



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

**MECANISMOS DE ACTIVACIÓN DE LA
COLAGENASA TIPO IV DE 92 kDa EN UN
MODELO DE COCULTIVO DE LINFOCITOS Y
MEMBRANAS FETALES HUMANAS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

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

P R E S E N T A

BIOL. ARTURO ERNESTO FLORES PLIEGO

DIRECTOR DE TESIS: DR. FELIPE VADILLO ORTEGA

MÉXICO, D.F.

JUNIO 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológica, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Los estudios de Maestría fueron posibles gracias Al apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca No. 189785

Al Dr. Felipe Vadillo Ortega por todas sus enseñanzas, su motivación y su gran apoyo durante todo este tiempo, gracias.

A la Dra. Annie Pardo Semo por su disponibilidad, apoyo y aportaciones que enriquecieron este trabajo.

A la Dra. Nimbe Torres y Torres por su atenta revisión y valiosos comentarios al manuscrito.

Al Dr. Rafael Bojalil Parra por contribuir a la revisión de este manuscrito.

Al Dr. Jesús Chimal Monrroy por su confianza, atención, esmero y sus apreciables comentario.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

El trabajo de investigación de esta tesis se llevo a cabo en el laboratorio de la Dirección de Investigación del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”.

Agradezco al Dr. Felipe Vadillo Ortega quien me dio la oportunidad de trabajar a su lado, por todas las enseñanzas que he recibido tanto dentro como fuera del laboratorio, gracias por siempre estar dispuesto a esclarecer mis dudas, por compartirme de su vasto conocimiento y experiencia, con lo que las cosas se ven más sencillas, además de su valiosa amistad.

“La ciencia tiene una característica maravillosa, y es que aprende de sus errores”.

Ruy Pérez Tamayo

A mis amigos: Aurora, Héctor, Lupita, Marisol, Nardhy, Noemi, Paty, Rodrigo, Toñita, Ana, Araceli, César, Israel, José Luis, gracias por su invaluable apoyo y disposición.

“El esqueleto de la ciencia son los hechos, pero los músculos y los nervios son el significado que se les confiere, y el alma de la ciencia son las ideas”.

Ruy Pérez Tamayo

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres por siempre confiar en mí, por su ejemplo de vida, por su dedicación, por todo el amor que me dan, paciencia e infinito apoyo. Los amo.

Lalo y Sandy, por estar siempre con migo, por su amor, consejos y su respaldo incondicional en todos los sentidos.

A Esther, Emilio, Rocío, Silvia, Chelita, Alejandra, Ariadna, Víctor, Lila, por su apoyo y hacernos de la vida algo muy divertido.

ÍNDICE

	Abreviaturas	1
1.	Resumen.	2
2.	Abstract.	3
3.	Introducción.	4
4.	Antecedentes.	6
	4.1 Membranas fetales humanas.	6
	4.2 Metaloproteasas de matriz extracelular.	8
	4.3 Regulación transcripcional de MMPs.	9
	4.4 Activación de MMPs.	11
	4.5 Inhibición de la forma activa de las MMPs.	14
	4.6 Metaloproteasas de matriz extracelular, ruptura de membranas fetales humanas y RPM.	15
	4.7 Fuente celular de la MMP-9 en la ruptura de las membranas fetales humanas.	17
	4.8 Contribución del infiltrado leucocitario en la ruptura de las membranas fetales humanas.	18
5.	Justificación.	19
6.	Hipótesis.	20
7.	Objetivos.	20
	7.1 Objetivo general.	20
	7.2 Objetivos particulares.	20
8.	Diseño experimental.	21
	8.1 Diseño del estudio.	21
	8.2 Población.	21
	8.3 Criterios de inclusión.	21
	8.4 Criterios de exclusión.	21
	8.5 Análisis estadístico.	22
9.	Material y Métodos.	22
	9.1 Material biológico.	22
	9.2 Método.	23
	9.3 Estandarización del cocultivo de explantes de membranas fetales humanas.	24
	9.4 Viabilidad de las membranas fetales humanas.	25

9.5	Obtención de leucocitos placentarios.	25
9.6	Prueba de funcionalidad de las membranas fetales humanas y leucocitos placentarios.	26
9.7	Cocultivo de explantes de membranas fetales humanas con leucocitos placentarios.	26
9.8	Zimografía en gelatina.	27
9.9	Cuantificación de la MMP-9 activa en los medios de cocultivo.	27
9.2.1	Actividad específica de MMP-9.	28
9.2.2	Caracterización inicial del activador de proMMP-9 en los medios de cocultivo.	28
9.2.3	Perfil de proteasas en los medios de cocultivo.	29
9.2.4	Secreción de MMPs al medio de cocultivo.	30
9.2.5	Inhibición del activador de la MMP-9 en el cocultivo.	30
10.	Resultados.	31
10.1	Viabilidad de las membranas fetales durante el cocultivo.	31
10.2	Secreción de proMMP-9 como prueba funcional en explantes de membranas fetales humanas y leucocitos placentarios.	32
10.3	Secreción y activación de proMMP-9 en los medios del cocultivo de explantes de membranas fetales humanas y leucocitos.	34
10.4	Aumento de MMP-9 activa a las 24 h.	36
10.5	Incremento en la actividad específica de MMP-9 durante el cocultivo.	37
10.6	Activación de MMP-9 por proteasas presentes en los medios de cocultivo.	38
10.7	Representatividad de MMPs y otras familias de proteasas en los medios de cocultivo.	39
10.8	MMPs presentes en los medios de cocultivo.	40
10.9	Inhibición específica de MMP-3.	42
11.	Discusión.	44
12.	Conclusiones.	52
12.	Apéndice de técnicas.	54
13.	Bibliografía.	62

Palabras claves: MMP-9, leucocitos, placenta, membranas fetales, activación de MMPs.

ABREVIATURAS

DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco.
DMEM-HLA	Medio Eagle modificado por Dulbecco suplementado con hidrolizado de lactoalbúmina.
DMEM-SFB	Medio Eagle modificado por Dulbecco suplementado con suero fetal bovino.
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético.
ELISA	Ensayo inmuno absorbente ligado a enzimas.
HEPES	Ácido N-2-hidroxi-etil-piperazina-N'-2-etanosulfónico.
MEC	Matriz extracelular.
MF	Membranas fetales.
MMPs	Metaloproteasas de matriz extracelular.
MMP-1	Metaloproteasa de matriz extracelular-1/colagenasa intersticial
MMP-3	Metaloproteasas de matriz extracelular-3/estromelina 1
MMP-7	Metaloproteasa de matriz extracelular-7/matrilisina
MMP-9	Metaloproteasa de matriz extracelular -9/gelatinasa B
MT-MMPs	Metaloproteasas de matriz extracelular asociadas a membrana.
NEM	N-etilmaleimida.
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
RPM	Ruptura prematura de membranas.
TP	Trabajo de parto.
XTT	2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfo-fenil)-2H-tetrazolio-5-carboxinilide.

1. RESUMEN

El parto humano es resultado de múltiples eventos fisiológicos que incluyen la sincronización de las contracciones uterinas, dilatación del cérvix y la ruptura de las membranas fetales (MF). Es posible que las MF se rompan en ausencia de los eventos antes mencionados y aparezca una patología obstétrica denominada ruptura prematura de membranas (RPM). La ruptura de las MF se relaciona con la expresión y actividad anómala de una familia de enzimas denominadas metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs), donde la colagenasa tipo IV de 92 kDa (MMP-9), ha sido considerada como un marcador bioquímico del evento de ruptura de las MF. Para entender la fisiopatología de la RPM es de gran importancia estudiar los mecanismos que regulan la actividad enzimática. En este trabajo se caracterizó la cinética de secreción y activación de la MMP-9 utilizando un modelo de cocultivo de leucocitos placentarios y MF durante 12, 24, 36 y 48 h, provenientes de mujeres con embarazos a término sin trabajo de parto (TP). Se demostró la existencia de una cinética de secreción de proMMP-9 al menos hasta las 24 h en el cocultivo como producto de la interacción de las poblaciones celulares de las MF y los leucocitos, y se observó que a las 12 h, la mayoría de la enzima se encuentra como zimógeno (92 kDa), apareciendo a las 24 h una especie de MMP-9 de 82 kDa, que corresponde a la forma activa de la MMP-9, que se mantiene hasta las 48 h. El perfil de proteasas presentes en los medios de cocultivo indicó que la mayor parte de las enzimas que son secretadas correspondían a metaloproteasas, logrando cuantificar además de la MMP-9, a la MMP-1, MMP-3 y MMP-7. El ensayo mostró que el único miembro de las MMPs que se encontraba aumentado cuando se da la aparición de la forma activa de la MMP-9 era MMP-3. La adición de un anticuerpo anti MMP-3 y un inhibidor específico para MMP-3 al cocultivo, impidió la activación de la MMP-9, con lo que se determinó a la MMP-3 como uno de los posibles activadores de la proMMP-9. Estos resultados indican que la interacción de leucocitos de placenta con las poblaciones celulares de las MF antes de iniciar el TP, representa una fuente potencial de mediadores que pueden inducir la degradación del tejido conectivo, representada al menos por una cinética de secreción de MMP-9 y su posterior activación por MMP-3.

2. ABSTRACT

The human delivery is been of multiple physiologic events that include the synchronization of the uterine contractions, dilation of the cervix and the rupture of the fetal membranes (MF). it is possible that the MF breaks before in absence of the events mentioned and appear a pathology obstetric denominated premature rupture of membranes (RPM). The rupture of the MF is related with the expression and anomalous activity of a family of enzymes denominated matrix metalloproteases (MMPs), where the collagenase type IV of 92 kDa (MMP-9), it has been considered as a biochemical marker of the event of rupture of the MF. To understand the physiopathology of the RPM it is of great importance to study the mechanisms that regulate the enzymatic activity. In this work it was characterized the kinetics of secretion and activation of the MMP-9 using a model of co-culture of leukocytes from placenta and MF during 12, 24, 36 and 48 h, coming from women with pregnancies to term without childbirth work (TP). the existence of a kinetics of proMMP-9 secretion was demonstrated at least until the 24 h in the co-culture like product of the interaction of the cellular populations of the MF and the leukocytes, and it was observed that to the 12 h, most of the enzyme is as zymogens (92 kDa), appearing to the 24 h kind of a MMP-9 of 82 kDa that corresponds to the active form of the MMP-9 that stays until the 48 h. The profile of present proteases in the co-culture means indicated that most of the enzymes that you/they are secreted corresponded to matrix metalloproteases, being able to quantify besides the MMP-9, to the MMP-1, MMP-3 and MMP-7. The assay showed that the only member of the MMPs that was increased when one gives the appearance in the active way of the MMP-9 it was MMP-3. The addition of an antibody anti MMP-3 and a specific inhibitor for MMP-3 to the co-culture, impeded the activation of the MMP-9, with what was determined the MMP-3 like one of the possible activators of the proMMP-9. These results indicate that the interaction of placenta leukocytes with the cellular populations of the MF before beginning the labor, represents a potential source of mediators that you/they can induce the degradation of the tissue connective, represented at least by a kinetics of secretion of MMP-9 and its later activation by MMP-3

MECANISMOS DE ACTIVACIÓN DE LA COLAGENASA TIPO IV DE 92 kDa EN UN MODELO DE COCULTIVO DE LINFOCITOS Y MEMBRANAS FETALES HUMANAS.

3. INTRODUCCIÓN.

El parto humano es el resultado de múltiples eventos fisiológicos que incluyen al menos la sincronización de las contracciones uterinas, dilatación del cérvix y finalmente la ruptura de las membranas fetales (MF) para permitir el nacimiento del producto. No obstante, existe la posibilidad de que las MF se rompan sin que se presente ninguno de los otros eventos antes mencionados, que caracterizan el trabajo de parto normal (TP). Cuando las MF se rompen en ausencia de TP, se le denomina ruptura prematura de membranas (RPM), patología que se define como la pérdida de continuidad de las MF con salida de líquido amniótico transvaginal en ausencia de TP y se presenta en embarazos mayores de 20 semanas¹.

La RPM es un problema grave de salud, ya que condiciona un riesgo que depende de manera directa de la edad gestacional en que se presente y pone en peligro tanto la vida del producto, como la de la madre². La RPM es la causa de la tercera parte de los nacimientos prematuros que ingresan a terapia intensiva neonatal y es la responsable directa de la quinta parte de las muertes de estos neonatos³. La frecuencia con que la RPM aparece en nuestro país es al menos del 10% de todos los embarazos y en el Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes" (INPerIER), su prevalencia es alta por la naturaleza de la institución, que concentra población de riesgo elevado, alcanzando la cifra de 12% de los nacimientos⁴.

Existen aún mucha controversia en todos los ámbitos relacionados a la RPM, a pesar de que ha sido estudiada desde hace tiempo y en la actualidad se considera que su etiopatogenia es multifactorial y el mecanismo exacto que la desencadena no ha sido completamente esclarecido.

Algunas de las aportaciones al estudio de la RPM han propuesto que el mecanismo molecular relacionado con la RPM implica diversos procesos bioquímicos, entre los que se encuentran un aumento en la degradación de la colágena en el amnios de las MF⁵, la alteración morfológica en la zona cervical que se manifiesta como un adelgazamiento en la capa del trofoblasto así como en la decidua materna⁶ y la inducción de la síntesis de enzimas que degradan la matriz extra celular (MEC)⁷.

El aumento en la actividad colagenolítica de las MF para facilitar la su ruptura, ha sido relacionado con la actividad anormal de una familia de enzimas denominadas metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs), que se expresan en el amnios y en la coriodecidua, siendo las responsables de inducir la degradación de forma selectiva de los componentes de la MEC de las MF. La expresión y actividad de estas enzimas, fuera de sincronía con otros eventos del TP podrían explicar la RPM⁸.

Además se considera que la RPM es el resultado de una compleja red de señalizaciones, poco caracterizada entre poblaciones celulares que se localizan en la interfase entre la madre y los tejidos fetales es decir entre las MF, la placenta y la decidua⁹. Esto solo parece una explicación parcial del problema, ya que debe existir un mecanismo asociado a la degradación de los diferentes tipos de colágenas que contienen las MF que permite la activación de estas enzimas en el tejido y de esta manera pueda darse una disminución en la fuerza ténsil de las MF, lo que sumado permita la ruptura de las MF.

Estudios previos han demostrado la actividad de algunas metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs) en el líquido amniótico y su expresión en las membranas fetales durante el trabajo de parto o en la RPM y su probable papel en el desarrollo de la ruptura de las MF. Se han detectado la presencia de colagenasa intersticial (MMP-1)¹⁰, estromelisina 1, 2 y 3 (MMP-3, -10 y -11)¹¹, matrilisina (MMP-7)¹² y la colagenasa tipo IV de 92 kDa o MMP-9¹³, que es una enzima que se expresa de manera selectiva hacia el final de la gestación, por lo que ha sido postulada como un marcador bioquímico del evento de ruptura⁷.

Así mismo, la identificación de los inhibidores tisulares específicos para estas MMPs, conocidos como TIMPs y su determinación cuantitativa han contribuido a postular que en el momento final de la gestación, previo a la ruptura de las membranas, se genera una combinación entre las MMPs y los TIMPs que promueve la proteólisis de las MF y que se manifiesta con mayor expresión y activación de las MMPs y disminución en la concentración tisular de los TIMPs¹⁴.

La familia de las MMPs es secretada al espacio extracelular en forma de enzimas latentes, las cuales requieren ser activadas por diferentes mecanismos para poder llevar a cabo su actividad proteolítica¹⁵. Hasta la fecha, el mecanismo fisiológico de activación de las MMPs en los diferentes tejidos es desconocido y en relación a lo que sucede durante el trabajo de parto normal o patológico, se desconoce en su totalidad. En este sentido, el evento de ruptura de las membranas constituye un modelo natural en el que se puede analizar la activación obligada de esta familia de enzimas en un espacio de tiempo muy circunscrito. En este trabajo se aborda la identificación inicial de un mecanismo de activación de MMPs, tomando en consideración las condiciones que se supone rodean a las membranas fetales durante el trabajo de parto.

4. ANTECEDENTES.

4.1 MEMBRANAS FETALES HUMANAS.

Las MF están formadas por dos tejidos, el amnios y el corion, que se encuentran superpuestos uno al otro, formando una unidad estructural y funcional. Ambos tejidos los constituyen diferentes tipos celulares, entre ellos, células epiteliales, inmunológicas y trofoblasto, que se encuentran embebidos en una matriz extracelular en donde el mayor constituyente es la familia de las colágenas¹⁶. La placenta y las MF son estructuras altamente organizadas que

Así mismo, la identificación de los inhibidores tisulares específicos para estas MMPs, conocidos como TIMPs y su determinación cuantitativa han contribuido a postular que en el momento final de la gestación, previo a la ruptura de las membranas, se genera una combinación entre las MMPs y los TIMPs que promueve la proteólisis del las MF y que se manifiesta con mayor expresión y activación de las MMPs y disminución en la concentración tisular de los TIMPs¹⁴.

La familia de las MMPs es secretada al espacio extracelular en forma de enzimas latentes, las cuales requieren ser activadas por diferentes mecanismos para poder llevar a cabo su actividad proteolítica¹⁵. Hasta la fecha, el mecanismo fisiológico de activación de las MMPs en los diferentes tejidos es desconocido y en relación a lo que sucede durante el trabajo de parto normal o patológico, se desconoce en su totalidad. En este sentido, el evento de ruptura de las membranas constituye un modelo natural en el que se puede analizar la activación obligada de esta familia de enzimas en un espacio de tiempo muy circunscrito. En este trabajo se aborda la identificación inicial de un mecanismo de activación de MMPs, tomando en consideración las condiciones que se supone rodean a las membranas fetales durante el trabajo de parto.

4. ANTECEDENTES.

4.1 MEMBRANAS FETALES HUMANAS.

Las MF están formadas por dos tejidos, el amnios y el corion, que se encuentran superpuestos uno al otro, formando una unidad estructural y funcional. Ambos tejidos los constituyen diferentes tipos celulares, entre ellos, células epiteliales, inmunológicas y trofoblasto, que se encuentran embebidos en una matriz extracelular en donde el mayor constituyente es la familia de las colágenas¹⁶. La placenta y las MF son estructuras altamente organizadas que

participan en la interacción materno/fetal, que garantiza el mantenimiento del embarazo y el desencadenamiento del trabajo de parto.¹⁷

Las MF intervienen en el mantenimiento de la homeostasis del feto, siendo una interfase altamente especializada entre la madre y el feto que proveen junto con el líquido amniótico protección mecánica, aislando al producto durante la gestación. Esta estructura es sumamente dinámica, además de que protege al feto contra infecciones ascendentes del tracto genital materno⁹.

El tejido amniótico está compuesto de cinco distintas capas, la capa más interna ó próxima al feto es el **epitelio amniótico** que se encuentra en contacto directo con el líquido amniótico, este epitelio secreta colágenas de tipo III y IV, así como algunas glucoproteínas, principalmente la laminina y la fibronectina, que forman la siguiente capa del amnios llamada **membrana basal**, la cual no contiene vasos sanguíneos. Contigua a esta última, se localiza la **capa compacta**, compuesta de tejido conectivo, en la cual los principales componentes son las colágenas intersticiales del tipo I y III, las cuales forman el esqueleto fibroso principal del amnios, que confiere gran fuerza mecánica al amnios. Otros tipos de colágenas que se encuentra en esta capa son las tipos V y VI que dan lugar a la formación de redes filamentosas entre la colágena intersticial y el epitelio de la membrana basal. La fuerza ténsil del amnios depende de la colágena que se encuentra en esta capa. En el siguiente estrato histológico se encuentra la **capa de fibroblastos**, donde se encuentran macrófagos envueltos en la matriz extracelular y células mesenquimales que son responsables de la secreción de la colágena encontrada en la capa anterior. Finalmente se localiza la capa intermedia o **capa esponjosa**, la cual limita al amnios y el corion. Esta capa contiene gran cantidad de colágena tipo III y proteoglicanos, que tienen como función principal absorber el estrés físico o mecánico del feto asociado a los movimientos del mismo, permitiendo que el amnios se deslice suavemente sobre el corion subyacente.^{17, 18}.

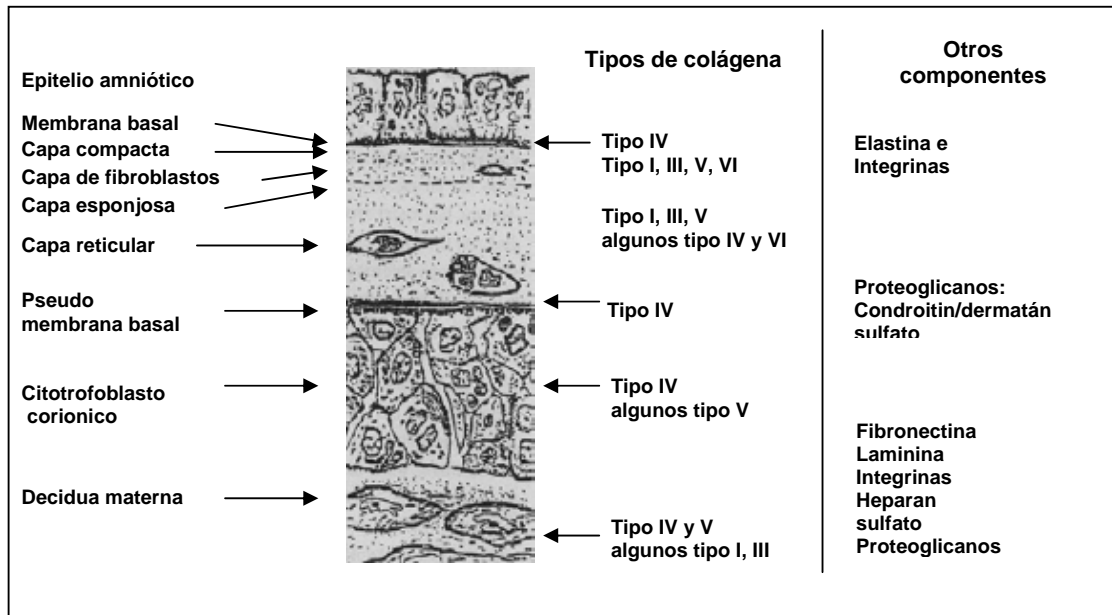


Fig. 1. Distribución de los diferentes tipos de colágenas y otros componentes que integran las MF.

El tejido del corion es la zona histológica de mayor espesor en las membranas fetales. **La capa reticular** se encuentra adyacente a la zona esponjosa del amnios y es seguida de una estructura tipo membrana basal que delimita la capa final del trofoblasto. Parte del corion se encuentra interdigitada con la decidua uterina¹⁷ (Figura 1).

La MEC de las MF es abundante en diferentes tipos de colágenas, ya que está constituida en su mayoría por diferentes tipos genéticos, entre las más abundantes podemos encontrar a las colágenas tipo I, III, IV, y VI entre otras¹⁸, las cuales pueden ser degradadas por la familia de las Metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs)¹⁹.

4.2 METALOPROTEASAS DE MATRIZ EXTRACELULAR (MMPs).

La degradación de la MEC en las MF es realizada por una familia de enzimas dependientes de Ca^{2+} y Zn^{2+} , denominadas metaloproteasas de matriz

extracelular (MMPs)²⁰. Estas enzimas pueden subagruparse estructuralmente de acuerdo a la homología que muestran en sus dominios y a la especificidad por su sustrato en: **colagenasas**, **gelatinasas**, **estromelinas**, **metaloproteasas de matriz asociadas a membrana** (MT-MMPs) y **otras MMPs**, donde se encuentran enzimas que aún no han sido completamente caracterizadas²¹ (Tabla 1).

La regulación de la actividad in vivo de las MMPs se lleva a cabo a tres diferentes niveles: **regulación transcripcional**, **activación del estado de proenzima** e **inhibición de la forma activa** por moléculas específicas²².

4.3 REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE MMPs.

Las MMPs comparten secuencias consenso que son comunes a toda la familia, la región promotora contiene una secuencia rica en timinas y adeninas (caja TATA), un elemento de respuesta a ésteres de forbol (TRE) y una secuencia específica para el activador de poliomavirus (PEA-3). Esta última parece colaborar con TRE acelerando la transcripción de MMP-2²³. La incubación de células con citocinas como el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-1 beta (IL-1 β) ó 12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato (TPA) pueden inducir la expresión de una familia de proteínas trans activadoras (AP-1) que se unen a el TRE e inician la transcripción, así TPA induce la expresión de colagenasas y estromelinas²⁴.

Se sabe que el factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β) es capaz de suprimir la expresión del RNAm de colagenasas y estromelinas, como es el caso de MMP-3 al unirse a un elemento inhibidor del promotor, conocido como el elemento inhibitorio TGF- β (TIE). Así mismo TGF- β_1 incrementa los niveles del RNAm de MMP-2 en diferentes tipos celulares^{25, 26}.

Tabla 1. FAMILIA DE METALOPROTEASAS DE MATRIZ EXTRACELULAR.

SUBGRUPOS	MMP	NOMBRE	kDa	SUSTRATO
COLAGENASAS	MMP-1	Colagenasa intersticial	57/52	Colágena fibrilar (tipo I,II, III, VII, X), gelatina.
	MMP-8	Colagenasa de neutrófilo	85/64	Colágena I, II, III.
	MMP-13	Colagenasa-3	52/42	Colágena II.
GELATINASAS	MMP-2	Gelatinasa A	72/68	Gelatinas, colágena IV, V, VII, X, elastina, fibronectina.
	MMP-9	Gelatinasa B	92/86	Gelatina, colágena IV, V, elastina.
ESTROMELISINAS	MMP-3	Estromelisina-1	57/45	Proteoglicanos, laminina, fibronectina, colágena III, IV, V, IX, gelatina.
	MMP-10	Estromelisina-2	57/44	Proteoglicanos, fibronectina, colágena III, IV, V, gelatina.
	MMP-11	Estromelisina-3	51/44	Laminina, fibronectina.
OTRAS	MMP-7	Matrilisina	28/19	Proteoglicanos, laminina, fibronectina, gelatina, colágena IV, elastina.
	MMP-12	Metaloelastasa	54/22	Elastina, fibronectina colágena IV.
	MMP-19	RASI-1	-----	Gelatinas.
	MMP-20	Enamelisina	54/22	Amelogenina.
METALOPROTEASAS DE MATRIZ ASOCIADAS A MEMBRANA (MT-MMPs)	MMP-14	MT1-MMP	66/54	Pro MMP-2
	MMP-15	MT2-MMP	72/62	Desconocido
	MMP-16	MT3-MMP	64/53	Pro MMP-2
	MMP-17	MT4-MMP	57/53	Desconocido

Tabla 1.Organización de familia de MMPs, se muestra su afinidad por sustrato, peso molecular en ambas formas, enzima latente y enzima activa.

4.4 ACTIVACIÓN DE MMPs.

A excepción de las MT-MMPs, que se encuentran ancladas a la membrana celular en forma de enzima activa, las MMPs son sintetizadas y secretadas al medio ambiente extracelular en estado de proenzimas y requieren ser activadas por diversos mecanismos para poder llevar a cabo su función.

La activación de las MMP in vitro puede llevarse a cabo por agentes no proteolíticos, que incluye a compuestos desnaturalizantes como el dodecil sulfato de sodio (SDS) y el tiocianato de sodio (NaSCN); también pueden ser activadas por agentes caotrópicos como la urea $[(\text{NH}_2)_2\text{CO}]$, por compuestos oxidantes como el hipoclorito de sodio (NaOCl) y por organomercuriales como el acetato amino fenilmercúrico (APMA), los cuales actúan vía el mecanismo del “switch de cisteína” propuesto por Van Wart en 1990. De acuerdo a este mecanismo la base fundamental para la activación, es la disposición del residuo de Cys73 en la región del propéptido de la enzima. Este residuo no se encuentra accesible en la enzima latente, pero es expuesto o modificado por tratamiento con agentes proteolíticos. Se propone que la Cys73 de la enzima latente está unida de manera coordinada al átomo de Zn^{2+} del sitio activo de manera que bloquea a éste.²⁷ Todos los modelos de activación llevan a la disociación de la Cys73 del átomo de Zn^{2+} con una exposición concomitante del sitio activo. La interrupción de esta interacción provoca que la cisteína reaccione con un SH para evitar la reasociación de la Cys73 con el átomo de Zn^{2+} , de esta manera se inicia una cascada de eventos que alteran la conformación de la enzima resultando en la activación de ésta y en el corte del propéptido²⁸.

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

- 1) Activación extracelular por otras proteasa (no MMPs).**
- 2) Activación extracelular por otras MMPs.**
- 3) Activación intracelular de MT-MMPs por furina.**
- 4) Activación de proMMP-2 por MT-MMPs²⁹**

1) Activación extracelular por otras proteínas (no MMPs). Este fue el primer mecanismo identificado como mediador de la activación de proMMP-9, proMMP-3 y proMMP-10. Este mecanismo ocurre cuando el plasminógeno (precursor o zimógeno) es convertido a plasmina, una proteasa de serina activa, por la acción de alguno de los dos activadores de plasminógeno, el activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) o por el activador de plasminógeno tipo tejido (tPA). El tPA puede directamente interactuar con componentes de la matriz extracelular. Una vez convertido el plasminógeno a plasmina, ésta rompe un segmento de 84 aminoácidos de la proMMP-3 y otro de 81 aminoácidos de la proMMP-1, resultando en enzimas totalmente activas, a diferencia de proMMP-9 que solo es parcialmente activada en 10-30%³⁰ (Figura 2).

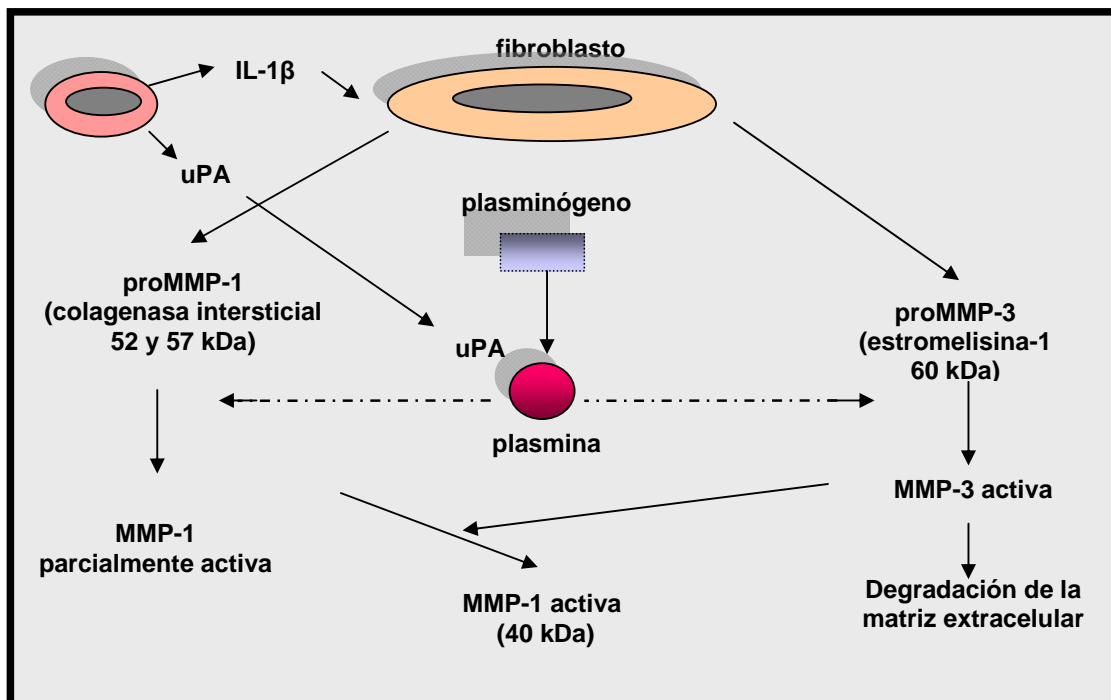


Figura 2. Activación de proMMP-3 (estromelisin-1) y proMMP-1 (colagenasa intersticial) mediada por plasmina. El plasminógeno del suero es convertido a plasmina por el uPA del keratinocito, así la plasmina subsecuentemente corta el dominio amino terminal de proMMP-3 y proMMP-1.

2) Activación extracelular por otras MMPs. La activación de una MMP puede ser iniciada por acción de otra MMP. Se ha demostrado que la MMP-7 puede actuar sobre la región propéptido de la proMMP-3 y de la proMMP-9, activando a ambas MMPs³¹. La activación de proMMP-3 por MMP-7 es similar a la mediada por el APMA e igualmente eficiente, mientras que la activación de proMMP-9 por la MMP-7 resulta en la activación equivalente al 50%. Sin embargo, existen datos que indican que la activación de proMMP-9 puede ser mediada también por MMP-2, ya que esta última corta en la región del aminoácido Glu40-Met41 de la proMMP-9, generando una enzima activa con peso molecular de 86 kDa^{32, 33}. También se conoce que la MMP-26 es capaz de activar a proMMP-9 al romper proteolíticamente en la posición Ala93-Met94, este proceso de activación es más estable que el que lleva a cabo la MMP-7³⁴. Otro mecanismo de activación de la proMMP-9 es mediado por la MMP-10, esta gelatinasa es totalmente activada y procesada a especies de diferente peso molecular que incluyen formas de 81, 65, 57, y 55 kDa. Se conoce que el sitio de corte ocurre en la posición Arg87-Phe88³⁵.

3) Activación intracelular de MT-MMPs por furina. La activación de MMPs por furina es el único mecanismo por el que las MMPs son activadas antes de la secreción de la enzima. La furina es una proteasa de serina que reconoce proteínas con una secuencia RXKR. Solamente la MMP-11 y miembros de las MT-MMPs como MT1 y MT2 son los que tienen un sitio sensible a furina, localizado entre el propéptido y el dominio catalítico³⁶.

4) Activación de MMP-2 por MT-MMPs. Los miembros de la familia de las MT-MMPs son reguladores duales de la remodelación de la MEC por medio de la degradación directa de la misma y por la activación de otras proMMPs. Las células cuentan con mecanismos específicos para promover la asociación y activación de gelatinasas en la superficie celular. En el caso de la proMMP-2, la asociación en la superficie celular y la activación se media por las interacciones con las MT-MMPs, esta subfamilia de MMPs se ancla a la membrana celular por medio de dominios específicos (dominio transmembranal y citoplásmico de

anclaje a la membrana celular)³⁷. La activación de proMMP-2 por MT1-MMP y por MT3-MMP incluye la acción del inhibidor específico de MMPs, el TIMP-2 (Inhibidor de metaloproteasas tipo tejido), el cual forma un complejo con MT1-MMP, que sirve como un receptor en la superficie celular para proMMP-2. Una vez unida proMMP-2 al complejo (MT1-MMP/TIMP-2), es activada por acción de una MT-MMP libre que hidroliza la 0región Asn37-Leu38 de proMMP-2 para generar un intermediario de MMP-2, que es subsecuentemente cortado en Ans80 y Tyr81 para generar una MMP-2 totalmente activa, por medio de un evento autocatalítico³⁸ (Figura 3).

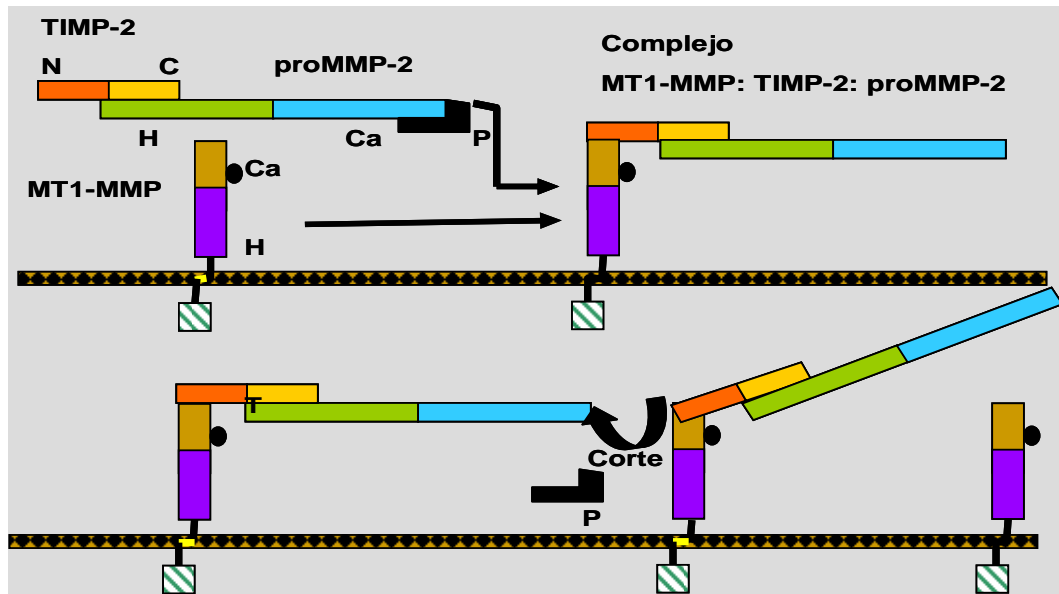


Figura 3. Activación de MMP-2 por MT-MMPs y TIMP-2. El complejo TIMP-2 y proMMP-2 se unen a MT1-MMP, así MT1-MMP es capaz de cortar el propéptido de la proMMP-2, resultando en la activación de la enzima. **C**: región carboxilo terminal de TIMP-2; **Ca**: dominio catalítico de MMP-2 y MT1-MMP; **H**: dominio a hemopexina de MMP-2 y MT1-MMP; **N**: región amino terminal de TIMP-2; **P**: propéptido de proMMP-2.

4.5 INHIBICIÓN DE LA FORMA ACTIVA DE LAS MMPs.

La α_2 -macroglobulina es una proteína que se encuentra en el suero humano, que es capaz de inhibir a todas las MMPs investigadas hasta la fecha. Debido a su gran tamaño y a su mecanismo de inhibición irreversible, la α_2 -

macroglobulina tiene un papel que se limita a la inhibición de proteasas localizadas en sangre y no a la regulación de la colagenolisis en el espacio intersticial, donde se encuentran los componentes del tejido conectivo¹⁹.

El papel más relevante en la inhibición de las MMPs corresponde a los inhibidores tisulares de metaloproteasas, conocidos por su acrónimo de TIMPs. Estos inhibidores son una familia integrada por cuatro distintos miembros: TIMP-1 de 20.6 kDa, TIMP-2 de 21.5 kDa, TIMP-3 de 21.6 kDa y TIMP-4 de 22.3 kDa, los cuales son glucoproteínas de que se comportan como inhibidores específicos de las MMPs. Estas proteínas contienen 12 residuos de cisteína que forman 6 bucles unidos por puentes disulfuro, en una región altamente conservada, tienen además un dominio N-terminal de ≈ 125 aminoácidos con secuencia consenso VIRAK, que es importante para la actividad inhibitoria hacia las MMPs y un C-terminal de ≈ 65 aminoácidos. Los TIMPs son el tercer mecanismo de regulación dada su afinidad por la región catalítica de las MMPs y de esta manera, bloquean su acción. La familia de los TIMPs inhiben a las MMPs de forma estequiométrica 1:1 para formar complejos no covalentes³⁹.

El TIMP-1 es una molécula capaz de unirse a las formas activas de MMP-1, 8 y 9, de igual manera el TIMP-2 tiene la particularidad de unirse a la forma activa de la MMP-2⁴⁰. El mecanismo de inhibición tanto de TIMP-3 como de TIMP-4 es igualmente eficaz que el de TIMP-1. Por lo que los TIMPs en conjunto con las MMPs son importantes por establecer un equilibrio entre la síntesis y la degradación de la MEC en procesos como la remodelación tisular⁴¹.

4.6 METALOPROTEASAS DE MATRIZ EXTRACELULAR, RUPTURA DE MEMBRANAS FETALES HUMANAS Y RPM.

Diferentes estudios han relacionado de manera consistente la degradación de los distintos componentes de la MEC con en el proceso que induce la ruptura de las membranas fetales, afectando directamente la fuerza ténsil de éstas⁴². Diversos grupos de investigación han aportado evidencias que apoyan la presencia de diferentes MMPs en la ruptura de las MF como es el caso de la

MMP-1, que es un constituyente fisiológico del líquido amniótico y se ha asociado con un incremento en su concentración en casos con RPM¹⁰.

La MMP-2 es una enzima que se encuentra en concentraciones constantes tanto en el líquido amniótico como en las MF y decidua a lo largo del embarazo, de igual manera la expresión de la MMP-2 no tiene variaciones en membranas fetales a término o pretérmino. La MMP-2 se ha localizado por inmunohistoquímica en el amnios, en la capa de trofoblasto del corion y en la decidua^{43, 44}.

Otras MMPs identificadas incluyen a la MMP-3, MMP-10 y MMP-11, que han sido documentadas en MF, placenta y líquido amniótico, por lo que se ha considerado a estos tejidos como una fuente importante de estromelinas, las cuales son capaces de degradar componentes de la MEC, incluyendo colágena tipo IV, laminina, elastina y proteoglicanos¹¹. La matrilisina o MMP-7, se considera un constituyente fisiológico del líquido amniótico, sus concentraciones se ha documentado que incrementan a medida que avanza la edad gestacional. Además de que la infección es un factor que dispara la concentración de esta enzima en el líquido amniótico. Se han reportado asociaciones de los partos pretérmino con un significativo incremento en la concentración de esta enzima¹². La MMP-8 que es producida en su mayoría por células del corion en las MF, aumenta su concentración alrededor de cinco veces en MF provenientes de TP en comparación con MF obtenidas por cesárea sin TP, de la misma manera el nivel de expresión del RNAm aumenta durante el parto⁴⁵.

En el líquido amniótico, cérvix y MF se han encontrado tanto MMP-1, MMP-2, MMP-8 y MMP-9, las cuales han sido implicadas en la ruptura de las MF de manera normal como de manera patológica (RPM)⁹. La expresión de la MMP-9 también ha sido documentada en el epitelio amniótico, macrófagos y fibroblastos, mientras que en el corion se ha documentado en el trofoblasto y células deciduales, incrementando su actividad en MF con TP. Este incremento en la expresión resulta en la degradación de la MEC de las MF y facilita su ruptura bajo condiciones fisiológicas y patológicas⁸. La presencia de esta enzima también ha sido documentada en el líquido amniótico de mujeres que presentaron infección intramniótica⁴⁶ al igual que su presencia se ha

relacionado con aumento en la concentración de la enzima en el TP normal y RPM en el líquido amniótico¹⁵.

La actividad proteolítica aumentada que se ha documentado en las MF que sufren RPM se atribuye a MMP-2 y MMP-9, las cuales son capaces de degradar colágenas tipo IV, V, VII y XI, siendo dentro de éstas la tipo IV el principal componente de las membranas basales⁴⁷. Reportes recientes asocian a la MMP-9 como parte principal de la maquinaria enzimática responsable de la RPM,^{44, 48} ya que su expresión y actividad se ven aumentadas en las MF durante el parto⁷. De igual manera las mujeres que presenta RPM muestran un aumento tanto en la secreción, expresión y actividad de la MMP-9 en las MF, líquido amniótico y suero fetal^{49, 50}.

Si bien es cierto que existen una gran cantidad de trabajos acerca de la ruptura normal o patológica de las MF, aun no se tienen claros los factores que pueden desencadenar el evento. No existen en la literatura elementos que nos permitan explicar por completo el mecanismo que conduce a la RPM y su complicación como nacimiento prematuro. El mecanismo de activación de las enzimas que degradan los componentes de la MEC en las MF durante el momento del TP es un tema que ha sido poco examinado. Existe la posibilidad de que uno o varios de los cuatro mecanismos de activación que regulan a las MMPs se estén llevando a cabo en el microambiente de las membranas y explique su ruptura súbita durante el TP.

4.7 FUENTE CELULAR DE LA MMP-9 EN LA RUPTURA DE LAS MEMBRANAS FETALES HUMANAS.

En los tejidos gestacionales como son la placenta y las MF, suceden procesos inflamatorios que se encuentran asociados con la infiltración de leucocitos antes de iniciarse el TP⁵¹ y se supone que estas células contribuyen a la formación un microambiente específico que rodea a las MF, el cual se compone por productos solubles que son secretados por las células locales y

por las células que arriban a las MF desde diferentes sitios. Teniendo en cuenta que los mediadores de inflamación pueden ser sintetizados por muchos tipos celulares entre los que se encuentran células endoteliales y leucocitos, a nivel local, el amnios, el corion, los trofoblastos y las células deciduales son capaces de producir citocinas proinflamatorias y MMP-9 tanto en presencia de productos bacterianos como en condiciones basales^{7,52, 53, 54} por lo que se sugiere que su producción por estos tejidos es dependiente del TP más que de la presencia de bacterias.

En la actualidad se ha podido identificar de manera más específica la fuente de citocinas y metaloproteasas tanto en las MF como en la placenta, y se ha demostrado que la mayor parte proviene del infiltrado leucocitario y no de las células locales como antiguamente se creía⁵⁵. Los neutrófilos, macrófagos y linfocitos T, atraídos quizá por un aumento en la expresión de moléculas de adhesión⁵⁶, invaden la placenta, el miometrio, el cuello uterino y las MF, lo que coincide con incremento en la cantidad IL-1 β , TNF- α y MMP-9 en esos tejidos⁵⁷.

4.8 CONTRIBUCIÓN DEL INFILTRADO LEUCOCITARIO EN LA RUPTURA DE LAS MEMBRANAS FETALES HUMANAS.

Las células inflamatorias han sido documentadas durante la etapa de dilatación cervical y su papel fue propuesto al observar que existe un incremento significativo en el número de neutrófilos que se infiltran en el cérvix de mujeres con embarazos a término, en comparación de mujeres en los primeros meses del embarazo⁵⁸. La mayoría de estas células se acumulan antes de que tenga lugar el TP, para que al inicio de la dilatación puedan infiltrar de manera masiva el estroma del cérvix, una vez ahí, estas células son capaces de secretar elastasa y colagenasas, enzimas que serán las encargadas de la degradación de todos los constituyentes de la matriz extracelular⁵⁹.

Algunas proteínas secretadas por los leucocitos y que están relacionadas con la dilatación cervical, son las citocinas proinflamatorias, como IL-1 β y TNF- α que dan lugar a que se establezca una respuesta inmune, lo cual determina la

expresión de moléculas de adhesión sobre las células endoteliales vasculares para favorecer la migración de estas células⁶⁰.

Se ha demostrado que durante diferentes etapas del embarazo tanto en el tejido cervico-uterino, placenta y MF existe un aumento en el número de macrófagos alrededor de diez veces más en embarazos a término en comparación con las etapas iniciales del embarazo⁵⁸. Se ha documentado que los macrófagos son capaces de producir la IL-1 β , el TNF- α , el factor activador de plaquetas y las MMPs que son considerados esenciales para la dilatación cervical y la remodelación de los tejidos⁶¹. Por lo anterior se cree que estas células y sus productos solubles, están estrechamente relacionados con procesos colagenolíticos a nivel intrauterino y de esta manera es probable que puedan desencadenar la ruptura de las MF de manera normal o patológica ya que se ha comprobado que las células mononucleares inmunológicamente activas modulan el metabolismo del tejido conectivo. Los linfocitos T constituyen la población más abundante de leucocitos en tejido cervical durante el primer trimestre del embarazo, siendo el subtipo supresor/citotóxico el que se encuentra en mayores cantidades, aumentando significativamente antes del parto⁵⁸.

5. JUSTIFICACIÓN.

La RPM representa un serio problema de salud mundial y en nuestro país el 10% del total de embarazos presenta ésta patología, por lo que es de gran importancia elucidar los diversos procesos bioquímicos y enzimáticos que explican el desarrollo de esta anomalía del embarazo humano. Estudios previos han demostrado la participación de las MMPs en la génesis del proceso y por ejemplo, se ha identificado a la MMP-1⁹, a la MMP-7¹² y a la MMP-9¹³, como mediadores del daño al tejido conectivo que caracteriza la RPM. Por esta razón es indispensable aumentar el conocimiento acerca de la regulación de este grupo de enzimas y de esta manera proponer nuevas alternativas en su control, bajo las condiciones que existen en la RPM.

expresión de moléculas de adhesión sobre las células endoteliales vasculares para favorecer la migración de estas células⁶⁰.

Se ha demostrado que durante diferentes etapas del embarazo tanto en el tejido cervico-uterino, placenta y MF existe un aumento en el número de macrófagos alrededor de diez veces más en embarazos a término en comparación con las etapas iniciales del embarazo⁵⁸. Se ha documentado que los macrófagos son capaces de producir la IL-1 β , el TNF- α , el factor activador de plaquetas y las MMPs que son considerados esenciales para la dilatación cervical y la remodelación de los tejidos⁶¹. Por lo anterior se cree que estas células y sus productos solubles, están estrechamente relacionados con procesos colagenolíticos a nivel intrauterino y de esta manera es probable que puedan desencadenar la ruptura de las MF de manera normal o patológica ya que se ha comprobado que las células mononucleares inmunológicamente activas modulan el metabolismo del tejido conectivo. Los linfocitos T constituyen la población más abundante de leucocitos en tejido cervical durante el primer trimestre del embarazo, siendo el subtipo supresor/citotóxico el que se encuentra en mayores cantidades, aumentando significativamente antes del parto⁵⁸.

5. JUSTIFICACIÓN.

La RPM representa un serio problema de salud mundial y en nuestro país el 10% del total de embarazos presenta ésta patología, por lo que es de gran importancia elucidar los diversos procesos bioquímicos y enzimáticos que explican el desarrollo de esta anomalía del embarazo humano. Estudios previos han demostrado la participación de las MMPs en la génesis del proceso y por ejemplo, se ha identificado a la MMP-1⁹, a la MMP-7¹² y a la MMP-9¹³, como mediadores del daño al tejido conectivo que caracteriza la RPM. Por esta razón es indispensable aumentar el conocimiento acerca de la regulación de este grupo de enzimas y de esta manera proponer nuevas alternativas en su control, bajo las condiciones que existen en la RPM.

6. HIPÓTESIS.

Las membranas fetales y/o leucocitos obtenidos de embarazos con trabajo de parto, expresan MMP-9 durante el período de cultivo y de manera coordinada expresan también diferentes activadores de la MMP-9.

7. OBJETIVOS.

7.1 OBJETIVO GENERAL.

- Identificar el (los) mecanismo(s) de activación para la proMMP-9, que están presentes en las membranas corioamnióticas humanas durante el trabajo de parto.

7.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Establecer un modelo experimental in vitro de cocultivo de membranas fetales y leucocitos para el analizar la expresión de enzimas que participan en la degradación de la matriz extracelular.
- Describir la cinética de secreción y activación de la proMMP-9 en el modelo experimental y correlacionarlo con la inducción de degradación de tejido conectivo de las membranas fetales.
- Identificar y caracterizar en el modelo experimental el o los diferentes activadores de la proMMP-9 presente a lo largo del período de cultivo.

8. DISEÑO EXPERIMENTAL.

8.1 DISEÑO DEL ESTUDIO.

- Tipo de investigación: experimental.
- Características del estudio: analítico y prospectivo.

8.2 POBLACIÓN.

- Muestras de membranas fetales y sangre de mujeres con embarazo normal a término sin ninguna patología, que se resolvió por cesárea en ausencia de trabajo de parto, sin evidencia clínica y microbiológica de infección.

8.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

- Mujeres que no muestren ninguna patología.
- Mujeres cuyo embarazo se resolvió por cesárea.
- Mujeres que no hayan presentado trabajo de parto.

8.4 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

- Mujeres con patología previa (diabetes mellitus, asma, artritis reumatoide, lupus eritematoso, hipertensión arterial, nefropatías).
- Mujeres con complicaciones obstétricas como malformaciones uterinas, placenta previa, preeclampsia, polihidramnios y oligohidramnios.

8.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El cambio en la cantidad y actividad de las diferentes MMPs fue analizado mediante un análisis de varianza (ANOVA) y expresado como el promedio \pm desviación estándar previo a un análisis de normalidad de los datos. El valor de $p \leq 0.05$ fue considerado significativo en cada caso.

9. MATERIAL Y MÉTODOS.

9.1 MATERIAL BIOLÓGICO.

- Membranas fetales a término (37-40 semanas de gestación) sin haber presentado trabajo de parto.
- Leucocitos de placenta.

9.2 MÉTODOS.

Diagrama de flujo de la metodología. Se muestra de manera sistemática las diferentes rutas seguidas en el presente trabajo, la cual permitió cubrir los objetivos planteados (Figura 4).

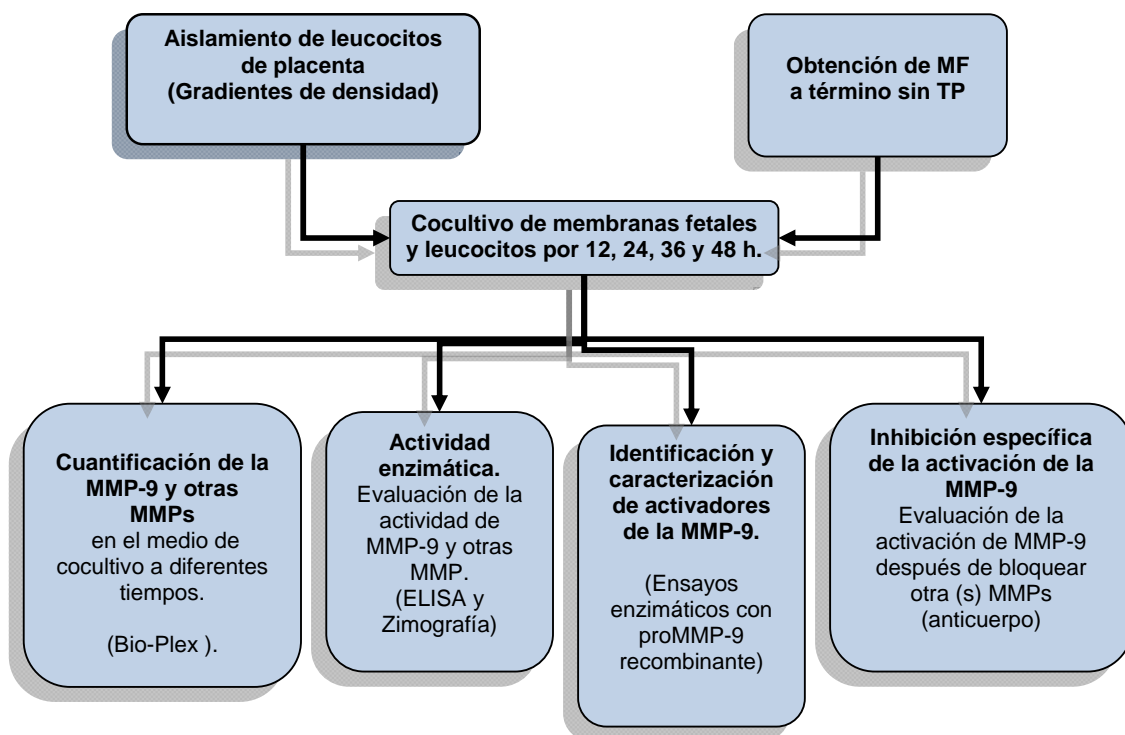


Figura 4. El diagrama de flujo muestra la metodología empleada para cubrir los objetivos planteados para este trabajo experimental

9.3 ESTANDARIZACIÓN DEL CULTIVO DE EXPLANTES DE MEMBRANAS FETALES HUMANAS.

Con la finalidad de poder establecer las condiciones óptimas para la obtención y la posterior manipulación de las MF, éstas se transportaron al laboratorio en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con antibiótico y antimicótico al 1%, posteriormente se lavaron con solución salina fisiológica estéril hasta eliminar los restos de sangre y fluidos en una campana de flujo laminar (Figura 5 A). Mediante un sacabocados dermatológico, se hicieron explantes de 1.0 cm de diámetro (Figura 5 B) que se colocaron sobre un inserto Transwell® (Costar, Acton, MA, USA) de 12 mm de diámetro, con membrana de policarbonato y poro de 0.4 micras, en dónde fueron sujetados con una liga de silicón estéril (Figura 5 D).

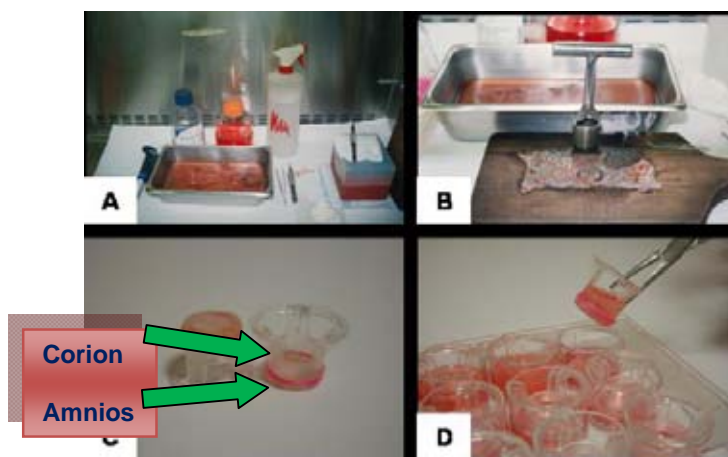


Figura 5. Procesamiento y obtención de las MF. El esquema ilustra el momento en que las MF son lavadas bajo condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar (A), para posteriormente obtener los explantes (b) que serán montados en el inserto Transwell® (C), el cual finalmente se colocaran en una caja de cultivo celular.

Una vez montados los explantes sobre el inserto Transwell® se colocaron en placas de 12 pozos con 700 μ l de DMEM (Figura 5 C) que se suplementó con 10% de suero fetal bovino, 1% de piruvato de sodio y 1% de antibiótico-

antimicótico (DMEM-SFB). Los cultivos se incubaron a 37°C, en una atmósfera de 5 % CO₂ por un periodo de 24 h. Al terminar este tiempo, el medio de cultivo fue remplazado por 1 mL de DMEM suplementado con 166.5 g/L de hidrolizado de lactoalbúmina, 1% de piruvato de sodio y 1% de antibiótico/antimicótico (DMEM-HLA) y los explantes fueron nuevamente incubados ahora por 48 h, y a intervalos de 12 h se colectaron los medios condicionados del cultivo para su posterior análisis. Con este modelo el corion quedó hacia la cara superior y el amnios hacia la cara inferior⁶².

9.4 VIABILIDAD DE LAS MEMBRANAS FETALES.

Con la intención de determinar si los explantes de las MF eran capaces de mantenerse metabólicamente competentes durante el período experimental, se determinó la viabilidad de los mismos mediante el sistema Cell Proliferation Kit II (Boehringer Mannheim Germany) que consiste en un ensayo colorimétrico basado en la transformación del compuesto azul de tetrazolio (XTT) a una sal de formazán soluble en agua, esta conversión sólo puede ser hecha por células metabólicamente activas (deshidrogenasa mitocondrial). La conversión metabólica fue evidenciada por espectrofotometría debido al cambio de color en el medio (a 475 nm). La intensidad del color es proporcional al número de células metabólicamente activas.⁶³ Una vez obtenidos los explantes, se colocaron en 1 mL de DMEM-SFB por 24 h a 37°C en 5% de CO₂. Al término de este tiempo de incubación, se sustituyó el medio de cultivo de los mismos explantes por 1 mL DMEM-HLA bajo las mismas condiciones, al que se le adicionaron 200 µL del reactivo XTT. El medio fue colectado a las 12, 24, 36 y 48 h para ser analizado.

9.5 OBTENCIÓN DE LEUCOCITOS PLACENTARIOS.

Con la finalidad de establecer por completo el modelo de cultivo de MF y leucocitos y analizar los productos solubles secretados por los leucocitos, se obtuvieron muestras de sangre de mujeres que tuvieron embarazo a término,

sin TP, el cual fue resuelto mediante cesárea electiva. La sangre se colectó mediante drenado de los cotiledones placentarios. Se obtuvieron 10 mL de sangre, la cual fue recolectada en tubos heparinizados (Vacutainer-heparina sódica, Becton-Dickinson, Rutheford, NJ). La muestra de sangre se sometió a un gradiente de densidad con el reactivo Lymphoprep™ (Axis-Shield, Oslo, Noruega), para obtener los leucocitos de acuerdo al protocolo sugerido por los fabricantes (Apéndice 1).

Una vez obtenidos los leucocitos se contaron y se midió su viabilidad mediante el uso del colorante vital azul tripano (Apéndice 2).

9.6 PRUEBA DE FUNCIONALIDAD DE MEMBRANAS FETALES HUMANAS Y LEUCOCITOS PLACENTARIOS.

Con el objetivo de poder validar el modelo en condiciones in vitro y demostrar la funcionalidad de los explantes de MF y leucocitos, se midió la secreción y actividad de MMP-9 como un marcador. Se realizó el cultivo de explantes de MF y células mononucleares como previamente se describió y bajo las mismas condiciones de cultivo, de manera independiente para cada cultivo. Los medios condicionados del cultivo se colectaron a las 12, 24, 36 y 48 h, se cuantificó en cada uno de los tiempos la concentración de proteína total por el método de Bradford⁶⁴ (Apéndice 3).

9.7 COCULTIVO DE EXPLANTES DE MEMBRANAS FETALES HUMANAS CON LEUCOCITOS PLACENTARIOS.

Con el propósito de analizar la interacción de las MF y los leucocitos placentarios en cuanto a la cinética de secreción de MMP-9 y el mecanismo que resulta en la activación de ésta enzima, se hicieron cocultivos con explantes de MF y 1×10^5 células mononucleares provenientes de la placenta. Los explantes fueron puestos sobre un inserto Transwell® (Costar, Acton, MA, USA) de 12 mm de diámetro, el cual contiene una membrana de policarbonato con poro de 0.4 micras, los explantes de MF se sujetaron al inserto Transwell®

mediante una liga de silicón estéril. Una vez montados los explantes sobre el inserto Transwell® se colocaron en placas de 12 pozos con 700 µl de DMEM-HLA. Con este sistema se formaron dos cámaras independientes donde el corion quedó hacia la cara superior y el amnios hacia la cara inferior⁶². Las células mononucleares fueron colocadas sobre el corion, esto permitió establecer un modelo in vitro para analizar de forma selectiva la interacción de los leucocitos placentarios con las MF.

El cocultivo se dejó en incubación durante 12, 24, 36 y 48 h a 37°C, 5% de CO₂. Al término de cada uno de los tiempos del cocultivo se colectó el medio condicionado y se almacenó a -70°C para su posterior análisis.

9.8 ZIMOGRAFÍA EN GELATINA.

Para poder detectar la actividad enzimática de gelatinasas de manera cualitativa en los medios condicionados del cultivo y del cocultivo, alícuotas de 5 µg de proteína de cada uno de los medios fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% con dodecil sulfato de sodio (SDS) copolimerizados con gelatina tipo A de piel porcina (Sigma, St. Louis, MO, USA) al 1% en condiciones no desnaturalizantes⁶⁵ (Apéndice 4), usando un sistema con formato de minigel (Bio-Rad, Richmond, CA). Las zonas de actividad enzimática aparecieron como bandas de lisis claras contra un fondo de sustrato no degradado. En cada corrida se incluyeron marcadores de actividad para MMP-2 y MMP-9 usando el sobrenadante obtenido de la línea celular de promielocitos U937⁶⁶. Las bandas obtenidas fueron analizadas por densitometría mediante analizador de imágenes (UVP, Southern, CA, USA) y expresadas como actividad gelatinolítica por área.

9.9 CUANTIFICACIÓN DE LA MMP-9 ACTIVA EN LOS MEDIOS DE COCULTIVO.

Simultáneamente a la zimografía y para poder determinar de manera cuantitativa la concentración de proMMP-9 y MMP-9 activa en los medios de

cocultivo, se utilizó un sistema cuantitativo tipo ELISA, el cual incorpora un sistema de captura con anticuerpos monoclonales y el uso de un sustrato específico para MMP-9 (Amersham, UK) (Apéndice 5). La concentración de la enzima se expresó como ng MMP-9/mg de proteína.

9.2.1 ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE MMP-9.

Para poder cuantificar de manera específica la actividad enzimática de la MMP-9 presente en cada uno de los medios de cocultivo, se empleó un sustrato específico para gelatinasas MMP-2/MMP-9 Ac-Pro-Leu-Gly-S-Leu-Leu-Gly-OC₂H₅ (Calbiochem, San Diego, CA). El ensayo se realizó de acuerdo a Weingarten y Feder⁶⁷, (Apéndice 6) con 0.5 µg de proteína de cada uno de los medios de cocultivo en una solución que contenía 3 mM de sustrato, 50 mM HEPES pH7.4, 1.0 mM de 4,4'-ditiopiridina e incubados por triplicado por 3 h a 25°C. La 4,4'-ditiopiridina reacciona con los fragmentos de hidrólisis del mercaptano para formar un producto con absorbancia a 324 nm, los cuales fueron leídos en espectrofotómetro (DU-800, Beckman Coulter, USA).

9.2.2 CARACTERIZACIÓN INICIAL DEL ACTIVADOR DE proMMP-9 EN LOS MEDIOS DE COCULTIVO.

Para poder identificar si en los medios de cocultivo, como producto de la interacción de las MF y los leucocitos placentarios existe la presencia de alguno de los posibles activadores de la MMP-9, los medios condicionados del cocultivo colectados a 12, 24, 36 y 48 h se incubaron con proMMP-9 recombinante humana (Calbiochem, San Diego, CA), la cual fue previamente marcada con biotina-NHS (Vector Laboratories, England) (Apéndice 7), como una fuente exógena de proMMP-9. Alícuotas de 2 µg de proteína de cada uno de los medios condicionados, fueron incubados con 0.2 ng de la enzima marcada, durante 2 h a 37°C. Al finalizar el período de incubación, los medios de cocultivo se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 8%, para posteriormente realizar la transferencia de proteínas (Apéndice 8) a

una membrana de nitrocelulosa Inmobilon-P (Millipore, Medford, MA, USA) durante 18 h a 40 volts a 4°C utilizando el método descrito por Towbin, *et al*⁶⁸. La identificación de las especies generadas de MMP-9 fueron detectadas con el kit VectaStain ABC Universal (Vector, Burlingame, CA, USA) y la actividad de peroxidasa se reveló bajo condiciones de emisión de quimioluminiscencia (ECL[®] Amersham Pharmacia Biotech, USA). Como control positivo se uso proMMP-9 recombinante humana. La intensidad relativa de las bandas fue capturada usando un analizador de imágenes (UVP, Southern, CA, USA).

9.2.3 PERFIL DE PROTEASAS EN LOS MEDIOS DE COCULTIVO.

Con la intención de documentar que familias de proteasas eran secretadas al medio condicionado por el cocultivo (MF y los leucocitos placentarios), y en que proporción, se analizaron alícuotas de 5 µg de dichos medios condicionados, los cuales fueron colectados a cada uno de los tiempos experimentales e incubados durante 2 h a 37°C en presencia de diferentes inhibidores específicos de proteasas que incluyeron ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 5 mM para proteasas dependientes de iones metal, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1mM para proteasas de serina y N-etilmaleimida (NEM) 2 mM para proteasas con residuos de cisteína. Posteriormente los medios condicionados fueron incubados con 500 µg de azocaseína (Sigma Chemical Co., St. Louis MO) y se llevó a 1 mL con amortiguador Tris 0.1 M pH 7.8. La mezcla se incubó durante 24 h a 37°C con agitación constante. La azocaseína no digerida fue precipitada con 200 µl de ácido tricloroacético (TCA) en frío, después de 30 minutos se centrifugó a 12,000 x g por 5 minutos (Apéndice 9). Los valores de absorbancia de los sobrenadantes fueron leídos a 336 nm por medio de un espectrofotómetro (DU-800, Beckman, USA). La actividad se expresó como µg de azocaseína degradada/mg de proteína incubada.

9.2.4 SECRECIÓN DE MMPS AL MEDIO DE COCULTIVO.

Para determinar la concentración de MMPs contenidas en el medio de cocultivo se utilizó un sistema de análisis múltiple de moléculas en suspensión (Bio-Plex), el cual es un inmunoensayo de tipo “sandwich” en fase sólida, diseñado para ser analizado con Luminex[®]. Esta metodología está basada en el uso de una avanzada tecnología de microesferas de colores, acopladas a anticuerpos, que utiliza un ensayo de citometría de flujo que permite la detección simultánea de más de 100 analitos en una sola muestra. El ensayo usado para cuantificar MMPs en los medio de cocultivo se diseñó en un formato de inmunoensayo de captura. Anticuerpos específicos para MMP-1, MMP-3, MMP-7 y MMP-9 fueron acoplados covalentemente a esferas de 5.6- μm , las cuales tienen un código de color diferente. Los anticuerpos acoplados a las esferas (R&D Systems, Minneapolis, MN) fueron incubados con concentraciones conocidas (curva estándar de 8 puntos) y no conocidas de MMPs (medios de cocultivo). Después de una serie de lavados para remover la proteína no unida a los anticuerpos, se agregó un anticuerpo de detección biotinilado para un epítipo específico de cada una de las MMPs (Apéndice 10). Alícuotas de 50 μL de cada uno de los medios de cocultivo fueron probados. Todos los ensayos (n=5) fueron normalizados por concentración de proteína total y el resultado se expreso como pg/mg de proteína.

9.2.5 INHIBICIÓN DEL ACTIVADOR DE LA MMP-9 EN EL COCULTIVO.

Para poder caracterizar de manera parcial al activador de la proMMP-9 dentro del modelo experimental de cocultivo (MF y leucocitos provenientes de la circulación placentaria), éstos se mantuvieron por 12, 24, 36 y 48 h incubados a 37°C en 5% de CO₂. Al inicio de cada uno de los tiempos de cocultivo (tiempo 0) y por cada 12 h del mismo se agregó una concentración de 2.5 $\mu\text{g/mL}$ de un anticuerpo anti MMP-3 (Affinity BioReagent, Golden, CO). Para confirmar este experimento en otro cocultivo se adicione una concentración de 130 nM de inhibidor específico para MMP-3, MMP-3 inhibidor II (Calbiochem, San Diego, CA). Al término de cada unos de los tiempos experimentales se colectaron los

medios condicionados de cada cocultivo y se analizaron por zimografía y actividad específica.

10. RESULTADOS.

10.1 VIABILIDAD DE LAS MEMBRANAS FETALES DURANTE EL CULTIVO.

La viabilidad presente en las MF medida con el reactivo XTT después de la manipulación y durante su cultivo (n=3), mostró que las poblaciones celulares de las MF (tanto corion como amnios), se mantuvieron viables y metabólicamente activas durante las 48 h que duró el período de cultivo, sin experimentar cambios estadísticamente significativos ($p > 0.05$) durante cada uno de los tiempos del cultivo, mostrando una viabilidad del 96.4% a las 48 h, tomando como el 100% de viabilidad el tiempo 0 del cultivo (Figura 6).

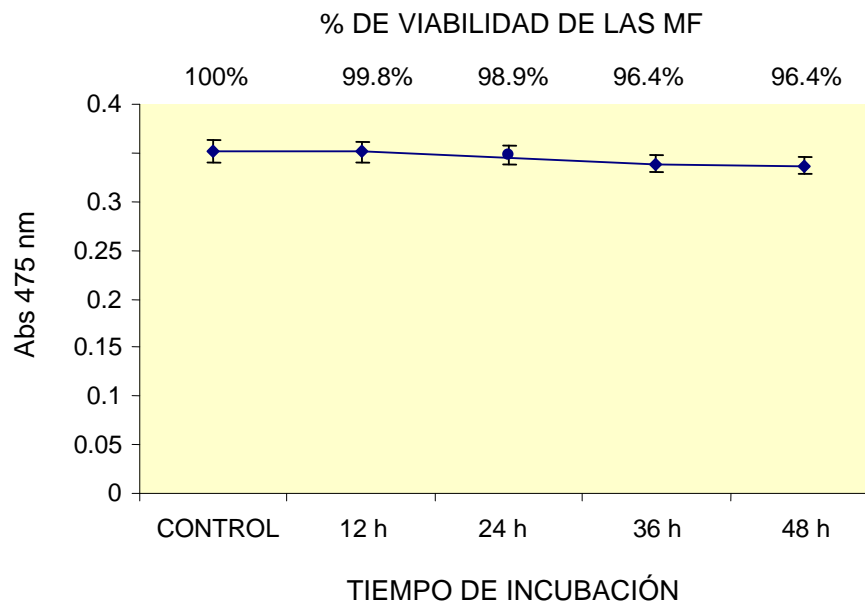


Figura 6. Ensayo de viabilidad de los explantes de MF. Se muestran los resultados de 4 MF distintas por triplicado, seguidas durante 2 días con el método de XTT. Se tomó como 100% de viabilidad la absorbancia del control (tiempo cero).

medios condicionados de cada cocultivo y se analizaron por zimografía y actividad específica.

10. RESULTADOS.

10.1 VIABILIDAD DE LAS MEMBRANAS FETALES DURANTE EL CULTIVO.

La viabilidad presente en las MF medida con el reactivo XTT después de la manipulación y durante su cultivo (n=3), mostró que las poblaciones celulares de las MF (tanto corion como amnios), se mantuvieron viables y metabólicamente activas durante las 48 h que duró el período de cultivo, sin experimentar cambios estadísticamente significativos ($p > 0.05$) durante cada uno de los tiempos del cultivo, mostrando una viabilidad del 96.4% a las 48 h, tomando como el 100% de viabilidad el tiempo 0 del cultivo (Figura 6).

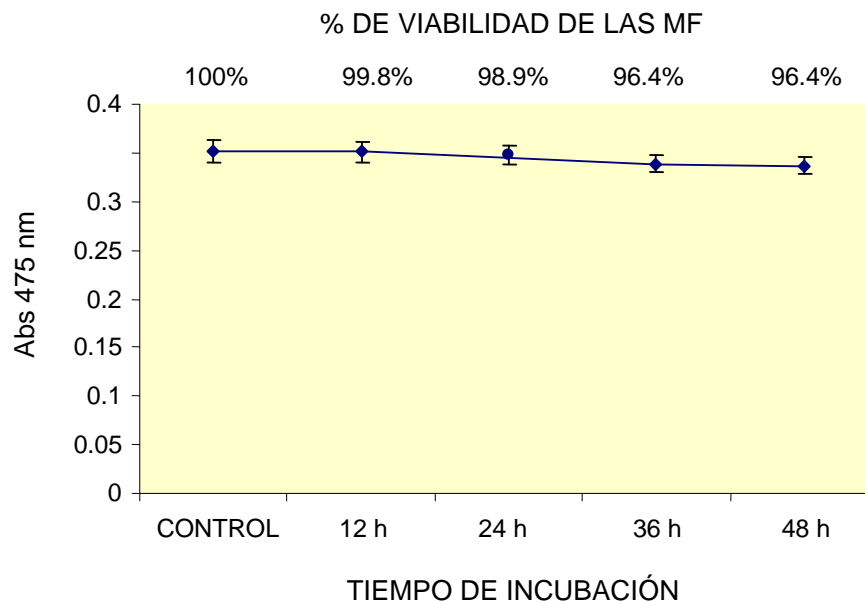


Figura 6. Ensayo de viabilidad de los explantes de MF. Se muestran los resultados de 4 MF distintas por triplicado, seguidas durante 2 días con el método de XTT. Se tomó como 100% de viabilidad la absorbancia del control (tiempo cero).

10.2 SECRECIÓN DE proMMP-9 COMO PRUEBA FUNCIONAL EN EXPLANTES DE MEMBRANAS FETALES HUMANAS Y LEUCOCITOS PLACENTARIOS.

Para demostrar la funcionalidad de los explantes de las MF y de los leucocitos, se analizó por separado la secreción de gelatinasas en los medios de los cultivos de explantes de MF (n=8) y leucocitos (n=8) con la técnica geles/sustrato zimografía, la cuál mostró la aparición de dos bandas de lisis con peso molecular estimado de 72 y 92 kDa a partir de las 12 h de cultivo tanto en los explantes de MF como en los leucocitos. Las gelatinasas encontradas correspondieron a la proMMP-2 (72 kDa) y a la proMMP-9 (92 kDa), de acuerdo a la migración relativa de las gelatinasas de la línea celular U937. En el ensayo no se observaron cambios en cuanto a la generación de especies de la MMP-9, esta enzima se mantuvo en forma latente a lo largo de todo el cultivo en ambos casos (Figura 7).

ZIMOGRAFIA DE LA SECRECIÓN DE proMMP-9 POR LAS MF Y LOS LEUCOCITOS DURANTE EL CULTIVO.

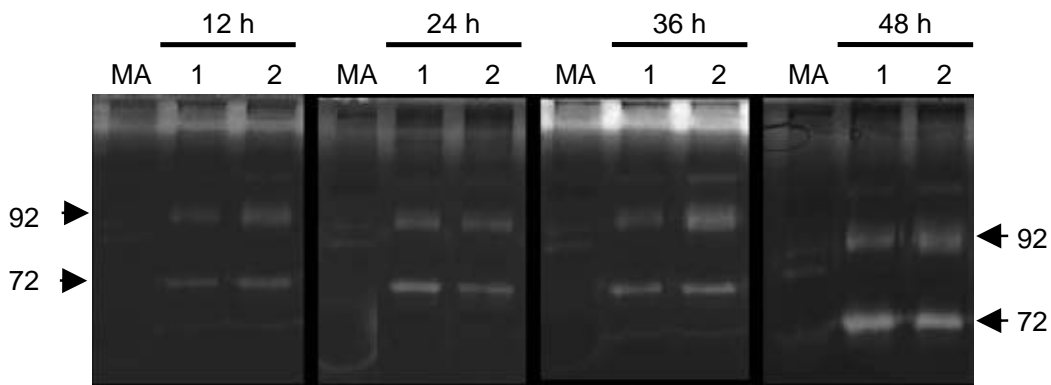


Figura 7. Actividad gelatinolítica por zimografía. Los medios de cultivo de leucocitos y MF fueron obtenidos como se describió en la metodología y analizados para zimografía en gelatina (n=8). La línea 1 muestra la actividad de proMMP-9 secretada por los leucocitos durante todo el cultivo. La línea 2 muestra la actividad de proMMP-9 secretada por los explantes de MF durante su cultivo (12, 24, 36, y 48 h). MA, Marcador de actividad.

El análisis densitométrico mostró que las bandas de lisis encontradas en los medios de cultivos de explantes (Figura 8 A) y en los medios de cultivos de leucocitos (Figura 8 B), se mantuvieron constantes en cuanto a su intensidad relativa durante las primeras 36 h de cultivo en ambos casos, mostrando que solamente a las 48 h de cultivo existen cambios estadísticamente significativos ($p < 0.05$) en la intensidad relativa de las bandas de lisis con respecto a la intensidad de las bandas de lisis observadas a las 12 h en ambos cultivos (Figura 7).

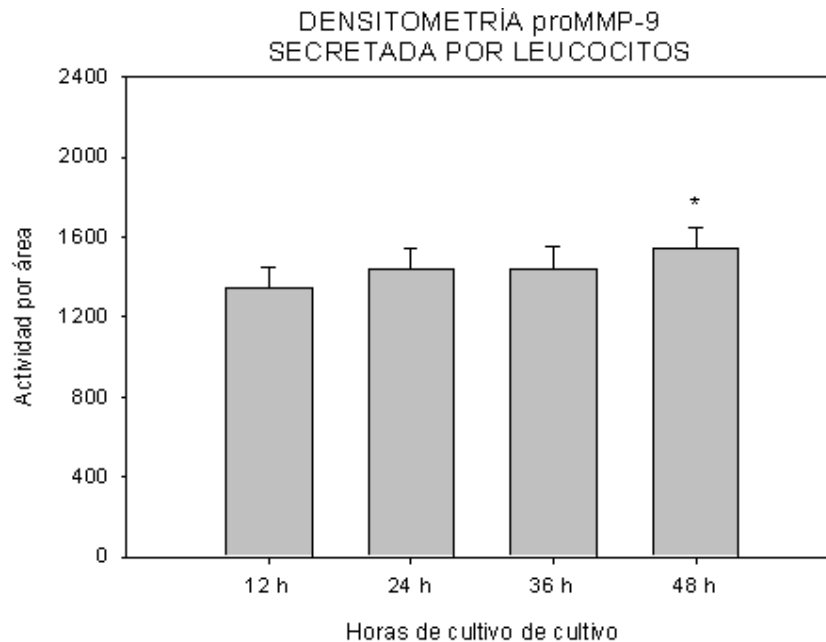


Figura 8 A. proMMP-9 secretada durante el cultivo de leucocitos placentarios. Las bandas de lisis obtenidas en zimografía (proMMP-9), fueron analizadas por densitometría durante las 48 h de cultivo ($n=8$, $*P < 0.05$).

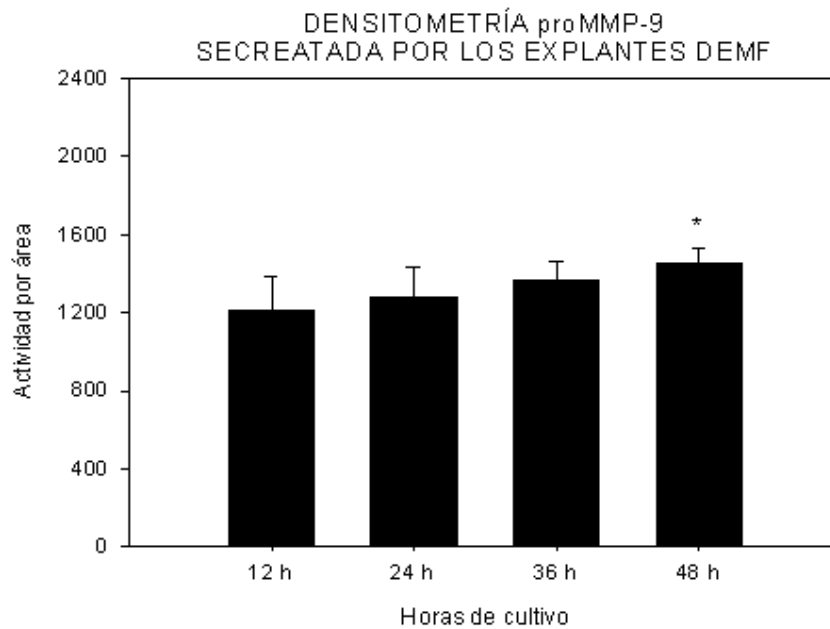


Figura 8 B. proMMP-9 secretada durante el cultivo de explantes obtenidos de MF. Las bandas de lisis obtenidas en zimografía (proMMP-9), fueron analizadas por medio de densitometría (n=8, *P<0.05).

10.3 SECRECIÓN Y ACTIVACIÓN DE proMMP-9 EN LOS MEDIOS DEL COCULTIVO DE EXPLANTES DE MF Y LEUCOCITOS.

Después de poner en contacto los explantes de MF y los leucocitos placentarios, se analizó la actividad gelatinolítica de los sobrenadantes del medio condicionado del cocultivo a las 0, 12, 24, 36 y 48 h, mediante el uso de la técnica de zimografía geles/sustrato. El ensayo mostró que a las 0 h el cocultivo no secreta ningún elemento producto del cocultivo al medio condicionado, a las 12 h el cocultivo secreta mayoritariamente proMMP-9 (92 kDa) (1917.37 ± 318.03 actividad por área) la cual aumenta su intensidad relativa a las 24 h (3059.3271 ± 621.46 actividad por área; $p < 0.05$), este aumento fue acompañado de la generación de una banda de lisis correspondiente a una especie de MMP-9 de menor peso molecular (82 kDa), MMP-9 activa (3366.03 ± 685.04 actividad por área; $p < 0.05$). La disminución en la intensidad relativa de la proenzima se dio a partir de las 36 h, tiempo en el que existe aumento de la intensidad relativa de la MMP-9 activa, la cual se

mantiene hasta las 48 h del cocultivo. La disminución en la intensidad de la proenzima correlaciona con la conversión a MMP-9 activa, lo que sugiere que la proenzima que se secreta al medio de cocultivo, está siendo activada por factores secretados por el mismo cocultivo.

Además se pudo observar la presencia constante durante todo el cocultivo de dos bandas de lisis adicionales, correspondientes a gelatinasas de alto peso molecular 115 y 215 kDa. Los pesos moleculares de las bandas de lisis fueron calculados de acuerdo a la migración relativa del U937 (MA). Figura 9 A y B.

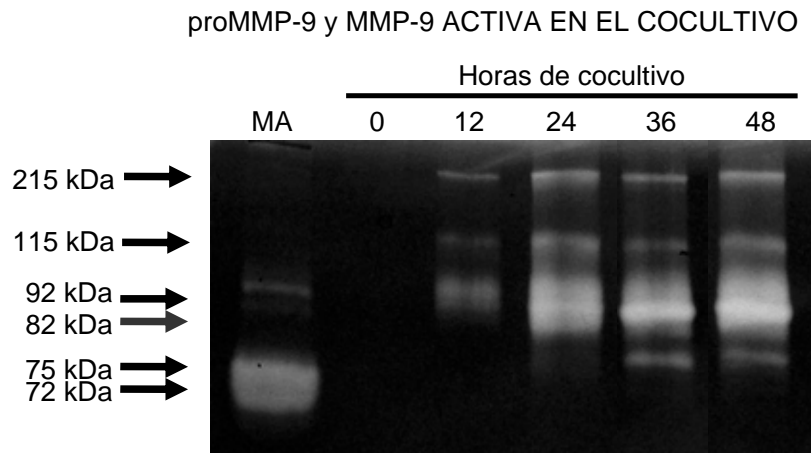


Figura 9 A. Actividad de gelatinasas por zimografía en el cocultivo. Los medios del cocultivo (n=7) fueron analizados por zimografía con gelatina mostrando la generación de dos especies de gelatinasas de diferente peso molecular generadas a lo largo del cocultivo proMMP-9 (92kDa) y MMP-9 activa (86 kDa) de acuerdo al patrón de migración del marcador de actividad (MA).

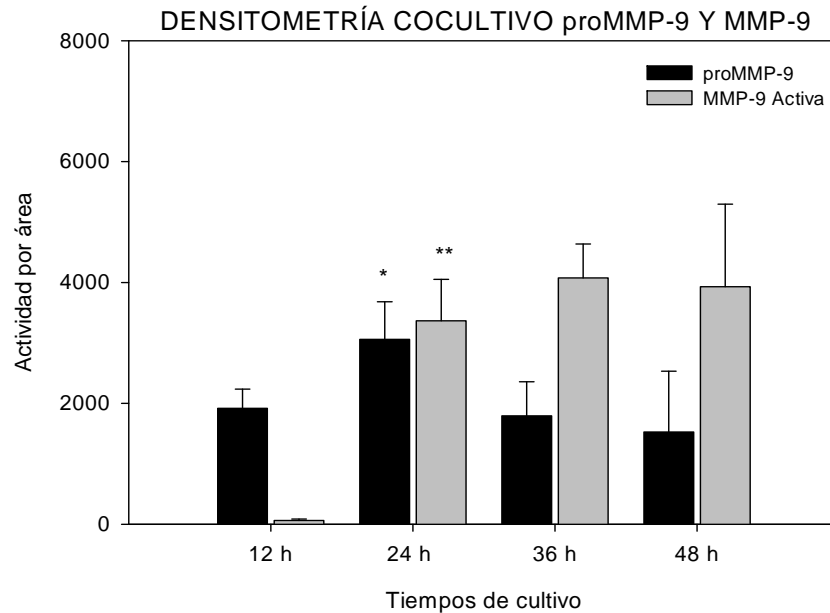


Figura 9 B. Análisis densitométrico de las especies de MMP-9 generadas en el cocultivo, proMMP-9 (92kDa) y MMP-9 activa (86 kDa) secretada al medio del cocultivo por los explantes de MF y leucocitos, durante las 48 h del cultivo. (n=7, *P=0.01, **P=0.001).

10.4 AUMENTO DE MMP-9 ACTIVA A LAS 24 H DE COCULTIVO.

La cantidad de MMP-9 activa secretada por el cocultivo, fue cuantificada a través de un ensayo de ELISA específico. Este ensayo permitió cuantificar la enzima en dos formas: como cantidad total de MMP-9 (MMP-9 total) y como cantidad de MMP-9 presente en forma activa (MMP-9 activa). Se observó que la MMP-9 total aumentó de manera significativa ($p < 0.05$) a las 24 h con respecto a las 12 h de cocultivo, este cambio en la cantidad de MMP-9 total se mantuvo constante sin diferencias significativas hasta las 48 h de cocultivo. La MMP-9 activa que se generó en el cocultivo también mostró un aumento en su concentración a partir de las 24 h de cocultivo, este aumento se mantuvo durante las 36 y 48 h siendo estadísticamente significativo ($p < 0.05$) con respecto a la cantidad de enzima activa de los medios de 12 h. Los resultados muestran que existe una tendencia hacia el aumento de la activación de la proMMP-9, por lo menos hasta las 24 h, lo que nos indica que el cocultivo

secreta lo necesario para poder llevar a cabo la conversión de la proenzima a enzima activa (Figura 10).

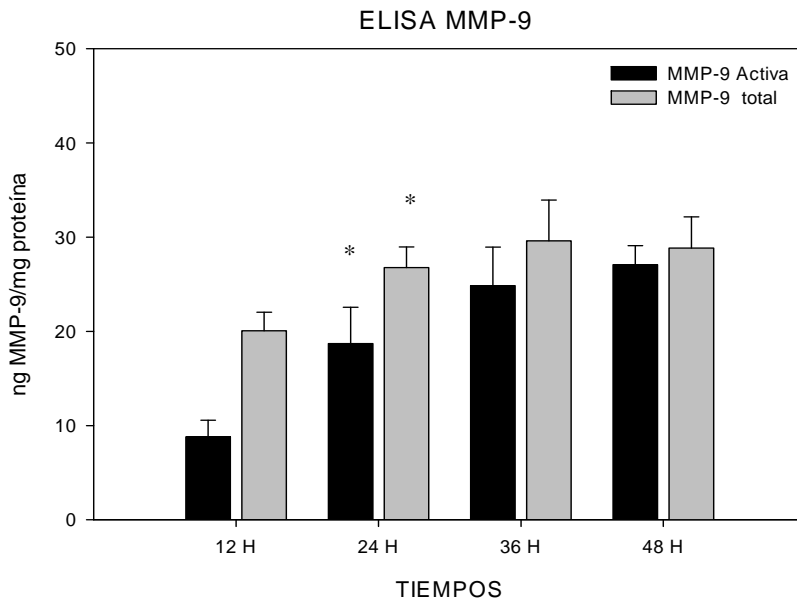


Figura10. Cuantificación de MMP-9 total y activa en los medios de cocultivo. Las concentraciones de MMP-9 total y activa fueron cuantificadas mediante un ensayo de ELISA comercial. Cada barra muestra el valor promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes con muestras por duplicado ($n=3$, * $p < 0.05$).

10.5 INCREMENTO EN LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE MMP-9 DURANTE EL COCULTIVO.

El ensayo para determinar la actividad específica de MMP-9 que es generada en el cocultivo mostró que esta enzima muestra una tendencia hacia el aumento de la actividad conforme aumenta el tiempo de cocultivo. Mediante este método se observó que a partir de las 12 h de cocultivo la enzima muestra evidencias de poder degradar el sustrato, sin embargo es a las 36 h cuando la MMP-9 ejerce su mayor actividad en comparación con las 12 h de cocultivo, conservando esta actividad sin diferencias significativas hasta las 48h de cocultivo. Figura 11.

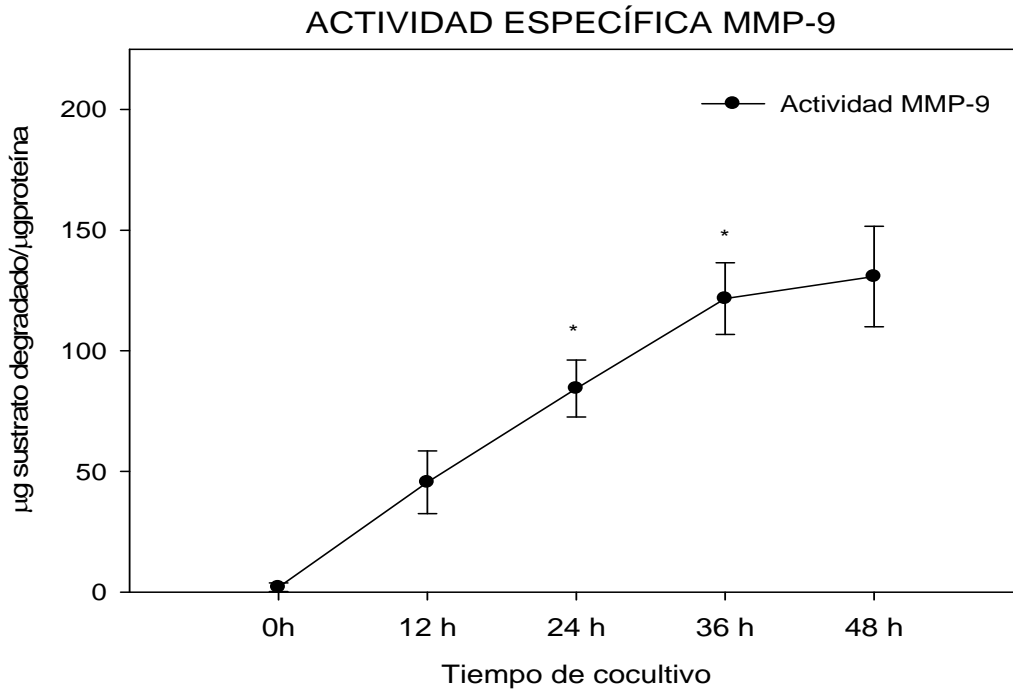


Figura 11. Actividad específica de MMP-9. Se muestra la actividad específica de la MMP-9 activa de cada uno de los medios de cocultivo a los diferentes tiempos, cada punto representa el promedio de 3 experimentos por duplicado \pm la desviación estándar (* $p < 0.05$).

10.6 ACTIVACIÓN DE MMP-9 POR PROTEASA PRESENTES EN LOS MEDIOS DE COCULTIVO.

Una vez observado que el modelo de cocultivo fue capaz de secretar ambas especies de MMP-9, ensayamos la capacidad del modelo para poder activar proMMP-9 recombinante humana (Calbiochem, San Diego, CA.) marcada con biotina como fuente exógena de la enzima. El ensayo permitió demostrar que el medio de cocultivo secretado por el modelo posee toda la maquinaria necesaria para activar a la proMMP-9 exógena a partir de las 24 h y hasta el final del tiempo experimental 48 h. Figura 12.

ACTIVACIÓN DE proMMP-9 POR LOS MEDIOS DEL COCULTIVO

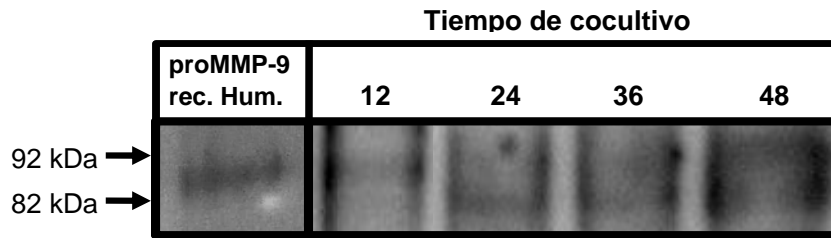


Figura 12. Activación de proMMP-9. Los medios del cocultivo de los diferentes tiempos experimentales fueron incubados con proMMP-9 recombinante humana marcada con biotina durante 2h a 37°C como se describió en *material y métodos*, la activación de la proMMP-9 fue revelada mediante la emisión de quimioluminiscencia (n=3), observando la aparición de MMP-9 activa a partir de la proMMP-9 exógena que fue incubada con los medios de cultivo de 24, 36 y 48 h.

10.7 REPRESENTATIVIDAD DE MMPs Y OTRAS FAMILIAS DE PROTEASAS EN LOS MEDIOS DE COCULTIVO.

Se ensayó la actividad de diferentes familias de proteasas secretadas a los medios condicionados por el cocultivo. La actividad basal de los medios de cocultivo de 48 h (control sin inhibidor) que fueron los que mostraron la mayor concentración de la enzima activa tuvieron una actividad de 0.105 ± 0.0033 mg de sustrato degradado/mg de proteína incubada (Figura 13). Al tratarse las muestras con los diferentes inhibidores se obtuvieron los siguientes valores y % de inhibición (Tabla 2):

INHIBIDOR	$\mu\text{g DE SUSTRATO DEGRADADO/ mg PROTEÍNA INCUBADA}$	% INHIBICIÓN
CONTROL S/I	0.105 ± 0.0033	0
EDTA	0.019 ± 0.0041	80.06
PMSF	0.094 ± 0.0149	6.6
NEM	0.101 ± 0.0069	1.2

Tabla 2. Porcentaje de inhibición de la degradación de sustrato. El porcentaje de inhibición más alto correspondió a la familia de MMPs, las cuales fueron en su mayoría totalmente inhibidas con EDTA. S/I: sin inhibidor.

Se encontró que la menor actividad enzimática se obtuvo al tratar los medios de cocultivo con EDTA. Al analizar los porcentajes de inhibición de la actividad específica para cada familia de proteasas, la actividad enzimática presente en los medios de cocultivo está dada en su mayoría por MMPs, existe también actividad de proteasas de serina aunque en menor proporción con respecto a la familia anterior y la mínima actividad encontrada fue debido a proteasas de cisteína.

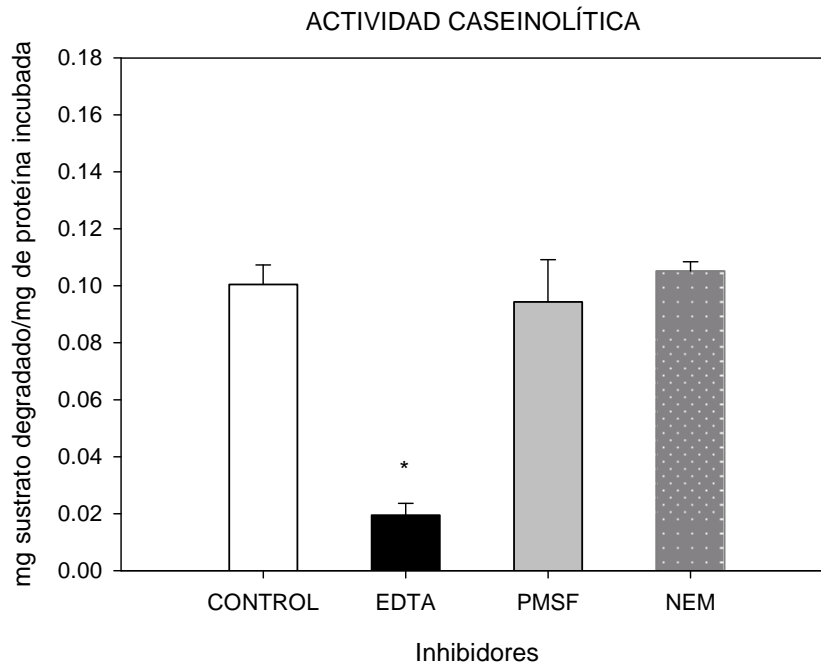


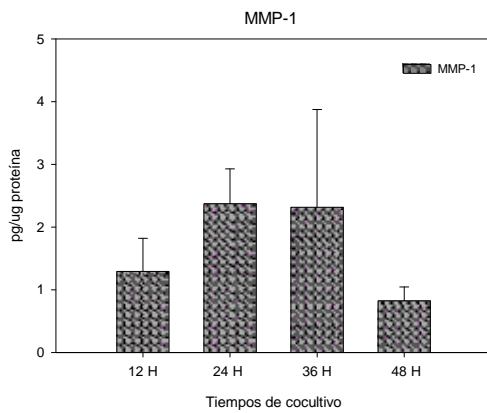
Figura 13. Perfil de inhibición de las proteasas presentes en los medios condicionados del cocultivo de 48 h, con los siguientes inhibidores: ácido etilendiaminotetra acético (EDTA), fluoruro sulfonil fenilmercúrico (PMSF), y N-etilmaleimida. (n=4,*P< 0.05).

10. 8 MMPs PRESENTES EN LOS MEDIO DE COCULTIVO.

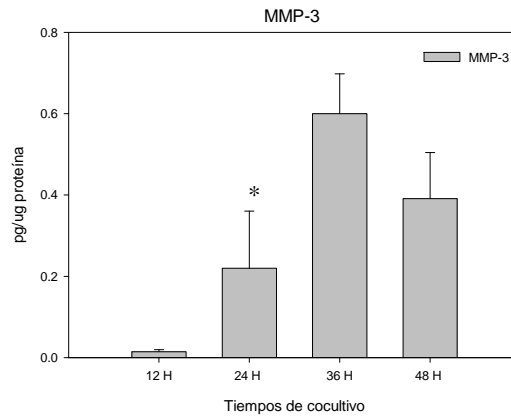
Considerando que la familia de proteasa que se encontró en mayor proporción en los medios de cocultivo correspondió a MMPs, se realizaron ensayos Multiplex para medir la concentración de varias MMPs en los medios de cocultivo. Este ensayo nos permitió medir las concentraciones de colagenasa intersticial (MMP-1) estromelisina 1 (MMP-3), matrilisina (MMP-7) y gelatinasa B (MMP-9). Dicho ensayo no mostró diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las concentraciones individuales de cada una de las MMPs a los

diferentes tiempos de cocultivo, a excepción de estromelisina-1 ó MMP-3 (Figura 14B), la cual aumento sus niveles de secreción significativamente a partir de las 24 h de cocultivo (0.220 ± 0.140 pg/mg de proteína; $p < 0.05$, comparado con 12 h) y hasta las 36 h (0.600 ± 0.0978 pg/mg de proteína; $p < 0.05$, comparado con 12 y 24 h) tiempo en el que se alcanzo su máxima concentración. La enzima más representativa o más abundante en los medios de cocultivo fue MMP-9 (Figura 14 D), (pg/mg de proteína; a las 36 h de cocultivo) seguida por MMP-1 (Figura 14A), (pg/mg de proteína; a las 24 h de cocultivo) y MMP-7 (Figura 14C)

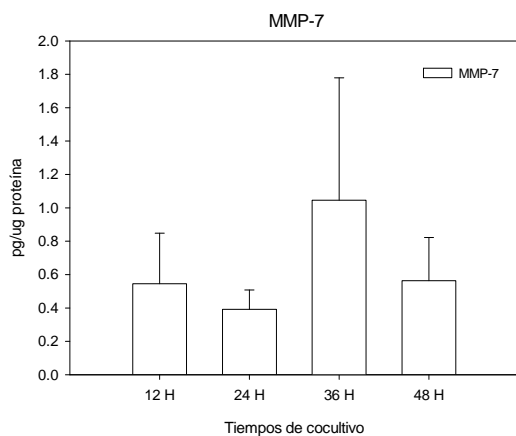
A



B



C



D

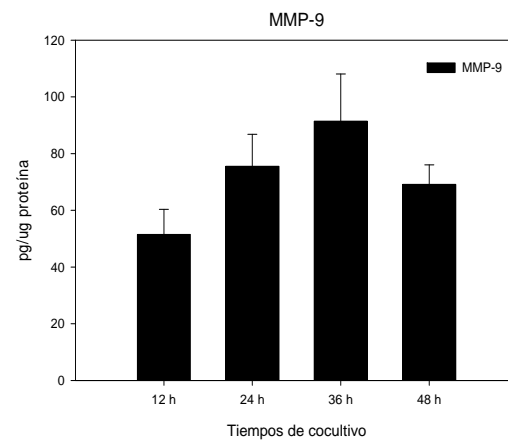


Figura 14. Perfil de MMPs secretadas por el cocultivo. El panel **A** muestra la concentración de MMP-1; panel **B**, MMP-3; panel **C**, MMP-7 y panel **D**, MMP-9. Cada barra representa el valor promedio \pm la desviación estándar ($n=5$, $*P < 0.05$).

10.9 INHIBICIÓN ESPECÍFICA DE MMP-3.

Debido a que el cocultivo mostró la capacidad de secretar diferentes MMPs, las cuales han sido documentadas como posibles activadores de la pro MMP-9, y observando que el aumento en la concentración de MMP-3 a las 24 h coincidió con la aparición de formas activas de MMP-9 en el cocultivo (observadas por zimografía; Figura 9 A), se agregó al cocultivo un anticuerpo anti MMP-3 (Affinity BioReagent, Golden, CO) a una concentración de 2 µg/mL. Los resultados por zimografía mostraron una clara desaparición de las bandas de lisis correspondientes a las formas activas de MMP-9 (82 kDa) en todos los tiempos de cocultivo, debido a que el posible activador de la proMMP-9 fue bloqueado con el anticuerpo (Figura 15 A).

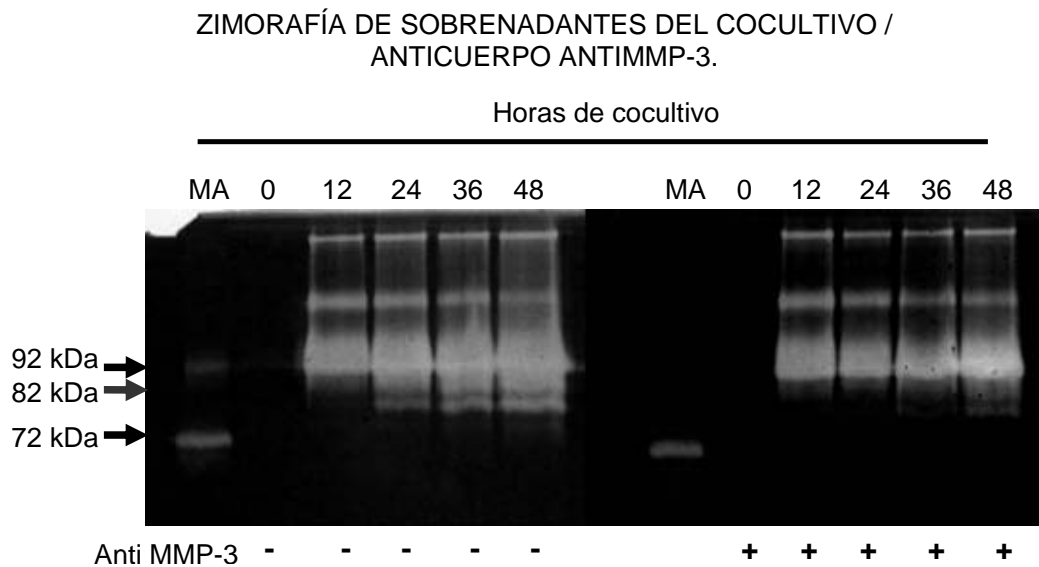


Figura 15 A. Actividad enzimática por zimografía. Se muestra el efecto del inhibidor específico para MMP-3 (n=3) en cuanto a la generación de bandas de lisis correspondientes a formas activas de MMP-9 (82 kDa) en los medios de cocultivo; (-), sin antiMMP-3; y (+), con antiMMP-3. (MA) Marcador de actividad de células U937.

Esta desaparición de las especies activas de MMP-9 correlacionó con una disminución estadísticamente significativa de la actividad de dicha enzima sobre el sustrato específico cuando los medios de cocultivo fueron tratados con

un inhibidor específico para MMP-3, MMP-3 Inhibitor II (Calbiochem, San Diego, CA) a una concentración de 130 nM. Figura 15 B.

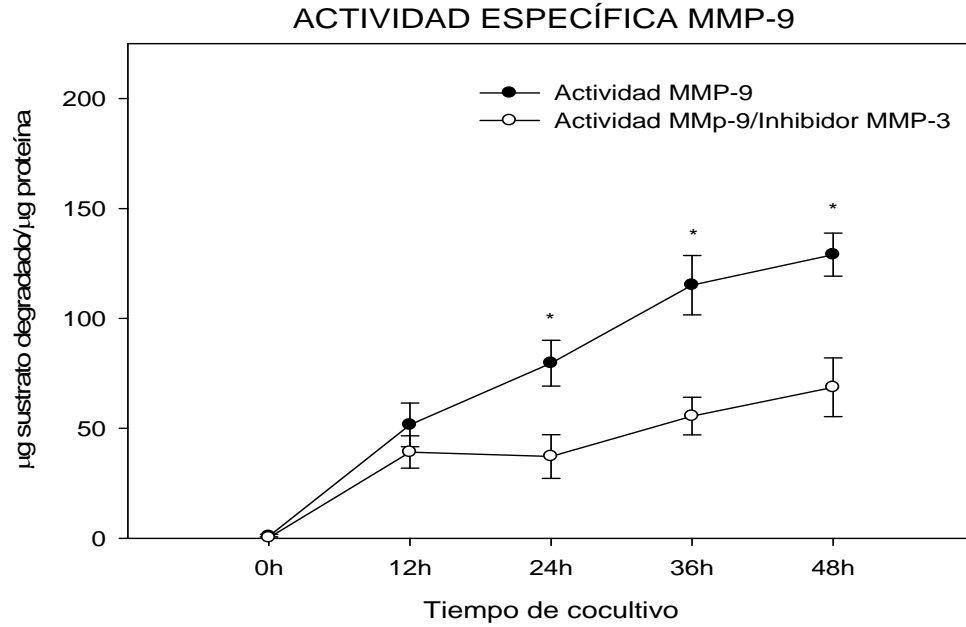


Figura 15 B, Actividad específica. Se muestra la disminución en la actividad de los medios de cocultivo tratados con inhibidor específico para MMP-3 130 nM (●), respecto a la actividad basal de la MMP-9 activa (○). Cada círculo representa la media de 3 experimentos por duplicado \pm la desviación estándar (* $p < 0.05$).

11. DISCUSIÓN.

Las membranas fetales en su conjunto forman una entidad dinámica que secretan diversas sustancias tanto al líquido amniótico como al útero, capaz de responder a diferentes señalizaciones bioquímicas que le permiten mantener su homeostasis y fuerza tensil hasta el momento del trabajo de parto⁹. Se ha observado tanto en modelos animales como en el humano, que las membranas fetales muestran cambios en su estructura en la etapa de cercanía al trabajo de parto, los cuales llevan a las membranas a romperse durante el trabajo de parto debido a una pérdida en la concentración de colágena y un incremento en la expresión de colagenasa tipo IV de 92 kDa, asociado a la disminución de la fuerza tensil de estas membranas^{5,6,7}. En la actualidad se sigue incrementando el conocimiento de los eventos que condicionan la ruptura de las membranas fetales de forma normal o durante el desarrollo de la ruptura prematura de membranas; como resultado de ello, se acepta que el principal daño es la degradación patológica del tejido conectivo de estos tejidos, que ocurre desfasado de otros eventos del trabajo de parto, trayendo por consecuencia el debilitamiento progresivo de estas estructuras y su consecuente ruptura.

En el presente estudio decidimos utilizar un modelo experimental que incluyó membranas fetales y leucocitos, con la intención de duplicar las condiciones que suponemos suceden in vivo y asegurar la presencia de todos los elementos celulares que son fuente potencial de moléculas efectoras relacionadas con la ruptura de las membranas. Las membranas fetales son tejidos que carecen de vasos sanguíneos y se sabe que el origen de los leucocitos que las infiltran debe ser el líquido amniótico o la coriodecidua, que representa la superficie de contacto entre los tejidos maternos y los fetales, existe evidencias en la literatura que apoyan el concepto de que las membranas fetales son capaces de producir diferentes mediadores involucrados en la degradación de las mismas y que diferentes tipos de leucocitos que arriban a los tejidos gestacionales en el tercer trimestre del embarazo poseen de igual manera, el potencial de secretar moléculas efectoras como citocinas y el sistema enzimático de MMPs, además, se ha observado que antes de iniciarse el trabajo de parto existe un aumento en la

cantidad de leucocitos que invaden las membranas fetales y a la coriodecidual, siendo estas células junto con las membranas fetales, un conjunto capaz de producir mediadores involucrados en la degradación de las propias membranas potenciando la secreción de las MMPs^{59,69, 70}.

La utilización de membranas fetales y leucocitos placentarios en este trabajo, esta soportada por evidencias generadas en nuestro laboratorio, donde se demostró que conjuntamente las membranas fetales y los leucocitos, específicamente los de origen coriodecidual (provenientes de un microambiente determinado), expresan mediadores solubles como TNF- α , IL-1 β y MMP-9, lo que sugiere que esta interacción contribuye principalmente con el debilitamiento de las membranas fetales⁵⁴.

Las MMPs que son implicadas en la degradación del tejido conectivo de las membranas fetales son la MMP-2 y la MP-9 y se ha correlacionado su expresión y activación con las modificaciones que sufren las membranas fetales durante el trabajo de parto o la ruptura prematura de membranas⁷¹. En este proceso está implícita la activación endógena de estas MMPs, que deben necesariamente transformarse a sus formas activas para poder ejercer su efecto catabólico sobre las moléculas que constituyen a las membranas fetales, ya que como se mencionó, las MMPs son secretadas en forma de zimógeno al espacio extracelular.

En la actualidad el estudio de los mecanismos que operan para activar a las MMPs no ha sido abordado de manera integral. Debido a lo anterior se han propuesto diversos modelos que afrontan el estudio de la activación in vivo de estas enzimas en diferentes procesos tanto fisiológicos como patológicos.⁷²

En el modelo de ruptura de las membranas fetales se ha documentado la presencia de al menos MMP-1, MMP-8, MMP-2, MMP-9, MMP-3 y MMP-7^{10, 73, 74, 75}, donde las colagenasas como MMP-1 y MMP-8 son las encargadas de cortar la colágena fibrilar de las membranas fetales, siguiendo una cascada de degradación que se extiende por la acción de la MMP-2 y MMP-9, las cuales culminan en la degradación de colágena tipo IV, fibronectina y proteoglicanos,

siendo la MMP-9 la principal enzima implicada de manera selectiva al momento del trabajo de parto, por lo que ha sido utilizada como un marcador bioquímico para este suceso⁷, pero los mecanismos de activación que llevan a estas enzimas a degradar su sustrato no están esclarecidos. A pesar de todas las evidencias que apoyan la activación de MMPs, en el modelo de ruptura de las membranas fetales, la forma activa de MMP-9 no ha sido documentada al menos por zimografía, estas enzimas han sido identificadas solamente en estado de proenzimas en diferentes modelos experimentales^{44, 76, 77}.

En el presente estudio, utilizamos un modelo de coincubación de explantes de membranas fetales y leucocitos placentarios para poder caracterizar el mecanismo de activación de proMMP-9 estableciendo un microambiente específico, proponiendo que la comunicación entre los leucocitos y las células residentes en las membranas fetales, resulta en la inducción de la activación de MMP-9 para la degradación de su tejido conectivo.

Para probar esta hipótesis, las membranas fetales (amnios y corion) se mantuvieron íntegras, lo que les permite mantener la comunicación autócrina-parácrina entre las dos capas del tejido. Las membranas fetales y los leucocitos empleados en este estudio, como se mencionó previamente, provenían de mujeres a las que se les practicó cesárea electiva sin trabajo de parto, lo que nos permitió trabajar con tejidos en condiciones basales, es decir, que todavía no empezaban los mecanismos normales de degradación que se llevan a cabo durante el trabajo de parto, ya que éste era el efecto final que se quería inducir. El primer paso para desarrollar el modelo *in vitro* consistió en la estandarización de las condiciones de cultivo de este tejido, para asegurarnos que se podía mantener viable y en buenas condiciones de funcionalidad, para lo cual se siguió un método reportado en la literatura⁷⁸. De acuerdo con estos autores, los explantes se preincubaron por un período de 48 h debido a que la expresión de algunos genes de interés es inducida por la manipulación del tejido, tiempo en el que se sustituyó el suero fetal bovino por hidrolizado de lactoalbúmina, debido a que el primero puede ser fuente tanto de MMPs y sus inhibidores, así como de citocinas que pudieran interferir en nuestros resultados. Por otro lado el manejo de las membranas y las condiciones de

incubación permitieron que el tejido se mantuviera con más del 95% de células viables a las 48 horas de cultivo, tiempo suficiente para realizar los ensayos. Por lo tanto la evidencia de que las membranas fetales reducen activamente al compuesto XTT, confirman que éstas mantienen su viabilidad durante el periodo experimental, lo que también se refuerza con la demostración de que tanto las membranas fetales como los leucocitos de manera independiente, son capaces de secretar proMMP-9 a lo largo del cultivo, y que únicamente a las 48 h de cultivo en ambos casos existió un incremento estadísticamente significativo en la secreción de la enzima respecto a las 12 h de cultivo. Además de evidenciar la estabilidad de esta enzima, ya que únicamente se pudo observar una especie de MMP-9 de 92 kDa que corresponde a proMMP-9 a lo largo del periodo experimental, lo que nos indicó una aparente resistencia a la activación de la enzima, ya que no se mostraron evidencias de la posible generación de formas activas de MMP-9 en cada uno de los medios de cultivo. Estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura, donde se apoya la evidencia de que tanto las poblaciones celulares de las membranas fetales, como las células inmunológicas de la placenta tienen la facultad de secretar proMMP-9⁵⁷. Lo anterior afirma el uso del modelo experimental propuesto, en lugar del cultivo del amnios o el corion solos, ya que el modelo experimental (cocultivo de membranas fetales y linfocitos placentarios) nos permite estudiar cuantitativamente y cualitativamente la contribución de las distintas poblaciones celulares de las membranas fetales⁶¹ y la de los leucocitos placentarios ante su coincubación.

El diseño del modelo *in vitro* para el cocultivo de los leucocitos placentarios, los cuales representan el entorno más cercano a las membranas fetales, con los explantes de las mismas, incluyó el uso de transwells, sistema que evita el contacto físico entre ambos, permitiendo solo la comunicación a través de mediadores solubles, ya que algunos autores postulan que la comunicación entre las células inmunológicas y las membranas fetales se lleva a cabo de esta manera⁷⁹. Cuando los explantes de las membranas fetales se coincubaron con los leucocitos placentarios, se observó que durante las primeras 12 h, el cocultivo solo secreta proMMP-9, estos resultados confirman lo observado previamente (a las 12 h de cocultivo) durante el cultivo independiente de cada

uno de los componentes (membranas fetales y leucocitos); algo muy notorio sucedió a las 24 h, ya que se manifestó un aumento significativo en la intensidad relativa de las bandas de lisis de la proMMP-9 secretada al medio de cocultivo, pero lo realmente interesante fue que acompañando a este aumento, y observado por zimografía, apareció una banda de lisis correspondiente a una especie de MMP-9 con un peso molecular de 82 kDa, la cual ha sido reportada como una especie totalmente activa de la enzima⁸⁰. Este hecho resulta realmente trascendente, ya que en este trabajo pudimos observar a la MMP-9 proveniente de la interacción de las membranas fetales con los leucocitos placentarios (cocultivos) como una enzima activa, y potencialmente capaz de degradar el tejido conectivo de las membranas fetales. A diferencia de la mayoría de reportes que existen en la literatura sobre esta enzima, donde relacionan directamente a ésta enzima con la degradación y la ruptura de las membranas fetales, pero en estos trabajos solo han sido identificada la MMP-9 como una enzima inactiva^{44, 76, 77}, lo que resulta en una inconsistencia biológica ya que la familia de enzimas de la MMP-9, o por lo menos ésta, deben encontrarse obligadamente en forma activa para ejercer la degradación del tejido conectivo de las membranas fetales durante el parto. Adicionalmente a las dos especies de MMP-9 (proMMP-9 y MMP-9 activa) encontradas por zimografía, pudimos documentar proteínas con actividad gelatinolítica de alto peso molecular, las cuales fueron observadas a ~115 y 215 kDa. Estas especies pueden corresponder a las asociaciones previamente descritas de MMP-9 con α_2 -microglobulina o lipocalina [lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilo (NGAL), una proteína asociada a MMP-9 de 25 kDa] para producir la especie de 125 kDa^{81,82}, o la forma dimérica de 215 kDa⁸³. La transición del estado de proenzima a enzima activa que pudimos observar, coincidió a las 36 h con la disminución de la proMMP-9 y un aumento en la intensidad relativa de las bandas de lisis generadas por la MMP-9 activa. Dicha transición se mantuvo constante a partir de las 36 h de coincubación y hasta las 48 h.

Los resultados anteriores que se obtuvieron con la zimografía fueron complementados al cuantificar la MMP-9 activa que se generó en el cocultivo mediante un ELISA específico, este ensayo mostró que al igual que existe un incremento en la secreción de proMMP-9, también existe en el cocultivo un

gradiente de MMP-9 activa, observando que a las 24 h, existen diferencias estadísticamente significativas con respecto a las 12 h de cocultivo. Posterior a las 24 h la MMP-9 activa sigue una tendencia hacia el aumento de la misma, aunque de manera no significativa, hasta las 48 h de cocultivo. Algo controversial a los resultados de la zimografía fue la presencia de MMP-9 activa a las 12 h, detectada por ELISA, lo cual pudo deberse a la sensibilidad que muestran ambos métodos para observar y cuantificar la MMP-9. De esta manera confirmamos de manera cuantitativa que el cocultivo de las membranas fetales y los leucocitos son capaces de generar la presencia de la especie activa de MMP-9.

En estudios de activación de zimogenos por proteasas, parece de gran importancia, el poder distinguir la verdadera activación de la enzima, de la conversión proteolítica de la proenzima a una especie de menor peso molecular pero catalíticamente inactiva,⁸⁴ por lo que la medición de la actividad enzimática de la especie de MMP-9 de 82 kDa en solución fue crítica en el presente trabajo, poniendo de manifiesto que la MMP-9 cuantificada por ELISA tiene una cinética de actividad, y por consecuencia esta enzima muestra una característica funcional, ya que necesariamente la enzima debe encontrarse en forma activa para ejercer su función proteolítica sobre las membranas fetales que traerá como consecuencia el debilitamiento de las mismas para su posterior ruptura.

El modelo empleado en este estudio nos permitió evaluar distintos parámetros, uno de ellos fue la capacidad que tienen tanto las membranas fetales en cocultivo con los leucocitos placentario de poder secretar el(los) activador(es) de la proMMP-9⁸⁵, lo cual fue confirmado mediante western blot; en donde se reveló la presencia de la especie activa de MMP-9 de 82 kDa, derivada a partir de la incubación de proMMP-9 recombinante humana marcada con biotina, la cual fue agregada a los medios condicionados del cocultivo como una fuente exógena de proMMP-9 y con la finalidad de tener un blanco de activación para el(los) activador(es) presente(s). Esta proteína de 82 kDa solo se visualizó en las muestras que se incubaron con medios extraídos del cocultivo de 24 y hasta 48. Lo mismo sucedió en la zimografía de los medios de cocultivo, donde

solo pudimos ver la forma activa de MMP-9 a partir de las 24 h. Esto nos confirmó la presencia de el(los) activador(es) en los medios condicionados del cocultivo y que la activación de la MMP-9 no es debida a las condiciones previamente descritas para el cocultivo, sino a la acción que ejerció alguno de los posibles activadores.

En el orden de poder identificar la naturaleza de las posibles familias de proteasas y conocer su respectiva representatividad, en los medio de cocultivo, como producto de la interacción de las membranas fetales y los leucocitos placentarios, ya que de manera independiente estos dos componentes son capaces de hacerlo; el análisis bioquímico indico que las proteasas secretadas son en su mayoría metaloproteasas, tales como las diferentes MMP, ya que el mayor porcentaje de inhibición se obtuvo al tratar los medios de dicho cocultivo con EDTA, inhibidor de metaloproteasas, esto coincide con lo reportado previamente por otros autores en un modelo de rata⁸⁶. Lo que sugiere también que en su mayoría esta familia de enzimas son las responsables de la actividad proteolítica en nuestro modelo, ya que ha sido documentado en diferentes modelos de estudio la capacidad que tienen muchos miembros de esta familia para activar a la proMMP-9. Estos hallazgos sustentan el concepto descrito en trabajos previos, sobre la participación activa y directa de esta familia de proteasas en la ruptura de las membranas fetales tanto de manera normal como patológica⁸⁷

En algunos estudios in vitro se ha podido documentar la activación de la proMMP-9 por otros miembros de la misma familia, y en la determinación de conocer las metaloproteasas de matriz extracelular presentes en el medio de cocultivo durante todo el periodo experimental, se cuantificaron las concentraciones de MMP-1, MMP-3 y MMP-7, las cuales han sido postuladas en la literatura internacional como ejes principales en la activación de la MMP-9, a demás de la misma MMP-9. La cuantificación de estas metaloproteasas de matriz extracelular mostró que solo la MMP-3, reveló diferencias estadísticamente significativas en su concentración a las 24 h de cocultivo, coincidiendo este aumento en su concentración con la aparición de la especie activa de 82 kDa de la MMP-9 a las 24 h. De hecho, se ha reportado que in

in vitro MMP-3 es un eficiente activador de proMMP-9, generando una especie de MMP-9 de 82 kDa, la cual ha sido reportada por otros autores como una enzima que posee efectiva función catalítica en el tejido⁸⁸. La adición del anticuerpo anti MMP-3 al cocultivo, impidió que la propia MMP-3 que es secretada por el mismo cocultivo pudiera ser activada por alguna de las proteasas presente, de esta manera también se logro evitar cualquier efecto que pudiera tener la MMP-3 sobre la proMMP-9 en cuanto a su activación. La disminución de la actividad que se observó con respecto a los medios no tratados con el anti MMP-3 fue muy evidente, aunque no desapareció por completo, lo que sugiere que la actividad que observamos de forma disminuida, se le puede relacionarse con el efecto de activación que tienen otras enzimas de esta familia sobre la proMMP-9, aunque la mayor parte de la activación de la proMMP-9 es responsabilidad de la MMP-3, de esta manera también podemos considerar que la MMP-3 se encuentra en concentraciones catalíticas para poder activar a la proMMP-9 en nuestro modelo.

12. CONCLUSIONES.

El análisis de este trabajo en su conjunto nos indica que la interacción de las poblaciones celulares de las membranas fetales con los leucocitos de la circulación placentaria tiene como resultado la secreción de una completa maquinaria que es necesaria para poder activar a la proMMP-9.

La aparición de la especie activa de MMP-9, parece ser un evento que aparece de manera dependiente de la secreción de productos solubles propios de la interacción de la membrana fetal con los leucocitos, siendo este un hallazgo que no ha sido documentado antes, pese a la gran cantidad de trabajos realizados al respecto, donde solo se ha reportado la presencia de esta metaloproteasa en forma de proenzima (proMMP-9)⁴³, lo cual resulta controversial ya que la enzima necesariamente debe encontrarse en forma activa para poder ejercer su función.

Es por esto que se podría considerar a la interacción ó comunicación de leucocitos de la circulación placentaria con las poblaciones celulares de las membranas fetales antes de iniciar el trabajo de parto, como una fuente potencial de mediadores que pueden inducir la degradación del tejido conectivo, representada al menos por una cinética de secreción de proMMP-9 y su posterior activación de la misma, o como ha sido postulado por otros investigadores, los cuales proponen que la señal que da lugar a que inicie la degradación del tejido conectivo debe ser originada por células del microambiente local, es decir, por las células presentes en la circulación de la sangre de la placenta que es el entorno más cercano a las membranas fetales.¹⁰³.

El modelo experimental propuesto permite mantener *in vitro* la integridad, viabilidad y funcionalidad de las membranas fetales y leucocitos, reproduciendo el evento que ocurre naturalmente.

Finalmente podemos proponer que la placenta y sus tejidos anexos son capaces de reclutar poblaciones específicas de leucocitos o bien condicionar a las subpoblaciones locales a mostrar capacidades funcionales específicas,

como es la secreción de la MMP-3. Por lo tanto en el modelo de estudio se reproduce el mecanismo de activación de proMMP-9 mediado en su mayoría por MMP-3 (activación de MMPs por MMPs), poderoso activador de la MMP-9 que relacionamos de manera directa con la inducción de la degradación del tejido conectivo de las membranas fetales.

13. APÉNDICE DE TÉCNICAS.

1. SEPARACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES A PARTIR DE SANGRE TOTAL UTILIZANDO UN GRADIENTE DE FICOLL (Lymphoprep-NYCOMED)

1. La sangre total se diluye con un volumen igual de solución salina fisiológica.
2. 6 ml de sangre diluída se estratifica sobre 3 ml de lymphoprep y se centrifuga a 2100 rpm por 30 min a 20°C
3. Con una pipeta Pasteur, se aspira la banda de células mononucleares que se forma en la interfase y se lavan con 4 ml de PBS pH 7.4 centrifugando a 750 rpm por 10 min a 20°C
4. Se decanta el sobrenadante y se agregan 10 ml de amortiguador de cloruro de amonio (NH₄Cl 155 mM, KHCO₃ 10 mM, EDTA 0.1 mM) para lisar los eritrocitos que estén presentes en el paquete celular, incubando por 10 min a temperatura ambiente.
5. Se hace un lavado con 4 ml de PBS/EDTA 2mM-pH 7.4, centrifugando a 750 rpm por 10 min a 20°C
6. Se decanta el sobrenadante, se resuspende el paquete celular en 1 ml de PBS/EDTA 2mM-pH 7.4 y se ponen en hielo mientras se hacen las pruebas de conteo y viabilidad.

2. CONTEO Y VIABILIDAD DE LAS CELULAS MONONUCLEARES CON AZUL TRIPANO

1. Se mezclan 90 µl de azul tripano al 0.1% en PBS pH 7.4 y 10 µl de la suspensión celular.
2. Se carga la cámara de Neubauer con 10 µl de esta mezcla y se cuenta el número de células en 1 mm², distinguiendo entre vivas (sin color) y muertas (azules): el número de células contadas se multiplica por 10⁵ para conocer el número de células/ml en la suspensión.

3. METODO DE BRADFORD PARA CUANTIFICACION DE PROTEINAS (Bradford, 1976)

REACTIVOS:

- a) **REACTIVO DE COLOR:**
- | | |
|----------------------------------|--------|
| Coomasie G-250..... | 100 mg |
| Etanol al 95%..... | 50 ml |
| Acido fosfórico al 85%..... | 100 ml |
| Llevar 200 ml con agua destilada | |

- b) **ESTANDAR DE PROTEINAS:** Albúmina sérica ovina en agua destilada (1mg/ml)

METODO:

Construir una curva patrón con 2, 5, 10, 15 y 20 µg de proteína, ajustando el volumen a 800 µl con solución salina fisiológica. Agregar 200 µl de reactivo de color, agitar y leer a 595 nm después de 5 min.

Seguir el mismo procedimiento con las muestras (30 µl de cada una), interpolando su lectura en la curva para determinar la concentración de proteínas.

4. ZIMOGRAFIA para MMP-9 (Kleiner y Stleter-Stevenson, 1994; Vadillo y cols, 1995)

La actividad de la MMPs puede ser detectada y cuantificada en un zimograma. Para esto, se preparan geles de poli-acrilamida al 8% con SDS, agregando gelatina porcina a una concentración de 1 mg/ml, la cual funciona como sustrato.

1. Se preparan los geles de acuerdo a la siguiente tabla:

REACTIVO	GEL INFERIOR	GEL SUPERIOR
Acrilamida/bis-acrilamida	2 ml	0.5 ml
Buffer inferior	2.5 ml	---
Buffer superior	---	1.25 ml
Gelatina porcina	2.0 ml	---
Agua	3.4 ml	3.1 ml
TEMED	10 µl	10 µl
Persulfato de amonio al 10%	50µl	50 µl

Acrilamida/bis-acrilamida: Se disuelven 38 g de acrilamida y 2 g de bis-acrilamida en agua desionizada. Se filtra con membrana de 0.22 micras y se conserva en frío, protegida de la luz.

Buffer inferior: Tris 1.5M pH 8.8

REACTIVO	CANTIDAD
Tris 1.5 M	18.17 g
SDS al 10%	4 ml

Ajustar a pH de 8.8 y aforar a 100 ml con agua desionizada.

Regulador superior: Tris 0.5M pH 6.8

REACTIVO	CANTIDAD
Tris 0.5 M	6.05 g
SDS al 10%	4 ml

Ajustar a pH de 6.8 y aforar a 100 ml con agua desionizada.

Gelatina porcina: Disolver 250 mg de gelatina porcina en 50 ml de agua desionizada hirviendo. Conservar en frío.

Persulfato de amonio al 10%: Disolver 10 mg de persulfato de amonio en 100 µl de agua desionizada. Preparar al momento de uso.

2. La cantidad de muestra se ajusta para tener 0.5 µg de proteína y se mezcla con una cantidad proporcional de regulador de muestra.

Buffer de muestra

REACTIVOS	CANTIDAD
Buffer superior	1.75 ml
Glicerol	1.0 ml
SDS al 10%	1.0 ml
Azul de bromofenol	10 mg
Agua	1 mL

3. Se hace la electroforesis de las muestras poniendo un marcador de actividad como control, corriendo durante aproximadamente 2 h a 10 mA con el siguiente buffer de cámara:

REACTIVOS	CANTIDAD PARA 1 L
Tris	3.0 g
Glicina	14.4 g
SDS al 10%	10 ml

4. Se lavan los geles con Tritón X-100 al 2.5%, agitando durante 30 m.
5. Se desecha el tritón y se agrega buffer de incubación por 24 h a 37°C, tiempo en el cual, la enzima degrada la gelatina y se hacen forman bandas de lisis en el gel.

Buffer de incubación con CaCl₂

REACTIVOS	CONCENTRACION	CANTIDAD PARA 1 L
Tris	50 mM	6.057 g
CaCl ₂	0.1 M	4.41 g
NaCl	0.15 M	8.76 g
NaN ₃ (azida de sodio)	----	2 g

6. Se pone el gel en solución teñidora durante media hora y posteriormente en solución desteñidora por 24 h.

Solución teñidora:

REACTIVOS	CONCENTRACION
Metanol	10%
Acido acético	10%
Glicerol	10%
Azul de Coomasie R-250 al 1%	10%

Solución desteñidora:

REACTIVOS	CONCENTRACION
Metanol	10%
Acido acético	10%
Glicerol	10%

7. El área de las bandas de lisis se analizaron con el analizador de imágenes UVP, Southern, CA, USA.

5. CUANTIFICACION DE MMP-9 ACTIVA con el equipo comercial MMP-9 activity assay system (Amersham Pharmacia Biotech).

1. Preparar los reactivos como indica el inserto del equipo, haciendo una curva estándar con concentraciones de 0, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 ng de MMP-9 por ml. La placa está recubierta con el anticuerpo de captura.
2. Poner 100 μ l de regulador de ensayo a cada pozo y 100 μ l del estándar apropiado o de la muestra a los pozos indicados. Cubrir la placa e incubar toda la noche a 2-8°C.
3. Aspirar y lavar 4 veces con el regulador de lavado, secando completamente el líquido sobre papel absorbente.
4. Adicionar 50 μ l de APMA 1 mM y agitar la placa por 20 seg sin tapar.
5. Cubrir la placa e incubar a 37°C por 1.5 h (justo antes de terminar este tiempo se prepara el agente de detección, mezclándolo suavemente en el vórtex).
6. Poner 50 μ l del agente de detección en los pozos y agitar la placa 20 seg.
7. Leer a 405 nm para obtener el valor de t_0 (tiempo 0).
8. Cubrir la placa e incubar a 37°C por 1 hora.
9. Agitar 20 segundos y leer a 405 nm. Al valor obtenido en este paso se le resta el valor de t_0 para obtener el valor real de la actividad.

6. ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE MMP-9 (Weingarten y Feder 1985).

1. Preparar el sustrato para gelatinasas MMP-9/MMP-2: Ac-Pro-Leu-Leu-Gly-OC₂H₅ (Calbiochem) una concentración final de 3 mM.
2. Preparar el buffer de ensayo (HEPES 0.05 M pH 7.4, CaCl₂ 0.01 M, 4,4'-ditiopiridina 0.001 M).
3. Agregar el sustrato y el buffer de ensayo en un tubo de reacción con la enzima (0.5 μ g/mL de proteína de cada uno de los medios de cocultivo).
4. Incubar la mezcla por 3 h a 25°C con agitación constante (es recomendable monitorear la reacción constantemente a 324 nm).
5. Los valores de la absorbancia de cada uno de los productos de la reacción fueron leídos a 324 nm en espectrofotómetro.
6. Las actividades enzimáticas son expresadas como μ g de sustrato degradado/mg de proteína incubada.

7. MMP-9 MARCADA CON BIOTINA.

1. Pesar 25 mg de biotina-Long Arm (Vector Laboratories, England) y disolverla agrgando 1 mL de Dimetilsulfoxido (DMSO) para una concentración final de 25 mg/mL.
2. Reconstituir la MMP-9 recombinante humana en PBS 100 mM pH 7.4.
3. Colocar 1 μ g/10 μ l de la proteína recombinante proMMP-9, y adicionarle 1 μ l de la solución de biotina previamente disuelta. Dejar Incubando por 2 h a T° ambiente con agitación ocasional.
4. Detener la reacción adicionando 10 mg de glicina disuelta en 500 μ l de HEPES 100 mM pH 8.5.

5. Eliminar el exceso de biotina de la proteína marcada por diálisis (Tubo de ¼ de pulgada de diámetro) contra HEPES 50 mM pH 7.4 por 3 veces. El tiempo de cada diálisis es de 8 h.
6. Recuperar la proteína dializada y alicuotarla.
7. Almacenar a -70°C.

8. WESTERN BLOT CON MMP-9 MARCADA CON BIOTINA.

SOLUCIONES:

- Buffer de transferencia:

Tris base	25 mM	3.03 gr
Glicina	192 mM	14.4 gr
Metanol	10%	200 mL

Ajustar a 1000 mL con agua calidad milli Q, 18.2 MΩ. El pH debe ser de 8.3, en caso de no ser así no ajustarlo.

- TTBS:

Tris	100 mM	24.228 gr
NaCl	150 mM	17.532 gr
Tween 20	0.5%	10 mL

Ajustar a 2000 mL con agua calidad milli Q, 18.2 MΩ.

- Solución de bloqueo: TTBS -Albúmina fracción V al 5%

- Kit VECTOR: Universal PK 6200

- Para el caso de revelado por Quimioluminiscencia usar ECL™ Western Blotting Detection Reagents cat # RPN2106 Amersham Biosciences

PROCEDIMIENTO

ELECTROFORESIS

1. Preparar un gel de acrilamida-SDS al 8 % donde se correrán las proteínas que se quieren transferir, (usando un marcador de pesos molecular preteñido) se aplicaran 10 mA por cada gel.

TRANSFERENCIA

2. Una vez terminada la electroforesis, se equilibra el gel en buffer de transferencia durante 15 minutos (usar guantes a partir de este procedimiento), haciendo tres cambio de buffer cada 5 minutos. Con 100 mL de buffer por vez es suficiente.
3. Cortar la membrana de cuerdo al tamaño del gel. Usar guantes para manipular la membrana y el gel.

4. Preparar la membrana para la transferencia; Para el caso de la Hybond-C extra, Amersaham life science cat No. RPN303E, equilibrar 10 minutos la membrana en buffer de transferencia.
5. Para la membrana Immobilon-P Transfer Membrane Millipore cat. No. IPVH00010, mojar la membrana en metanol al 100 % por 15 segundos o hasta que se observe que cambia de opaca a semitransparente, después poner la membrana en H₂O Milli-Q por 2 minutos, finalmente equilibrarla en Buffer de transferencia por 5 minutos
6. Empapar el papel Watman (mini trans-blot Filter Paper Cat No. 1703932) y las esponjas en buffer de transferencia.
7. Montar el sistema; abrir los sándwich de plástico (negro-transparente) poniendo sobre la parte negra la foam pad – papel watman – gel – membrana – papel watman – foam pad y se cierra con la parte transparente del sándwich.
8. Correr la transferencia a 4° C en el cuarto frío a 30 V durante aproximadamente 18 hrs.
9. Parar la transferencia al cabo del tiempo determinado.

NOTA: El reactivo VECTASTAINc ABC (número 12) debe ser preparado a este tiempo. Agregar 2 gotas de **reactivo A** en 10 mL ó 5 mL de TTBS mezclar y agregar otras 2 gotas de **reactivo B**, mezclar y dejar incubando 30 minutos para que se de la formación del complejo. Para un gel completo preparar 15 mL.

10. Secar la membrana y bloquearla con albúmina fracción V por 1 hrs. a T° ambiente (hacerle una muesca a la membrana para identificar la parte superior y la inferior).
11. Lavar la membrana con TTBS, seis veces por 5 minutos c/vez.
12. Agregar a la membrana el reactivo VECTASTAIN® ABC y dejarlo incubando por 30 minutos con agitación.
13. Lavar la membrana con TTBS, seis veces cada lavado por 5 minutos.

QUIMIOLUMINISCENCIA

14. Prepara el reactivo de detección ECL™ Western Blotting Detection Reagents, agregando 1 mL del reactivo 1 y 1 mL del reactivo 2 en tubo de 15 mL.
15. Agregar los 2 mL de la mezcla anterior sobre la membrana, asegurando que el reactivo de detección se vierta sobre la parte frontal de la membrana. Dejar 1 incubando con el reactivo de detección 1 min.
16. Retirar el exceso del reactivo de detección sobre una sanita y poner la membrana sobre cleen pack. Envolver la membrana con el mismo cleen pack.
17. Colocar la membrana y fijarla en el cassette radiográfico.
18. Poner sobre la membrana una placa radiográfica y exponerla el tiempo necesario.

9. ENSAYO DE ACTIVIDAD CON AZOCASEINA COMO SUSTRATO (Tomarelli R M. *et al* 1949).

Método colorimétrico.

REACTIVOS:

- A 0.5% (w/v) bicarbonato de sodio (NaHCO₃), pH 8.3 a 37°C
(Prepararlo usando H₂O desionizada).
- B 2.50% (w/v) solución de Azocaseina (Azocaseina)
(Preparar 15 mL en el reactivo A, caliente y agite si es necesario para preparar la solución).
- C 5.0% (v/v) de una solución de Ácido tricloroacético (TCA)
(Preparar la solución en H₂O desionizada a partir de Ácido tricloroacético 100% (w/v).
- D Hidróxido de sodio (NaOH) 500 mM
(Preparar la solución en H₂O desionizada)
- E Tripsina
(Prepara la solución a una concentración de 10 mg/mL en el reactivo A)

PROCEDIMIENTO:

Pipetar (microlitros) los siguientes reactivos.

	<u>Muestra</u>	<u>Blanco</u>
Reactivo B (Azocaseina)	250 µl	250 µl
Reactivo A (Buffer)	150 µl	250 µl

Mezclar por agitación y equilibrar a 37°C , y agregar:

Reactivo E (Tripsina)	100 µl	-----
-----------------------	--------	-------

Mezclar por agitación e incubar a 37°C por 30 minutos

Tomar una alícuota de 100 µl de cada una de las soluciones (tanto del blanco como de las muestras) ponerlos en un tubo de reacción y agregar:

Reactivo C (TCA)	400 µl	400 µl
------------------	--------	--------

Mezclar por agitación y filtrar mediante el uso de papel whatman # 54 o un filtro para jeringa de 0.45 mm. Tomar una alícuota de 100 µl de ambas soluciones, blanco y muestras, ponerlas en un nuevo tubo de reacción y agregar:

Ractivo D (NaOH)	300 µl	300 µl
------------------	--------	--------

Mezclar por agitación y leer el blanco y las muestras en un espectrofotómetro a 440 nm

CALCULOS:

$$\Delta A_{440\text{nm}} = A_{440\text{nm}} \text{ Muestras} - A_{440\text{nm}} \text{ Blanco.}$$

10. ENSAYO DE DETECCIÓN MÚLTIPLE DE MOLÉCULAS EN SUSPENSIÓN BIOPLEX PARA MMPS.

1. Reconstituir todos los estándares del arreglo de MMPs
2. Preparar la dilución del cóctel de microesferas conjugadas y colocar 50 µl/pozo.
3. Agregar 50 µl de tanto de los estándares como de las muestras.
4. Cubrir la placa, para protegerla de la luz e incubar durante 1 hora a T° ambiente con agitación constante de 500 rpm.
5. Realizar 3 lavados por aspiración con amortiguador de lavado
6. Preparar la dilución del cóctel de anticuerpos biotinilados para la detección y adicionar 25 µl/pozo. Dejar incubando durante 1 hora a T° ambiente con agitación constante de 500 rpm.
7. Lavar 3 veces por aspiración.
8. Preparar la dilución de estreptavidina ficoeritrina y adicionar 50 µl a cada pozo. Incubar durante 30 min.
9. Lavar 3 veces por aspiración.
10. Resuspender las microesferas con 125 µl de buffer de ensayo con agitación de 1100 rpm durante 30 segundos.
11. Leer la placa en la plataforma Luminex (Bio-Plex de Bio-Rad)

La detección y cuantificación de la concentración de cada una de las moléculas se realiza mediante el software de análisis del equipo a través de métodos de regresión que da como resultado la concentración en pg/ml presente en cada muestra, para cada una de las moléculas analizadas, siendo una técnica totalmente cuantitativa. (Ver protocolo del fabricante).

BIBLIOGRAFÍA

-
- ¹ Normas y Procedimientos de Ginecología y Obstetricia. Instituto Nacional de Perinatología 2002.
 - ² The American College of Obstetricians and Gynecologist (ACOG). Preterm premature rupture of the membranes. ACOG 2003;101:178-193.
 - ³ Beltrán MJ, Enríquez PMM. Asistencia actual en la rotura prematura de membranas. En: Prematurez, un enfoque perinatal. ETM, S.A. de C.V. 2004; 118-127.
 - ⁴ Instituto Nacional de Perinatología (INPer). Anuario estadístico 2000.
 - ⁵ Vadillo-Ortega F, González-Avila G, Karchmer S, Meraz-Cruz N, Ayala-Ruiz A, Selmán L M. Collagen metabolism in premature rupture of amniotic membranes. *Obstet Gynecol* 1990; 75(1):84-88.
 - ⁶ Malak TM, Bell SC. Structural characteristics of term human fetal membranes: a novel zone of extreme morphological alteration within the rupture site. *Br J Obstet Gynecol* 1994;101(5):375-386.
 - ⁷ Vadillo-Ortega F, González-Avila G, Furth EE, Lei H, Muschel RJ, Stetler-Stevenson WG, Strauss III JF. 92-kd type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) activity in human amniochorion increases with labor. *Am J Pathol* 1995;146(1):148-156.
 - ⁸ Vadillo-Ortega F, Hernández MA, Meraz-Cruz N, Monzón BF, Beltrán MJ, Soto MJ, Bustos LH. Participación de las metaloproteasas de matriz extracelular en la ruptura prematura de membranas fetales: un modelo fisiopatogénico novedoso. *Ginec Obst Mex* 1992; 60:79-85.
 - ⁹ Parry S, Strauss JF III. Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med*. 1998; 338(10):663-670.
 - ¹⁰ Maymon E, Romero R, Pacora P, Gervasi M T, Bianco K, Chezzi F, Yoon BH. Evidence for the participation of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase 1) in preterm rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol*. 2000; 183(4): 914-920.
 - ¹¹ Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Stromelysins in placental membranes and amniotic fluid with premature rupture of membranes. *Obstet Gynecol*. 1999; 94(3): 435-440.
 - ¹² Maymon E, Romero R, Pacora P, Gervasi MT, Edwin S S, Gomez R, Seubert DE. Matrylisin (matrix metalloproteinase 7) in parturition, premature rupture of membranes, and intrauterine infection. *Am J Obstet Gynecol*. 2000; 182(6):1545-1553.
 - ¹³ McLaren J, Taylor DJ, Bell SC. Increased concentration of pro-matrix metalloproteinase 9 in term fetal membranes overlying the cervix before: implications for membrane remodeling and rupture. *Am J Obstet Gynecol*. 2000; 182(2):409-416.
 - ¹⁴ Vadillo-Ortega F, Hernández MA, González-Avila G, Bermejo L, Iwata K, Strauss JF III. Increased matrix metalloproteinase activity and reduced tissue Inhibitor of metalloproteinases-1 levels in amniotic fluids from pregnancies complicated by premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174(4):1371-1376.

-
- ¹⁵ Woessner JF, Nagase H. MMP Sequences. En: Matrix Metalloproteinases and TIMPs. Oxford University Press, 2000; 1a Ed. 11-40.
- ¹⁶ Bryant-Greenwood GD. The extracellular matrix of the human fetal membranes: structure and function. *Placenta*. 1998; 19(1):1-11.
- ¹⁷ Damjanov I. Vesalius and hunter were right: Decidua is a membrane. *Lab Invest*. 1985; 53(6): 597-598.
- ¹⁸ Malak TM, Ockleford CD, Bell SC, Dalgleish R, Bright N, Macvicar J. Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes. *Placenta* 1993; 14(4): 385-406.
- ¹⁹ Woessner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitor in connective tissue remodeling. *FASEB J*. 1991; 5(8): 2145-2154.
- ²⁰ Fata JE, Ho AT, Leco KJ, Moorehead RA, Khokha R. Cellular turnover and extracellular matrix remodeling in female reproductive tissues: functions of metalloproteinases and their inhibitors. *Cell Mol Life Sci*. 2000; 57(1): 77-95.
- ²¹ McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore. *Current Opinion in cell biology*. 2001; 13(5): 534-540.
- ²² Parsons SL, Watson SA, Brown PD, Collins HM, Steele RJ. Matrix metalloproteinases. *Br J Surg*. 1997; 84(2): 160-166.
- ²³ Yeung O, Hurta RA. Phorbol ester tumour promoter mediated altered expression and regulation of matrix metalloproteinases-2 in H-ras transformed cell line capable of benign tumour formation. *Mol Cell Biochem*. 2001; 220(1-2): 39-48.
- ²⁴ Frisch S, Morisaki JH. Positive and negative transcriptional elements of the human type IV collagenase gene. *Mol Cell Biol*. 1991; 10(12): 6524-6532.
- ²⁵ Delany AM, Brinckerhoff CE. Post-transcriptional regulation of collagenase and stromelysin gene expression by epidermal growth factor and dexamethasone in cultured human fibroblast. *J Cell Biochem*. 1992; 50(4): 400-410.
- ²⁶ Sehgal I, Thompson TC. Novel regulation of type IV collagenase (matrix metalloproteinases-9 and -2) activities by transforming growth factor- β 1 in human prostate cancer cell lines. *Mol Biol Cell*. 1999; 10(2): 407-416.
- ²⁷ Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87(14): 5578-5582.
- ²⁸ Springman EB, Anglenton EL, Birkedal-Hansen H, Van Wart HE. Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: Evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87(1): 364-368.

- ²⁹ Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003; 92(8): 827-839.
- ³⁰ Van den Steen PE, Opdenakker G, Wormald MR, Dwek RA, Rudd PM. Matrix remodelling enzymes, the protease cascade and glycosylation. *Biochim Biophys Acta.* 2001; 1528(2-3): 61-73.
- ³¹ Imai k, Yokohama Y, Nakanishi I, Ohuchi E, Fujii Y, Nakai N, Okada Y. Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) from human rectal carcinoma cells. Activation of the precursor, interaction with other matrix metalloproteinases and enzymic properties. *J Biol Chem.* 1995; 270(12): 6691-6697.
- ³² Murphy G, Stanton H, Cowell S, Butler G, Knäuper V, Atkinson S, Gavrilovic J. Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *APMIS.* 1999; 107(1): 38-44.
- ³³ Fridman R, Toth M, Peña D, Mobasherym S. Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2). *Cancer Res.* 1995; 55(12): 2548-2555.
- ³⁴ Zhao YG, Xiao AZ, Newcomer RG, Park HI, Kang T, Chung LW, Swanson MG, Zhau HE, Kurhanewicz J, Sang QX. Activation of pro-gelatinase B by endometase/matrilysin-2 promotes invasion of human prostate cancer cells. *J Biol Chem.* 2003; 278(17):15056-64.
- ³⁵ Nakamura H, Fujii Y, Ohuchi E, Yamamoto E, Okada Y. Activation of the precursor of human stromelysin 2 and its interactions with other matrix metalloproteinases. *Eur J Biochem.* 1998; 253(1):67-75.
- ³⁶ Seiki M. Membrane-type matrix metalloproteinases. *APMIS.* 1999; 107(1): 137-143.
- ³⁷ Hernandez-Barrantes S, Bernardo M, Toth M, Fridman R. Regulation of membrane type-matrix metalloproteinases. *Semin Cancer Biol.* 2002; 12(2): 131–138.
- ³⁸ Corcoran ML, Hewitt RE, Kleiner DE Jr, Stetler-Stevenson WG. MMP-2: expression, activation and inhibition. *Enzyme protein.* 1996; 49(1-3): 7-19.
- ³⁹ Gómez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol.* 1997. 74(2): 111-122.
- ⁴⁰ Fortunato SJ, Menon R, Lombardi S. MMP/TIMP imbalance in amniotic fluid during PROM: an indirect support for endogenous pathway to membrane rupture. *J Perinat Med* 1999; 27(5):362-368.
- ⁴¹ Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* 1990; 6(4):121-125.
- ⁴² Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Amniochorion gelatinase-gelatinase inhibitor imbalance in vitro: A possible infectious pathway to rupture. *Obstet Gynecol* 2000; 95(2):240-244.
- ⁴³ Goldman S, Weiss A, Eyali V, Shalev E. Differential activity of the gelatinases (matrix metalloproteinases 2 and 9) in the fetal membranes and deciduas, associated with labour. *Mol Hum Rep.* 2003; 9(6):367-373.

-
- ⁴⁴ Xu P, Alfaidy N, Challis J. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in human placenta and fetal membranes in relation to preterm and term labor. *J Clin Endocrinol Metabol.* 2002; 87(3):1353-1361.
- ⁴⁵ Arechavaleta-Velasco F, Marciano D, Diaz-Cueto L, Parry S. Matrix metalloproteinase-8 is expressed in human chorion during labor. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2004;190(3):843-850.
- ⁴⁶ Harirah H, Donia SE, Hsu CD. Amniotic fluid matrix metalloproteinase-9 and interleukin-6 in predicting intra-amniotic infection. *Obstet Gynecol.* 2002; 99(1):80-4.
- ⁴⁷ Draper D, McGregor J, Hall J, Jones W, Bautz M, Heine P, Porreco. R. Elevated protease activities in human amnion and chorion correlate with preterm premature rupture *Am J Obstet Gynecol.* 1995;173(5): 1506-1512.
- ⁴⁸ Fortunato SJ, Rambkumar M, Bryant C y Lombardi SJ. Programmed cell death (apoptosis) as a posible pathway to metalloproteinase activation and fetal membrana degradation in premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182(6):1468-1476.
- ⁴⁹ Athayde N, Edwin SS, Romero R, Gomez R, Maymon E, Pacora P, Menon RA. Role for matrix metalloproteinase-9 in spontaneous rupture of the fetal Membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 1998;179(5):1248-1253.
- ⁵⁰ Romero R, Chaiworapongsa T, Espinoza J, Gomez R, Yoon HB, Edwin S, Mazor M, Maymon E, Berry S. Fetal plasma MMP9 concentrations are elevated in preterm premature rupture of the membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;187(5):1125-1130.
- ⁵¹ Thomson AJ, Telfer JF, Young A, Campbell S, Stewart CJR, Cameron IT, Greer IA, Norman JE. Leukocytes infiltrate the myometrium during human parturition: further evidence that labour is an inflammatory process. *Hum Reprod.* 1999. 14(1):229-236.
- ⁵² Romero R, Wu YK, Brody DT, Oyarzun E, Duff GW, Durum SK. Human decidua: a source of interleukin-1. *Obstet Gynecol.*1989; 73(1):31-34.
- ⁵³ Nilkaeo A, Bhuvanath S. Interleukin-1 modulation of human placental trophoblast proliferation. *Mediators Inflamm.* 2006;2006(2):1-6.
- ⁵⁴ Vega Sánchez R, Estrada Gutiérrez G, Cerbulo Vázquez A, Beltran Montoya J, Vadillo-Ortega F. Caracterización del espacio coriodecidual como un microambiente rico en moléculas efectoras que inducen la rotura de las membranas corioamnióticas durante el trabajo de parto. *Ginecol Obstet Mex.* 2004; 72:593-601.
- ⁵⁵ Young A, Thompson AJ, Ledingham MA, Jordan F, Greer IA, Norman JE. Immunolocalization of proinflammatory cytokines in myometrium, cervix, and fetal membranes during human parturition at term. *Biol Reprod.* 2002; 66(2):445-449.
- ⁵⁶ Kruse A, Martens N, Fernekorn U, Hallman R, Butcher EC. Alterations in the expression of homing-associated molecules at the maternal/fetal interface during the course of pregnancy. *Biol Reprod.* 2002; 66(2): 333-345.

-
- ⁵⁷ Osman I, Young A, Ledinham MA, Thompson AJ, Jordan F, Greer IA, Norman JE. Leukocyte density and pro-inflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term. *Mol Hum Reprod.* 2003; 9(1):41-45.
- ⁵⁸ Bokström H, Brännstrom M, Alexandersson M, Norström A. Leukocyte subpopulations in the human uterine cervical stroma at early and term pregnancy. *Hum Reprod.* 1997; 12(3): 586-590.
- ⁵⁹ Junqueira LC, Zugaib M, Montes GS, Toledo OM, Krisztan RM, Shigihara KM. Morphological and histochemical evidence for the occurrence of collagenolysis and for the role of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes during cervical dilatation. *Am J Obstet Gynecol.* 1980; 138(3): 273-81.
- ⁶⁰ Mitchell MD, Trautman MS, Dudley DJ. Cytokine networking in the placenta. *Placenta.* 1993; 14(3):249-75.
- ⁶¹ Kelly RW. Inflammatory mediators and parturition. *Rev Reprod.* 1996; 1(2):89-96.
- ⁶² Zaga-Clavellina CV, López-Vancell R, Maida-Claros R, Beltrán-Montoya, Vadillo-Ortega F. Desarrollo de un modelo experimental para la caracterización de la respuesta funcional del corioamnios humano. *Perinatol Reprod Hum.* 2004; 18(3): 162-169.
- ⁶³ Gerlier D, Thomasset N, Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods.* 1986; 94(1-2): 57-63.
- ⁶⁴ Bradford MM. 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.
- ⁶⁵ Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem.* 1994; 218(2):325-9.
- ⁶⁶ Watanabe H, Nakanishi I, Yamashita K, Hayakawa T, Okada Y. Matrix metalloproteinase-9 (92 kDa gelatinase/type IV collagenase) from U937 monoblastoid cells: correlation with cellular invasion. *J Cell Sci.* 1993; 104(4): 991-999.
- ⁶⁷ Weingarten H, Feder J. Cleavage site specificity of vertebrate collagenases. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986.139(3):1184-1187.
- ⁶⁸ Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979; 76(9):4350-4354.
- ⁶⁹ El Khwad M, Stetzer B, Moore RM, Kumar D, Mercer B, Arikat S, Redline RW, Mansour JM, Moore JJ. Term human fetal membranes have a weak zone overlying the lower uterine pole and cervix before onset of labor. *Biol Reprod.* 2005; 72(3):720-726.
- ⁷⁰ Li W, Alfaidy N, Challis JR. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in human placenta and fetal membranes at term labor. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(6):2897-904.

- ⁷¹ Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ: Collagenolytic enzymes (gelatinases) and their inhibitors in human amniochorionic membrane. *Am J Obstet Gynecol.* 1997;177(4):731-741.
- ⁷² Unemori EN, Bair MJ, Bauer EA, Amento EP. Stromelysin expression regulates collagenase activation in human fibroblasts. Dissociable control of two metalloproteinases by interferon-gamma. *J Biol Chem.* 1991; 266(34): 23477-23482.
- ⁷³ Maymon E, Romero R, Pacora P, Gomez R, Athayde N, Edwin S, Yoon BH. Human neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase 8) in parturition, premature rupture of the membranes, and intrauterine infection. *Am J Obstet Gynecol.* 2000; 183(1):94-99.
- ⁷⁴ Biggio JR Jr, Ramsey PS, Cliver SP, Lyon MD, Goldenberg RL, Wenstrom KD. Midtrimester amniotic fluid matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) levels above the 90th percentile are a marker for subsequent preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;192(1):109-113.
- ⁷⁵ Yonemoto H, Young CB, Ross JT, Guilbert LL, Fairclough RJ, Olson DM. Changes in matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in the fetal amnion and chorion during gestation and at term and preterm labor. *Placenta.* 2006;27(6-7):669-677.
- ⁷⁶ Niu R, Okamoto T, Iwase K, Nomura S, Mizutani S. Quantitative analysis of matrix metalloproteinases-2 and -9, and their tissue inhibitors-1 and -2 in human placenta throughout gestation. *Life Sci.* 2000; 66,1127–1137.
- ⁷⁷ Vadillo-Ortega F, Sadowsky DW, Haluska GJ, Hernández-Guerrero C, Guevara-Silva R, Gravett MG, Novy MJ. Identification of matrix metalloproteinase-9 in amniotic fluid and amniochorion in spontaneous labor and after experimental intrauterine infection or interleukin-1 beta infusion in pregnant rhesus monkeys. *Am J Pathol.* 2002;186,128–138
- ⁷⁸ Fortunato SJ, Menon R, Swan KF, Lyden TW. Organ culture of amniochorionic membrane in vitro. *Am J Reprod Immunol.* 1994; 32(3):184-187.
- ⁷⁹ Estrada-Gutierrez G, Zaga V, Gonzalez-Jimenez MA, Beltran-Montoya J, Maida-Claros R, Giono-Cerezo S, Vadillo-Ortega F. Initial characterization of the microenvironment that regulates connective tissue degradation in amniochorion during normal human labor. *Matrix Biology.* 2005; 24(4): 306-312.
- ⁸⁰ Shapiro SD, Fliszar CJ, Broekelmann TJ, Mecham RP, Senior RM, Welgus HG. Activation of the 92-kDa gelatinase by stromelysin and 4-aminophenylmercuric acetate. Differential processing and stabilization of the carboxyl-terminal domain by tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP). *J Biol Chem.* 1995; 270(11): 6351-6356.
- ⁸¹ Yan L, Borregaard N, Kjeldsen L and Moses MA. The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL. *J Biol Chem.* 2001; 276:37258–37265.
- ⁸² Triebel S, Blaser J, Reinke H and Tschesche H. A 25 kDa α 2-microglobulin related protein is a component of the 125 kDa form of humangelatinase. *FEBS Lett.* 1992; 314:386–388.

-
- ⁸³ Triebel S, Blaser J, Reinke H, Knauper V and Tschesche H. Mercurial activation of human PMN leucocyte type IV procollagenase (gelatinase). *FEBS Lett.* 1992; 298:280–284.
- ⁸⁴ Ogata Y, S, Enghildp J, Nagase H. Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem.* 1992; 267: 3581-3584
- ⁸⁵ Bryant-Greenwood GD, Yamamoto SY. Control of peripartal collagenolysis in the human chorion-decidua. *Am J Obstet Gynecol.* 1995; 172: 63
- ⁸⁶ Meraz-Cruz N, Molina DG and Vadillo-Ortega F. Cambios secuenciales de metaloproteinasas de matriz extracelular durante la gestación y el trabajo de parto en el corioalantoides de la rata. *Rev Invest Clin.* 2003; 55:36–42.
- ⁸⁷ Uchide K, Ueno H, Inoue M Sakai A, Fujimoto N, Okada D. Matrix Metalloproteinase-9 and tensile strength of fetal membranes in uncomplicated labor. *Obstet Gynecol.* 2000; 95:851–855.
- ⁸⁸ Ogata Y, Itoh Y, Nagase H. Steps involved in activation of the pro-matrix metalloproteinase 9 (progelatinase B)-tissue inhibitor of metalloproteinases-1 complex by 4-aminophenylmercuric acetate and proteinases. *J Biol Chem.* 1995; 270:18506-18511.