

11281 /



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**CARACTERIZACIÓN DEL DIÁLOGO MOLECULAR ENTRE POBLACIONES
CELULARES DEL CORIO-AMNIO DURANTE EL TRABAJO DE PARTO
HUMANO PARA LA INDUCCIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE LA MATRIZ
EXTRACELULAR**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR

EN

CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A

M en C FABIAN JESÚS ARECHA VALETA VELASCO

MÉXICO, D. F.

2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Toda nuestra ciencia,
comparada con la realidad,
es primitiva e infantil.....
sin embargo es lo máspreciado
que tenemos.

ALBERT EINSTEIN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIAS

A mis padres, por su amor, por enseñarme a vivir, por darme ánimo para seguir adelante, por apoyarme en cada uno de los momentos difíciles y enorgullecerse por cada éxito por pequeño que fuera.

A mi hermano Miguel y Carmen, por su cariño, por brindarme su apoyo desde la lejanía cuando más lo necesitaba dándome las fuerzas para seguir siempre adelante y por todos los años de verdadera amistad.

A Laura, mi gran amor, por estar conmigo, por creer en mi, por su ayuda y apoyo en los momentos difíciles, pero sobretodo por su amor.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Felipe Vadillo Ortega, por su amistad, su asesoría y permitirme realizar mi trabajo en su laboratorio.

A Javier Márquez, Ismael Bustos y Héctor Flores por su amistad sincera, apoyo y consejos en todo momento.

Al Dr. Samuel Parry, por brindarme la oportunidad de establecerme como investigador independiente durante mi estancia posdoctoral en la Universidad de Pennsylvania, pero sobretodo le agradezco su amistad y apoyo.

Al Dr. Federico Martínez Montes, por su amistad y consejos.

A Eva, por su amistad y ayuda en todos los problemas administrativos durante el doctorado.

A mis maestros y amigos, por lo mucho que me han ensañado y el apoyo que me han brindado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca-crédito otorgada.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE

DR. HORACIO MERCHANT LARIOS

SECRETARIO

DR. FELIPE VADILLO ORTEGA

VOCAL

DR. FEDERICO MARTINEZ MONTES

VOCAL

DR. ENRIQUE ANTONIO PEDERNERA ASTEGIANO

VOCAL

DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA

SUPLENTE

DRA. PATRICIA TATO ZALDIVAR

SUPLENTE

DR. JOSE ANTONIO ENCISO MORENO

Este trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. Felipe Vadillo Ortega, en la Dirección de Investigación, del Instituto Nacional de Perinatología de la Secretaría de Salud.

Tutor: Dr. Felipe Vadillo Ortega

Sustentante: M. en C. Fabián Jesús Arechavaleta Velasco

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
MODELO GENERAL DE LA RUPTURA DE MEMBRANAS.....	2
MEMBRANAS FETALES	4
MECANISMO DE LA RUPTURA DE LAS MEMBRANAS FETALES	5
FACTORES QUE ALTERAN EL CONTENIDO Y CALIDAD DE COLÁGENA EN LAS MEMBRANAS FETALES.....	7
<i>Metaloproteasas</i>	7
<i>Deficiencias nutricionales</i>	10
FACTORES CLÍNICOS ASOCIADOS A LA RUPTURA PREMATURA DE MEMBRANAS	12
<i>Infección</i>	12
<i>Apoptosis</i>	14
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MMPs Y APOPTOSIS EN EL CORIOAMNIO POR CITOCINAS PROINFLAMATORIAS.	15
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	18
DISEÑO EXPERIMENTAL	19
MÉTODOS	20
TEJIDOS	20
CULTIVO DE EXPLANTES	21
PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE CORION Y AMNIO	22
EXTRACCIÓN DE DNA DE CORION Y AMNIO.....	22
ZIMOGRFÍA	23
ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DEL DNA GENÓMICO.....	24
DETECCIÓN DE DNA FRAGMENTADO <i>IN SITU</i> E INMUNOHISTOQUÍMICA DE MMP-9	24
INMUNOHISTOQUÍMICA PARA RECEPTORES DE TNF- α	25
ZIMOGRFÍA <i>IN SITU</i>	25
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CITOCINAS.....	26
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27
RESULTADOS	28
CULTIVO <i>EX VIVO</i> DE MEMBRANAS FETALES	28
EFECTO DEL LPS EN EXPLANTES DE AMNIO Y CORION	30
EFECTO DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS EN POBLACIONES DE CORION Y AMNIO	30
REGULACIÓN AUTOCRINA DE LA SECRECIÓN DE PROMMP-9 POR TNF- α EN EXPLANTES DE AMNIO	32
PRODUCCIÓN DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS POR EXPLANTES DE CORION	32
ACTIVIDAD GELATINOLÍTICA EN EXTRACTOS PROTEICOS DE MEMBRANAS DE CESÁREA, TRABAJO DE PARTO Y RPM	33
PRESENCIA DE MUERTE CELULAR PROGRAMADA Y MMP-9 EN MEMBRANAS PROVENIENTES DE PACIENTES CON CESÁREA, TRABAJO DE PARTO Y RPM	34
PRESENCIA DE RECEPTORES PARA TNF- α EN MEMBRANAS PROVENIENTES DE PACIENTES CON CESÁREA, TRABAJO DE PARTO Y RPM	38
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	52
BIBLIOGRAFÍA	53

RESUMEN

Los mecanismos moleculares que conducen a la ruptura de las membranas fetales, así como las señales que coordinan dicho evento, permanecen aún poco entendidos. Recientemente se demostró que la ruptura de las membranas corioamnióticas involucra un grupo de enzimas denominadas metaloproteasas de matriz extracelular (MMP). Uno de los miembros de esta familia de enzimas, la colagenasa tipo IV de 92 kDa (MMP-9), se induce selectivamente durante la ruptura de las membranas tanto en condiciones normales como patológicas. Por otra parte, se ha descrito que las membranas fetales producen la interleucina-1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), citocinas proinflamatorias que se encuentran en el líquido amniótico durante el trabajo de parto y que son capaces de estimular la producción de la colagenasa-1 y la estromielisina-1 en células coriónicas; sin embargo, aún no se ha estudiado su efecto sobre la expresión de la MMP-9 en el corioamnios humano. El primer objetivo del presente trabajo fue caracterizar si la IL-1 β y el TNF- α regulan la expresión de MMP-9 en membranas fetales humanas. El segundo objetivo fue correlacionar la expresión simultánea del receptor tipo I para el TNF- α (TNF-R1), la MMP-9 y apoptosis en membranas corioamnióticas provenientes de pacientes con trabajo de parto y ruptura prematura de membranas (RPM). Membranas fetales obtenidas de embarazos a término con indicación de cesárea, sin trabajo de parto y sin historia de infección, se separaron manualmente para cultivar el corion y amnios de manera independiente. Estos explantes fueron estimulados con lipopolisacárido (LPS), TNF- α o IL-1 β . La expresión de proMMP-9 en los medios de cultivo fue evaluada por la técnica de zimografía. La producción de IL-1 β y TNF- α se determinó por ensayos inmunoenzimáticos. Para

resolver el segundo objetivo, se midió la actividad gelatinolítica por zimografía *in situ* y zimografía en extractos de membranas con: 1) trabajo de parto, 2) cesárea y 3) RPM. Se analizó la fragmentación del DNA *in situ* y en el DNA extraído de las mismas membranas. Por medio de histoquímica se analizó la expresión del TNF-R1, así como la colocalización de MMP-9 y células apoptóticas. Los explantes de amnios mostraron un aumento dosis dependiente de la actividad de proMMP-9 cuando se estimularon con LPS, TNF- α o IL-1 β . La presencia de anticuerpo neutralizante anti-TNF- α , pero no anti-IL-1 β , disminuyó la respuesta al LPS. En el caso del corion y corioamnios no se observó ningún incremento en la actividad de proMMP-9 cuando fueron estimulados con LPS, TNF- α o IL-1 β ; sin embargo, el corion sintetizó ambas citocinas al incubarse con LPS. Por otra parte, se observó aumento de la actividad gelatinolítica en los tejidos y extractos de RPM y de trabajo de parto, comparativamente con los de cesárea. En todas las muestras se localizaron células apoptóticas, sin embargo, fueron más abundantes en las muestras de trabajo de parto y RPM. La fragmentación del DNA *in situ* fue corroborada mediante electroforesis en gel de agarosa con el DNA extraído. La inmunohistoquímica fue positiva para MMP-9 en las muestras de trabajo de parto y RPM, que se colocalizó con células apoptóticas. Las laminillas estudiadas mostraron la asociación del TNF-R1 en las membranas con RPM y trabajo de parto, mientras que las membranas de cesárea se asociaron al TNF-R2. Los resultados del presente trabajo sugieren que la actividad de proMMP-9 en el corioamnios humano es regulada de manera autocrina/paracrina por citocinas proinflamatorias. La presencia de esta enzima se asocia con fenómenos de muerte celular programada y la expresión del TNF-R1 en membranas fetales obtenidas de pacientes con RPM y trabajo de parto.

ABSTRACT

The mechanisms that predispose the fetal membranes to rupture, as well as the signals regulating the onset of such changes, remain poorly understood. Expression of matrix metalloproteinase-9 has been associated with rupture of fetal membranes in normal and pathological conditions. Recently, it has been demonstrated that fetal membranes produce interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α , proinflammatory cytokines that increase MMP-1 and MMP-3 expression in human chorionic cells. The effect of these cytokines in the MMP-9 production by the human chorioamnion has not been established. The objective of this study was to determine the presence of autocrine/paracrine regulation of 92 kDa collagenase type IV (MMP-9) expression mediated by proinflammatory cytokines (i.e., tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β) in human fetal membranes. The secondary aim was to correlate the expression of MMP-9 and presence of tumor necrosis factor receptors (TNF-R)-1 and 2 with apoptosis in human chorioamnion subsequent to premature rupture of membranes (PROM), labor and cesarean section (C/S, no labor). Fetal membranes obtained from women who underwent C/S before labor and with no history of infection were manually separated into amnion and chorion layers and maintained in culture. These explants were stimulated with TNF- α , IL-1 β and either lipopolysaccharide (LPS) alone or LPS with anti-TNF- α or anti-IL-1 β neutralizing antibodies. Levels of MMP-9 activity in culture media were evaluated by zymography. Enzyme-linked immunosorbant assay was performed to measure the quantity of IL-1 β and TNF- α after LPS stimulation. To address the secondary objective, fetal membranes were obtained after labor, C/S, or PROM, and MMP-9 expression was measured by immunohistochemistry, *in situ*

zymography, and zymography. Localization of TNF-R1 and 2 was done by immunohistochemistry. Apoptosis was assessed by *in situ* 3' end-labeling technique and DNA fragmentation in agarose gel electrophoresis. MMP-9 activity was upregulated after stimulation of the amnion by LPS, TNF- α , or IL-1 β . The increased activity of MMP-9 resulting from LPS stimulation in the amnion was blocked by the addition of a TNF- α neutralizing antibody, but not with an IL-1 β antibody. No significant effect of LPS, TNF- α , or IL-1 β on MMP-9 expression was observed in the chorion or chorioamnion, however, the chorion produced both cytokines when stimulated with LPS. *In situ* labeled DNA fragments indicating apoptotic cells were scarce in membranes from C/S, abundant in those from normal labor, and more abundant in those from PROM. DNA laddering in agarose gel electrophoresis corroborated DNA fragmentation. MMP-9 immunoreactivity was high in the extracellular matrix of membranes from labor and PROM. Gelatinolytic activity was associated with extracellular matrix rather than cells and was higher in extracts from PROM and labor membranes than in membranes obtained after C/S. TNF-R1 also was abundant in membranes from normal labor and more abundant in those from PROM. By contrast TNF-R2 was abundant only in membranes from C/S. Therefore, these data indicate that MMP-9 is produced by the amnion, but not the chorion, in response to LPS. Because anti-TNF- α neutralizing antibody inhibits MMP-9 activity in the amnion, TNF- α appears to upregulate MMP-9 production by the amnion in an autocrine fashion. Meanwhile, TNF- α and IL-1 β produced by the chorion may upregulate amnionic MMP-9 production in a paracrine manner. Finally, apoptosis appears to be correlated with MMP-9 activity and TNF-R1 expression in PROM and labor membranes.

INTRODUCCIÓN

El embarazo humano termina generalmente con la inducción espontánea del trabajo de parto, momento en el que coinciden una serie de mecanismos coordinados para garantizar el nacimiento. Durante este período, participan al menos tres tejidos diferentes: el miometrio, el cérvix y las membranas fetales. Cada uno de ellos experimenta una serie de cambios bioquímicos que los preparan para expulsar al producto de la cavidad uterina. Por ejemplo, durante la primera etapa del trabajo de parto, el cérvix disminuye el contenido de colágena en su matriz extracelular ocasionando su dilatación y borramiento. En las etapas subsecuentes, el miometrio incrementa la cantidad de receptores para oxitocina y el número de uniones gap. Estos cambios permiten que las contracciones uterinas se sincronicen en respuesta a los cambios en la pulsatilidad de la oxitocina, es decir, la hormona estimula la actividad uterina, mientras que el flujo de señales eléctricas entre miocitos es rápido y sincrónico gracias a la cantidad de uniones gap. Por su parte, las membranas fetales incrementan la producción de enzimas que degradan proteínas de la matriz extracelular, ocasionando su debilitamiento y finalmente su ruptura [1].

Las membranas fetales o corioamnióticas han sido reconocidas como barrera mecánica que mantiene aislado al producto durante la gestación; sin embargo, se han identificado otras propiedades que las asocian con la producción del líquido amniótico, factores de crecimiento, citocinas y hormonas. Al final del embarazo, las membranas fetales experimentan una serie de cambios bioquímicos y morfológicos que le hacen perder su elasticidad e integridad, culminando con su rompimiento durante el trabajo de

parto [2, 3]. Esta serie de eventos se asocian de modo sincrónico en el parto normal con la actividad uterina y los cambios del cérvix; sin embargo, existe la posibilidad de que los cambios del corioamnios sucedan de manera independiente y fuera de sincronización. Esta patología obstétrica se denomina ruptura prematura de membranas (RPM).

La definición formal de la RPM es la salida de líquido amniótico por lo menos dos horas antes del inicio del trabajo de parto; si ésta sucede antes de la semana 37 de gestación, se denomina como ruptura prematura de membranas pretérmino. Su prevalencia es del 5 al 10% de todos los embarazos vistos en México, mientras que las complicaciones mas frecuentes asociadas a esta patología son las infecciones intrauterinas, infecciones neonatales (neumonía, sepsis, meningitis), desprendimiento previo de placenta y prolapso de cordón, por lo que se le considera un problema real de salud [1].

MODELO GENERAL DE LA RUPTURA DE MEMBRANAS

Tradicionalmente la ruptura de membranas fetales se ha atribuido al estrés mecánico que sufren durante el trabajo de parto; sin embargo, durante los últimos años, se ha asociado a cambios bioquímicos que incluyen el incremento en la producción de enzimas que degradan la colágena, proteína que le da la fuerza tensil a la membrana, así como a la inducción de procesos apoptóticos en el corioamnios. Estos cambios estructurales ocurren en regiones localizadas de la membrana en donde de manera orquestada se disminuye el contenido de colágena y el número de células

tanto amnióticas como coriónicas. La consecuencia de estos eventos es el debilitamiento de las membranas fetales, que asociado al estiramiento ocasionado por las contracciones uterinas producen su ruptura (Figura 1).

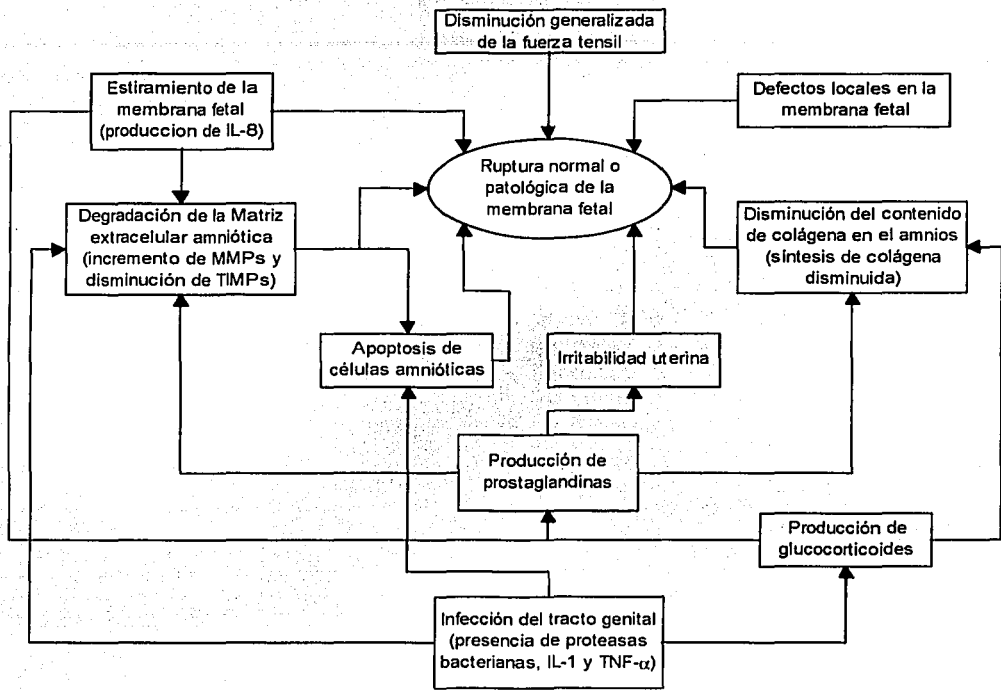


Figura 1. Diagrama de los diferentes mecanismos que se han propuesto para explicar la ruptura de membranas fetales de manera normal o patológica (Tomado de Parry S, Strauss JF III. Premature Rupture of the Fetal Membranes. N Engl J Med 1998;338:663-70).

MEMBRANAS FETALES

Las membranas fetales están constituidas por dos capas principales que contienen diferentes poblaciones celulares. La capa más adyacente al feto se denomina amnios, mientras que la capa que se encuentra más cerca de la pared uterina es el corion. El amnios se considera como tejido avascular, mientras que el corion posee algunos vasos sanguíneos provenientes de la placenta que se atrofian a lo largo del embarazo (Figura 2).

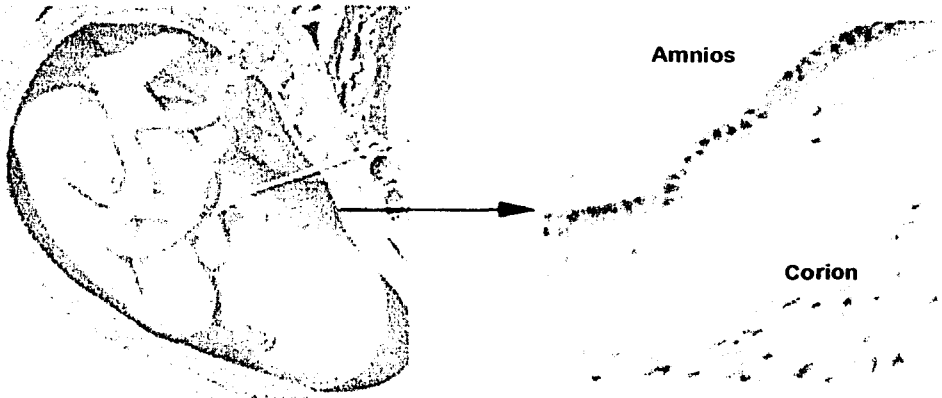


Figura 2. Anatomía e histología de las membranas corioamnióticas (Tomado de http://www.meddean.luc.edu/lumen/MedEd/Histo/frames/h_fram22.html y <http://health.discovery.com/minisites/pregnancy/>).

El amnios está formado por una monocapa de células epiteliales de apariencia cuboide, con microvellosidades adheridas a una membrana basal constituida por colágena tipo III, IV, V, laminina y fibronectina. Por debajo de ésta, se encuentra el tejido conectivo amniótico conformado de dos capas, una acelular que contiene una red densa de proteínas fibrilares denominada compacta y otra zona que contiene

fibroblastos. En ambas capas, las proteínas que forman la matriz extracelular son laminina, fibronectina y colágena tipo III, IV y V. Entre el amnios y el corion se encuentra la capa esponjosa constituida por proteoglicanos y colágena tipo I, III y IV, cuya función es disminuir el estrés mecánico, permitiendo el desplazamiento del amnios sobre el corion [4-7].

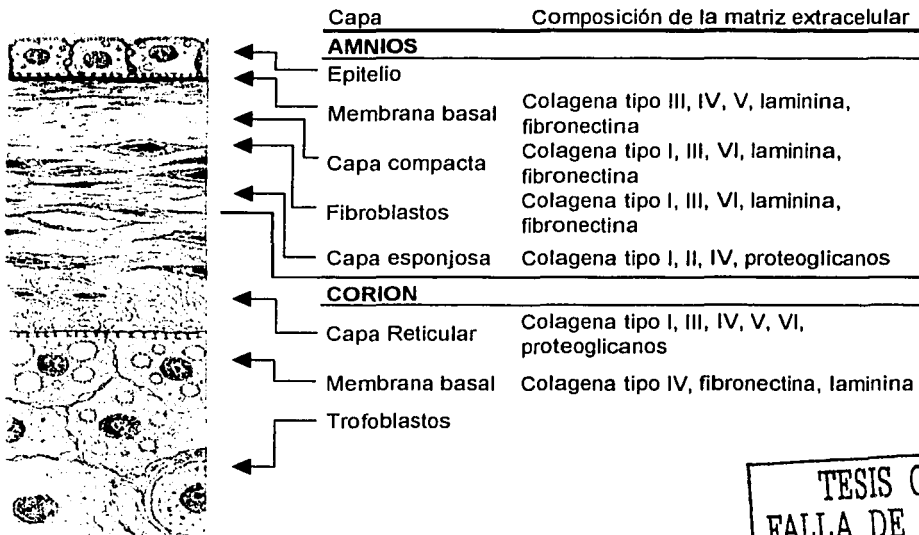
Por su parte, el corion se divide en tres capas principales: 1) la reticular, compuesta por proteoglicanos y colágena tipo I, III, IV, V y VI que soportan células fusiformes y estrelladas, 2) la membrana basal conformada por laminina, fibronectina y colágena tipo IV y 3) la capa de trofoblastos [4, 6, 7].

Además de los diferentes tipos de colágena presentes en la matriz extracelular del corioamnios, existen otras proteínas como la elastina, fibronectina, lamina y proteoglicanos incluidos en el tejido conectivo de este tejido, que en conjunto le proporcionan una fuerza tensil elevada para soportar el estiramiento mecánico durante el embarazo y el trabajo de parto (Figura 3) [6].

MECANISMO DE LA RUPTURA DE LAS MEMBRANAS FETALES

El mecanismo normal que condiciona el rompimiento de las membranas fetales es aún poco entendido, sin embargo se ha asociado con mayor frecuencia al debilitamiento generalizado de las membranas debido al constante estiramiento durante las contracciones uterinas, así como al aumento de la presión intrauterina durante el trabajo de parto. Aunque los factores mecánicos juegan un papel importante,

existen evidencias que indican que la ruptura del corioamnios tiene origen multifactorial, ya que las membranas fetales provenientes de RPM son intrínsecamente defectuosas y el debilitamiento que sufren es localizado y antecede al trabajo de parto; por lo tanto, se plantea la posibilidad de que existan cambios bioquímicos específicos en las membranas que coordinados o no con las contracciones uterinas facilitan su ruptura [4, 7, 8].



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 3. Representación esquemática de la estructura de las membranas fetales a término. Se muestra la composición de la matriz extracelular y la producción de MMPs de cada capa (Tomado de: Parry S, Strauss JF III. Premature Rupture of the Fetal Membranes. N Engl J Med 1998;338:663-70).

Considerando que el mantenimiento de la fuerza tensil de las membranas fetales involucra el equilibrio entre la síntesis y la degradación de los componentes de la matriz extracelular, existen evidencias que indican que la disminución en la cantidad y/o

calidad de colágena y aumento en la actividad colagenolítica son factores asociados a la ruptura normal y/o a la RPM [7, 9]. Por ejemplo, Skinner y cols. y Kanayama y cols. encontraron que las membranas que se rompen de manera prematura tienen un menor contenido de colágena [10, 11]. En cuanto a la actividad colagenolítica, recientemente se demostró que el incremento de MMP-9 se asocia a una disminución en la fuerza tensil en membranas corioamnióticas obtenidas de pacientes con trabajo de parto a término [12].

FACTORES QUE ALTERAN EL CONTENIDO Y CALIDAD DE COLÁGENA EN LAS MEMBRANAS FETALES

Metaloproteasas

La degradación de la colágena es mediada principalmente por una familia de más de 20 endopeptidasas denominadas metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs), las cuales se dividen en 4 clases principales: 1) colagenasas, 2) gelatinasas, 3) estromielisinas y 4) MMPs de membrana celular (Tabla 1) [13].

Las MMPs comparten características estructurales que incluyen: 1) requerimiento absoluto de zinc como cofactor, 2) se sintetizan como proenzimas, 3) se secretan al espacio extracelular como proenzimas inactivas y 4) se activan del zimógeno o proenzima a la enzima.

MMP	Nombres	Peso (kDa)		Sustrato
		proenzima	enzima	
1	colagenasa-1, colagenasa intersticial	55	45	colágena tipo I, II, III, VII, VIII, X.
8	colagenasa-2, colagenasa de neutrófilos	75	58	colágena tipo I, II, III, V, VII, VIII, X, fibronectina, laminina, elastina
13	colagenasa-3	60	48	colágena tipo I, II, III, IV
2	colagenasa tipo IV de 72 kDa, gelatinasa A	72	62	colágena tipo I, II, III, IV, V, VII, X, XI, gelatina, laminina, fibronectina.
9	colagenasa tipo IV de 92 kDa, gelatinasa B	92	82	colágena tipo I, II, III, IV, V, VII, X, XI, gelatina, laminina, fibronectina.
3	estromielisina-1	57	45	colágena tipo II, III, IV, IX, X, XI, fibronectina, laminina
10	estromielisina-2	57	44	colágena tipo III, IV, V, fibronectina, elastina, laminina
11	estromielisina-3	51	44	fibronectina, laminina
14	MMP de membrana celular-1	66	56	colágena tipo I, II, III, IV

Tabla 1. Nomenclatura, peso molecular y sustratos de las metaloproteasas de matriz extracelular. (Modificado de Calbiochem Corp., San Diego, CA y Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ).

El estado inactivo de la proenzima se mantiene por el grupo sulfhidrilo no apareado de la cisteína, que se encuentra cerca del extremo carboxilo del dominio del propéptido. Este grupo sulfhidrilo actúa como una cuarta ligadura para el zinc presente en el sitio activo, por lo tanto la activación requiere que esta interacción cisteína-zinc

sea eliminada por una proteólisis enzimática del propéptido o por modificaciones químicas. Los compuestos que activan las MMPs incluyen agentes no enzimáticos y enzimáticos, por ejemplo se ha observado que la presencia de especies reactivas de oxígeno y compuestos organomercuriales activan a las MMPs [14]. En el caso de los mecanismos enzimáticos encontramos que proteasas bacterianas, el activador de plasminógeno y las mismas MMPs activan proMMPs presentes en el espacio extracelular [15]. A este respecto, se ha mostrado que la MMP-2 y la MMP-3 activas, son capaces de activar la proMMP-9 para dar lugar a la MMP-9 [16, 17].

A pesar de la similitud en la estructura y activación de las MMPs, existe una diferencia importante en la especificidad de los sustratos; por lo tanto, el catabolismo efectivo de los diferentes componentes de la matriz extracelular requiere de la acción concertada de varias MMPs. Por ejemplo, la MMP-1, 8 y 13 cortan la triple hélice de la colágena fibrilar, dando lugar a fragmentos que se desnaturalizan a gelatina. Estos fragmentos son degradados por las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9), que junto con las estromielisinas cortan colágena tipo IV, fibronectina y laminina [13].

La actividad de las MMPs debe ser controlada de manera precisa para evitar daño excesivo a los tejidos. Existen dos tipos de inhibidores naturales para estas enzimas, los inhibidores presentes en el suero como son las macroglobulinas y los inhibidores tisulares (TIMPs), que se unen al sitio activo de las MMPs formando un complejo estequiométrico 1:1. El TIMP-1 tiene preferencia por la unión con la MMP-1, MMP-8 y MMP-9, mientras que el TIMP-2 forma complejo preferencialmente con la MMP-2 [18].

En cuanto a las membranas fetales, se ha observado que al inicio el trabajo de parto, la relación MMPs/TIMPs se desplaza hacia la degradación proteolítica de la matriz extracelular, es decir, aumenta la concentración de MMPs y disminuye la de TIMPs. Por ejemplo, en el amnios de la rata se demostró incremento de la actividad MMP-1 y MMP-9 horas antes del inicio del trabajo de parto. En el humano, se ha mostrado incremento en la expresión y actividad de la MMP-1, MMP-3, MMP-8 y MMP-9 y que coexiste con la disminución de TIMP-1 en membranas fetales obtenidas de trabajo de parto, comparativamente con aquellas obtenidas de cesárea [19-23]. Estos cambios reflejan una serie de eventos que controlan la degradación de la matriz extracelular de las membranas fetales desde el inicio hasta el final del trabajo de parto.

Deficiencias nutricionales

Las concentraciones deficientes de nutrientes han sido relacionadas con la RPM [7, 24]. Por ejemplo, Artal y cols. asociaron una disminución en la concentración de cobre en el suero materno y de cordón umbilical con el desarrollo de RPM [25]. Por su parte, Wideman y cols. demostraron que mujeres con concentraciones plasmáticas de ácido ascórbico por debajo del valor normal en el último trimestre de gestación, tienen mayor probabilidad de desarrollar RPM [26]. Casanueva y cols. determinaron que niveles bajos de vitamina C en leucocitos de mujeres embarazadas a partir de la semana 20 hasta el final de la gestación se asocian a la RPM [27].

Los mecanismos por los cuales el cobre y la vitamina C puedan funcionar como factores protectores para presentar RPM en las mujeres embarazadas aun permanecen poco entendidos, sin embargo pueden relacionarse con la biosíntesis de colágena, principalmente durante las modificaciones postraduccionales y/o la expresión de enzimas capaces de degradarla.

En cuanto al metabolismo de colágena, se sabe que el ácido ascórbico estimula diferentes dioxigenasas que contienen Fe^{2+} como son la prolil y la lisil hidroxilasa. La función del ácido ascórbico en estas enzimas es proveer electrones para mantener al hierro metálico en su forma reducida y de esta forma estimular a la enzima. Estas observaciones implican que el ácido ascórbico no se requiere para la hidroxilación como tal, pero sí para mantener en su estado ferroso al hierro que se encuentra en el sitio catalítico de las hidroxilasas. Estas enzimas convierten a la prolina en 4-hidroxiprolina y a la lisina en 5-hidroxilisina. Una vez terminados los procesos postraduccionales de hidroxilación, ocurre la formación de la triple hélice de procolágena, en donde la estabilización de ésta se logra mediante la formación de puentes de hidrógeno en donde el grupo hidroxilo de la hidroxiprolina juega un papel importante. En condiciones normales, la procolágena sintetizada es finalmente secretada; sin embargo, una disminución en la formación de la hidroxiprolina por ausencia de ascorbato, origina una procolágena inestable en donde las cadenas se desnaturalizan rápidamente, aumentando su degradación intracelular y disminuyendo su secreción [24, 28].

La procolágena secretada es procesada y ensamblada cerca de la superficie celular para formar las fibras de colágena, las cuales se estabilizan por la formación de uniones covalentes entre los residuos de lisina e hidroxilisina mediante la enzima lisil oxidasa. Esta enzima contiene un ion cobre en su sitio activo, por lo tanto, una deficiencia de este mineral origina colágena de baja calidad [29, 30].

Por otra parte, se ha comprobado que la presencia de ascorbato influye la expresión y actividad de MMP-2 en cultivos de células amnióticas [31]. Mas aún, cuando se estimulan los amniocitos en cultivo con TNF- α en presencia de ascorbato, se observa reducción en la actividad gelatinolítica de MMP-9.

Ambos mecanismos, síntesis defectuosa de colágena e incremento de la actividad colagenolítica, explican por qué una mujer con concentración deficiente de vitamina C y/o cobre presenta un mayor riesgo para desarrollar la RPM.

FACTORES CLÍNICOS ASOCIADOS A LA RUPTURA PREMATURA DE MEMBRANAS

Infección

Cabe mencionar, que la presencia de infección local o sistémica se encuentra en un porcentaje elevado de las mujeres que presentan RPM, por lo que se postula que de manera directa o indirecta, la existencia del proceso infeccioso puede inducirla (Figura 4); sin embargo, aún existe cierta controversia acerca de una relación causal entre éstas, ya que la interpretación de los resultados varía de un estudio a otro. Algunos

investigadores, que han realizado metanálisis de la literatura, proponen la existencia de una especificidad y temporalidad de asociación entre la infección y la RPM [32-34].

Las teorías actuales que vinculan la infección con la RPM, proponen tres posibilidades: 1) que las manifestaciones sean efecto directo de los productos bacterianos, 2) que sean consecuencia de la respuesta inmune o 3) que sean una mezcla de ambos [8].

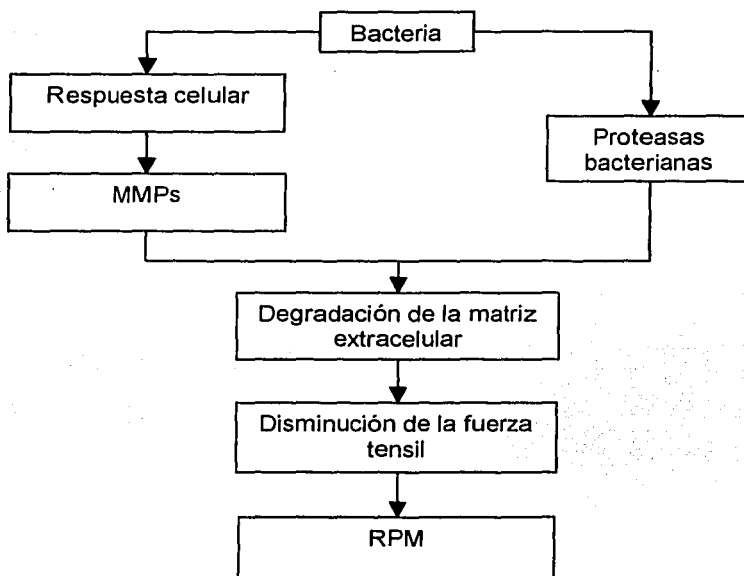


Figura 4. Diagrama de los diferentes mecanismos que se han propuesto para explicar la participación de la infección en la ruptura prematura de membranas.

Diversos microorganismos que normalmente se encuentran como flora normal en el tracto genitourinario femenino, son capaces de secretar proteasas que tiene actividad colagenolítica y fosfolipasa A₂ que hidroliza los fosfolípidos de las membranas celulares, liberando araquidonato. El incremento de los niveles de araquidonato

promueve la elevación en las concentraciones locales de prostaglandina E₂ (PGE₂) y prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), que en conjunto con las proteasas bacterianas, juegan un papel importante en la inducción de las contracciones uterinas y de la degradación de los componentes moleculares de la matriz extracelular [7, 8, 35]. Por otra parte, recientemente se estableció una asociación entre el incremento de la síntesis de MMP-2 y MMP-9, y la disminución de la producción del inhibidor tisular de metaloproteasas (TIMP-2), con la presencia del lipopolisacárido (LPS) en cultivo de membranas corioamnióticas, lo que plantea la posibilidad de que algunos productos bacterianos tengan un efecto directo en la síntesis de MMPs [36].

La respuesta inflamatoria del hospedero constituye otro mecanismo importante en el desarrollo de la RPM, ya que la migración de células polimorfonucleares o monocitos al sitio de la infección ocasiona la liberación de prostaglandinas y citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF-α, las cuales han sido relacionadas con el incremento en la producción de enzimas que degradan los componentes moleculares de la matriz extracelular en células coriónicas humanas [37-39].

Apoptosis

Asociado a la degradación de la matriz extracelular, debe existir la aparición de procesos apoptóticos en las membranas fetales que aseguren que la muerte celular masiva al final de la vida útil del corioamnios, no se acompañe de fenómenos inflamatorios que podrían mediar efectos dañinos sobre el producto o la madre. Al respecto, recientemente se ha ligado la inducción de muerte celular programada con la

degradación del tejido conectivo en el corioamnios durante el trabajo de parto de la rata [40]. En el caso del corioamnios humano, estudios recientes demuestran que la apoptosis es un fenómeno que aparece en la zona adyacente al sitio de ruptura durante el trabajo de parto [41].

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MMPs Y APOPTOSIS EN EL CORIOAMNIOS POR CITOCINAS PROINFLAMATORIAS

En los últimos años se ha descrito con claridad la participación de las MMPs, así como la inducción de apoptosis durante la ruptura de las membranas fetales, sin embargo, aun no se ha definido completamente la forma en cómo son regulados ambos procesos.

El aumento de citocinas proinflamatorias (IL-1 y TNF- α) en el líquido amniótico al final del embarazo o la RPM, sugiere su participación como moléculas moduladoras de los cambios bioquímicos y morfológicos que sufren las membranas corioamnióticas durante su ruptura [42-44]. Por ejemplo, Katsura y cols. demostraron que IL-1 α es capaz de estimular la actividad colagenolítica en células coriónicas [37], mientras que So y cols. determinaron el mismo efecto utilizando TNF- α [38]. En el caso del epitelio amniótico, se observó que la IL-1 α aumenta la expresión de la MMP-9 y MMP-1 [45]. Estudios recientes utilizando el modelo animal del mono *Rhesus*, demuestran que la infusión de IL-1 β en el líquido amniótico induce la producción de MMP-9 [46]. Este modelo muestra la existencia de una relación temporal de los eventos *in vivo*, es decir, el incremento de citocinas en el líquido amniótico precede a la síntesis de MMPs.

En cuanto a la muerte celular programada de las membranas fetales, resalta de manera importante la posible participación del TNF- α , ya que es una señal conocida capaz de inducir este proceso en diferentes estirpes celulares [47]. El TNF- α es una proteína que consta de 233 aminoácidos (26 kDa) en su forma transmembranal, y que al procesarse por una metaloproteasa, libera una proteína soluble de 157 aminoácidos (17 kDa). El efecto que ocasiona el TNF- α depende del receptor que expresa cada célula; por ejemplo, la actividad citotóxica o apoptótica parece mediarse por el receptor tipo I (TNF-R1) o CD120a, mientras que la acción como factor de crecimiento depende del receptor tipo II (TNF-R2) o CD120b [47-51]. En lo que se refiere a las membranas fetales, Fortunato y cols. reportaron la presencia del TNF-R1 en membranas fetales obtenidas de pacientes con trabajo de parto [52], mientras que Austgulen y cols. y Yelavarthi y cols. encontraron que la placenta expresa ambos receptores para TNF- α [53, 54].

En lo que se refiere a la producción de IL-1 y TNF- α , estudios *in vivo* han reportado que las membranas fetales aumentan su síntesis al final del embarazo y durante la RPM [55-57]. Los experimentos *in vitro* mostraron que la estimulación de explantes de corioamnios con LPS induce un incremento significativo en la producción de TNF- α e IL-1 [58-60], lo cual confirma la capacidad de este tejido para transcribir y sintetizar citocinas proinflamatorias.

Es un hecho que se cuenta con información sobre la producción y el efecto de citocinas en las membranas fetales humanas; sin embargo, aun no existen evidencias acerca del efecto del TNF- α o IL-1 β sobre la inducción de la MMP-9 en el corioamnios humano. Más aún, no se ha estudiado el tejido específico que produce esta enzima. Por otra parte, la relación entre la apoptosis, la degradación de la matriz extracelular y el tipo de receptor para TNF- α expresado en las membranas fetales durante su ruptura normal o prematura, aun no ha sido investigado.

OBJETIVO GENERAL

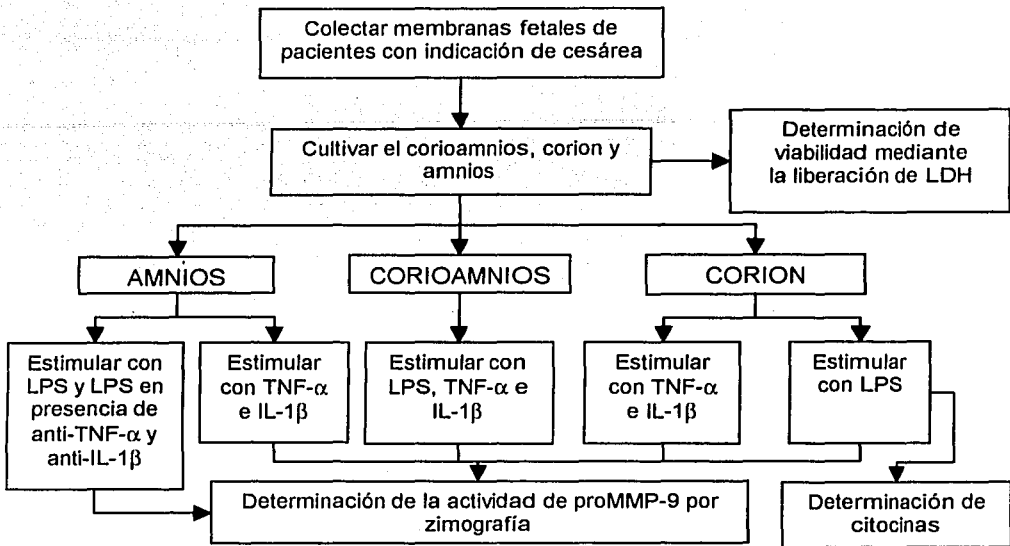
Determinar el efecto de citocinas proinflamatorias en la expresión de MMP-9 por el corioamnios humano en un modelo *in vitro* y correlacionar procesos de muerte celular programada con la producción de MMP-9 en membranas fetales, para establecer el mecanismo por el cual se induce su ruptura del corioamnios tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

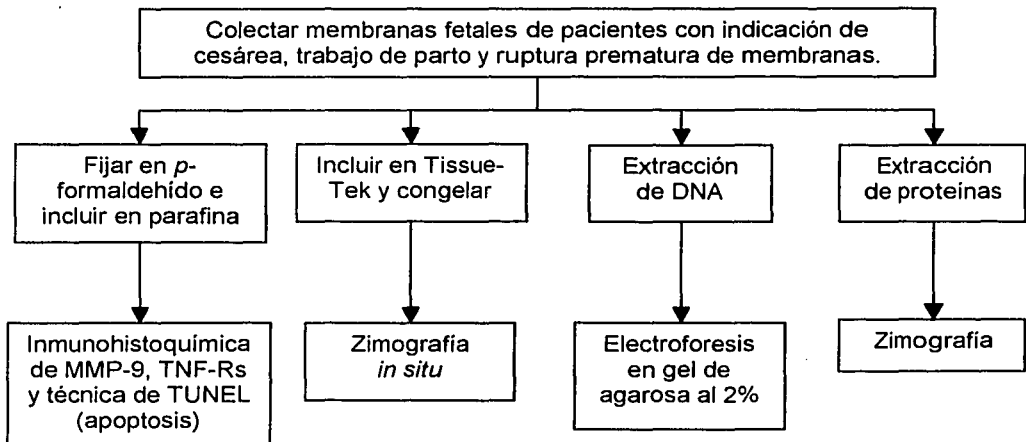
1. Establecer y estandarizar un modelo *in vitro* de explantes de membranas corioamnióticas humanas.
2. Determinar el efecto de TNF- α , IL-1 β y LPS sobre la producción de mediadores de degradación de tejido conectivo en explantes de amnios, corion y corioamnios humanas.
3. Identificar y cuantificar apoptosis en membranas corioamnióticas humanas con y sin trabajo de parto, así como con ruptura prematura.
4. Evaluar la relación entre el proceso apoptótico y la expresión de MMP-9 en membranas con y sin trabajo de parto, al igual que con ruptura prematura.
5. Establecer la correlación entre la apoptosis y la actividad colagenolítica en membranas provenientes de pacientes con cesárea, trabajo de parto y RPM.
6. Identificar la distribución diferencial de receptores para TNF- α en membranas con y sin trabajo de parto, al igual que con ruptura prematura.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Primera parte



Segunda parte



MÉTODOS

TEJIDOS

Se colectaron membranas fetales de los siguientes grupos:

- 1) Mujeres embarazadas de 38 a 40 semanas de gestación, con trabajo de parto espontáneo sin ninguna patología asociada.
- 2) Mujeres embarazadas de 38 a 40 semanas de gestación, con indicación de cesárea, sin trabajo de parto activo y sin patologías asociadas.
- 3) Mujeres embarazadas de 25 a 40 semanas de gestación, sin infección y con diagnóstico de RPM, la cual se define como la salida de líquido amniótico por lo menos dos horas antes del inicio del trabajo de parto en embarazos de al menos 20 semanas de gestación.

Un fragmento obtenido de la zona media de cada membrana fue fijado en solución de paraformaldehído al 4% para los estudios de inmunohistoquímica y detección de fragmentación de DNA *in situ*. Otros fragmentos fueron congelados a -70°C en solución comercial Tissue-Tek OCT (Sakura Finetek, CA, U.S.A.) para la zimografía *in situ* o en solución amortiguadora de fosfatos para la extracción de MMPs y DNA.

CULTIVO DE EXPLANTES

Para el cultivo de las membranas fetales se siguió la técnica descrita por Fortunato y cols. [61]. De modo breve, se emplearon membranas fetales de embarazos a término con indicación de cesárea sin trabajo de parto ni infección. Después de colectadas en el quirófano se procedió a lavarlas con amortiguador de fosfatos para eliminar sangre o coágulos adheridos. Una vez limpias, las membranas se separaron manualmente para cultivar el corion y amnios de manera independiente. Se realizaron cortes circulares de 10 mm de diámetro de cada membrana y se colocaron en cajas de 24 pozos (dos explantes/pozo) en medio DMEM (Gibco, BRL, Bethesda, U.S.A.) complementado con suero fetal bovino al 10% (Gibco, BRL, Bethesda, U.S.A.), piruvato de sodio 1 mM (Gibco, BRL, Bethesda, U.S.A.) y una mezcla de penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml y anfotericina B 0.25 µg/ml (Gibco, BRL, Bethesda, U.S.A.).

Los explantes se incubaron en una estufa Forma Scientific modelo 3158 durante 5 días a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. El medio de cultivo se cambió cada 24 horas y un día previo a la estimulación, los explantes se incubaron en medio complementado con hidrolizado de lactoalbúmina al 0.2% (Gibco, BRL, Bethesda, U.S.A.) en lugar de suero fetal bovino. La viabilidad de los explantes se determinó mediante la liberación de la lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio de cultivo, utilizando el estuche comercial CytoTox 96 ® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega Corp., Madison, U.S.A.). La liberación máxima se obtuvo incubando los explantes en medio de cultivo con Triton X-100 al 1%. Los resultados se expresaron en

porcentaje de viabilidad, calculado con la siguiente formula: % Viabilidad=100 X (1-(liberación espontánea de LDH/liberación máxima de LDH)).

Los explantes se estimularon con diferentes dosis de citocinas (TNF- α e IL-1 β) o LPS y 24 horas después los medios de cultivo fueron recolectados y almacenados a -70°C hasta ser usados para determinar la presencia de MMP-9 o citocinas respectivamente. Para los ensayos de neutralización, los explantes de amnios fueron estimulados con 1 ng/ml de LPS en presencia de diferentes concentraciones de un anticuerpo anti-TNF- α o anti-IL1 β (R & D Systems, Minneapolis, U.S.A.).

PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE CORION Y AMNIOS

Se homogenizaron de 1 a 2 g de amnios o corion en dos volúmenes de Tris 50 mM, pH 7.4, que contenía NaCl 0.15 M y CaCl₂ 100 mM de acuerdo al método de Woessner y Taplin [62]. La concentración de proteínas de los homogenizados se cuantificó de acuerdo al método de Bradford [63].

EXTRACCIÓN DE DNA DE CORION Y AMNIOS

Se aisló DNA de las membranas fetales utilizando una solución comercial DNAzol (Gibco, BRL, Bethesda, U.S.A.) de acuerdo al método descrito por el fabricante, el cual consiste en homogenizar 30 mg de tejido en 1 ml de DNAzol, seguido de incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos y centrifugación a 10,000 g para eliminar los fragmentos grandes. El DNA se precipitó con la adición de

0.5 ml de etanol absoluto por cada ml de DNAzol y centrifugación a 13,000 g durante 5 minutos. Se realizaron 3 lavados con etanol al 70% y finalmente se resuspendió en Tris 10 mM pH 7.5 con EDTA 1 mM.

ZIMOGRAFÍA

Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 8% de acuerdo a la técnica de Laemmli [64], con excepción de que se agregó 1 mg/ml de gelatina durante la polimerización. Se utilizó un sistema con formato de mini-gel (Bio-Rad, Richmond, CA).

Se aplicaron 10 µg de las muestras obtenidas de membranas o 1 µg de los sobrenadantes a cada carril en condiciones no desnaturizantes y se corrieron a 10 mA/gel constantes durante 2 horas. Los geles se lavaron con Tritón X-100 durante 30 minutos para eliminar el SDS y se incubaron durante 24 horas a 37°C en solución de Tris 50 mM pH 7.4 con NaCl 0.15 M, CaCl₂ 20 mM y azida de sodio 0.02%. Al finalizar la incubación, los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250. En cada corrida se incluyó un carril que contenía marcadores de pesos moleculares preteñidos (Gibco BRL, Bethesda, U.S.A.) y otro con 5 µl del sobrenadante de células U-937 (ATCC, NIH; donadas amablemente por el Dr. Alejandro Zentella D., IFC, UNAM) que producen MMP-2 y MMP-9 de manera constitutiva. Las bandas de actividad fueron analizadas con el programa Image-NIH. Se calculó el área bajo la curva para cada banda y se determinó su incremento tomando de manera arbitraria como valor de 1 la actividad basal en cada gel.

ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DEL DNA GENÓMICO

De las muestras de DNA obtenido se corrieron 10 µg en electroforesis en gel de agarosa al 1.8% en solución amortiguadora TBE 1X durante 2 horas a 75 V constantes. Se tiñó con bromuro de etidio y se observó con luz UV.

DETECCIÓN DE DNA FRAGMENTADO *IN SITU* E INMUNOHISTOQUÍMICA DE MMP-9

La detección del DNA fragmentado *in situ* se realizó de acuerdo al método descrito por Sgonc [65], el cual consiste en desparafinar cortes de membranas según el procedimiento estándar. A estas preparaciones se les adicionó dUTP-fluoresceinado en presencia de la deoxinucleotidil transferasa terminal por 30 minutos a 37°C. La detección del dUTP se realizó mediante la adición de un anticuerpo conjugado, antifuoresceina-peroxidasa, revelándose con una solución de diaminobenzidina. Una vez terminada esta fase se continuó con la detección inmunohistoquímica de la MMP-9 en las mismas laminillas, utilizando el anticuerpo Ab-110 (donado gentilmente por el Dr. William Stetler-Stevenson, National Cancer Institute, NIH), que reconoce la región inmediata al dominio de unión con los metales de la MMP-9. La tinción se realizó de acuerdo a la técnica del complejo avidina-biotina-fosfatasa alcalina (Vectastain AP-ABC kit, Vector, Burlingame, CA). Las laminillas se preincubaron durante 20 minutos en presencia de suero de cabra a 37°C. El anticuerpo primario se adicionó a una dilución de 1:1000 y se incubó por 45 min a 37°C. Esta incubación fue seguida por una segunda incubación de 30 minutos con el conjugado anti-IgG de conejo-biotina y 30 minutos más con el complejo avidina-fosfatasa alcalina. El revelado se realizó

utilizando como sustrato fosfato de bromocloroíndol y azul de nitroretrozolío. En estos experimentos se utilizó el suero preimmune como control negativo.

INMUNOHISTOQUÍMICA PARA RECEPTORES DE TNF- α

La tinción se realizó de acuerdo a la técnica del complejo avidina-biotina-fosfatasa alcalina (Vectastain AP-ABC kit, Vector, Burlingame, CA). Los tejidos se desparafinaron según el procedimiento estándar, seguido de incubación en H₂O₂ por 20 minutos a temperatura ambiente. Las laminillas se preincubaron durante 20 minutos en presencia de suero de conejo a 37°C. Los anticuerpos primarios anti-TNF-R1 o anti-TNF-R2 (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) se adicionaron en concentración de 15 μ g/ml y se incubaron por 90 minutos a 37°C. Esta incubación fue seguida por una segunda incubación de 30 minutos con el conjugado anti-IgG de ratón-biotina y 30 minutos más con el complejo avidina-fosfatasa alcalina. El revelado se realizó utilizando como sustrato la solución comercial Vector Red substrate kit (Vectastain, Vector, Burlingame, CA, USA). Para este experimento se utilizaron como controles IgG de cabra y la exclusión de los anticuerpos primarios (únicamente anticuerpos secundarios).

ZIMOGRAFÍA *IN SITU*

La técnica de zimografía *in situ* se realizó según el método descrito por Galis y cols. [66], en donde gelatina fluoresceïnada se mezcló 1:1 con agarosa al 1% en un amortiguador de Tris-HCl 50mM pH 7.4, que contenía cloruro de calcio 10 mM y 0.05% de Brij 35. La mezcla se extendió sobre laminillas precalentadas, de manera similar a

un frote sanguíneo, y una vez gelificada se colocaron cortes del tejido congelado sin fijar sobre ellas. Se cubrieron con un cubreobjetos utilizando el mismo amortiguador y se incubaron en cámara húmeda a 37°C por una semana. Las zonas de lisis, que aparecen como zonas oscuras contra el fondo de sustrato no degradado, fueron analizadas mediante un microscopio de fluorescencia (Axioscop, Zeiss, Germany).

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CITOCINAS

Las citocinas IL-1 β y TNF- α se determinaron por medio de inmunoensayo enzimático (prueba de ELISA), bajo el principio de doble anticuerpo. Para la determinación de IL-1 se utilizaron anticuerpos de R&D (mAb anti-IL-1 β , MAB601 y Ab policlonal biotinilado anti-IL-1 β , BAF201), mientras que para TNF- α se utilizaron de Pharmingen (mAb anti-TNF- α MAB1 y Ab policlonal biotinilado anti- TNF- α MAB11).

El desarrollo de la técnica es el siguiente, de acuerdo al método descrito por Harlow y Lane [67]:

1. Diluir el anticuerpo de captura (monoclonal) a una concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$ en amortiguador de bicarbonato de sodio a pH 8.2. Agregar 50 μl de dicha solución a una placa de ELISA de 96 pozos (Nunc, Denmark) e incubar toda la noche a 4°C.
2. Lavar la placa dos veces con amortiguador salino de fosfatos y 0.05 % de Tween 20 (PBS-Tween).

3. Bloquear la placa agregando 200 μ l/pozo de una solución de PBS-albúmina sérica bovina (Sigma Chemical, Co.) al 3% (PBS-BSA 3%) e incubar por 2 horas a temperatura ambiente y lavar 4 veces con PBS-Tween.
4. Añadir 100 μ l/pozo de los estándares y muestras diluidas en PBS-BSA 3%, incubar toda la noche a 4°C y lavar 4 veces con PBS-Tween.
5. Diluir el segundo anticuerpo a una concentración de 4 μ g/ml en PBS-BSA 3%, agregar 100 μ l/pozo e incubar por 45 minutos a temperatura ambiente.
6. Lavar la placa 3 veces y agregar 100 μ l de la dilución de la estreptavidina-fosfatasa alcalina (Gibco BRL, Bethesda, U.S.A.) e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Lavar 3 veces con PBS-Tween y añadir 250 μ l/pozo de la solución de *p*-nitrofenilfosfato, incubar a temperatura ambiente y en obscuridad hasta observar la reacción.
8. Detener la reacción con hidróxido de sodio 3 M y leer la absorbancia a 405 nm de longitud de onda

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de las variables experimentales se realizó usando un programa estadístico "Sigma Stat para Windows. Statistical Software. Versión 2.0" (Jandel Corporation) en el cual se hicieron las pruebas de Kruskal-Wallis o ANOVA, seguidas de la prueba de múltiples comparaciones versus el grupo control (método de Dunnett). En dichas pruebas, el límite máximo permitido del valor alfa (α) fue de 0.05 y el valor expresado como *p* es la significancia existente en cada caso.

RESULTADOS

CULTIVO *EX VIVO* DE MEMBRANAS FETALES

La viabilidad de los explantes de amnios, corion y corioamnios se determinó por la liberación de la lactato deshidrogenasa (LDH) al medio de cultivo. En todos los casos, la viabilidad celular (80-90%) se mantuvo constante durante 120 horas de cultivo (Figura 5). La secreción de MMPs al medio de cultivo por los explantes de membranas fetales fue evaluada por la técnica de zimografía. Después de 24 horas en cultivo, se observaron bandas de lisis de pesos moleculares de 72 y 92 kDa. Estas bandas corresponden a la proMMP-2 y proMMP-9 respectivamente, de acuerdo a los marcadores de actividad. La actividad de la banda correspondiente a la proMMP-9 fue observada en todos los tejidos durante el periodo de incubación. Debido a la variabilidad en la secreción de la proMMP-9 por las membranas fetales en cultivo, los resultados del zimograma se normalizaron de acuerdo al procedimiento descrito en los Métodos. La secreción de proMMP-9 se incrementó durante las primeras 24 horas debido a la manipulación de los tejidos; sin embargo, ésta decayó gradualmente hasta alcanzar su nivel basal a las 48 horas, donde se mantuvo constante durante 5 días. Después de 72 horas de cultivo, la estimulación de la membrana fetal con LPS incrementó la secreción de proMMP-9 en forma dosis dependiente. Este fue estadísticamente significativo con respecto al control, cuando se usaron 500 y 1000 pg/ml de LPS (Figura 6). Estos resultados muestran evidencia de viabilidad y funcionalidad de los tejidos en las condiciones experimentales, haciendo de este cultivo un sistema adecuado para estudiar los mecanismos de la ruptura de membranas.

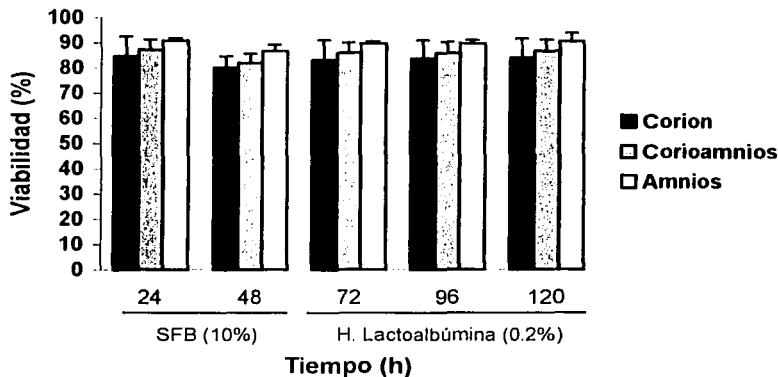


Figura 5. Viabilidad de explantes de membranas fetales mantenidos en cultivo por 120 horas. Explantes de corion, corioamnios y amnios provenientes de membranas fetales obtenidas de pacientes con indicación de cesárea fueron cultivados en medio DMEM con 10% SFB o 0.2% hidrolizado de lactoalbúmina. La viabilidad fue determinada por la liberación de la lactato deshidrogenasa al medio de cultivo. Cada barra representa la media \pm D.S de 3 experimentos realizados por duplicado.

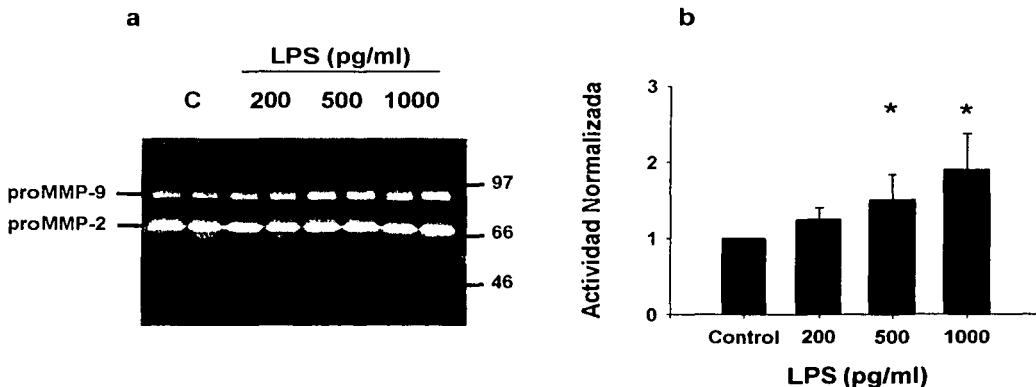


Figura 6. Efecto del LPS en la actividad de proMMP-9 en medio de cultivo de explantes de corioamnios después de incubarlos 72 horas. Explantes de membranas fetales obtenidas de pacientes con indicación de cesárea fueron incubados por 72 horas y estimulados con diferentes dosis de LPS por 24 horas. Aliquotas del medio de cultivo fueron analizadas por zimografía (b). Los niveles de proMMP-9 fueron cuantificados y normalizados como se indica en los Métodos. Cada barra representa la media \pm D.S de 3 experimentos realizados por duplicado (a). La prueba de Kruskal-Wallis seguida por la prueba de Dunnet's mostró diferencia significativa ($p < 0.05$, * indica diferencia significativa con respecto al control).

EFEECTO DEL LPS EN EXPLANTES DE AMNIOS Y CORION

Al estimular el amnios con LPS se observó incremento en forma dosis dependiente y de manera significativa de la producción de proMMP-9. Por su parte, el corion no aumentó la síntesis de proMMP-9 al ser estimulado con las mismas concentraciones de LPS (Figura 7).

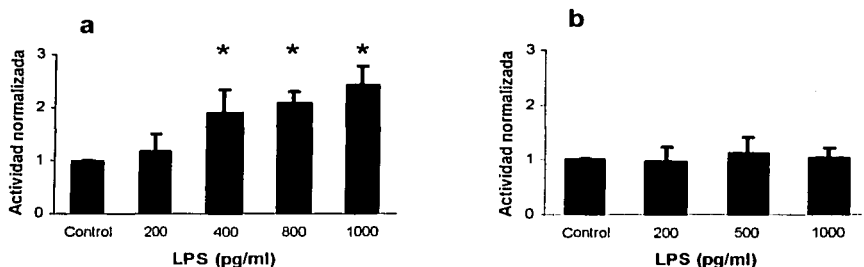


Figura 7. Producción de proMMP-9 por explantes de amnios (a) y corion (b) estimulados con LPS. Cada barra representa la media \pm D.S de 3 experimentos realizados por duplicado. La prueba de ANOVA seguida por la prueba de Dunnett mostró significancia estadística para los valores mostrados por el amnios ($p < 0.05$, * indica diferencia significativa con respecto al control).

EFEECTO DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS EN POBLACIONES DE CORION Y AMNIOS

Los resultados de la estimulación de explantes de amnios con $IL-1\beta$ o $TNF-\alpha$ mostraron aumento en la producción de proMMP-9 con respecto a los controles. En el caso del $TNF-\alpha$ el aumento fue dosis dependiente (Figura 8a), mientras que con la $IL-1\beta$ el incremento tuvo la respuesta máxima en la dosis de 10 ng/ml, la cual disminuyó con la dosis mayor (Figura 8b). En ambos casos el incremento fue significativo y la actividad normalizada de la proMMP-9 en los explantes estimulados con $TNF-\alpha$ o $IL-1\beta$ a 10 ng/ml fue 4 y 1.5 veces mayor que el control, respectivamente. Para el corion y

corioamnios, no se observó incremento significativo en la producción de proMMP-9 cuando fueron estimulado con TNF- α o IL-1 β (Figura 9).

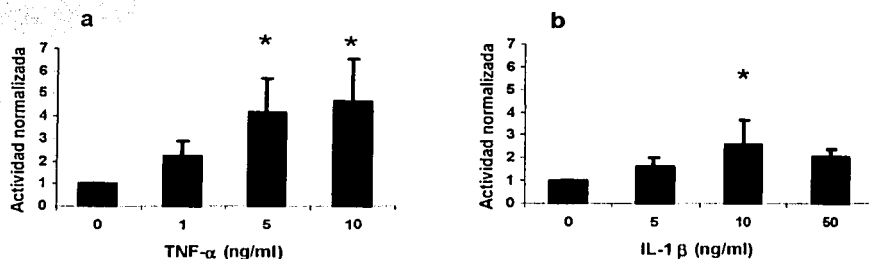


Figura 8. Producción de proMMP-9 en explantes de amnios incubados en presencia de TNF- α (a) e IL-1 β (b). Los niveles de proMMP-9 fueron cuantificados y normalizados como se indica en los métodos. Cada barra representa la media \pm D.S de 5 experimentos realizados por duplicado. La prueba de ANOVA seguida por la prueba de Dunnet's mostró diferencia significativa ($p < 0.05$, * indica diferencia significativa con respecto al control).

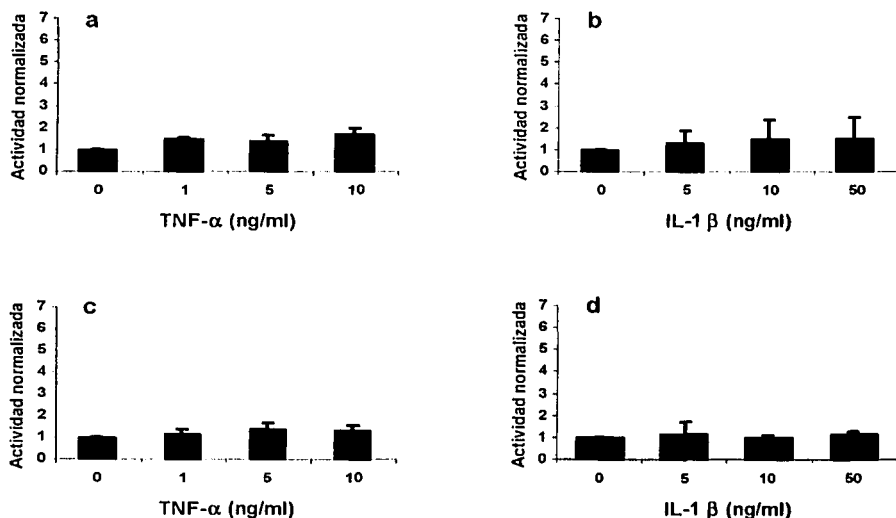


Figura 9. Producción de proMMP-9 en explantes de corion (a, b) y corioamnios (c, d) incubados en presencia de TNF- α (a, c) e IL-1 β (b, d). Los niveles de proMMP-9 fueron cuantificados y normalizados como se indica en los Métodos. Cada barra representa la media \pm D.S de 5 experimentos realizados por duplicado. No hubo diferencia significativa.

REGULACIÓN AUTOCRINA DE LA SECRECIÓN DE proMMP-9 POR TNF- α EN EXPLANTES DE AMNIOS

Explantes de amnios fueron estimulados con LPS en presencia de un anticuerpo neutralizante anti-TNF- α o anti-IL-1 β . La producción de proMMP-9 en estos explantes estimulados con LPS se redujo de manera significativa cuando se adicionó el anticuerpo anti-TNF- α a una concentración de 60 ng/ml. La presencia del anticuerpo anti-IL-1 β en el cultivo no tuvo efecto en la síntesis de la enzima (Figura 10).

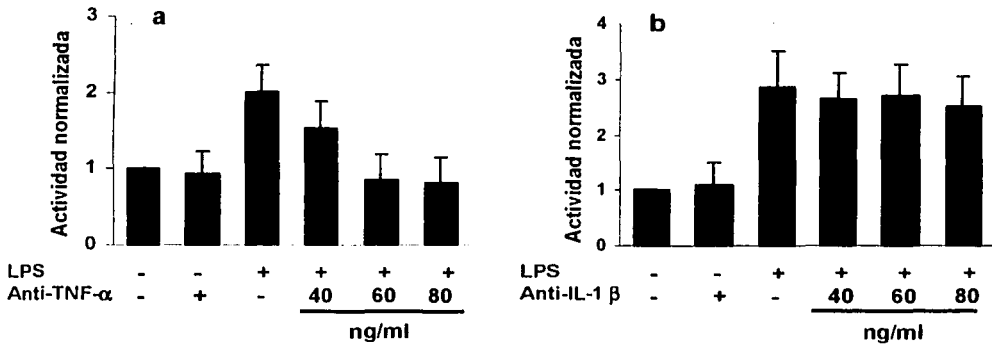


Figura 10. La inducción de proMMP-9 en los explantes de amnios estimulados con LPS es dependiente de la expresión de TNF- α . Explantes de amnios fueron incubados con LPS en presencia de un anticuerpo neutralizante anti-TNF- α (a) o anti-IL-1 β (b). Los niveles de proMMP-9 fueron cuantificados y normalizados como se indica en los Métodos. Cada barra representa la media \pm D.S de 3 experimentos realizados por duplicado.

PRODUCCIÓN DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS POR EXPLANTES DE CORION

Con el objetivo de investigar la participación del corion en un sistema paracrinó de regulación en la expresión de proMMP-9 por el amnios, fue determinada la producción de citocinas proinflamatorias por explantes de corion estimulados con LPS.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La síntesis de tanto TNF- α como de IL-1 β fue en forma dosis dependiente y de manera significativa ($p < 0.05$; figura.11).

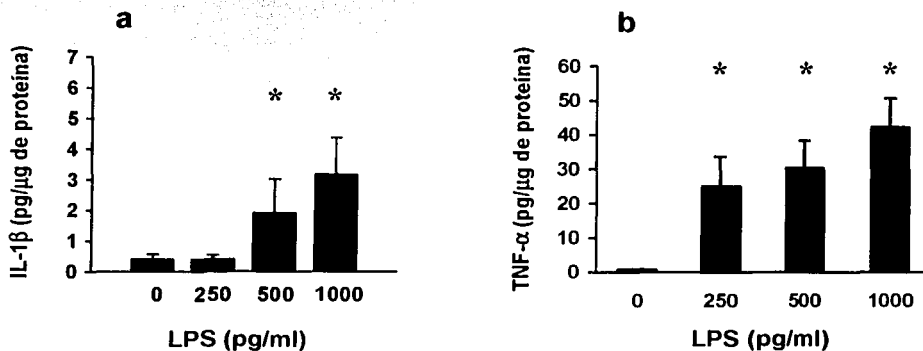


Figura 11. Producción de IL-1 β (a) y TNF- α (b) por explantes de corion. Cada barra representa la media \pm D.S de 5 experimentos realizados por duplicado. La prueba de ANOVA seguida por la prueba de Dunnet's mostró significancia estadística para IL-1 β ($p < 0.05$, * indica diferencia significativa con respecto al control).

ACTIVIDAD GELATINOLÍTICA EN EXTRACTOS PROTEICOS DE MEMBRANAS DE CESÁREA, TRABAJO DE PARTO Y RPM

Al explorar la producción de MMPs en extractos proteicos de membranas fetales por zimografía, se observó incremento de la actividad enzimática tanto en el trabajo de parto como en la RPM. Los extractos de amnios obtenidos de pacientes con trabajo de parto y RPM, así como todos los de corion, mostraron bandas de lisis de altos pesos moleculares. Estas bandas correspondieron a la pro-MMP-9, MMP-9 y dímeros de la misma (Figura 12). La actividad de la banda correspondiente a la pro-MMP-9 en el amnios se incrementó hasta 5 veces en los casos con RPM y hasta 2.3 veces en los muestras obtenidas de pacientes con trabajo de parto al ser comparadas con los extractos preparados de membranas obtenidas por cesárea. En cuanto al corion, este incremento fue de 6 veces en los casos con RPM y 4 veces en los extractos obtenidos

de muestras con trabajo de parto con respecto a las muestras de membranas obtenidas por cesárea. Un gel representativo de estos ensayos se presenta en la figura 12.

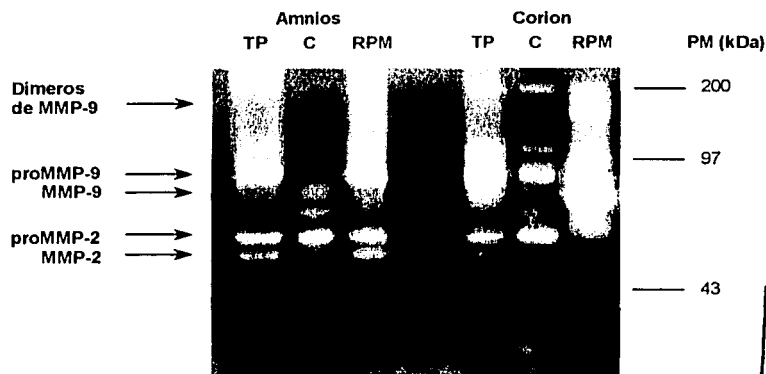


Figura 12. Zimografía de los extractos de membranas amnióticas y coriónicas. En esta figura se observa aumento de la actividad enzimática correspondiente a la proMMP-9 en los carriles con extractos de membranas amnióticas y coriónicas provenientes de trabajo de parto y ruptura prematura de membranas (TP, trabajo de parto, C, cesárea, RPM, ruptura prematura de membranas).

PRESENCIA DE MUERTE CELULAR PROGRAMADA Y MMP-9 EN MEMBRANAS PROVENIENTES DE PACIENTES CON CESÁREA, TRABAJO DE PARTO Y RPM

La identificación de apoptosis *in situ* con la técnica TUNEL que reconoce células con DNA fragmentado, reveló que el amnios es la zona donde predominan células positivas para este indicador de muerte celular programada. La distribución de células positivas para apoptosis fue diferente entre los distintos tejidos. Las membranas provenientes de cesáreas programadas mostraron escasas células positivas esparcidas a lo largo del amnios (Figura 13a). Las membranas provenientes de trabajo de parto mostraron zonas que fueron intensamente positivas, que se alternaron con zonas en las que algunas células eran positivas y otras no (Figura 13b). El amnios

proveniente de los casos con RPM mostró la reactividad más intensa de los analizados e incluyó casi la totalidad del amnios y porciones extensas del corion (Figura 13c). La fragmentación de DNA en las muestras referidas arriba fue confirmada por electroforesis en geles de agarosa (Figura 14). La inmunodetección de la MMP-9 reveló patrones semejantes a los de apoptosis con nula reactividad en las muestras provenientes de cesáreas (Figura 13a), reactividad intermedia en las muestras con trabajo de parto, en las que se localizó en el estroma (Figura 13b) y alta reactividad en las muestras de casos con RPM, en las que se localizó tanto en el estroma como en el interior de las células (Figura 13d). La inmunoreactividad tuvo correlación con los datos de zimografía. El suero preimmune utilizado como control no mostró reactividad.

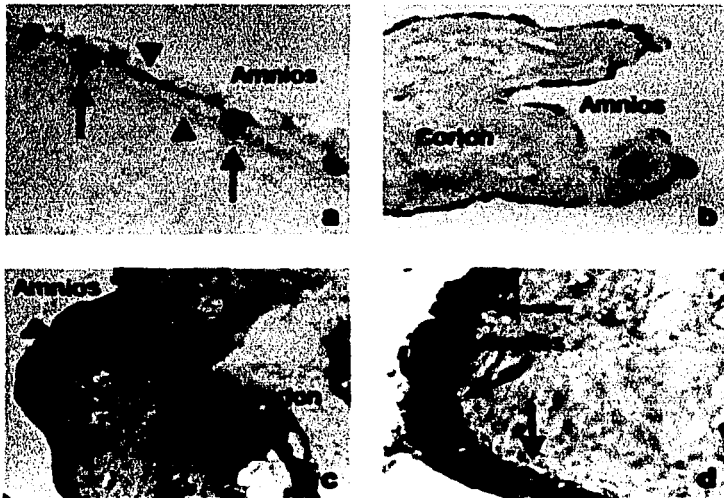


Figura 13. Inmunohistoquímica de la localización de núcleos apoptóticos por la técnica de TUNEL (color café) e inmunoreactividad de MMP-9 (color azul) en membranas fetales obtenidas de pacientes con indicación de cesárea (a, 40X), trabajo de parto (b, 20X) y RPM (c, 20X; d, 40x). Las flechas señalan núcleos apoptóticos y las cabezas de flechas señalan los núcleos no apoptóticos en el epitelio amniótico.

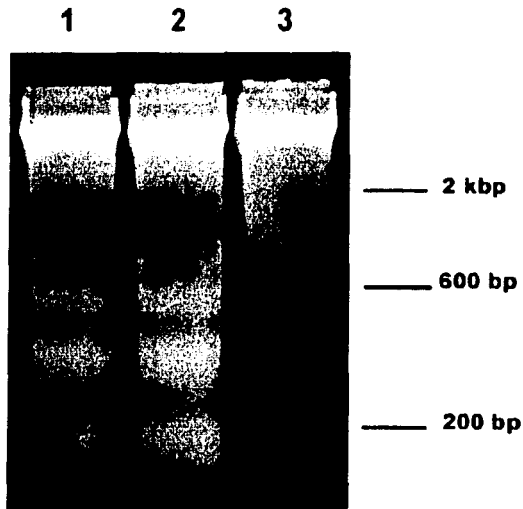


Figura 14. Análisis electroforético del DNA extraído de membranas fetales obtenidas de pacientes con trabajo de parto (carril 1), RPM (carril 2) y cesárea (carril 3). La fragmentación característica de apoptosis se detectó en el carril 1 y 2. Estos resultados fueron consistentes en cinco muestras analizadas de cada grupo.

La técnica de zimografía *in situ* se utilizó para corroborar que la inmunoreactividad observada en las membranas de cesárea, trabajo de parto y RPM correlaciona con actividad gelatinolítica. En las membranas de trabajo de parto y RPM las zonas de lisis correspondieron con la inmunodetección de MMP-9; esta lisis se localizó en el espacio intercelular del epitelio amniótico (Figura 15). En las membranas de cesárea no se observó actividad gelatinolítica. La integridad morfológica del espacio intercelular de todas las membranas fue comprobada por la tinción con eosina-hematoxilina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

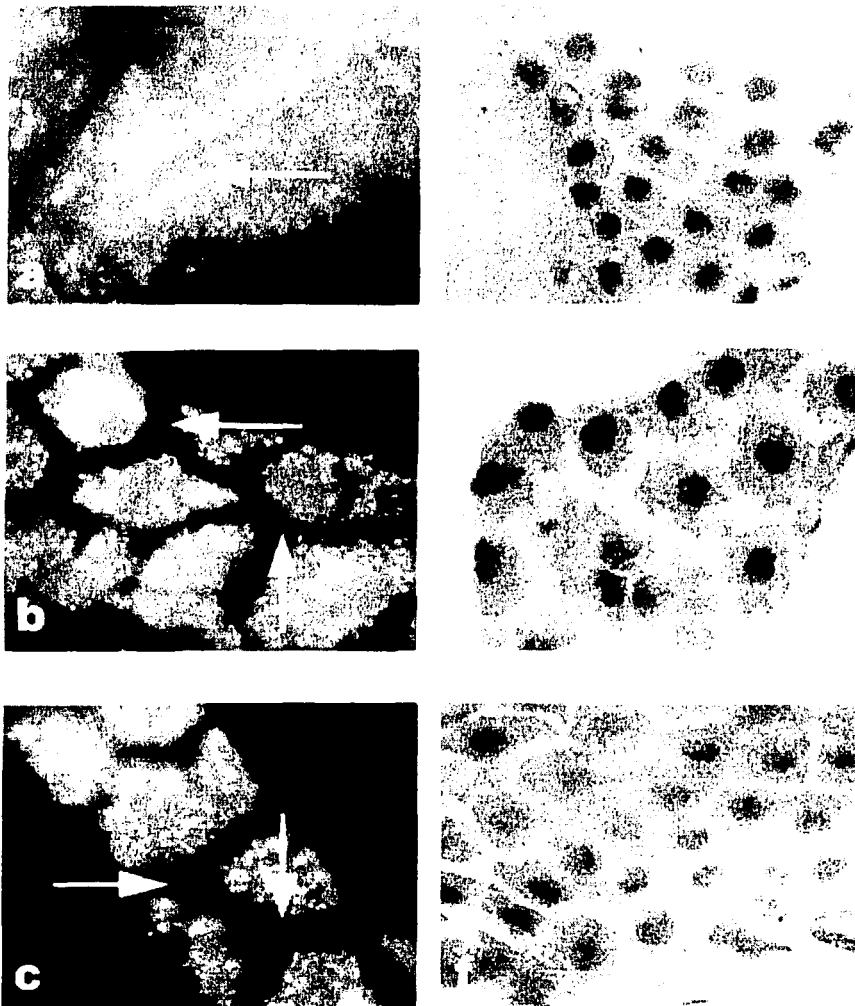
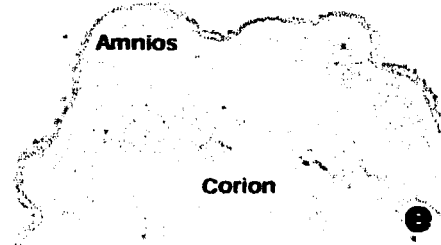
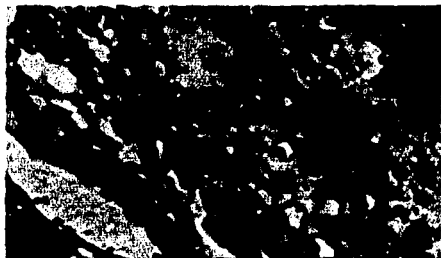


Figura 15. Actividad gelatinolítica estudiada por zimografía *in situ* en membranas corioamnióticas. Cortes de membranas congeladas obtenidas de pacientes con indicación de cesárea (a), trabajo de parto (b) y RPM (c) fueron incubados sobre portaobjetos cubiertos con gelatina fluoresceinada. Las flechas señalan áreas en donde se observa la degradación del sustrato. Los mismo tejidos teñidos con hematoxilina-eosina se muestran en los recuadros d, e y f. Todos los recuadros muestran el epitelio amniótico a la misma amplificación (100x).

PRESENCIA DE RECEPTORES PARA TNF- α EN MEMBRANAS PROVENIENTES DE PACIENTES CON CESÁREA, TRABAJO DE PARTO Y RPM

El TNF-R1 fue detectado en la superficie del epitelio amniótico y en la capa coriónica de las muestras obtenidas de trabajo de parto normal y RPM (Figura 16). Las membranas fetales de pacientes con RPM mostraron la mayor intensidad para el TNF-R1, mientras que las membranas obtenidas de pacientes con indicación de cesárea no tuvieron células positivas para este receptor (Figura 16e). La distribución de la proteína inmunoreactiva fue homogénea dentro del citoplasma de la célula. En contraste, la inmunoreactividad para el TNF-R2 fue observada en células del epitelio amniótico y en la capa coriónica de las membranas obtenidas de pacientes con indicación de cesárea y trabajo de parto normal (Figura 16d y 16f), mientras que en las muestras obtenidas de RPM no se detectó ninguna célula positiva para este receptor (Figura 16b). La proteína inmunoreactiva se encontró principalmente en la superficie de las células del amnios. Estos resultados fueron consistentes en cinco muestras analizadas de cada grupo. Ninguno de los controles (IgG de cabra como anticuerpo primario y la exclusión de los anticuerpos primarios) mostraron reactividad.

TNF-R1



TNF-R2

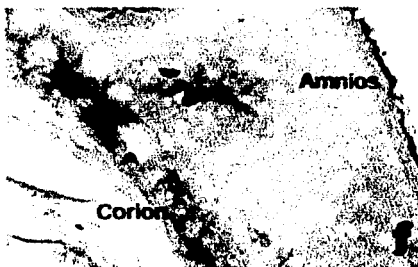
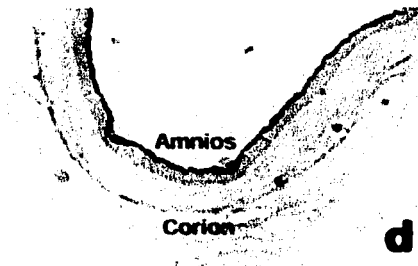
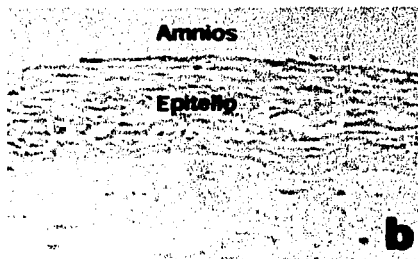


Figura 16. Identificación de TNF-R1 y TNF-R2 en membranas fetales. Cortes de membranas fetales obtenidos de pacientes con RPM (a, b, 40x), trabajo de parto (c, 40x; d, 20x) y cesárea (e, f, 20x). El TNF-R1 se localiza principalmente en membranas obtenidas de pacientes con diagnóstico de RPM y trabajo de parto (a, c), mientras que el TNF-R2 se expresa en las membranas de trabajo de parto y cesárea (d, f).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

En este trabajo, se describe un modelo simple de cultivo de membranas fetales, en donde la viabilidad y funcionalidad del tejido se mantuvo por un período de 120 horas. Este modelo se desarrolló utilizando tejidos provenientes de pacientes a término con indicación de cesárea sin trabajo de parto, que corresponden al estado basal del corioamnios en donde los mecanismos de expresión de MMPs no han sido inducidos. El período prolongado de viabilidad y la capacidad de responder a estímulos exógenos (p.e. TNF- α , IL-1 β o LPS), permite utilizar este modelo para evaluar el efecto de diferentes compuestos en las membranas fetales y la respuesta de las membranas de manera individual o asociada. Por otra parte, se consideró que el uso de membranas fetales provenientes de trabajo de parto o RPM no es adecuado para este modelo, ya que a diferencia de las obtenidas por cesárea, éstas presentan activación de los mecanismos estudiados y por lo tanto no podrían observarse cambios al estimularlas.

La ruptura de las membranas fetales durante el trabajo de parto o la RPM se ha asociado a la secreción y activación de un grupo de enzimas denominado metaloproteasas de matriz extracelular. Aunque a la fecha se conoce el patrón enzimático que aparece en el corioamnios durante el trabajo de parto y el origen celular de las enzimas principales, se desconoce que mecanismos las inducen. En este sentido se ha postulado que esta familia de enzimas, principalmente la MMP-9, se encargan de degradar la matriz extracelular, ocasionando el rompimiento de las membranas. A este respecto, se demostró recientemente que la disminución de la

fuerza tensil en zonas de membranas fetales obtenidas de pacientes con trabajo de parto a término, se asocia al incremento de MMP-9 [12]. En el caso de la RPM se ha demostrado el aumento de actividad de este grupo de enzimas, que coexiste con disminución de sus inhibidores específicos (TIMPs) [20]. La expresión de las metaloproteasas en el corioamnios al inicio del trabajo de parto puede ser inducida por señales fisiológicas o durante una infección por moléculas bacterianas. A este respecto, el LPS induce la aparición de estas enzimas, mientras que a nivel fisiológico se han asociado factores tan diversos como el factor activador de plaquetas, endotelinas, prostaglandinas y citocinas, lo que muestra la complejidad en la ruptura de membranas y los múltiples factores que pueden intervenir en este proceso [7, 37, 38, 45].

Estudios *in vitro* han demostrado que el TNF- α y la IL-1 β incrementan la producción de MMPs en las poblaciones celulares de las membranas fetales; por ejemplo la estimulación de cultivos primarios de células coriónicas o amnióticas con estas citocinas induce incremento de la actividad colagenolítica, así como la expresión de MMP-1 y MMP-3 [37, 38, 45]. Por otra parte, se ha descrito que la concentración de TNF- α e IL-1 β en el líquido amniótico aumenta de manera significativa durante el trabajo de parto o la RPM [42-44]. La síntesis de estas citocinas se realiza, al menos en parte, por las células de las membranas fetales y la placenta, ya que se ha reportado un incremento en la tasa de transcripción para estas citocinas en los tejidos de pacientes con trabajo de parto o RPM. [55, 56]. Estas evidencias sugieren la participación del TNF- α e IL-1 β como moléculas que coordinan la expresión de MMPs

por las distintas poblaciones celulares de las membranas fetales durante el trabajo de parto y que podrían funcionar de manera anormal en la RPM. Ejemplos similares del funcionamiento alterado en la expresión de citocinas se han descrito en complicaciones obstétricas como la preeclampsia y las pérdidas fetales recurrentes, en donde se ha reportado que la placenta expresa de manera anticipada el TNF- α [68, 69].

En trabajos previos, se reportó la capacidad de las membranas fetales para sintetizar TNF- α , IL-1 β o MMPs en respuesta al LPS [36, 59]; sin embargo, no se ha descrito si la producción de proMMP-9 y estas citocinas provienen de la misma estirpe celular o de diferentes células o tejidos, ni la secuencia de eventos que conectan la expresión de MMPs y citocinas proinflamatorias con productos bacterianos. Los resultados del presente trabajo mostraron que el amnios, pero no el corion, fue capaz de producir la proMMP-9 cuando se estimuló con LPS, TNF- α o IL-1 β , lo que sugiere que estos compuestos participan en la expresión de la proMMP-9. Los resultados obtenidos con los anticuerpos neutralizantes anti-TNF- α o anti-IL-1 β , demostraron que la síntesis de esta enzima por el amnios humano incubado en presencia de LPS, es dependiente de la secreción de TNF- α pero no así de la de IL-1 β . Esto coincide con el hecho de que el amnios tiene receptores para TNF- α .

Resalta de manera interesante la ausencia de síntesis de proMMP-9 en respuesta a la estimulación con TNF- α e IL-1 β por los explantes del corioamnios; ya que se esperaría que por la presencia de células del epitelio amniótico debiera incrementarse la producción de la enzima como ocurre al estimular los explantes de

amnios con estas citocinas. Con respecto al TNF- α , recientemente se demostró que los trofoblastos son capaces de secretar de manera constitutiva grandes concentraciones de los receptores solubles para TNF-R1 y TNF-R2 [70, 71], mecanismo inhibitorio de la actividad de esta citocina por el cual se puede explicar la falta de síntesis de MMP-9 por los explantes del corioamnios al ser estimulados por el TNF- α . Además, la producción del antagonista del receptor de IL-1 por los trofoblastos podría bloquear la unión de la IL-1 β a su receptor siendo un mecanismo importante en la regulación de la actividad biológica de esta citocina en los experimentos del corioamnios [70, 72].

Por otra parte, se encontró que la estimulación de los explantes de corion con LPS producen de manera significativa tanto TNF- α como IL-1 β . Estos datos se pueden interpretar como la necesidad de que el corion le envíe información al amnios para iniciar la expresión de la proMMP-9; que a su vez, sugiere una posible regulación paracrina.

La descripción de un sistema de regulación autocrino/paracrino requiere de la identificación de al menos tres parámetros, 1) efecto de mediadores solubles sobre células blanco, 2) síntesis de estos mediadores y 3) presencia de sus receptores. Una forma para establecer la existencia de sistemas autocrinos ha sido el uso de antagonistas específicos o anticuerpos neutralizantes de los mediadores solubles, mientras que la regulación paracrina se ha demostrado mediante la evaluación del efecto y la producción de las moléculas efectoras. Con estas estrategias experimentales y considerando los resultados de este trabajo, se puede proponer que la síntesis de proMMP-9 por el amnios humano es regulada a través de un sistema

autocrino mediado por $\text{TNF-}\alpha$, mientras que el corion podría regular la expresión de la proMMP-9 a través de la síntesis de $\text{IL-1}\beta$ y $\text{TNF-}\alpha$ (figura 18). Si bien es cierto que esta propuesta no es nueva, ya que un sistema autocrino/paracrino se reportó en la corio-decidual humana, en el cual se propone a la relaxina para regular la expresión de MMP-1, MMP-3, TIMP-1 y el activador de plasminógeno [73, 74], éste es el primer estudio donde se demuestra la existencia de un sistema de regulación autocrina/paracrina en donde el $\text{TNF-}\alpha$ y la $\text{IL-1}\beta$ controlan la síntesis de MMP-9 en el corioamnios humano.

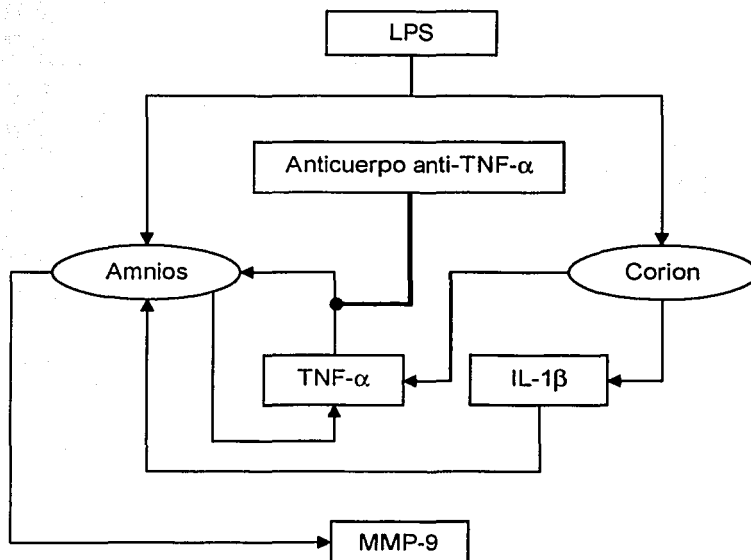


Figura 18. Representación esquemática de la regulación autocrina/paracrina de la síntesis de MMP-9 en el corioamnios humano.

La mayor parte del conocimiento sobre los mecanismos moleculares de la ruptura de membranas fetales aún está por dilucidarse, sin embargo se puede proponer un modelo que explique, al menos en parte, la secuencia de eventos para inducir la

degradación de la matriz extracelular en el corioamnios humano, durante una infección intraamniótica. El contacto del amnios con productos bacterianos como el LPS estimula la secreción de TNF- α , que de manera autocrina induce la síntesis de proMMP-9. Por otra parte, el contacto del corion con el LPS libera TNF- α y IL-1 β , que al unirse a sus receptores presentes en el epitelio amniótico [75], incrementa la producción de proMMP-9. La proenzima inactiva, una vez secretada, es procesada por la MMP-3 [17], el activador de plasminógeno (uPA) [76] o la MMP-2 [16] que se encuentran presentes en el líquido amniótico, para producir la enzima activa que comienza la degradación de la colágena tipo I, IV, V, VII, X, XI, fibronectina y elastina [77]. Este proceso tiene como consecuencia final la disminución de la fuerza tensil de las membranas fetales y por lo tanto su ruptura. Aunque esta serie de eventos podría presentarse durante una infección intraamniótica por intermediación del LPS, la presencia de proMMP-9, MMP-9 y ambas citocinas en el líquido amniótico de mujeres embarazadas a término sin infección [21, 44], sugiere que este mecanismo es utilizado en condiciones fisiológicas. Para completar este modelo propuesto de degradación de la matriz extracelular del corioamnios, aun falta establecer la participación de otras citocinas y MMPs. Sin embargo, los resultados y la estrategia empleada en este estudio, permitió establecer parámetros bioquímicos de la inducción de la proMMP-9 en un modelo *in vitro*.

Establecer esta metodología fue necesario debido al impedimento de coleccionar membranas fetales humanas de manera longitudinal para establecer la temporalidad de los eventos que inducen su ruptura. Por estas razones y para tener el conocimiento detallado de los eventos que acompañan a la ruptura de las membranas fetales, se

decidió utilizar tres grupos de pacientes que representan estados específicos del funcionamiento del tejido durante la gestación, es decir, desde un estado basal, sin activación de los mecanismos de ruptura, hasta el totalmente activado como el de la RPM. El corioamnios obtenido de pacientes con indicación de cesárea sin trabajo de parto corresponde al estado basal que se observa durante todo el embarazo, hasta antes del parto, con ausencia de la activación de los mecanismos estudiados. Las muestras del grupo de pacientes con RPM representan la respuesta máxima en los cambios bioquímicos. El tercer grupo de pacientes fue con trabajo de parto activo y con la misma edad gestacional que el grupo de RPM, y representa el estado intermedio, fisiológico que de manera natural utiliza el ser humano.

De acuerdo con los resultados de zimografía e inmunoreactividad, las membranas fetales provenientes de pacientes con RPM y trabajo de parto normal mostraron aumentos en la actividad de proMMP-9 y MMP-9. Los resultados obtenidos en la zimografía de extractos proteicos de membranas fetales, son apoyados por hallazgos previos [19], en donde se mostró incremento de la actividad enzimática. La distribución de gelatinasas, según lo revelado por inmunohistoquímica y zimografía *in situ* permite sugerir que la MMP-9 está asociada normalmente a la matriz extracelular y que durante el trabajo de parto o la RPM los mecanismos de activación de las proenzimas son inducidos. La ausencia virtual de los cambios en la expresión de la proMMP-9 y de su actividad en las membranas fetales provenientes de pacientes con indicación de cesárea, en donde por definición las membranas se encuentran íntegras, confirma la ausencia de mediadores antes del parto. Al igual que en otros reportes, en

donde analizan placas de aterosclerosis por zimografía *in situ*, se detectó actividad gelatinolítica adyacente al tejido estudiado [66], la cual puede reflejar la difusión de la enzima durante el período de incubación.

Como se mencionó, la ruptura de las membranas fetales es un proceso dinámico, multifactorial y complejo que además de involucrar cambios en el metabolismo de la colágena, debe involucrar cambios bioquímicos y morfológicos de las células. Durante la gestación las poblaciones celulares del corioamnios humano se mantienen activas en la síntesis de β -endorfinas, neuropéptido Y, factor liberador de corticotropina, factores de crecimiento y citocinas, entre otras [78]; sin embargo, al llegar al final del embarazo debe existir un proceso de muerte celular que garantice que las poblaciones celulares del corioamnios no secreten sustancias que puedan dañar a la madre o al feto. La muerte por necrosis es un fenómeno masivo en el que las células experimentan un aumento de volumen, ocasionando la pérdida en la integridad de la membrana y por lo tanto la liberación de sustancias tóxicas que provocan una inflamación que puede tener un efecto nocivo en el organismo. Por su parte, la apoptosis es un fenómeno discreto en el que existe una condensación del citoplasma y reducción del volumen celular, acompañado de cambios en la estructura del núcleo. La cromatina se condensa y forma cúmulos densos adosados a la membrana nuclear; esto es seguido de invaginaciones de la membrana nuclear y termina con la fragmentación del núcleo en estructuras membranosas con cantidades variables de cromatina. De manera análoga, la membrana plasmática sufre invaginaciones que terminan por fragmentar a la célula formando racimos de vesículas de tamaño variable

que contienen organelos intactos que no se fusionan con lisosomas. A estas vesículas se les denomina cuerpos apoptóticos, los cuales son fagocitados rápidamente por células vecinas. Por tanto, una de las consecuencias fisiológicas más relevantes de la apoptosis, es que no se libera material intracelular al medio intersticial, impidiendo así el inicio de un proceso inflamatorio [79]. Los datos obtenidos de la técnica de TUNEL en membranas de RPM y trabajo de parto normal muestran la presencia de muerte celular programada en membranas fetales que se están degradando, datos apoyados por observaciones previas [41, 80-82]. Más aún, las observaciones de este trabajo permiten proponer la asociación entre la expresión de MMP-9 y la apoptosis, propuesta que es apoyada por las observaciones previas en el modelo de la rata, en donde la expresión de MMP-1 y MMP-9 se asocia con la apoptosis del amnios [40, 83].

Los resultados descritos aquí sobre la identificación simultánea de células apoptóticas e inmunoreactividad intracelular a MMP-9 en las membranas provenientes de pacientes con RPM, así como la muerte celular programada en ausencia de reactividad a MMP-9 observada en las membranas con cesárea y en algunas zonas de las membranas provenientes de casos con trabajo de parto, sugieren que la activación de la apoptosis precede a la inducción de enzimas que degradan matriz extracelular. Esta propuesta es apoyada por los hallazgos previos, en donde se demostró que el incremento de p53 durante la apoptosis de membranas fetales humanas induce la expresión de la MMP-2 [81].

La señal de inicio de degradación del corioamnios durante el trabajo de parto o en la RPM, debe ser un factor o factores que induzcan apoptosis, que entre otras manifestaciones incluye la secreción de metaloproteasas de matriz extracelular. A este respecto, el aumento de TNF- α e IL-1 β que antecede al trabajo de parto o la RPM los hace candidatos importantes para iniciar ambos procesos. Los efectos del TNF- α son mediados por su unión a cualquiera de sus receptores en las células blanco [48]. Actualmente, se han caracterizado dos receptores para el TNF- α , el receptor tipo 1 (TNF-R1) que se ha asociado a efectos citotóxicos e inducción de MMP-9 [84, 85] y el tipo 2 (TNF-R2) que está implicado en señales de crecimiento celular [51]. Los resultados de la inmunohistoquímica de receptores para TNF- α son apoyados por los hallazgos previos, en donde se demostró que las membranas fetales provenientes de pacientes con trabajo de parto expresan TNF-R1 y TNF-R2 [52-54]. Sin embargo, los datos descritos aquí toman relevancia porque demuestran que el tipo de receptor para TNF- α se modifica de acuerdo al estado en que se encuentran las membranas fetales, es decir, las membranas obtenidas de cesárea expresan únicamente TNF-R2, mientras que aquellas obtenidas de pacientes con RPM solo expresan TNF-R1. De manera interesante, ambos receptores fueron observados en las muestras obtenidas de pacientes con trabajo de parto normal. Estos datos sugieren un mecanismo novedoso, aún no descrito, mediante el cual las membranas fetales se preparan para su degradación a través de cambios en la expresión de estos receptores.

El cambio en la expresión de los receptores para TNF- α en el corioamnios humano adquiere un interés especial ya que las consecuencias funcionales podrían

incluir la activación de procesos que disminuyen la fuerza tensil de las membranas fetales, es decir, que la secreción de MMP-9 y la inducción de apoptosis en el amnios humano puede ser dependiente del tipo de receptor para TNF- α presente en la membrana celular.

Se ha reportado que la expresión de receptores para TNF- α es modulada por cambios en el microambiente celular; por ejemplo, la presencia de estradiol, progesterona, interferón- γ , IL-4, IL-3 y LPS regulan los efectos biológicos de TNF- α a través de la expresión diferencial de sus receptores [86-90]. Si bien es cierto que en este trabajo no se investigaron los mecanismos que regulan la expresión de los receptores para TNF- α , se podría especular que las alteraciones en el patrón de citocinas en el líquido amniótico durante el embarazo o la presencia de LPS durante una infección intraamniótica, podrían controlar la expresión diferencial de los receptores para TNF- α ; sin embargo, es necesario realizar estudios posteriores para demostrar esta hipótesis.

A pesar de que en los últimos años se ha generado una gran cantidad de información acerca de la fisiopatología de la ruptura prematura de membranas, aun quedan incógnitas que deben ser contestadas, tal es el caso de la participación de otras metaloproteasas de matriz extracelular (p.e. MMP-7, MMP-8, MMP-13) o citocinas (p.e. IFN- γ , IL-2, IL-10) presentes en el líquido amniótico, que aun no han sido estudiadas en el contexto de la ruptura de las membranas fetales. Por otra parte, el entender los mecanismos que controlan la expresión diferencial de los receptores para

TNF- α , así como las vías de transducción de señales del TNF-R1 para inducir la producción de proMMP-9 y apoptosis en el amnios humano, permitirá diseñar estrategias terapéuticas encaminadas a retardar la degradación de las membranas fetales durante la RPM.

CONCLUSIONES

1. El epitelio amniótico es el tejido productor de proMMP-9.
2. La producción de proMMP-9 es regulada de manera autocrina por el TNF- α .
3. El corion produce TNF- α e IL-1 β .
4. Existe identificación simultánea de la expresión de MMP-9 y muerte celular programada en el amnios de membranas fetales humanas con trabajo de parto y RPM.
5. Los receptores para TNF- α se expresan de manera diferencial en el corioamnios humano durante el trabajo de parto o la RPM.

BIBLIOGRAFÍA

1. Iams J. Preterm birth. In: Gabbe S, Niebyl J, Simpson J (eds.), *Obstetrics. Normal and problem pregnancies*, Third ed. New York: Churchill Livingstone; 1996: 792-801.
2. Husslein P, Leitich H. Some aspects on the mechanism of human labor and delivery. *Eur J Obstet Gynecol* 1995; 59: S3-S7.
3. Halaburt JT, Uldbjerg N, Helming R, Ohlsson K. The concentration of collagen and the collagenolytic activity in the amnion and the chorion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1989; 31: 75-82.
4. 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: 375-386.
5. Fawthrop RK, Ockleford CD. Cryofracture of human term amniochorion. *Cell Tissue Res* 1994; 277: 315-323.
6. Bryant-Greenwood G. The extracellular matrix of the human fetal membranes: structure and function. *Placenta* 1998; 19: 1-11.
7. Parry S, Strauss JF, III. Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med* 1998; 338: 663-670.
8. Vadillo-Ortega F, Bermejo-Martínez L, Pfeffer F. Ruptura prematura de membranas: Mecanismos de la enfermedad. *Perinatol Reprod Hum* 1994; 8: 180-189.
9. Shubert PJ, Diss E, Iams JD. Etiology of preterm premature rupture of membranes. *Obst Gyn Clin N Am* 1992; 19: 251-263.
10. Skinner SJ, Campos GA, Liggins GC. Collagen content of human amniotic membranes: effect of gestation length and premature rupture. *Obstet Gynecol* 1981; 57: 487-489.
11. Kanayama N, Terao T, Kawashima Y, Horiuchi K, Fujimoto D. Collagen types in normal and prematurely ruptured amniotic membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 153: 899-903.
12. Uchide K, Ueno H, Inoue M, Sakai A, Fujimoto N, Okada Y. Matrix metalloproteinase-9 and tensile strength of fetal membranes in uncomplicated labor. *Obstet Gynecol* 2000; 95: 851-855.
13. Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274: 21491-21494.

14. Van Wart H, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: A principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5578-5582.
15. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteases. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5: 891-897.
16. Fridman R, Toth M, Peña D, Mobashery S. Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2). *Cancer Res* 1995; 55: 2548-2555.
17. Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H. Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin-1) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase-9. *J Biol Chem* 1992; 267: 3581-3584.
18. Brew K, Dinakarparandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1477: 267-283.
19. Vadillo-Ortega F, Gonzalez-Avila G, Furth EE, Lei H, Muschel RJ, Stetler-Stevenson WG, Strauss JF, III. 92-kd type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) activity in human amniochorion increases with labor. *Am J Pathol* 1995; 146: 148-156.
20. Vadillo-Ortega F, Hernandez A, Gonzalez-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: 1371-1376.
21. Athayde N, Edwin SS, Romero R, Gomez R, Maymon E, Pacora P, Menon R. A role for matrix metalloproteinase-9 in spontaneous rupture of the fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179: 1248-1253.
22. Fortunato S, Menon R, Lombardi S. Stromelysins in placental membranes and amniotic fluid with premature rupture of membranes. *Obstet Gynecol* 1999; 94: 435-440.
23. Bryant-Greenwood G, Yamamoto SY. Control of peripartal collagenolysis in the human chorion-decidua. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172: 63-70.
24. Casanueva E, Vadillo-Ortega F, Pfeffer F, Tejero E. Vitamin C and premature rupture of chorioamniotic membranes. *Nut Res* 1998; 18: 241-245.
25. Artal R, Burgeson R, Fernandez FJ, Hobel CJ. Fetal and maternal copper levels in patients at term with and without premature rupture of membranes. *Obstet Gynecol* 1979; 53: 608-610.
26. Wideman GL, Baird GH, Bolding OT. Ascorbic acid deficiency and premature rupture of fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1964; 88: 592-595.

27. Casanueva E, Magaña L, Pfeffer F, Baez A. Incidence of premature rupture of membranes in pregnant women with low leukocyte levels of vitamin C. *Eur J Clin Nut* 1991; 45: 401-405.
28. Voet D, Voet J. *Biochemistry*. New York: J. Wiley and Sons; 1995.
29. Casey ML, MacDonald PC. Lysyl oxidase (ras recision gene) expression in human amnion: ontogeny and cellular localization. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 167-172.
30. Kadler KE, Holmes DF, Trotter JA, Chapman JA. Collagen fibril formation. *Biochem J* 1996; 316.
31. Pfeffer F, Casanueva E, Kamar J, Guerra A, Perichart O, Vadillo-Ortega F. Modulation of 72-kilodalton type IV collagenase (matrix metalloproteinase-2) by ascorbic acid in cultured human amnion-derived cells. *Biol Reprod* 1998; 59: 326-329.
32. Romero R, Mazor M, Wu YK, Sirtori M, Oyarzun E, Mitchell MD, Hobbins JC. Infection in the pathogenesis of preterm labor. *Sem Perinatol* 1988; 12: 262-279.
33. Greig PC. The diagnosis of intrauterine infection in women with preterm premature rupture of the membranes (PROM). *Clin Obstet Gynecol* 1998; 41: 849-863.
34. Goldenberg R, Hauth J, Andrews W. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med* 2000; 342: 1500-1507.
35. Bejar R, Curbelo V, Davis C, Gluck L. Premature labor II. Bacterial source of phospholipase. *Obstet Gynecol* 1981; 57: 479-482.
36. Fortunato S, Menon R, Lombardi S. Amniochorion gelatinase-gelatinase inhibitor imbalance in vitro: A possible infectious pathway to rupture. *Obstet Gynecol* 2000; 95: 240-244.
37. Katsura M, Ito A, Hirakawa S, Mori Y. Human recombinant interleukin-1 α increases biosynthesis of collagenase and hyaluronic acid in cultured human chorionic cells. *FEBS Lett* 1989; 244: 315-318.
38. So T, Ito A, Sato T, Mori Y, Hirakawa S. Tumor necrosis factor- α stimulates the biosynthesis of matrix metalloproteinases and plasminogen activator in cultured human chorionic cells. *Biol Reprod* 1992; 46: 772-778.
39. Gomez R, Romero R, Edwin SS, David C. Pathogenesis of preterm labor and preterm premature rupture of membranes associated with intraamniotic infection. *Infect Dis Clin N Am* 1997; 11: 135-176.
40. Lei H, Furth E, Kalluri R, Chiou T, Tilly K, Tilly J, Elkon K, Jeffrey J, Strauss JF, III. A program of cell death and extracellular matrix degradation is activated in the amnion before the onset of labor. *J Clin Invest* 1996; 98: 1971-1978.

41. McLaren J, Taylor DJ, Bell SC. Increased incidence of apoptosis in non-labour-affected cytotrophoblast cells in term fetal membranes overlying the cervix. *Hum Reprod* 1999; 14: 2895-2900.
42. Opsjøn S, Wathen N, Tingulstad S, Wiedswang F, Sundan A, Waage A, Austgulen R. Tumor necrosis factor, interleukin-1, and interleukin-6 in normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169: 397-404.
43. Hillier S, Witkin S, Krohn M, Watts H, Kivat N, Eschenbach D. The relationship of amniotic fluid cytokines and preterm delivery, amniotic fluid infection, histologic chorioamnionitis and chorioamnion infection. *Obstet Gynecol* 1993; 81: 941-948.
44. Halgunset J, Johnsen H, Kjøllesdal A, Qvigstad E, Espevik T, Austgulen R. Cytokine levels in amniotic fluid and inflammatory changes in the placenta from normal deliveries at term. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1994; 56: 153-160.
45. Meráz-Cruz N, Beltran J, Hernández MA, Bermejo-Martínez L, Vadillo-Ortega F. Interleucina 1-alfa y prostaglandina E2 como mediadores moleculares en la ruptura prematura de membranas. *Perinatol Reprod Hum* 1994; 8: 222-225.
46. Vadillo-Ortega F, Sadowsky D, Haluska G, Hernandez C, Guevara R, Gravett M, Novy MJ. Identification of matrix metalloproteinase-9 in amniotic fluid and amniochorion in spontaneous labor and after experimental intrauterine infection or interleukin-1 β infusion in pregnant rhesus monkeys. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186: 128-138.
47. Larrick JW, Wright SC. Cytotoxic mechanism of tumor necrosis factor- α . *FASEB J* 1990; 4: 3215-3223.
48. Vilcek J, Lee T. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem* 1991; 266: 7313-7316.
49. Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 1992; 10: 411-452.
50. Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu Rev Cell Biol* 1993; 9: 317-343.
51. Tartaglia LA, Goeddel DV. Two TNF receptors. *Immunol Today* 1992; 13: 151-153.
52. Fortunato S, Menon R, Swan K. Expression of TNF- α and TNFR p55 in cultured amniochorion. *Am J Reprod Immunol* 1994; 32: 188-193.
53. Austgulen R, Espevik T, Mecsei R, Scott H. Expression of receptors for tumor necrosis factor in human placenta at term. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1992; 71: 417-424.
54. Yelavarthi K, Hunt JS. Analysis of p60 and p80 tumor necrosis factor- α receptor messenger RNA and protein in human placentas. *Am J Pathol* 1993; 143: 1131-1141.

55. Dudley D, Collmer D, Mitchell M, Trautman M. Inflammatory cytokine mRNA in human gestational tissues: implications for term and preterm labor. *J Soc Gynecol Invest* 1996; 3: 328-335.
56. Kleelan J, Marvin K, Sato T, Coleman M, McCowan L, Mitcell M. Cytokine abundance in placental tissues: Evidence of inflammatory activation in gestational membranes with term and preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181: 1530-1536.
57. Tashima I, Millar I, Bryant-greenwood G. Genes Upregulated in human fetal membranes by infection or labor. *Obstet Gynecol* 1999; 94: 441-449.
58. Steinborn A, Günes H, Halberstadt E. Signal for term parturition is of trophoblast and therefore of fetal origin. *Prostaglandins* 1995; 50: 237-252.
59. Fortunato S, Menon R, Swan K, Menon R. Inflammatory cytokine (interleukins 1, 6, and 8 and tumor necrosis factor- α) release from cultured human fetal membranes in response to endotoxic lipopolysaccharide mirrors amniotic fluid concentrations. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174: 1855-1862.
60. Menon R, Swan K, Lyden T, Rote N, Fortunato S. Expression of inflammatory cytokines (interleukin-1 β and interleukin-6) in amniochorionic membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172: 493-500.
61. Fortunato S, Menon R, Swan K, Lyden T. Organ culture of amniochorionic membrane in vitro. *Am J Reprod Immunol* 1994; 32: 184-187.
62. Woessner JF, Taplin C. Purification and properties of a small latent matrix metalloproteinase of the rat uterus. *J Biol Chem* 1988; 263: 16918-16925.
63. 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.
64. Laemmli NK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. *Nature* 1970; 227: 680-684.
65. Sgonc R, Boeck G, Dietrich H, Gruber J, Recheis H, Wick G. Simultaneous determination of cell surface antigens and apoptosis. *Trends Genet* 1994; 10: 41-42.
66. Galis Z, Sukhova G, Libby P. Microscopic localization of active proteases by in situ zymography: detection of matrix metalloproteinase activity in vascular tissue. *FASEB J* 1995; 9: 974-980.
67. Harlow E, Lane D. *Antibodies. A laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1988.

68. Daher S, Fonseca F, Ribeiro O, Musatti CC, Gerbase-DeLima M. Tumor necrosis factor during pregnancy and at the onset of labor and spontaneous abortion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999; 83: 77-79.
69. Vince GS, Starkey PM, Austgulen R, Kwiatkowski D, Redman CW. Interleukine-6, tumour necrosis factor and soluble tumour necrosis factor receptors in women with pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynecol* 1995; 102: 20-25.
70. Kelly RW, Carr GG, Elliott CL, Tulppala M, Critchley HO. Prostaglandin and cytokine release by trophoblastic villi. *Hum Reprod* 1995; 10: 3289-3292.
71. Knöfler M, Stenzel M, Husslein P. Shedding of tumour necrosis factor receptors from purified villous term trophoblasts and cytotrophoblastic BeWo cells. *Hum Reprod* 1998; 13: 2308-2316.
72. Fidel PL, Romero R, Ramirez M, Cutright J, Edwin SS, LaMarche S, Cotton DB, Mitchell MD. Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) production by human amnion, chorion, and decidua. *Am J Reprod Immunol* 1994; 32: 1-7.
73. Qin X, Chua PK, Ohira RH, Bryant-Greenwood GD. An autocrine/paracrine role of human decidual relaxin. II. Stromelysin-1 (MMP-3) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1). *Biol Reprod* 1997; 56: 812-820.
74. Qin X, Garibay-Tupas J, Chua PK, Cachola L, Bryant-Greenwood GD. An autocrine/paracrine role of human decidual relaxin. I. Interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) and tissue plasminogen activator. *Biol Reprod* 1997; 56: 800-811.
75. Bry K, Lappalainen U, Hallman M. Interleukin-1 binding and prostaglandin E2 synthesis by amnion cells in culture: regulation by tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, and interleukin-1 receptor antagonist. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1181: 31-36.
76. Ramos-DeSimone N, Hahn-Dantona E, Siple J, Nagase H, French DL, Quigley JP. Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J Biol Chem* 1999; 274: 13066-13076.
77. McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13: 534-540.
78. Petraglia F, Paquale F, Nappi C, Genazzani A. Peptide signaling in human placenta and membranes: autocrine, paracrine, and endocrine mechanisms. *Endocrine Rev* 1996; 17: 156-186.
79. Zakeri Z, Bursch W, Tenniswood M, Lockshin R. Cell death: programmed, apoptosis, necrosis, or other? *Cell Death Differentiation* 1995; 2: 87-96.

80. Runic R, Lockwood C, LaChapelle L, Dipasquale B, Demopoulos RL, Kumar A, Guller S. Apoptosis and fas expression in human fetal membranes. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 660-666.
81. Fortunato S, Menon R, Bryant C, Lombardi S. Programed cell death (apoptosis) as a possible pathway to metalloproteinase activation and fetal membrane degradation in premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182: 1468-1476.
82. Hsu CD, Meaddough E, Basherra H, Harirah H, C LL. Increased apoptosis in human amnion is associated with labor at term. *Am J Reprod Immunol* 2000; 43: 255-258.
83. Lei H, Kalluri R, Furth EE, Baker AH, Strauss JF, III. Rat amnion type IV collagen composition and metabolism: implications for membrane breakdown. *Biol Reprod* 1999; 60: 176-182.
84. Rekdal O, Østerud B, Svendsen S, Winberg JO. Evidence for exclusive role of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor in mediating the TNF-induced collagenase expression by human dermal fibroblast. *J Invest Dermatol* 1996; 107: 565-568.
85. Ismail MG, Ries C, Lottspeich F, Zang C, Kolb HJ, Petrides PE. Autocrine regulation of matrix metalloproteinase-9 gene expression and secretion by tumor necrosis factor- α (TNF- α) in NB4 leukemic cells: specific involvement of TNF receptor type 1. *Leukemia* 1998; 12: 1136-1143.
86. Aggarwal BB, Pandita R. Both type I and type II interferons down-regulate human tumor necrosis factor receptors in human hepatocellular carcinoma cell line Hep G2. Role of protein kinase C. *FEBS Letters* 1994; 337: 99-102.
87. Gatanaga T, Hwang CD, Gatanaga M, Cappuccini F, Yamamoto RS, Granger GA. The regulation of TNF receptor mRNA synthesis, membrane expression, and release by PMA- and LPS-stimulated human monocytic THP-1 cells in vitro. *Cellular Immunology* 1991; 138: 1-10.
88. Taylor DJ. Interleukin-4 (IL-4) induces down-modulation and shedding of the p55 tumour necrosis factor receptor and inhibits TNF alpha's effect on rheumatoid synovial fibroblast. *Rheumatol Int* 1994; 14: 21-25.
89. Roby KF, Laham N, Hunt JS. Cellular localization and steroid hormone regulation of mRNA encoding tumour necrosis factor receptor I in mouse uterus. *J Reprod Fertil* 1996; 106: 285-290.
90. Williams MA, Newland AC, Kelsey SM. Cytokine modulated cell-membrane bound tumour necrosis factor expression is associated with enhanced monocyte-mediated killing of human leukaemic targets. *Leuk Res* 2000; 24: 317-330.