management. Clinic Perinatol 2001; 28:735-51.
- Athayde N., Romero R., Maymon E., Gomez R., Pacora P., Yoon B.H., Edwin S.S.: Interleukin 16 in pregnancy, parturition, rupture of fetal

membranes, and microbial invasion of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182(1 pt 1):135-41.

- Bell S.C., Malak T.M. Structural and cellular biology of the fetal membranes. En: Elder, M.G., Romero R., Lamont R.F., (Eds.) *Preterm Labor*, Churchill Livingstone, New York, USA, 1997 pp 401-428.
- Bou-Resli M. N., Al-Zaid N. S., Ibrahim MEA.: Full-term and prematurely ruptured fetal membranes. An ultrastructural study. *Cell Tissue Res* 1981; 220:263-78.
- Bradford M.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.
- Bryant-Greenwood G.D.: The extracellular matrix of the human fetal membranes: structure and function. *Placenta*. 1998; 19(1):1-11.
- Casey M. L., MacDonald P. C.: Interstitial collagen synthesis and processing in human amnion: a property of the mesenchymal cells. *Biol Reprod* 1996; 55:1253-1260.

- Casey M.L., McDonald P.C.: Biomolecular processes in the initiation of parturition: decidual activation. *Clin Obstet Gynecol* 1988; 31:533-552.
- Challis John R.G., Matthews Stephen G., Gibb William, y Lye Stephen J.: Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm. *Endocr Rev* 2000 21(5): 514-550.
- Creatsas G., Palvlatos M., Lolis D., Aravantinos D., Kaskarelis D.: Bacterial contamination of the cervix and premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1981; 139:522-525.
- Draper D., McGregor J., Hall J., Jones W., Heine P., Porreco R.: Elevated protease activities in human amnion and chorion correlate with preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173:1506-1512.
- Eschenbach D.: Amniotic fluid infection is a fetal infection. *Prenat Neonat Med* 1998; 3:76-81.
- Espinoza J., Chaiworapongsa T., Romero R., Edwin S., Rathnasabapat C., Gomez R., Bujold E., Camacho N., Kim YM., Hassan S., Blackwell S., Whitty J., Berman S., Redman M., Yoon BH., Sorokin Y.: Antimicrobial peptides in amniotic fluid: defensins, calprotectin and bacterial/permeability-

increasing protein in patients with microbial invasion of the amniotic cavity, intra-amniotic inflammation, preterm labor and premature rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2003; 13:13(1)2-21.

- Fortunato S. J. Menon R., Lombarda S. J.: Support for an infection-induced apoptotic pathway in human fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184:1392-8.
- Fortunato S. J. Rambkumar M, Bryant C., Lombardi SJ. Lombarda S J.: Programmed cell death (apoptosis) as a possible pathway to metalloproteinase activation and fetal membrane degradation in premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2000a; 182:1468-76.
- Fortunato S. J., Menon R., Lobarti S. J.: Amniochorion gelatinase-gelatinase inhibitor imbalance *in vitro*: a posible infectious pathway to ruptura. *Obstet Gynecol* 2000b; 95(2):240-244.
- Fortunato S. J., Menon R., Lombarda S. L.: MMP/TIMP imbalance in amniotic fluid during PROM: an indirect support for endogenous pathway to membrane rupture. *J Perinat Med* 1999; 27:362-368.

- Fortunato S.J., Menon R, Lombardi S.J.: Collagenolytic enzymes (gelatinases) and their inhibitors in human amniochorionic membrane. Am J Obstet Gynecol 1997; 177:731-741.
- Fortunato S.J., Menon R., Lombardi S.J.: Role of tumor necrosis factor- α in the premature rupture of membranes and preterm labor pathways. Am J Obstet Gynecol 2002; 187:1159-1162.
- Fortunato S.J., Menon R.: IL-1 beta is a better inducer of apoptosis in human fetal membranes than IL-6. Placenta. 2003; 24(10):922-8.
- Fortunato S.J. Ramkumar M Kenneth FS. II: Expression of TNF- α and TNFR p55 in cultured amniochorion. Am J Reprod Immun 1994; 32:188-193.
- 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; 13:409-418.
- Gerlier D., Thomasset N.: Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. J. Immunol. Methods. 1986; 94(1-2):57-63.

- Gomez R., Romero R., Edwin S.S., David C.: Pathogenesis of preterm labor and preterm premature rupture of membranes associated with intraamniotic infection. *Infect Dis Clin North Am* 1997; 11:35-176.
- Gravett M. G., Witkin S. S., Novy K. J.: A Nonhuman primate model for chorioamnionitis and preterm labor. *Sem Reprod Endocrinol* 1994; 15:210-224.
- Greig P.C: The diagnosis of intrauterine infection in women with preterm premature rupture of the membranes (PPROM). *Clin Obstet Gynecol* 1998; 41:849-863.
- Heddleston L., McDuffie RS, Gibbs R.S.: A rabbit model for ascending infection in pregnancy: intervention with indomethacin and delayed ampicillin-sulbactam therapy. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169:708-712.
- Hersh D., Weiss J., Zychlinsky A.: How bacteria initiate inflammation: aspects of the emerging story. *Curr Opin Microbiol* 1998; 1:43-48.
- Hsu C.D., Meaddough E., Aversa K. Hong S. F., Lu L. C., Jones D. C., Copel J. A.: Elevated amniotic fluid levels of leukemia inhibitory factor, interleukin 6, and interleukin 8 in intra-amniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179: 1267-1270.

- Katsura M., Ito A., Hirakawa S., Mori Y.: Human recombinant interleukin-1 β increases biosynthesis of collagenase and hyaluronic acid in cultured human chorionic cells. *FEBS letters* 1989; 244:315-318.
- Kawakami A., Eguchi K., Matsuoka N., Tsuboi M., Kawabe Y., Ishikawa N., Ito K., Nagataki s.: Thyroid-stimulating hormona inhibits Fas antigen-mediated apoptosis of human thyrocytes in Vitro. *Endocrinology* 1996; 137(8):3163-9.
- Kraupp B.G., Ruttkay-Nedecky B., Koudelka H., et al: *In situ* detection of fragmented DNA TUNEL assay fails to discriminate among apoptosis, necrosis and autolytic cell death: A cautionary note. *Hepatology* 1995; 21:1465-8.
- Lei H., Furth E.E., Kalluri R., Chiou, Tilly K.I., Tilly J.L., Elkon K.B., Jeffrey J.J., Strauss III J.F.: A program of cell death an extracellular matrix degradation is actived in the amnion before the onset of labor. *J Clin Invest* 1996; 98:1971-78.
- Leppert P.C., Takamot N., Yu S.Y.: Apoptosis in fetal membranes may predispose them to rupture. *J Soc Gynecol Invest* 1996; 3:128-30.

- Locksmith G. J., Clark P., Duff P., Schultz G. S.: Amniotic fluid matrix metalloproteinase-9 levels in women with preterm labor and suspected intra-amniotic infection. *Obstet Gynecol* 1999; 94:1-6.
- Malak T. M. Mulholland G., Bell S. C.: Morphometric characteristics of the deciduas, cytotrophoblast, and connective tissue of the prelabor ruptured fetal membranes. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 734:430-433.
- Malak T.M., Bell S.C.: Structural characteristics of term human fetal membranes: A novel zone of extreme morphological alteration with the rupture site. *Br J Obstet Gynecol* 1994; 101:375-86.
- 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: 385-406.
- Maymon E., Romero R., Pacora P., Gervasi M.T., Gomez R., Edwin S.S., Yoon B.H.: Evidence of in vivo differential bioavailability of the active forms of matrix metalloproteinases 9 and 2 in parturition, spontaneous rupture of membranes, and intra-amniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183:887-894.

- McDonald H.M., O'Loughlin J.A., Jolley P.T., Vigneswaran R., Mc Donald P.J.: Changes in vaginal flora during pregnancy and association with preterm birth. *J Infect Dis* 1994; 170:724-728.
- McGregor J. A., French J. I., Parker R., Draper D., Patterson E., Jones W., Thorsgard K., McFee J.: Prevention of premature birth by screening and treatment for common genital tract infections: Results of a prospective controlled evaluation. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173:157-167.
- McGregor J. A., French J. I.: Bacterial vaginosis in pregnancy. *Obstet Gynecol Surv* 2000; 55 (5 suppl): S1-S19.
- McGregor J. A., French J.I., Jones W., Parker R., Patterson E., Draper D.: Association of cervicovaginal infections with increased vaginal fluid phospholipase A2 activity. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167:1588-1594.
- McGregor J. A., Lawellin D., Franco-Buff A., Todd J.K., Makawski L.: Protease production by microorganisms associated with reproductive tract infection. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 154:109-114.
- McLaren J., Taylor DJ., Bell SC.: Increased incidence of apoptosis in non-labour affected cytotrophoblastic cells in term fetal membranes overlying the cervix. *Human Reprod* 1999; 14:2895-900.

- Menon R. and Fortunato S.J.: The role of matrix degrading enzymes and apoptosis in rupture of membranes. *J Soc Gynecol Investig* 2004; 11:427-37.
- Menon R., Lombardi S. J., Fortunato S. J.: TNF-alpha promotes caspase activation and apoptosis in human fetal membranes. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2002; 19(4):201-4.
- Menon R., Swan K.F., Lyden T.W., Rote N.S., Fortunato, S.J.: Expression of inflammatory cytokines (interleukin-1 β and interleukin-6) in amniochorionic membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172:493-500.
- Mitchel M. D., Branch D. W., Lundin-Schiller S., Romero R. J., Daynes R.A., Dudley D. J.: Immunologic aspects of preterm labor. *Sem Perinal* 1991; 15:210-224.
- Newton E. R., Clark M.: Group B streptococcus and preterm rupture of membranes. *Obstet Gynecol* 1988; 71:198-202.
- Oltvai Z. N., Milliman C. L., Korsmeyer S. J.: Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74:609-19.

- Parry S., Strauss J.F.: Premature rupture of the membranes. *N Engl Me* 1998; 338(10):663-70.
- Reed J.C.: Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994; 124:1-6.
- Reisenberger K., Egarter C., Kñofler M., Schiebel I., Gregor H., Hirschl A.M., Heinza G., Husslein P.: Cytokine and prostaglandin production by amnion cells in response to the addition of different bacteria. *Am J. Obstet Gynecol.* 1998; 178:50-53.
- Reisenberger K., Egarter C., Schiebel I., Obermair A., Kiss H., Lehner R.: In vitro cytokine and prostaglandin production by amnion cells in the presence of bacteria. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176:981-984.
- Romero R., Espinoza J., Mazor M., Chaiworapongsa T.: The preterm parturition syndrome. En: Critchley H, Bennet P, Thornton S. (Edits). En: *Preterm birth*. London: RCOG Presss; 2004; 28-60.
- Romero R., Mazor M., Muñoz H., Gomez R., Galasso M., Sherer D.M.: The preterm labor syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 734:414-29.

- Romero R., Avila C., Santhanam U., Sehgal P. B.: Amniotic fluid interleukin-6 in preterm labor: association with labor. *J Clin Invest* 1990; 85:1392-1400.
- Romero R., Mazor M., Sepulveda W., Avila C., Copeland D., Williams J.: Tumor necrosis factor in preterm and term labor. *Am J Obstet Gynecol.* 1992; 166(5):1576-87.
- Romero R., Wu Y. K., Brody D. T., Oyarzun E., Duff G. W., Durum S. K.: Human Decidua A source of interleukin-1. *Obstet Gynecol* 1989; 73:31-34.
- Romero R., Mazor M., Wu Y.K., Sirtori M., Oyarzun E., Mitchell M.D., Hobbins J.C.: Infection in the pathogenesis of preterm labor. *Semin Perinatol*, 1988; 12:262-279.
- Runic R., Lockwood C.H., LaChapelle L., Dipasquale B., Demopoulos R. I., Kumar A., Guller S.: Apoptosis and Fas expression in human fetal membranes. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:660.66.
- Sagol S., Safgol O., Ozkal S., Asena U.: Rol of apoptosis, bcl-2 and bax protein expression in premature rupture of fetal membranes. *J Reprod Med* 2002; 47:809-815.

- Sbarra A. J., Selvaraj R.J., Cetrulo C.L., Feingold M., Newton E., Thomas G. B.: Infection and phagocytosis as possible mechanisms of rupture premature of the membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 153:38-43.
- Schoonmaker J. N., Lawellin D. w., Lunt B., McGregor J. A.: Bacteria and inflammatory cells reduce chorioamniotic membrane integrity and tensile strength. *Obstet Gynecol* 1989; 74(4):590-596.
- So T., Ito A., Sato T., Mori Y., Hirakawa S.: Tumor necrosis factor- α stimulates biosynthesis of matrix metalloproteinases and plasminogen activator in cultured human chorionic cells. *Biol Reprod* 1992;46:772-778.
- Spencer S: J., Cataldo N. A., Jaffe R. B.: Apoptosis in the human female reproductive tract. *Obstet Gynecol Surv* 1996; 51(5):314-323.
- Steiborn A., Gall C. V., Hildenbrand R., Stutte H. J., Kaufmann M.: Identification of placental cytokine-producing cells in term and preterm labor. *Obstet Gynecol* 1998; 91:329-335.
- Svanborg C., Godaly G., Hedlund M.: Cytokine responses during mucosal infection: role in disease pathogenesis and host defense. *Curr Opin Microbiol* 1999; 2:99-105.

- Tashima L. S., Millar L. K., Bryant-Greenwood G. D.: Genes upregulated in human fetal membranes by infection or labor. *Obstet Gynecol* 1999; 94:441-449.
- Tilly J. L., Kowlski K. I., Jonson A. L., Hsueh AJW.: Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology*. 1991, 129:2799-2801.
- Vadillo F., Arechavaleta F., Montoya B.: Apoptosis y degradación de matriz extracelular en corioamnios durante el trabajo de parto y en la ruptura prematura de membranas. *Ginecol Obstet Mex*. 1998b; 66:202-207.
- Vadillo-Ortega F., González-Avila G., Furth E.E., Lei H., Muschel R.J., Stetler-Stevenson W.G., Strauss J.F.: 92-kd type IV Collagenase (Matrix Metalloproteinase-9) activity in human amniochorion increases with labor. *Am J Pathol* 1995; 146:148-156.
- Vadillo-Ortega F., Hernández A., González-Avila G., Bernejo L., Iwata K., Strauss J. F.: 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* 1998a; 174:1371-1376.

- Vadillo-Ortega F., Sadowsky D., Haluska G., Hernández C., Guevara R., Gravett M., Novi M. J.: Identification of matrix metalloproteinase-9 in amniotic fluid and amniochorion in spontaneous labor and alter experimental intrauterine infection or interleukin-1 β infusion in pregnant rhesus monkeys. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186: 128-138.
- Visse R., Nagase H.: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases structure, function and biochemistry. *Cir Res.* 2003; 92:827.839.
- Watari M., Watari H., Hachamkin I., Strauss J. F.: Lipopolysaccharide induces expression of genes encoding pro-inflammatory cytokines and elastin-degrading enzyme, cathepsin S in human cervical smooth muscle cells. *J Soc Gynecol Investig* 2000; 7:190-198.
- Yasuda M., Umemura S., Osumara RY., et al: Apoptotic cells in the human endometrium and placental villi: Pitfalls in applying the TUNEL method. *Arch Histol Cytol* 1995; 58:185-90.
- Yoon B.H., Romero R., Park J.S., Chang J.W., Kim Y.A., Kim J.C., Kim K.S.: Microbial invasion of yhe amniotic cabvity with *Ureaplasma urealyticum* is associated with a robust host response in fetal, amniotic, and maternal compartments. *Am J Obstet Gynecol.* 1998; 179(5):1254-60.

- Yuan J. Transducing signals of life and death. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9:247-51.
- Zaga C.V., Merchant L.H., Garcia L.G., Maida C.R., Vadillo O.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; 13:271-9.
- 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 choriodecidua with lipopolysaccharides or group B streptococci. *Biol Reprod.* 2004; 71(4):1296-302.

13. ABREVIATURAS

ESPAÑOL

RPM: Rptura Prematura de membranas

MEC: Matriz Extracelular

MCH: Membranas Corioamnióticas Humanas.

UFC: Unidades formadoras de colonias

MMP: Metaloproteínasa de Matriz

TIMP: Inhibidor Tisular de Metaloproteínasa

MT-MMPs: Metaloproteínasas de Matrix Tipo Membrana

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa

FasL: Fas Ligando

TNF-R: Receptor del Factor de Necrosis Tumoral

IL-1 β : Interleucina-1 beta

IL-6: Interleucina-6

SFB: Suero Fetal de Bovino

HLA: Hidrolizado de Lactoalbumina

U-937: Línea Celular de promielocitos

XTT: Sal de Tetrazolio

PBS: Solución Salina amortiguada con fosfatos

DNA: Ácido Desoxiribonucleico

APMA: acetato p-aminofenilmercúrico

mRNA: Ácido ribonucleíco mensajero

RT PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa por Transcriptasa Reversa

dNTPs: deoxi-nucleotidos tri-fosfato

INGLES

ELISA: enzyme-linked immunosorbent sandwich assay

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase deoxy-UTP-nick end labeling

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

GADPH: Glyceraldehyde-3-phosphatemdehydrogenase