



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

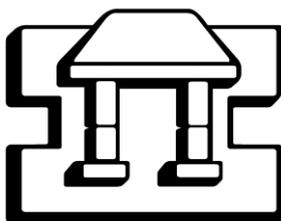
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“Análisis proteómico inicial de un complejo
de metaloproteasas de matriz extracelular
asociado al tejido conectivo de las membranas
corioamnióticas humanas”**

**TESIS PROFESIONAL
PARA OBTENER EL TITULO DE:
BIOLOGO**

**PRESENTA:
SAMANTA ALEJANDRA CAMPOS PAZ**

**DIRECTORA DE TESIS:
Dra. Noemí Meraz Cruz**



Los Reyes Iztacala, Estado de México

Noviembre 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

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

A la Comisión Coordinadora de Institutos Nacionales y Hospitales de Alta Especialidad por el apoyo otorgado a través de la beca No. 77

A la Dra. Noemí Meraz Cruz por todo su tiempo, sus enseñanzas y su motivación durante todo este tiempo.

A los sinodales que ayudaron con sus valiosas aportaciones y comentarios para el enriquecimiento y revisión de la presente tesis:

M en C Martha Ofelia Salcedo
Dr. Ricardo Mejía Zepeda
M en C María Guadalupe Martínez
Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras

Al Instituto de Salud Pública de Cuernavaca, Morelos por su colaboración para la realización de este proyecto.

AGREDECIMIENTOS PERSONALES

A la Dra. Noemí Meraz Cruz quien me dio la oportunidad de trabajar y de aprender de ella durante todo este tiempo, por compartir y enseñarme de todo el conocimiento que ella tiene en el área de la ciencia e investigación, por su interés genuino y su paciencia hacia mí, además de su valiosa amistad.

A mis amigos del laboratorio: Arturo, Aurora, Paty, Toñita, Susi, Selene, Higinio, Rodrigo, Nardy por su disposición y apoyo incondicional durante toda mi estancia en Perinatología.

A la Biol. María Juana Morales Padrón por inspirarme a ser una mejor persona y ser un gran ejemplo para mí.

A mis amigos de la carrera: Mayel, Celeste, Yolanda, Jesy, Sindy, Jenifer y André por todos los momentos que compartimos juntos durante este largo tiempo de nuestra formación.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis amados padres que me han apoyado a lo largo de toda mi vida ha lograr mis mas grandes metas y luchar por mis sueños, por su infinito amor incondicional, por impulsarme y motivarme en los tiempos difíciles y ser un ejemplo de vida. Los amo mucho.

A mis amados hermanos Ezra y Maryan quienes siempre me apoyaron y me animaron a seguir adelante, por los tiempos tristes y los tiempos más felices de nuestras vidas, por su amor incondicional.

A Alicia, Roció, Sary, Margarita, Ale, André y David por su apoyo, por estar en los momentos más importantes de mi vida y por hacer de mi vida algo muy divertido y única!!.

ÍNDICE	PÁGINA
ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO	1
1. RESUMEN	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 Membranas Corioamnióticas	3
2.2 Metaloproteasas de Matriz Extracelular	5
2.4 Mecanismos de Regulación de las MMPs	6
2.3 Complejos Multienzimáticos	10
3. ANTECEDENTES	11
4. OBJETIVOS	13
4.1 Objetivo General	13
4.2 Objetivos Particulares	13
5. MATERIAL Y MÉTODO	14
5.1 Colecta de Muestras Biológicas	14
5.2 Preparación del Extracto	14
5.3 Extracción del Complejo Proteico	14
5.4 Electroforesis SDS	15
5.5 Zimograma de Gelatina	15
5.6 Electroforesis Bidimensional (2-D)	17
5.7 Análisis de Proteínas	17

6. RESULTADOS	19
6.1 Electroforesis SDS	19
6.2 Zimograma en Gelatina	20
6.3 Electroforesis Bidimensional (2-D)	21
6.4 Espectrometría de Masas	23
7. DISCUSIÓN	27
8. CONCLUSIONES	33
9. APÉNDICE DE TÉCNICAS	34
10. BIBLIOGRAFÍA	41

ABREVIATURAS

CRT	Calreticulina.
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético.
ERp57	Proteína del retículo endoplásmico 57
GRp78	Proteína reguladora de glucosa 78
MCA	Membranas corioamnióticas.
MEC	Matriz extracelular.
MMPs	Metaloproteasas de matriz extracelular.
MMP-2	Metaloproteasa de matriz extracelular-2/ gelatinasa A.
MMP-9	Metaloproteasa de matriz extracelular-9/gelatinasa B.
MT- MMPs	Metaloproteasas de matriz extracelular asociadas a membranas.
PH4,sub β	Prolil 4- hidroxilasa subunidad beta.
TP	Trabajo de parto.
TIMPs	Inhibidor tisular de metaloproteasas de matriz extracelular

1. RESUMEN.

El parto humano es el resultado de múltiples eventos fisiológicos que incluyen la sincronización de contracciones uterinas, dilatación del cervix y la ruptura de las membranas corioamnióticas (MCA). En la ruptura de estas membranas participan diversos procesos bioquímicos entre los que se encuentran el aumento en la degradación de diferentes tipos de colágena que conforman la matriz extracelular (MEC). La explicación a esta degradación ha sido relacionada con la presencia de una familia de enzimas llamadas metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs), las cuales han sido reportadas en líquido amniótico, cervix y membranas fetales por lo que se propone que tienen un papel fundamental en la ruptura de estas membranas. Por medio de técnicas de zimografía, cromatografía de exclusión molecular y microcalorimetría diferencial de barrido se ha reportado la presencia de un complejo multienzimático en las MCA formado por diferentes MMPs que se encuentran en estado latente horas antes del trabajo de parto (TP) y cuya actividad es regulada por concentraciones de calcio. El complejo se encuentra en la fase inicial de caracterización, desconociéndose su estructura molecular, origen y aún la existencia de otras proteasas o proteínas que posiblemente participen con las MMPs identificadas en la formación del complejo. En el presente trabajo utilizando herramientas de proteómica molecular se inició la identificación de las proteínas que lo constituyen. Para ello se extrajo el complejo multienzimático de las MCA de mujeres con embarazos a término sin TP y se inició el estudio en geles de Poliacrilamida, posteriormente las muestras se corrieron en electroforesis Bidimensional (2-D) y las huellas más abundantes se analizaron por medio del programa Image Master. Finalmente se procedió a la espectrometría de masas (MALDI-TOF), los datos generados se procesaron usando los programas bioinformáticos Aldente y Mascot. Los resultados confirmaron la presencia de MMP (-9 y -2), además de las siguientes proteínas: proteína reguladora de glucosa (GRp78), calreticulina (CRT), prolil 4- hidroxilasa subunidad beta (P4H, sub β) y proteína del retículo endoplasmático 57 (ERp57). Los resultados generados en este trabajo marcan la pauta para iniciar la caracterización estructural y funcional de este complejo.

2. INTRODUCCIÓN.

El parto humano es el resultado de múltiples eventos fisiológicos que incluye la sincronización de las contracciones uterinas, dilatación del cérvix y finalmente la ruptura de las membranas corioamnióticas (MCA) para facilitar la expulsión del producto y de sus anexos sin interferencia, accidente o complicación¹. La ruptura de las MCA involucra diversos procesos bioquímicos entre los que se encuentra un aumento en la degradación de la colágena en el amnios, la alteración morfológica en la zona cervical que se manifiesta como un adelgazamiento en la capa del trofoblastos así como en la decidua materna² y la inducción de la síntesis de enzimas que degradan la matriz extracelular (MEC)³.

La degradación de la MEC está relacionada con la actividad de una familia de enzimas llamadas Metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs), estas enzimas son secretadas al espacio extracelular en forma de enzimas latentes capaces de degradar los componentes de la MEC provocando la ruptura de las MCA^{2,4}.

Estudios previos han demostrado la actividad de las MMPs presentes en las MCA como: la colagenasa intersticial (MMP-1)⁵, estromelisinina 1 (MMP-3)⁶, matrilisina (MMP-7)⁷, así como las gelatinasas A y B (MMP-2 y MMP-9)^{8,9}.

2.1 MEMBRANAS CORIOAMNIÓTICAS.

Las MCA están formadas por dos tejidos, el amnios y el corion, que se encuentran superpuestos uno al otro, formando una unidad estructural funcional. La función principal de las membranas es el mantenimiento de la homeostasis del feto, además de proteger al feto contra infecciones ascendentes del tracto genital materno².

El amnios y el corión están formados por distintos tipos celulares, entre ellos las células epiteliales, inmunológicas y trofoblastos, que se encuentran embebidos en una MEC cuyo principal constituyente es la colágena¹⁰.

La colágena es un componente importante envuelto en la MEC de las MCA, que contribuye a la elasticidad y fuerza tensil del amnios. Entre las colágenas más abundantes se encuentran las tipo I, III, IV y VI, las cuales pueden ser degradadas por las MMPs¹¹.

El tejido amniótico está compuesto por cinco capas: 1) capa del epitelio amniótico, 2) capa de la membrana basal, 3) capa compacta, 4) capa de fibroblastos y 5) capa intermedia o esponjosa¹².

- 1) La capa del epitelio amniótico es la más cercana al feto la cual se encuentra en contacto directo con el líquido amniótico, esta capa secreta colágenas de tipo III, IV y proteoglicanos.
- 2) La membrana basal está conformada principalmente de colágenas tipo III, IV y V, además de laminina y fibronectina. Esta capa no contiene vasos sanguíneos.
- 3) La capa compacta está compuesta por tejido conectivo, cuyos principales componentes son las colágenas de tipo I, III y IV.
- 4) En la capa de fibroblastos se encuentran colágenas de tipo I, III, IV y V, macrófagos envueltos en la MEC y células mesenquimales que son responsables de la secreción de la colágena encontrada en la capa compacta.
- 5) Por último la capa intermedia o esponjosa, es la que limita al amnios y el corion. Esta capa contiene gran cantidad de colágena tipo I, III, IV y proteoglicanos, cuya principal función es la absorción del estrés físico o mecánico, permitiendo el deslice del amnios sobre el corion.

El tejido del corión es la zona histológica de mayor espesor en las MCA la cual posee una mayor fuerza tensil. La capa reticular se encuentra adyacente a la zona esponjosa del amnios y es seguida de una estructura tipo membrana base que delimita la capa final de trofoblasto. Parte del corión se encuentra interdigitado con la decidua uterina¹³ (Fig 1).

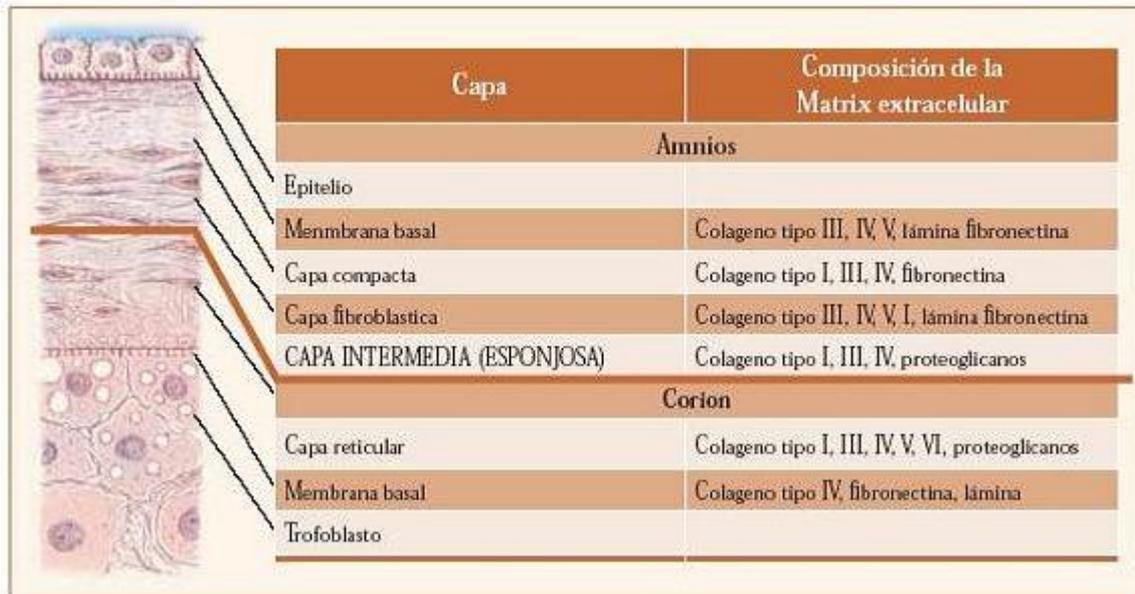


Fig.1.- Representación esquemática de la membrana corioamniótica a término y su composición extracelular correspondiente¹³

2.2 METALOPROTEASAS DE MATRIZ EXTRACELULAR.

Las MMPs son una familia de enzimas dependientes de Ca^{2+} y Zn^{2+} que muestran gran selectividad por su sustrato, siendo las responsables de la degradación de la MEC¹⁴. Hasta la fecha se han identificado 26 MMPs en el ser humano¹⁵ (Tabla 1). Estas enzimas pueden ser agrupadas estructuralmente de acuerdo a la homología de sus dominios y a la especificidad de sus sustratos en: Colagenasas, Gelatinasas, Estromelisinias, Matrilisinias, Metaloproteasas de matriz asociadas a membranas (TM-MMPs) y otras MMPs en donde se encuentran enzimas que no han sido completamente caracterizadas¹⁶.

Todos los miembros de esta familia son secretados en forma de zimógenos o proenzimas los cuales son procesados subsecuentemente por otras enzimas proteolíticas (otros miembros de la familia o por diferentes proteasas) para generar la forma activa¹⁶. Las MMPs se expresan bajo condiciones fisiológicamente normales por lo que mantienen una homeostasis. La sobreexpresión de las MMPs puede resultar en un desequilibrio en su actividad lo que puede conducir a una variedad de enfermedades patológicas^{17,18}.

2. 3 MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LAS MMPs.

La regulación de la actividad en vivo de las MMPs puede llevarse a cabo por varios mecanismos: regulación transcripcional, estabilidad del mRNA, compartimentalización celular, activación de zimógenos e inhibición de la forma activa por moléculas específicas ^{14,19}.

2.3.1 Regulación Transcripcional de MMPs.

La mayoría de las MMPs y TIMPs responden a estímulos a nivel transcripcional. Una serie de promotores de MMPs han sido hasta el momento descritos, revelando una variedad funcional de los elementos cis como por ejemplo: AP-1, PEA-3, Sp1, Tcf/Lef-1, NFκB, RARE. El elemento AP-1 es una familia de proteínas trans activadoras, es un elemento de acción cis implicado en la inducción de la expresión de MMP-1¹⁴.

El promotor NFκB es conocido por regular muchos genes de MMPs. Un sitio de NFκB fue identificado en el promotor de MMP-9 con una probable participación en la inducción del gen de TNFα. Otros estudios también han demostrado que NFκB tiene una participación esencial en la inducción cinérgica de la expresión de MMP-9 ²⁰.

Las MMPs comparten secuencias consenso que son comunes en toda la familia, la región promotora contiene una secuencia rica en timinas y adeninas (caja TATA). Recientes estudios sobre la expresión genética de las MMPs las agruparon en 3 grupos de acuerdo a su conformación genética: 1) aquellas que tienen caja TATA con alrededor de 30 pb y con un sitio AP-1 de alrededor 70 pb como son MMP1, MMP3, MMP7, MMP9, MMP10, MMP12, MMP13, MMP19 y MMP26 ; 2) aquellas que poseen caja TATA pero no tiene promotor del sitio AP-1 como la MMP-8, MMP-11y MMP-21 ; 3) aquellas que no poseen caja TATA ni promotor del sitio AP-1 como la MMP-2, MMP-14 y MMP-28¹⁴.

Tabla 1.- Clasificación en familias de Metaloproteasas de matriz extracelular presentes en el humano¹⁵.

No.	SUBGRUPOS	MMP	NOMBRE	kDa	SUSTRATO
1	COLAGENASAS	MMP-1	Colagenasa intersticial	57/52	Colágena fibrilar (tipo I, II, III, VII, X), gelatina.
2		MMP-8	Colagenasa de Neutrófilo	85/64	Colágena I, II, III.
3		MMP-13	Colagenasa-3	52/42	Colágena II.
4		MMP-18	Colagenasa-4	-----	-----
5	GELATINASAS	MMP-2	Gelatinasa A	72/68	Gelatinasas, colágena IV, V, VII, X, elastina, fibronectina
6		MMP-9	Gelatinasa B	92/86	Gelatinasas, colágena IV, V, elastina.
7	ESTROMELISINAS	MMP-3	Estromelisina-1	57/45	Proteoglicanos, laminina, fibronectina, colágena III, IV, V, IX, gelatina.
8		MMP-10	Estromelisina-2	57/45	Proteoglicanos, fibronectina, colágena III, IV, V, gelatina.
9		MMP-11	Estromelisina-3	51/44	Laminina, fibronectina.
10		MMP-27	Homólogo de Estromelisina-2(51.6 %)	-----	-----
11	MATRILISINAS	MMP-7	Matrilisina (PUMP)	28/19	Proteoglicanos, laminina, fibronectina, gelatina, colágena IV, elastina.
12		MMP-26	Matrilisina-2	-----	-----
13	METALOPROTEASA DE MATRIZ ASOCIADA A MEMBRANA (MT-MMP)	MMP-14	MT1-MMP	66/54	Pro MMP-2
14		MMP-15	MT2-MMP	72/62	Desconocido
15		MMP-16	MT3-MMP	64/53	Pro MMP-2
16		MMP-17	MT4-MMP	57/53	Desconocido
17		MMP-24	MT5-MMP	-----	-----
18		MMP-25	MT6-MMP	-----	-----
19	OTRAS	MMP-12	Metaloelastasa Macrófago	54/22	Elastina, fibronectina, colágena IV.
20		MMP-19	RASI-1	-----	Gelatinas.
21		MMP-20	Enamelisina	54/22	Amelogenina.
22		MMP-21	MMP identificada en el cromosoma 1	-----	-----
23		MMP-22	MMP identificada en el cromosoma 1	-----	-----
24		MMP-23	CA MMP	-----	-----
25		MMP-28	Epilisina	-----	-----
26		MMP-29	Sin nombre	-----	-----

3.2 Estabilidad del mRNA.

A nivel post-transcripcional, la expresión genética puede ser regulada a través de la estabilidad del mRNA en el citoplasma. Esto es mediado a través de una variedad de factores incluyendo la unión de proteínas y microRNAs (MIR) que interactúan con el elemento cis localizado en muchos sitios en el mRNA. El elemento cis comúnmente más descrito es la secuencia AUUUA la cual se encuentra a menudo en múltiples copias dentro de 3' UTR de mRNAs²¹.

La expresión de MMP-9 puede ser regulada a nivel de estabilidad del mRNA. En las células mesangiales, el ATP análogo ATP γ S potencializa la habilidad de IL-1beta para inducir el estado estable de MMP-9 mRNA. Este efecto es vía tres elementos ricos de AU en el 3' UTR del gen MMP-9 que está constitutivamente limitado en estas células por la estabilización del RNA factor HuR²².

De igual manera el cortisol induce a la MMP-13 estando estable el mRNA en los osteoblastos mediante la estabilidad transcripcional. Se demostró que el cortisol incrementa la unión de las proteínas a los elementos ricos de AU en el 3' UTR de las MMP-13. Estudios realizados usando transgenes reportaron que el 3' UTR en MMP-13 estabiliza un c-fos de mRNA, y que el cortisol aumenta aun más la estabilidad del mRNA en este sistema²³.

2.3.3 Compartimentalización celular

La compartimentalización se refiere al lugar y tiempo en que es liberada la MMP dentro del ambiente pericelular, esto es importante ya que nos permite ver la afinidad de la interacción entre la enzima y su sustrato. Las células no liberan las proteasas indistintamente, por el contrario, las proteasas, como las MMPs probablemente pueden anclarse a la membrana celular, de este modo mantienen una alta concentración local de enzimas y orientan su actividad catalítica a sustratos específicos dentro del espacio pericelular. Existen diferentes ejemplos de la interacción específica entre células y MMPs como la unión de la MMP-2 a la integrina $\alpha 2\beta 1$, MMP-9 a CD44, MMP-7 a la superficie de proteoglicanos y colesterol. Se ha reportado que proMMP-7 es capturada y activada en las membranas celulares mediante su interacción con CD151²⁴. Tal como se sugiere para CD44 y para la integrina $\alpha 2\beta 1$ estas anclas

en la membrana pueden actuar como accesorios que pueden mediar la activación de la pro-enzima³.

2.3.4 Activación de zimógenos.

Las MMPs son sintetizadas y secretadas al medio ambiente extracelular en estado de proenzimas o zimógenos que requieren ser activadas para llevar a cabo su función. Para que una proMMP se vuelva catalíticamente activa, la interacción del tiol y Zn^{2+} debe ser interrumpida. Van Wart y Birkedal Hansen²⁵ propusieron este proceso como un paso general y requerido en la activación de todas las proMMPs, llamando a este mecanismo "switch de cisteína". En esencia la interacción tiol- Zn^{2+} puede ser rota y una MMP latente puede ser catalíticamente activada por 3 mecanismos *in vitro*: 1) modificación del tiol libre por compuestos fisiológicos (oxidantes, disulfuros) y no fisiológicos (agentes alcalinos, iones de metales pesados), 2) corte directa del predominio por otras proteinasas, 3) perturbación química o alosterica del zimógeno conduciendo a un corte intramolecular o intermolecular autolítico del predominio¹⁹.

De acuerdo con los mecanismos antes mencionados la base fundamental de activación, es la disposición del residuo de Cys73 en la región del propéptido de la enzima. Este residuo no se encuentra accesible en la enzima latente, pero éste es expuesto o modificado por tratamiento con agentes proteolíticos. Se propone que la Cys73 de la enzima latente está unida de manera coordinada al átomo de Zn^{2+} del sitio activo de manera que bloquea a este. Todos los modelos de activación llevan a la disociación de la Cys73 del átomo de Zn^{2+} con una exposición concomitante del sitio activo. La interrupción de esta interacción provoca que la cisteína reaccione con un SH para evitar la reasociación de la Cys 73 con el átomo de Zn^{2+} , de esta manera se inicia una cascada de eventos que altera la conformación de la enzima resultando en la activación de ésta y en el corte del propéptido¹⁹.

2.3.5 Inhibición de la forma activa de las MMPs.

El papel más relevante de la inhibición de las MMPs corresponde a los inhibidores tisulares de metaloproteasas, conocidos como TIMPs. Estos inhibidores son una familia integrada por cuatro distintos miembros: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4 los cuales son glucoproteínas que se comportan como inhibidores específicos de las MMPs. Estas proteínas contienen 12 residuos de cisteína que forman 6 bucles unidos por puentes disulfuro y 2 nudos. Tienen 2 sitios de dominio: el dominio N-terminal y el dominio C-terminal²⁶. Los TIMPs inhiben a las MMPs en una relación 1:1 a través del dominio N-terminal de la molécula TIMP con el sitio activo de la MMP. Estos TIMPs coordinan el sitio catalítico de Zn^{2+} el cual se une al sitio activo de manera similar como a un sustrato de MMP²⁷.

Otras proteínas también pueden inhibir la actividad de las MMPs. Como la α_2 - macroglobulina, el principal inhibidor de metaloproteasas en los fluidos corporales²⁸.

2.4 COMPLEJOS ENZIMATICOS.

Los complejos multienzimáticos son grupos de enzimas asociadas, no covalentes que comprenden múltiples centros catalíticos²⁹. Estos complejos catalizan diversas reacciones metabólicas y regulan muchas funciones celulares como la síntesis de ácidos grasos³⁰, la síntesis de triptófano³¹ y la síntesis del péptido no ribosomal³² entre otros.

Diferentes investigadores han reportado la presencia de complejos formados por diferentes miembros de la familia de las MMPs en la superficie celular. La MMP-2 y MMP-9 se distinguen de otras MMPs secretadas ya que en su forma latente pueden formar complejos con otros TIMPs. Uno de estos complejos ha sido propuesto como un mecanismo de activación de la MMP-2 sobre la superficie de la célula. TIMP-2 primero forma un complejo con proMMP-2 por la unión a su dominio de hemopexina, después de lo cual el

complejo localiza la superficie de la célula donde está unido al sitio activo de una MT1- MMP. Este complejo ternario proMMP-2/TIMP-2/MT1-MMP facilita la activación de la proMMP-2 mediante otra molécula MT1-MMP³³.

Otro complejo en la superficie celular es el formado por MMP-14 y TIMP-2 que se unen a proMMP-2 permitiendo que otra MMP-14 activa corte el pro dominio y libere a la MMP-2 activa³⁴.

Se ha observado que en tejidos con patología vascular MMP-1 y MMP-3 son secretadas y activadas simultáneamente y pueden ser inhibidas mediante el incremento de TIMP-1 y la formación del complejo TIMP1/ MMPs³⁵.

Recientes investigaciones han reportado la presencia de un complejo formado por diferentes MMPs el cual se encuentra presente momentos antes del TP en las MCA³⁶.

3. ANTECEDENTES DE LA PRESENCIA DE MMPs EN RELACIÓN CON EL TRABAJO DE PARTO.

Diferentes estudios han relacionado de manera consistente la presencia de diferentes MMPs durante todo la gestación⁴ y horas antes de que inicie el TP³⁷.

La MMP-2 se encuentra presente en concentraciones constantes en líquido amniótico y decidua a lo largo de la gestación^{4,28,38} y se ha observado que la concentración de esta aumenta al final de la gestación³⁹.

Otras MMPs reportadas incluyen a MMP-3 que se expresa en las células de la decidua, esta MMP degrada un extremo del sustrato de la MEC y que puede activar la forma de proenzima de otras MMPs incluyendo proMMP-1 y proMMP-9⁴⁰.

Se ha observado que MMP-9 incrementa su actividad al momento del parto en las MCA⁴¹, líquido amniótico⁴² y en la decidua⁴³. MMP-9 es expresada por el epitelio del amnios, los macrófagos, por los trofoblastos del corion y por las células deciduales⁴⁴.

La MMP-7 ha sido identificada como un constituyente fisiológico del líquido amniótico, corión, amnios y decidua⁷, se sabe que la actividad de MMP-7 se incrementa conforme avanza la gestación⁴⁵. MMP-8 está presente en el líquido amniótico, se ha observado que su concentración en las MCA aumenta cuando estas presentan TP en comparación con las MCA que no presentan TP⁴⁶.

En el 2006 Meraz, *et al*³⁶, caracterizó la expresión y actividad de MMPs en las MCA de la rata durante la gestación y el trabajo de parto mediante las técnicas de calorimetría diferencia, cinética enzimática y zimografía. Se demostró la existencia de un complejo de alto peso molecular, formado por diferentes MMPs y TIMPs el cual se mantiene estable en calcio y que en ausencia de calcio presenta un amplio rango de desnaturalización. La calorimetría reveló la presencia de proMMP-9, MMP-9, proMMP-3, MMP-3, proMMP-2, MMP-2, TIMP-1 y TIMP-2. Mediante inmunohistoquímica y microscopía confocal se demostró la presencia de cada una de las enzimas (moléculas del complejo) en la MEC de las MCA.

Por lo que en este trabajo de tesis se identifican parte de las proteínas que conforman este complejo multienzimático en las membranas corioamnióticas humanas a término.

4. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Iniciar la identificación de las proteínas que constituyen el complejo multienzimático localizado en las membranas coriamnióticas humanas a término utilizando herramientas de proteómica molecular.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Evaluar la actividad gelatinolítica del complejo multienzimático presente en los extractos de MCA humanas a término.
- Identificar las proteínas que conforman el complejo de las MCA humanas a término mediante geles de segunda dimensión.
- Analizar cada una de las huellas de proteína obtenidas por segunda dimensión, mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF).

5. MATERIAL Y MÉTODO.

5.1 Colecta de Muestras Biológicas.

Las MCA humanas a término (37- 40 semanas de gestación) fueron obtenidas por medio de cesárea, sin TP y sin patología alguna, en los quirófanos del área clínica del Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes" ubicado en la Ciudad de México, México.

5.2 Preparación del Extracto.

Las MCA fueron lavadas con solución salina a una temperatura de 4° C , una vez lavadas las membranas fueron liberadas de células en una solución amortiguadora Buffer: Trizma base 50 mM, CaCl₂ 20 mM, NaCl 150 mM y azida de sodio 0.02%, pH 7.4 más Tritón X-100 al 0.25% con 10 ciclos de temperatura de 37 °C y -70 °C (diagrama 1).

5.3 Extracción del Complejo Proteico.

Se realizaron extractos de MCA. Para ello se prepararon homogenados en una solución amortiguadora Buffer: Trizma base 50 mM, CaCl₂ 20 mM, NaCl 150 mM y azida de sodio 0.02%, pH 7.4 con la ayuda de un Polytron (Brinkman Instruments, USA). Posteriormente los homogenados fueron centrifugados durante una hora a 10, 000 x g a una temperatura de 4° C, el precipitado y el sobrenadante fueron separados. El precipitado fue tratado con una solución amortiguadora Buffer: Trizma base 50 mM, EDTA 40 mM, NaCl 150 mM y azida de sodio 0.02%, pH 7.4 y fue centrifugado durante una hora a 10, 000 x g a una temperatura de 4° C, el precipitado final obtenido fue dializado con Buffer: Trizma base 50 mM, NaCl 150 mM y azida de sodio 0.02%, pH 7.4 para liberar el EDTA. Una vez dializado, fue colectado para análisis. La

concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford⁴⁷, usando albúmina bovina como estándar de referencia (diagrama1).

5.4 Electroforesis SDS.

Se analizaron alícuotas de los sobrenadantes colocando 10 µg de proteína por carril en geles de poliacrilamida SDS al 10%, usando un sistema con formato de minigel (Bio-Rad, Richmond, CA. USA), en condiciones desnaturizantes con Mercaptoetanol e incubadas durante 5 minutos a 95 ° C. Después de la electroforesis los geles fueron teñidos con Azul de Coomasie R-250 y desteñidos con ácido acético 10% y metanol 10%.

5.5 Zimograma de Gelatina.

Para identificar las proteínas con actividad de gelatinasas, se analizaron alícuotas de los sobrenadantes colocando 10 µg de proteína por carril en condiciones no desnaturizantes en geles de poliacrilamida-SDS al 8% con gelatina al 1% de acuerdo con las modificaciones sugeridas por Fisher, *et al.*,⁴⁸ usando un sistema con formato de minigel (Bio-Rad, Richmond, CA. USA). Después de la electroforesis los geles fueron lavados con Tritón X-100 al 2.5% durante 30 minutos con 3 cambios de buffer cada 10 minutos, e incubados toda la noche a 37° C en un buffer: Trizma base 50 mM, CaCl₂ 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4. Al finalizar la incubación los geles fueron teñidos con azul de Coomasie R-250 y desteñidos en ácido acético 10 % y metanol 10%. En cada corrida se incluyeron marcadores de actividad para proMMP-9 y proMMP-2, usando el sobrenadante de la línea celular U-937.

Diagrama de flujo de la metodología.

Se muestra de manera breve los métodos utilizados para la separación de las membranas, preparación del extracto y extracción del complejo de proteínas a analizar.

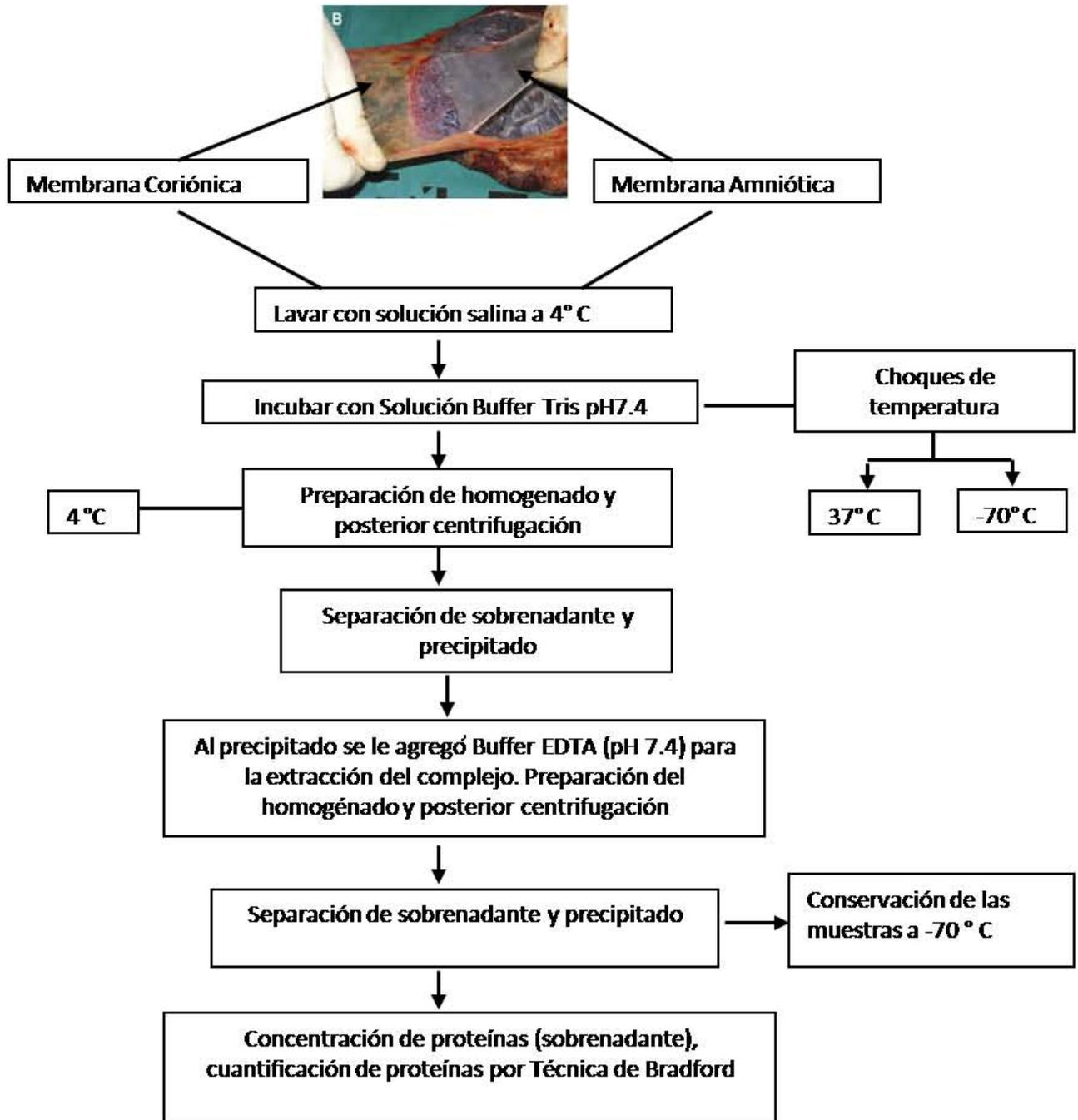


Diagrama 1.- Método de colecta de muestras, preparación del extracto y extracción del complejo de proteínas.

5.6 Electroforesis Bidimensional (2- D).

Para la identificación de Proteínas por medio de punto isoelectrico y peso molecular, antes de correr alícuotas del extracto se corrieron 3 patrones de estándar 2-D SDS Page Standards (BIO-RAD) para corroborarlos con nuestras muestras. Alícuotas del extracto del complejo fueron tratadas con 2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare) y se dejaron precipitar durante toda la noche a - 20° C. Posteriormente se cuantificó la concentración de proteínas mediante el kit 2-D Quant Kit (GE Healthcare). Las proteínas fueron resuspendidas en una solución stock de rehidratación: 8M urea, 2% CHAPS, 2% IPG Buffer, 0.002% azul de bromofenol, utilizándose tiras GE HealthCare IPG Buffer de 13 cm de largo con un gradiente de pH 3-10 NL las cuales se dejaron rehidratando toda la noche. Después de la rehidratación, la primera dimensión fue corrida usando el Sistema de Eléctroenfoque GE Healthcare Ettan™ IPGphor™ 3. Una vez finalizada la primera dimensión las tiras fueron equilibradas en una solución buffer SDS (6M urea, 75 mM Tris-HCl pH 8.8, 29.3% glicerol, 10% SDS y 0.002% azul de bromofenol) con DTT durante 15 y posteriormente durante 15 minutos en solución buffer SDS con Iodoacetamida.

La segunda Dimensión fue corrida en geles de poliacrilamida SDS al 10% (Bio-Rad, Richmond, CA. USA) a 200 V constantes. Después de la electroforesis los geles fueron teñidos con azul de Coomasie R- 250 y desteñidos con ácido acético 10 % y metanol 10%.

5.7 Análisis de Proteínas.

Las huellas de las proteínas fueron analizadas en el sistema Image Master y escindidas para su análisis posterior mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) en el Instituto de Salud Pública en Cuernavaca, Morelos. Las huellas fueron desteñidas en una solución 25 Mm Bicarbonato de amonio, 50% acetonitrilo. Después de haber dejado a las huellas toda la noche en tripsina de digestión, la mezcla de péptidos fue extraída con ácido trifluoroacetico 1% (TFA), las huellas fueron tratadas con un ZipTip de limpieza (Millipore SPA, Milan,

Italia) y eluidas directamente en una matriz ácido α -ciano-4 hidroxicinámico (10 g/ L ácido α -ciano-4 hidroxicinámico, 50% acetonitrilo, 0.3% TFA). Los espectros de la espectrometría MALDI-TOF fueron obtenidos con un espectrómetro de masas DE Pro (Applied Biosystems), con rango de peso molecular de 700 a 4000 Da, un tiempo de retardo de 15 ns y una aceleración de iones con un voltaje de 20 kV. Se denomina MALDI por sus siglas en inglés Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (desorción/ionización láser asistida por matriz) y TOF por el detector de iones que se acopla al MALDI y cuyo nombre procede también de sus siglas en inglés Time-Of-Flight. MALDI-TOF. Este permite el análisis de biomoléculas (proteínas, azúcares y péptidos) y moléculas orgánicas grandes (polímeros y macromoléculas) que tienden a hacerse frágiles y fragmentarse cuando son ionizadas.

El análisis de los datos obtenidos por MALDI-TOF se realizó con los programas bioinformáticos Aldente⁴⁹ y Mascot⁵⁰.

6. RESULTADOS.

6.1. Electroforesis SDS

Para identificar a las proteínas que se encontraron presentes en el complejo extraído en ausencia de calcio, las muestras se corrieron por electroforesis SDS-Page para verificar que las proteínas se encontraran sin degradación. Se observó un total de 20 bandas de diferente peso molecular (PM) entre los cuales estaban 50, 53, 57, 59, 62, 65, 69, 72, 75, 84, 92, 100 y 135 kDa, así como bandas de peso mayor a 250 kDa (Figura 2).

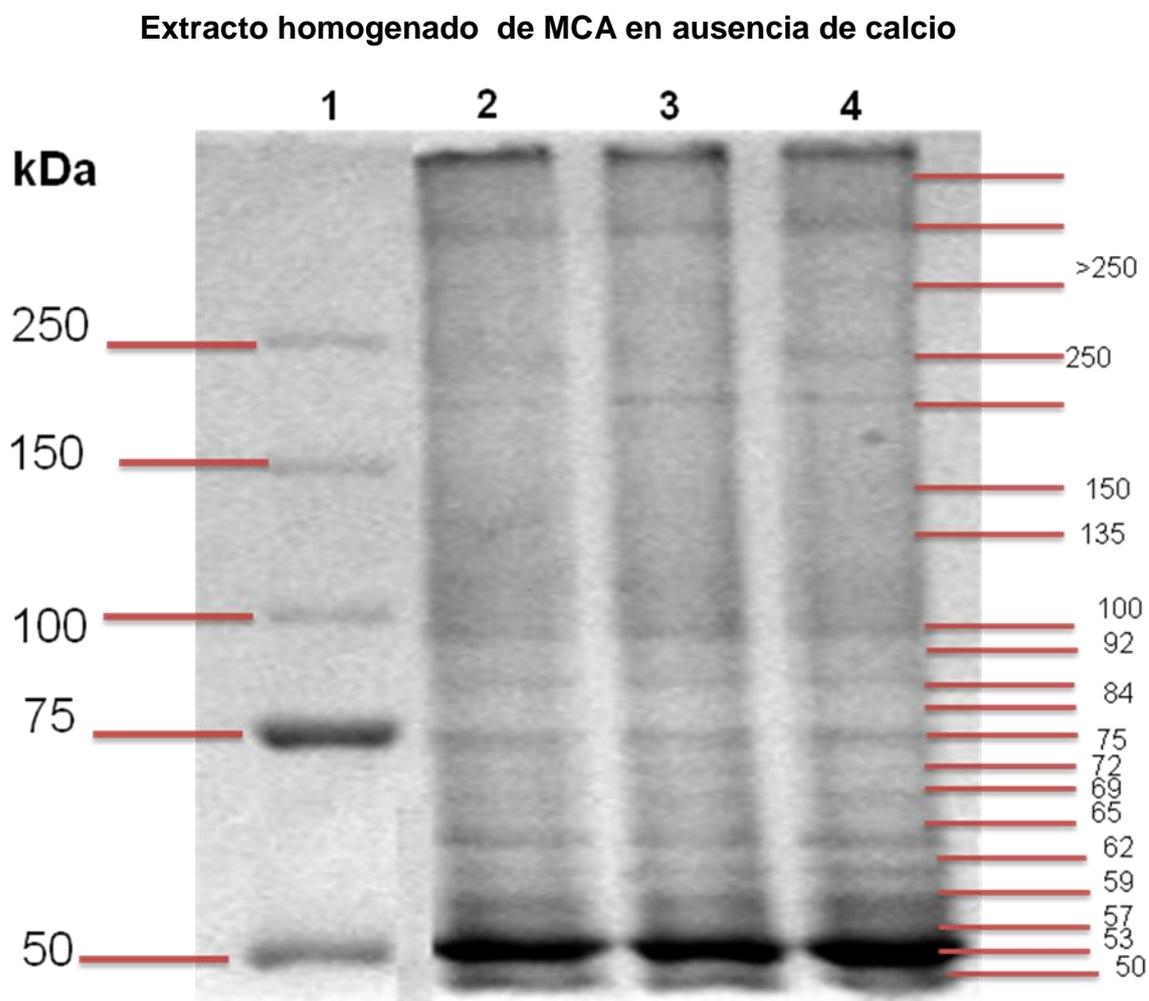


Fig. 2.- Gel SDS-Page 10%, extracto de MCA en ausencia de calcio. Carril 1 marcador de peso molecular. El extracto obtenido en ausencia de calcio fue corrido por triplicado (Carril 2-4).

6.2 Zimograma de Gelatina.

La detección de metaloproteasas se hizo a través de la técnica de zimografía de gelatina en el cual se observaron bandas con pesos moleculares de 92, 82, 72 y 65 kDa, además se observó una banda con peso molecular elevado (115 kDa) (figura 3). Las bandas corresponden a proMMP-9, MMP-9, proMMP-2 y MMP-2.

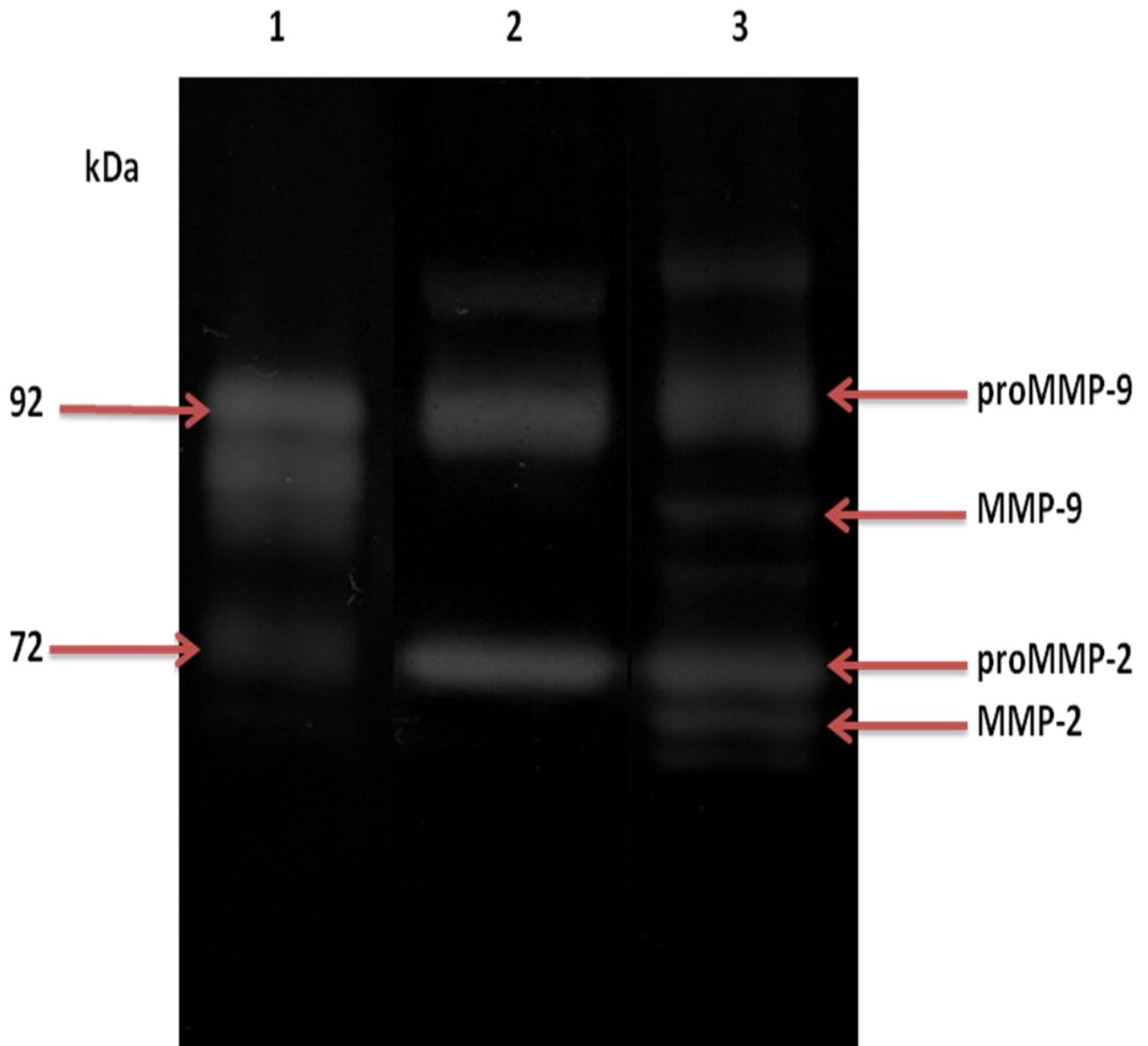


Figura 3.- Alícuotas del extracto de membranas corioamnióticas (MCA) en presencia y ausencia de calcio. Carril 1. Marcador de actividad, Carril 2. Muestras del extracto de MCA en presencia de calcio. Carril 3. Muestras de extractos de MCA en ausencia de calcio.

6.3 Electroforesis Bidimensional (2-D).

Mediante la electroforesis 2-D de los patrones de estándar 2-D SDS Page observamos 5 huellas de proteínas (figura 4).

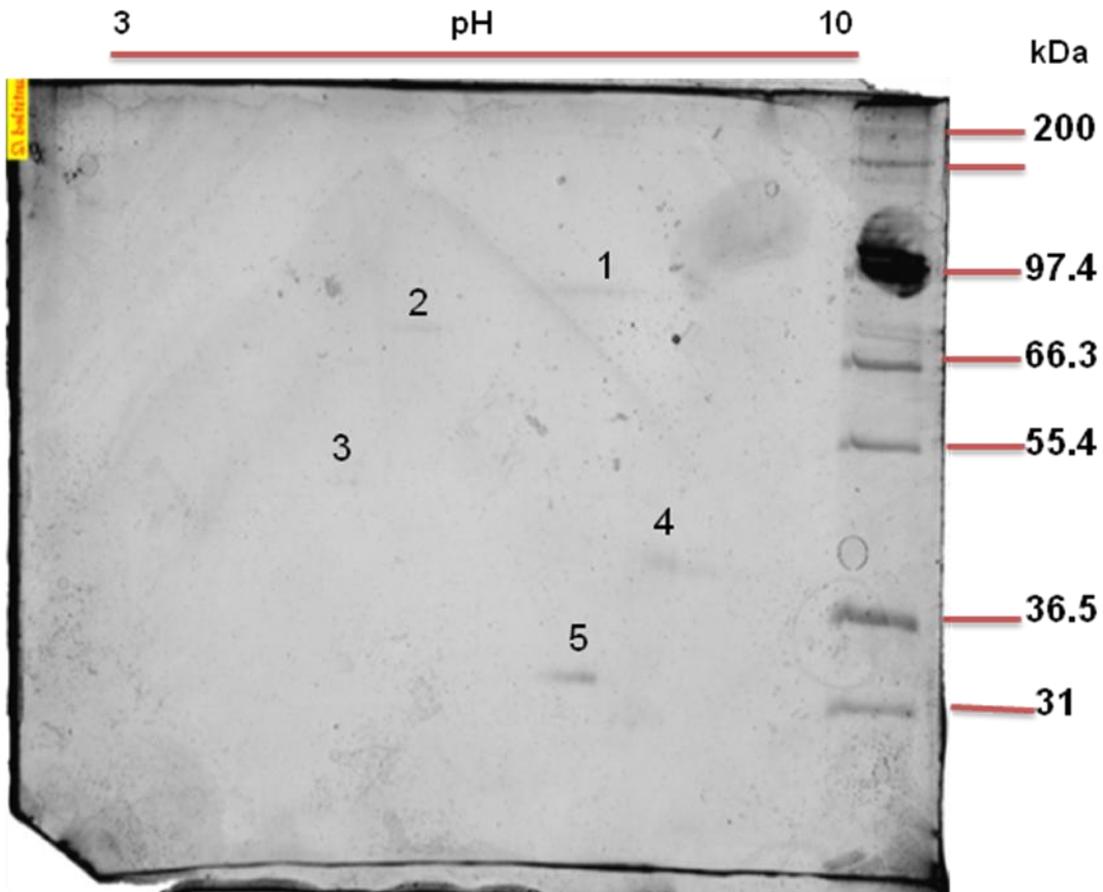


Fig. 4.- Gel 2-D del estándar para 2-D SDS-Page.

De acuerdo con el patrón 2-D las huellas observadas corresponden a las proteínas:

Tabla 2.- Proteínas del estándar 2-D SDS Page.

Huella	Proteína	Peso Molecular (kDa)	Punto Isoeléctrico
1	Conalbúmina	76	6.0, 6.3, 6.6
2	Albúmina	66.2	5.4, 5.6
3	Actina bovina	43	5.0, 5.1
4	GAPDH	36	5.9, 6.0
5	Anhidrasa c	31	5.9, 6.0

Se corrieron un total de 10 gels de 2- D del extracto de MCA en ausencia de calcio en donde se observaron un número mayor a 20 huellas de proteínas (Fig. 5), de las cuales 6 fueron seleccionadas para ser analizadas por el programa Image Master.

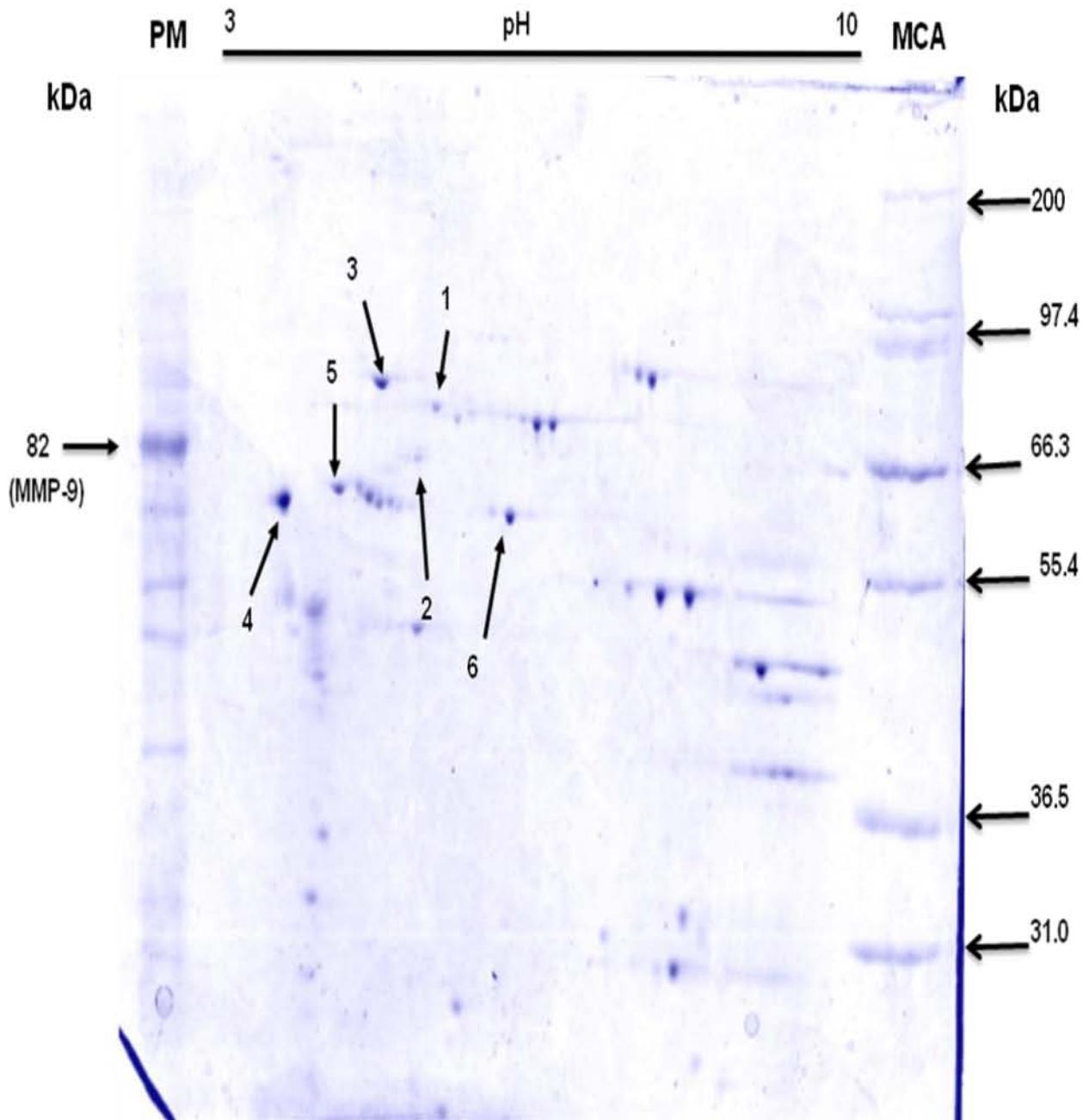


Fig. 5. – Gel 2-D del extracto de membranas corioamnióticas (MCA) en ausencia de calcio señalándose la banda de un peso molecular de 82 kDa la cual corresponde a MMP-9; señaladas con flechas negras las huellas de las proteínas que fueron analizadas.

De las huellas seleccionadas obtenidas mediante Electroforesis 2-D, se obtuvo su peso molecular y punto isoeléctrico con el programa Image Master (Tabla 3).

Tabla 3.- Número de huellas analizadas de la 2-D mediante el programa Image Master. El PI teórico fue obtenido por medio de la base de datos de SwissProt.

Huellas	Peso Molecular (kDa)	PI experimental	PI teórico
1	92	5.4 ± 0.3	5.6
2	82	5.1 ± 0.1	5.2
3	72	5.0 ± 0.0	5.0
4	46	4.2 ± .0.0	4.2
5	57	4.7 ± 0.0	4.7
6	56	5.6 ± 0.2	5.9

6.4 Espectrometría de masas

Por medio del análisis de los resultados obtenidos por Espectrometría de Masas (MALDI –TOF) se logró identificar a las siguientes proteínas: MMP-2, MMP-9, la Proteína reguladora de glucosa de 78 kDa (GRp78), Calreticulina (CRT), Prolil 4- hidroxilasa subunidad beta (P4H, sub β), y a la Proteína del retículo endoplásmico (ERp57)(Tabla 4).

Tabla 4.- Proteínas identificadas en el complejo de MCA a término, mediante la técnica de espectrometría de masa (MALDI-TOF).

Huella	No. de Ref. del Banco de Datos de Proteínas (PDB)	Nombre	Masa (kDa)	Puntaje	Esperado	P \leq
1	EC 3.4. 24.35	MMP-9	92	150	3.4 e-09	0.05
2	EC 3.24.24	MMP-2	82	170	4.2 e-07	0.05
3	Gi 121567	GRp78	72.33	150	3.5 e-09	0.05
4	Gi4757900	CRT	48.14	88	0.00021	0.05
5	Gi 2507460	P4H sub β	57.11	168	2.3 e-12	0.05
6	Gi2507461	ERp57	56.78	84	0.00058	0.05

Voyager Spec #1=>NR(2.00)=>BC[BP = 1410.7, 7022]

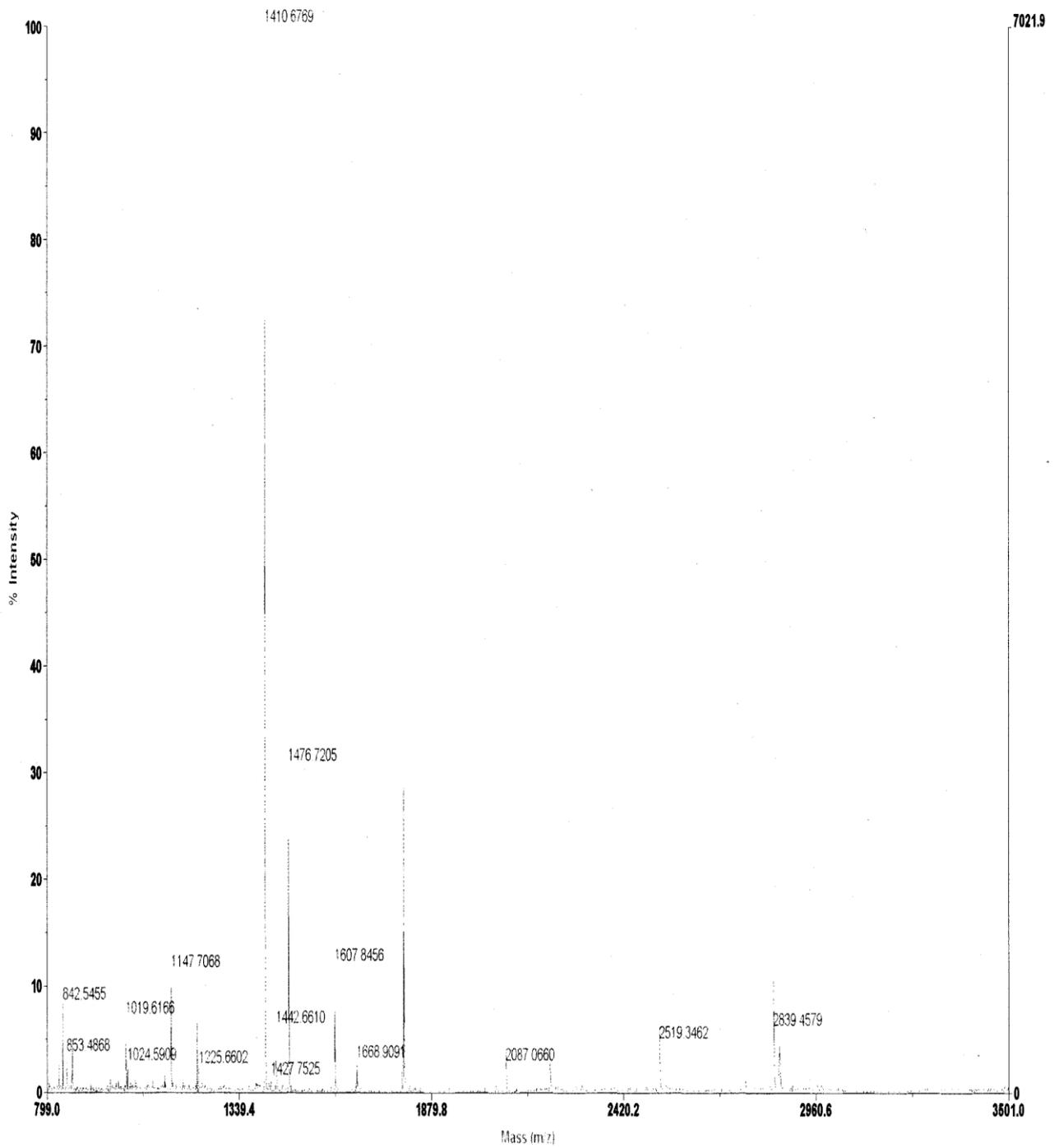


Fig.6.- Espectro de la Espectrometría de Masas MALDITOF correspondiente a la proteína Calreticulina.

Voyager Spec #1=>NR(2.00)=>BC[BP = 1781.9, 3297]

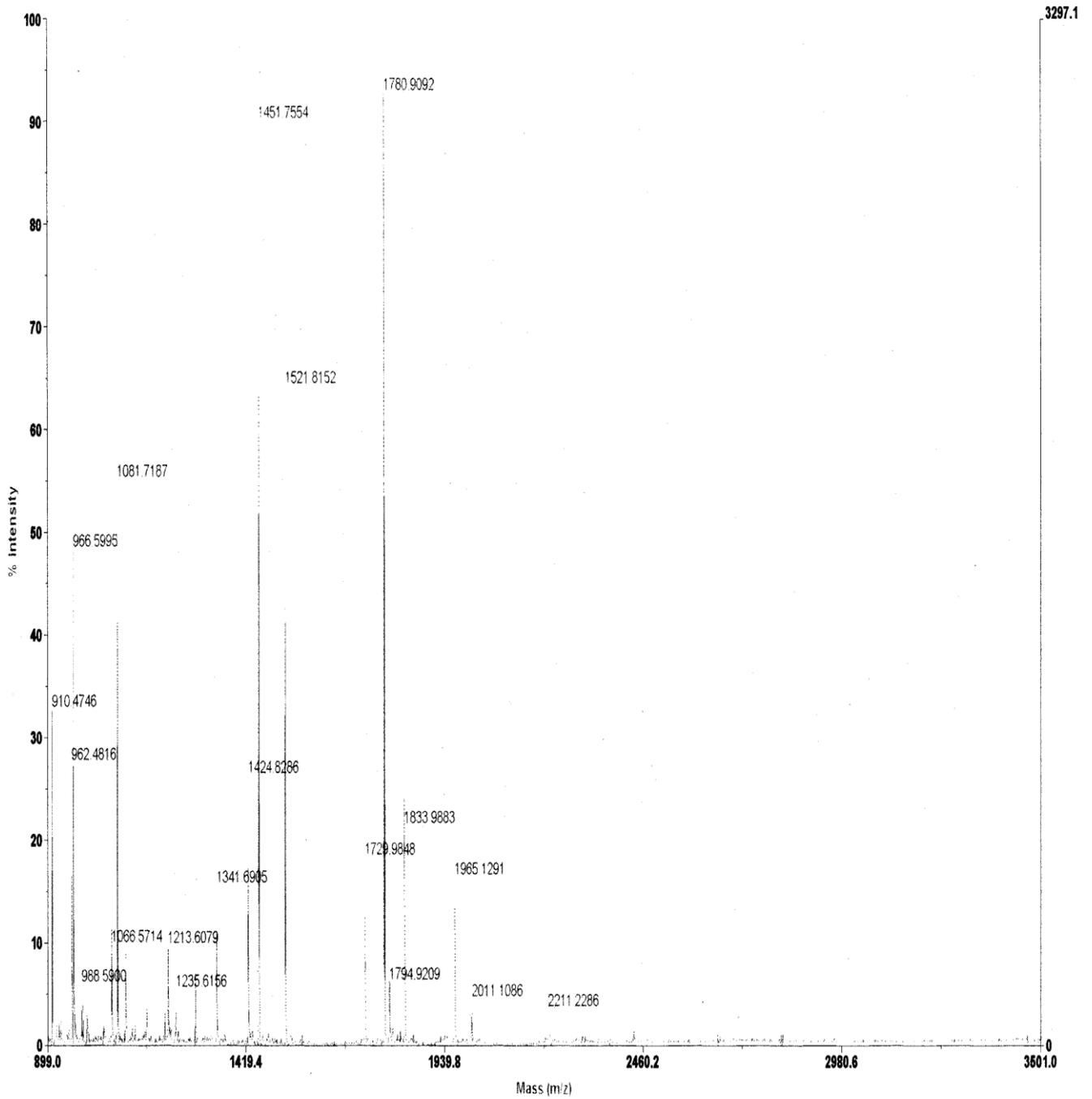


Fig.7.- Espectro de la Espectrometría de Masas MALDITOF correspondiente a la proteína P4H sub β .

Voyager Spec #1=>NR(2.00)=>BC[BP = 1566.9, 2058]

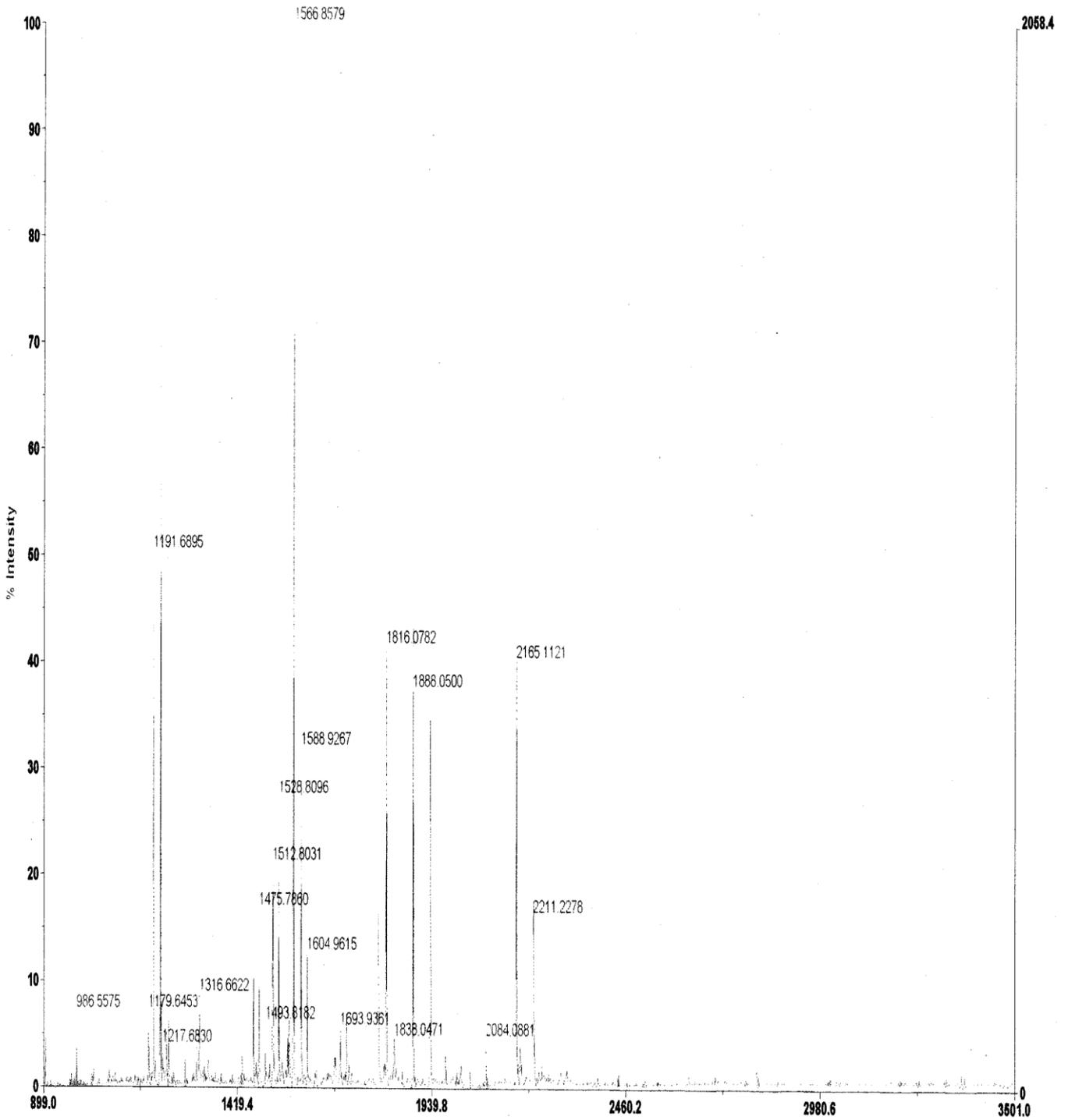


Fig.8.- Espectro de la Espectrometría de Masas MALDITOF correspondiente a la proteína GRp78.

7. DISCUSIÓN

El mecanismo de activación de las MMPs que participa momentos antes que se desarrolle el TP es una línea de investigación importante ya que se conoce muy poco del tema. Por datos obtenidos en el laboratorio se encontró la presencia de un complejo formado por diferentes MMPs y TIMPs presente en la MEC de las MCA horas antes del inicio del TP, el cual se encuentra regulado por concentraciones de calcio que da la estabilidad al complejo³⁶. De este complejo se desconoce su estructura molecular, las proteínas que lo conforman, sin embargo este complejo podría sugerir un mecanismo de actividad enzimática que podría participar en el control de la actividad de las MMPs en el tejido.

Este trabajo inició con la extracción del complejo en ausencia de calcio de MCA obtenidas de cesaría. La extracción del complejo se verificó observándose el despliegue de aproximadamente 19 bandas de proteínas (Figura 2) que con la técnica de zimograma no es posible observar. Posteriormente al aplicar la misma muestra sobre el sustrato (gelatina), además de verificar la presencia y actividad de las MMPs (-2 y -9), verificamos la latencia del complejo en presencia de calcio³⁶ (Figura 3). Una vez obtenida la suficiente cantidad de muestra que requeríamos para iniciar el análisis de las proteínas que conforman el complejo, utilizamos diferentes técnicas de proteómica molecular, procediendo a correr la muestra en 2ª dimensión.

A través de la 2ª dimensión observamos más de 20 huellas de las cuales 6 fueron las seleccionadas para su análisis debido a que eran huellas cuya presencia predominaba siempre que se corrieron los geles y por la intensidad que estas presentaban (figura 4). Las huellas seleccionadas para su análisis oscilaron entre los 57 y 97 kDa, y un punto isoeléctrico (PI) en un rango de pH de 4.0 a 5.9 (tabla 2). Entre algunos de los PMs y PIs observados encontramos aquellos valores que correspondieron a MMP-9 y MMP-2 lo cual reforzaba lo observado mediante el SDS- Page y la zimografía de gelatina.

Una vez que realizamos 10 geles de 2ª dimensión y que nuestros datos eran reproducibles procedimos a identificar las huellas seleccionadas por medio de espectrometría de masas y su análisis fue realizado con los

programas bioinformáticos Aldente y Mascot. Todas las proteínas identificadas con excepción de MMP-9 y MMP-2 fueron proteínas chaperonas que se han reportado en el Retículo endoplasmático (RE).

Se identificó la presencia de las proteínas chaperonas: proteína reguladora de glucosa (GRp78), calreticulina (CRT), prolil 4- hidroxilasa subunidad beta (P4H sub β) y proteína del retículo endoplásmico (ERp57) como proteínas que conforman el complejo

Las chaperonas son una familia de proteínas cuya función principal a nivel intracelular es la de unirse a otras proteínas para ayudar en su plegamiento, además participan en la síntesis de nuevas proteínas (glicoproteínas) y en su transporte⁵¹. Las chaperonas del RE están clasificadas en 4 grupos, de los cuales en este trabajo encontramos proteínas que pertenecen a 3 de ellos (Tabla 5).

Tabla 5.- Características de las proteínas chaperonas reportadas como integrantes de nuestro complejo.

Proteínas	Subfamilia	Localización	Función	Enfermedades
GRp78 / BiP	Chaperonas de choque térmico.	Lumen del RE Transmembrana del RE Núcleo	Chaperona de unión a Ca^{++} , sensor de estrés en el RE, regulador de la respuesta para el despliegue de proteínas, anti apoptosis ^{52,53}	Alzheimer ⁵⁴ Arteriosclerosis Cáncer ⁵⁵ Inducidas por priones ⁵⁶ Parkinson
CRT	Chaperonas parecidas a lectinas.	Transmembrana del RE	Plegamiento de glicoproteínas, unión a Ca^{++} , regulador de la homeostasis y almacenaje de Ca^{++} en el RE ^{57,58} .	Alzheimer Autoinmunes ⁵⁹ Hipertrofia cardica Cáncer
P4H sub β / PDI	Chaperonas catalizadoras de plegamiento.	Lumen del RE	Tio oxidoreductasa catalizador de puentes de disulfuro ⁶⁰	Alzheimer Parkinson ⁶¹
ERp57		Lumen del RE Núcleo Citosol	Tio oxidoreductasa cataliza la formación de uniones o puentes de glicoproteínas ⁶²	Alzheimer Inducidas por priones

La GRP78 también conocida como proteína de unión a la cadena pesada inmunoglobulina (BiP) además de participar en el plegamiento de proteínas es considerada centro regulador de la homeostasis del RE específicamente de las

células eucarióticas. Esta proteína generalmente es constitutiva, sin embargo su expresión aumenta en condiciones de estrés como la ausencia de Ca^{++} en el RE, estrés oxidativo e hipoxia⁶³. Se sabe que esta proteína puede formar complejos dependientes de Ca^{++} con otras chaperonas como la CRT⁶⁴.

La CRT, proteína de alta afinidad por Ca^{2+} , ayuda en la modulación de la expresión de genes⁶⁵ y participa en la cardiogénesis⁶⁶. Se ha reportado que la CRT puede formar estructuralmente y funcionalmente complejos proteicos con otras chaperonas residentes del RE como Grp74, PDI, ERp72 dependientes de Ca^{++} ⁶⁵.

P4H sub β inhibe la agregación de proteínas mal plegadas en la células, sin embargo si se encuentra en bajas concentraciones puede facilitar la agregación de proteínas. Esta proteína ha sido identificada como una de las proteínas de potencial marcaje en las áreas involucradas con el mecanismo de acción antiangiogénica⁶⁷. Se ha reportado que PDI participa en la formación de complejos con la CRT la cual al parecer es dependiente de Zn^{++} e involucra el sitio del dominio- P y la región terminal NH_2 del dominio- N de la CRT. La CRT se une reversiblemente a PDI a bajas concentraciones de Ca^{++} en RE, mientras que los complejos proteicos se disocian rápidamente en concentraciones altas de Ca^{++} ⁶⁸.

La ERp57 trabaja en conjunto con las proteínas calnexina y calreticulina constituyendo el ciclo Calreticulina- Calnexina el cual es responsable del plegamiento y del control de la calidad de las nuevas glicoproteínas sintetizadas⁶⁹. La expresión de ERp57 se ve aumentada en presencia de CRT y calnexina, esta interacción es dependiente de Ca^{++} . La interacción entre ERp57 y CRT se encuentra restringida a la región N- terminal de la proteína, mientras que la sensibilidad a Ca^{++} es conferida a la parte del dominio C-terminal de la proteína, lo que sugiere que el dominio C-terminal de la CRT juega un papel de sensor de Ca^{++} en el lumen del RE⁶⁵. La capacidad de almacenaje de Ca^{++} en el lumen del RE se ve aumentado por la unión de diferentes chaperonas a Ca^{++} , esto incluye a la CRT, GRp78, PDI⁷⁰.

Si bien es cierto que las proteínas identificadas como parte de nuestro complejo se encuentran trabajando en el RE en un ambiente intracelular, se sabe también que estas pueden estar presentes en un ambiente extracelular

con excepción de la ERp57 que hasta el momento no había sido reportada extracelularmente (tabla 6). Por otro lado, diferentes estudios reportan la presencia de chaperonas de choque térmico en algunos compartimientos fetales (tabla 7), lo cual nos hace suponer que no sería raro encontrar a estas proteínas identificadas en nuestro estudio presentes en la MEC de las MCA.

Tabla 6.- Chaperonas localizadas extracelularmente

Proteínas	Localización	Función
GRp78 / BiP	Superficie celular de células 1-LN de cáncer de próstata ⁷¹	Receptor de señalización en la superficie celular
CRT	Superficie celular de linfocitos. En unión a proteínas de matriz extracelular como laminina y fibrinógeno ⁷²	Modulador de la adhesión celular. Impide la autólisis de linfocitos. Regulador de la respuesta del sistema inmune.
P4H sub β / PDI	Superficie celular de: leucocitos, linfocitos fibrosarcomas, plaquetas ⁷³	Actúa como una reductasa que rompe enlaces disulfuro de las proteínas unidas a la célula. Modulador de la actividad de trombospondina. Regulador de la adhesión de leucocitos.

. Los componentes de la MEC como la fibronectina un componente muy importante de la MEC, participan en el proceso de adhesión, migración y diferenciación celular. Recientemente se encontró un motivo Cys-X-X-Cys en la fibronectina doce tipo 1 que posee una actividad PDI la cual está parcialmente “muerta”, se ha sugerido que este dominio es importante para el ensamblaje de la matriz a fibronectina⁷⁴. Se sabe que la CRT induce la expresión de los genes de fibronectina y su depositación en la MEC y que esta expresión de CRT es sensible a los niveles de Ca^{++} extracelular⁷⁵.

Tabla 7.- Participación de proteínas chaperonas de choque térmico expresadas en compartimentos fetales.

Proteínas	Localización	Características
HSP60	Placenta	La expresión de HSP60 está presente en la placenta de mujeres con TP a término y pretérmino, sin embargo no existe diferencia significativa en la intensidad de expresión de esta chaperona, por lo que la presencia o ausencia de esta proteína al parecer no tiene ninguna influencia en el TP pretérmino. Se observó en la placenta la presencia del anticuerpo HSP60 y HSP70 y del anticuerpo del antígeno del complejo HSP60 y HSP70 que fue detectado en mujeres con TP pretérmino. La activación de citocinas pro inflamatorias mediante estos complejos puede influir negativamente en la inducción del TP pretérmino ⁷⁶ .
HSP70	Líquido amniótico	La concentración de HSP70 en mujeres con TP a término fue significativamente más alta que en aquellas que se encontraban a término pero que no presentaron TP. Es posible que la liberación de HSP70 en el compartimiento intracelular pueda estar relacionada con una respuesta inflamatoria leve y con el proceso de remodelación tisular que se observa con frecuencia en el tracto reproductivo durante el TP a término. Se pueden observar también que las mujeres con infecciones amnióticas con ruptura prematura de membrana tienen una mayor concentración de HSP70 en contraste con aquellas que presentan ruptura prematura de membrana sin infecciones amnióticas, esta proteína es liberada en la cavidad amniótica después de la invasión microbiana. Las endotoxinas bacterianas y HSP70 podrían estar involucradas con TLR-2 y TLR-4 en la activación de NF κ B e inducir la producción de citocinas proinflamatorias incluyendo a la interleucina (IL) -1, IL-6, y TNF- α por células mononucleares y macrófagos induciendo la producción de prostaglandina y el TP prematuro ⁷⁷ .
HSP90	Placenta	La expresión de HSP90 está presente en la placenta de mujeres con TP a término y pretérmino, sin embargo no existe diferencia significativa en la expresión de esta, por lo que al parecer su ausencia o presencia no tiene ninguna relación con el TP pretérmino ⁷⁶ .
HSP105	Decidua, tejido de trofoblastos	La expresión de HSP105 en el epitelio luminal del útero de ratas se ve a partir del primer día de gestación, su máxima expresión puede observarse en células deciduales adyacentes a la implantación del embrión entre el día 5 y 6 de gestación. La inyección de antisense oligodeoxinucleótidos al 3er día de gestación en el útero de ratas suprime la expresión de HSP105 reduciendo el número de embriones implantados. Al parecer HSP105 es capaz de inducir la apoptosis de las células luminales desestabilizando la barrera epitelial en el lugar de la implantación y con ellos facilitando la invasión del trofoblasto y la implantación del embrión ⁷⁸ .

La expresión de GRp78 ha sido identificada en personas con osteoartritis. Esta enfermedad cambia la expresión génica de los condrocitos y de los componentes de la MEC, provocando el estrés de los condrocitos y la expresión de GRp78 ⁷⁹. Todos los datos reportados nos hacen ver que en efecto los componentes de la MEC se encuentran interactuando de alguna forma con las proteínas que conforman nuestro complejo.

Durante el TP pueden ocurrir cambios en las concentraciones Ca^{++} , por lo que estas chaperonas podrían estar participando en la estabilización de las concentraciones de Ca^{++} del complejo horas antes del inicio del TP, ya que una vez iniciando este TP las contracciones miométricas modifican las concentraciones de Ca^{++} provocando así la inestabilidad del complejo y con ello liberando a las MMPs para posteriormente degradar a las MCA.

La formación del complejo podría también tener como función el almacenaje de enzimas en grandes cantidades para que al momento del inicio del TP todas estas enzimas puedan ser liberadas llevando a cabo una degradación masiva de los componentes de la MEC.

Este complejo podría ser propuesto como un nuevo mecanismo de activación de las MMPs momentos antes del desarrollo del TP. Sin embargo se requieren de futuras investigaciones para conocer que otras proteínas conforman este complejo u otros complejos y su participación durante el TP, así como conocer su estructura molecular y su estequiometría.

7. CONCLUSIONES

En este estudio se estandarizó la técnica de Electroforesis Bidimensional para iniciar la caracterización de nuestro complejo.

Mediante los resultados obtenidos se confirma la presencia de MMP-2 y MMP-9 como metaloproteasas de MEC presentes en el complejo. Mediante las diferentes técnicas de proteómica molecular fue posible identificar a las proteínas: proteína reguladora de glucosa 78, calreticulina, prolil 4- hidroxilasa subunidad β , y proteína del retículo endoplasmático 57 como parte de las proteínas que conforman el complejo multienzimático identificado en las MCA. Por primera vez se reporta la presencia de la proteína del retículo endoplasmático 57 en un ambiente extracelular.

Al parecer todas estas proteínas participan en la estabilización de las concentraciones de Ca^{++} del complejo y con ello mantenerlo estable, además este complejo podría estar también ayudando en el almacenaje masivo de diferentes MMPs para la degradación de los componentes de la MEC de las MCA.

7. APÉNDICE DE TÉCNICAS

1. MÉTODO DE BRADFORD PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS (Bradford, 1976)

REACTIVOS:

a) REACTIVO DE COLOR DE BRADFORD

b) ESTANDARD DE PROTEÍNAS: Albúmina sérica bovina en agua destilada (1 mg/ml)

MÉTODO:

Construir una curva patrón con 2, 5, 10, 15 y 20 µg de proteína, ajustar el volumen a 1000 µl con solución salina fisiológico. Tomar 160 µl de la curva realizada y agregar 40 µl del reactivo de color de Bradford, agitar y leer a 595 nm.

Seguir el mismo procedimiento con las muestras tomar 30 µl de cada una y ajustar a volumen 160 µl con solución salina. Tomar 40 µl de reactivo de color, agitar y leer.

2. ELECTROFORESIS SDS

1.- Se preparan geles de poliacrilamida SDS al 10% de acuerdo con la siguiente tabla:

REACTIVO	GEL INFERIOR (10 ml)	GEL SUPERIOR (5 ml)
Acrilamida/bis-acrilamida	2.5 ml	500 µl
Buffer superior	-----	1.25 ml
Buffer inferior	2.5 ml	-----
Agua	4.9 ml	3.19
TEMED	10µl	10µl
Persulfato de amonio al 10%	50µl	50 µl

Buffer inferior: Tris 1.5M pH 8.8

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

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

Buffer superior: Tris 0.5M pH 6.8

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

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

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

2. La cantidad de muestra se ajusta para tener 5 μ g de proteína y se pone a incubar durante 5 minutos a 95 ° C con 1 μ l de Mercaptoetanol y agua 1:3; y se mezcla con una cantidad proporcional de buffer de muestra.

Buffer de muestra

REACTIVOS	CANTIDAD
Buffer superior	1.75 ml
Glicerol	1 ml
SDS 10%	1 ml
Azul de bromofenol	10 mg
Agua	5.75 ml

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

REACTIVOS	CANTIDAD PARA 1 L
Tris	3 g
Glicina	14.4 g
SDS al 10%	10 ml

4. Se ponen los geles en solución teñidora durante media hora y posteriormente en solución desteñidora por 24 h.

Solución teñidora

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

Solución Stock de Coomasie: Disolver 0.5 g azul de Coomasie R-250 en 50 ml de agua desionizada.

Solución desteñidora

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Metanol	10 %
Acido acético	10 %
Glicerol	10 %

3.- ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (2-D)

SOLUCIONES

Buffer de Rehidratación

Almacenar en alícuotas de 2.5 ml a -20° C.

Reactivos	Concentración Final	Cantidad
Urea	6 M	72.1 g
Tris-HCL, pH 8.8(ver solución H)	75 mM	10 ml
Glicerol 29.3%	29.3%	58.6 ml
SDS 2%	2% (v/v)	40 ml SDS al 10%
1% azul de Bromofenol de solución stock 0.002%	0.002%	400 µl
Agua doblemente destilada	-----	Llevar a 200 ml

Almacenar en alícuotas de 20 ml a -20°C.

DTT Y IODOACETAMIDA

Reactivos	Cantidades
DTT	200 mg / 20 ml
Yodoacetamida	200 mg/ 10 ml

H. 4x Solución Buffer Gel de 1.5 M Tris base, pH 8.8

Reactivos	Concentración Final	Cantidad
Tris Base	1.5 M	18.17 g
Agua Doblemente destilada	-----	75 ml
HCl _{aq}	-----	Ajustar a pH 8.8
Agua doblemente destilada	-----	llevar a 100 ml.

Solución Buffer de Electroforesis SDS Laemmli 1x. de 25 mM Tris base, 192 mM glicina, 0.1% SDS

Reactivos	Concentración Final	Cantidad
Tris base	25 mM	15.15 g
Glicina	192 mM	72 g
SDS	0.1 % (w/v)	50 ml
Agua doblemente destilada	-----	Llevar a 500 ml

Solución Agarosa de 25 mM Tris base, 192 glicina, 0.1% SDS, 0.5 % agarosa, 0.002% azul de bromofenol.

Reactivos	Concentración Final	Cantidad
Buffer de Electroforesis Laemmli SDS	-----	100 ml (10 ml Laemmli SDS 10x + 90 de agua milliQ)
Agarosa (NA o M)	0.5 %	0.5 g
1% azul de Bromofenol	0.002% (w/v)	200 µl

PROCEDIMIENTO

LIMPIEZA DE MUESTRAS

- 1.- Tratar la muestra con 2-D Clean – Up kit.
- 2.- Dejar precipitar las proteínas de la muestra a -20°C al menos 12 hrs.

REHIDRATACIÓN

- 3.- Centrifugar la muestra a 12, 000 rpm a 4° C durante 5 minutos.
- 4.- Quitar sobrenadante.
- 5.- Cuantificar la concentración de proteína mediante 2-D Quant Kit
- 6.- Resuspender el pellet en 200 µl de una solución stock buffer de rehidratación de 8M urea, 2% CHAPS, 0.5/2% IPG Buffer, 0.002% azul de bromofenol.
- 7.- Agregar DTT (7mg DTT / 2.5 ml de Buffer de Rehidratación) y 0.5% buffer IPG
8. - Centrifugar a 12, 000 rpm a 4°C durante 5 minutos.
- 9.- Equilibrar la placa de rehidratación con la ayuda de la burbuja.
- 10.- Colocar la muestra a lo largo de un carril de la placa de rehidratación.
- 11.- Colocar encima de la muestra la tira IPG Buffer GE HealthCare de pH 3-10 NL, verificando que el lado del gel de la tira este hacia abajo.
- 12.- Quitar burbujas entre la tira de pH y la muestra.
- 13.- Llenar el carril en donde está la muestra y la tira con aceite Plus One y dejarlo rehidratar a TA al menos 12 hrs.

PRIMERA DIMENSION

- 14.- Correr la primera dimensión en el Sistema de Electroenfoque GE HealthCare Ettan IPg3.

15.- Una vez que termine de correr la primera dimensión la tira puede guardarse en una bolsa de plástico a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

SEGUNDA DIMENSION

16.- Preparar gel inferior de SDS- Page al 10%.

17.- Preparar gel inferior dejando 1 centímetro de distancia del borde del cristal, colocar 2 peines en los extremos del gel.

18.- Tratar la tira de pH con 200 mg de DTT en 200 ml de Buffer de equilibrio durante 15 minutos con movimiento constante.

19.- Tratar la tira con 400 mg de Iodoacetamida en 200 ml de Buffer de equilibrio durante 15 minutos con movimiento constante.

20.- Colocar la tira de pH sobre el gel inferior.

21.- Sellar los vidrios de la cámara con Agarosa cuidando de que esta no esté muy caliente ya que puede derretir el gel superior.

22.- En uno de los pocitos colocar marcador de peso molecular y en el otro pocito muestras del extracto.

23.- Correr el gel a 100V constante en el gel superior.

24.- Cuando la muestra ingrese al gel inferior subir el voltaje a 200V.

25.- Teñir el gel con solución Azul de Commasie R-250.

2-D QUANT PROTEIN KIT

Reactivos

- BSA solución estándar.
- Reactivo precipitante.
- Reactivo co- precipitante.
- Solución Cooper.
- Reagente de color A.
- Reagente de color B.

Procedimiento:

1.- Hacer la siguiente curva estándar:

No. de tubo	1	2	3	4	5	6
Volumen 2mg/ ml BSA solución estándar	-----	5 μl	10 μl	15 μl	20 μl	25 μl
Proteína cuantificada	-----	10 μg	20 μg	30 μg	40 μg	50 μg

Solución Salina	25µl	20 µl	15 µl	10 µl	5 µl	-----
-----------------	------	-------	-------	-------	------	-------

2.- Colocar en un tubo eppendor la(s) muestra(s) a cuantificar puede ocuparse desde un volumen de 1 µl a 100 µl.

Nota: Los reactivos deben de agregarse tanto a las muestras a cuantificar como a los tubos de la curva estándar.

3. – Agregar 500 µl del Reactivo de precipitante, vortexear e incubarlos 3 minutos a TA.

4.- Agregar 500 µl del Reactivo de co-precipitante y mezclar por inversión.

5.-Centrifugar los tubos a 10, 000 rpm durante 5 minutos.

6.- Quitar el sobrenadante sin tocar el pellet.

7.- Centrifugar nuevamente por un momento y quitar el sobrenadante restante con la ayuda de una micropipeta.

8.- Agregar 100 µl de solución Cooper y 400µl de agua destilada, vortexear y disolver el pellet.

9.- Agregar 1 ml del Reagente de color a cada tubo y mezclar por inversión.

100 partes del Reagente de Color A por 1 parte del Reagente de Color B.

10.- Incubar a TA de 15- 20 minutos.

11.- Leer a una longitud de onda de 480 nm.

KIT 2-D CLEAN UP

Reactivos

- Reactivo precipitante.
- Reactivo Co-precipitante.
- Reactivo wash additive.
- Reactivo wash buffer.

Procedimiento:

1.- Colocar 120 µl de muestra en un tubo eppendor

2.- Agregar a la muestra 310 µl del reactivo de precipitante y dejar reposar en hielo durante 15 minutos.

3.- Agregar 310 µl del reactivo de Co-precipitante y mezclar.

4.- Centrifugar a 4^o C a 12, 000 rpm durante 8 minutos.

- 5.- Quitar el sobrenadante sin tocar el pellet.
- 6.- Agregar 45 μ de Co- precipitante y dejar reposar durante 5 minutos en hielo.
- 7.- Centrifugar a 4° C a 12, 000 rpm durante 5 minutos.
- 8.- Quitar sobrenadante sin tocar pellet.
- 9.- Agregar 50 μ l de agua estéril fría y con los dedos dar golpecitos para que el pellet se despegue de las paredes del tubo pero que no se disuelva.
- 10.- Agregar 5 μ l de wash additive y 1 ml de wash buffer y vortexear durante 30 segundos cada 10 minutos durante 30 minutos.
- 11.- Dejar reposa por lo menos 12 horas a -20° C.

10. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Manual de Normas y Procedimientos de Obstetricia y Ginecología 2003. Subdirección General Médica, Instituto Nacional de Perinatología, México, D.F.
- ² Bryant- Greenwood GD, Millard LK. Human fetal membranes: Their preterm premature rupture. *Biology of Reproduction*. 2000; 63: 1575-1579.
- ³ Fu X, Parks WC, Heinecke JW. Activation and silencing of matrix metalloproteinases. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2008; 19: 2-13.
- ⁴ Fortunato SJ, Rambkumar M, Bryant C, Lombarda SJ. Programmed 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(6): 1468-1476.
- ⁵ Maymon E, Romero R, Pacora P, Gervasi MT, Bianco K, Chezzi F, Yoon BH. Evidence for the participation of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase 1) in preterm rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol*. 2000; 183(4): 914-920.
- ⁶ Meraz C.N., Beltrán M.J., Estrada G.G., Vadillo O.F. Identificación de la metaloproteasa de matriz extracelular-3 en la membrana fetal de la rata y su posible implicación en la rotura de las membranas corioamnióticas. *Ginecol Obstet Mex* 2006;74:671-677
- ⁷ Maymon E, Romero R, Pacora P, Gervasi MT, Edwin SS, Gómez R, Seubert DE. Matrylisin (matrix metalloproteinase-7) in parturition, premature rupture of membranes, and intrauterine infection. *Am J Obstet Gynecol*. 2000; 182(6): 1545-1553.
- ⁸ Uchide K, Ueno H, Inoue M, Sakai A, Fujimoto N, Okada Y. Matrix metalloproteinase-9 and tensile strength of the fetal membranes in uncomplicated labor. *Obstet Gynecol*. 2000; 95(6): 851- 855.
- ⁹ Ota A, Yonemoto H, Someya A, Itoh S, Kinoshita K, Nagaoka I. Changes in matrix metalloproteinase 2 activities in amniochorion during premature rupture of membranes. *J Soc Gynecol Investig*. 2006; 13(8): 592-597.
- ¹⁰ Ilancheran S, Moodley I, Manuelpillai U. Human fetal membranes: A Source of Stem cells for Tissue regeneration and repair?. *Placenta*. 2009; 30:2-10.
- ¹¹ Ulug U, Goldaman S, Ben-Shlomo I, Shalev E. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 and their inhibitor, TIMP-1, in human term deciduas and fetal membranes: effect of prostaglandin F(2alpha) and indomethacin. *Mol Hum Reprod* 2001;7:1187- 1193.
- ¹² Reyna VE, Torres MM, Reyna VN. Estructura y función de la matriz extracelular de las membranas fetales humanas. *Rev Obstet Ginecol Venez* 2003; 63:19-30.
- ¹³ López OFA, Ordóñez SSA. Ruptura prematura de membranas fetales: de la fisiología hacia los marcadores tempranos de la enfermedad. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 2006; 57(4): 279-290.
- ¹⁴ Clarck IM, Swingler TE, Sampieri CL, Edwards DR. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biol*. 2008; 1-17.
- ¹⁵ Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical-biological functions and (Q) SARs. *Bioorganic and Medical Chemistry*. 2007; 15: 2223- 2268.
- ¹⁶ McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore. *Current Opinion in cell biology*. 2001; 13(5): 534- 540.

- ¹⁷ Aranapakam V, Grosu GT, Davis JM, Hu B, Ellingboe J, Baker JL, Skotnicki JS, Zask A, DiJoseph JF, Sung A, Sharr MA, Killar LM, Walter T, Jin G, Cowling R. Synthesis and structure-activity relationship of alpha-sulfonylhydroxamic acids as novel, orally active matrix metalloproteinase inhibitors for the treatment of osteoarthritis. *J Med Chem.* 2003; 46(12): 2361-2375.
- ¹⁸ Raspollini MR, Castiglione F, Degl'Innocenti DR, Garbini F, Cocía ME, Taddei GL. Difference in expresión of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in patients with persistent ovarian cyst. *Fértil Steril.* 2005; 84(4): 1049-1052.
- ¹⁹ Ra HJ, Parks WC. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biology.* 2007; 26: 587-596.
- ²⁰ Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Signal transduction and cell-type specific regulation of matrix metalloproteinase gene expression: Can MMPs be good for you? *J. Cell. Physiol.* 2007;213: 355–364.
- ²¹ Garneau N L, Wilusz J, Wilusz CJ. The highways and byways of mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2007;8, 113–126.
- ²² Huwiler A, Akool el S, Aschrafi A, Hamada FM, Pfeilschifter J, Eberhardt W. ATP potentiates interleukin-1 betainduced MMP-9 expression in mesangial cells via recruitment of the ELAV protein HuR. *J. Biol. Chem.*2003; 278: 51758–51769.
- ²³ Rydzziel S, Delany AM, Canalis E. AU-rich elements in the collagenase 3 mRNA mediate stabilization of the transcript by cortisol in osteoblasts. *J. Biol. Chem.*2004; 279, 5397–5404.
- ²⁴ Shiomi T, Inoki I, Kataoka F, Ohtsuka T, Hashimoto G, Nemori R, Okada. Pericellular activation of proMMP-7 (promatrilysin-1) through interaction with CD151. *Lab. Invest.*2005; 85, 1489–1506.
- ²⁵ Van Wart HE, Birkedal- Hansen H. The cysteine switch a principle pf regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Pro Natl Acad Sci USA.* 1990; 87_ 5578-5582.
- ²⁶ Gill SE, Parks WC. Metalloproteinases and their inhibitors: Regulation of wound healing. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 2007; 1-14.
- ²⁷ Brew K, Dinakarbandian, Nagase H. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: Evolution, structure and function. *Biochim.Biophys. Acta.* 2000; 1477(1/2): 267–283.
- ²⁸ Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J. Cell Sci.* 2002;115(19): 3719–3727.
- ²⁹ Müller J, Niemeyer CM. DNA-directed assembly of artificial multienzyme complexes. *Biochemical and Biophysical Research Communicatins.* 2008; 377: 62-67.
- ³⁰ Ishikawa M, Tsuchiya D, Oyama T, Tsunaka Y, Morikawa K. Structural basis for channelling mechanism of a fatty acid b-oxidation multienzyme complex, *EMBO J.* 2004; 23(14): 2745–2754.
- ³¹ Miles EW. Tryptophan synthase: a multienzyme complex with an intramolecular túnel. *Chem. Rec.* 2001; 1 (2):140–151
- ³² Fischbach MA, Walsh CT. Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. *Chem. Rev.* 2006; 106 (8): 3468–3496.
- ³³ Morgunova E, Tuuttila A, Bergmann U, Tryggvason K. Structural insight in to the complex formation of latente matrix metalloproteinase 2 with tissue inhibitor of metalloproteinase 2. *PNSA.* 2002. 99(11): 7414 – 7419.

- ³⁴ Greenlee KJ, Werb Z, Kheradmand F. Matrix metalloproteinases in Lung: multiple, multifarious and multifaceted. *Physiol Rev.* 2007; 87(1): 69-98.
- ³⁵ Naveau A, Reinald N, Fournier B, Duran E, Lafont A, Coulomb B, Gogly B. Gingival fibroblasts inhibit MMP-1 and MMP-3 activities in an Ex-vivo artery model. *Connective Tissue Reseach.* 2007; 48: 300-308.
- ³⁶ Meraz CN, Ortega A, Estrada GG, Flores A, Espejel A, Hernández GC, Vadillos FO. Identification of a calcium- dependent matrix metalloproteinase complex in rat chorioallantoid membranes during labour. *Molecular Human Reproduction.* 2006; 12(10): 633-641.
- ³⁷ Xu P, Alfaidy N, Challis JR. Expression of Matrix Metalloprotease (MMP)-2 and MMP-9 in Human Placenta and Fetal Membranes in Relation to Preterm and Term Labor. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2002; 87(3): 1353-1361.
- ³⁸ Goldman S, Weiss A, Shalev E. The effect of progesterone on gelatinase expression in the deciduas and fetal membranes before and after contractions. *Am J Obstet Gynecol.* 2007; 197: 521.e1- 521.e7.
- ³⁹ Meraz CN, Molina DG, Vadillo OF. Cambios secuenciales de metaloproteinasas de matriz extracelular durante la gestación y el trabajo de parto en el corioalantoides de la rata. *Revista de Investigación Clínica.* 2003;55(1): 36-42.
- ⁴⁰ Oner C, Schatz F, Kizilay G, Murk W, Buchwalder LF, Kayisli A, Arici A, Lockwood CJ. Progesterin-Inflammatory Cytokine Interaction Affect Matrix Metalloproteinase- 1 and -3 Expression in Term Decidual Cells: Implications for Treatment of Chorioamnionitis- Induced Preterm Delivery. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 93(1): 252-259.
- ⁴¹ Vadillo OF, González AG, Furth EE, Lei H, Muschel JR, Stetler SWG, Straus III JF. 92-kd type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) activity in human amniochorion increases with labour. *American Journal of Pathology.* 1995; 146(1): 148-156.
- ⁴² 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 (5): 1248-1253.
- ⁴³ Tsatas D, Baker MS, Rice GE. Differential expresión of proteases in human gestational tissues before, during and after spontaneous-onset labour at term. *Journal of Reproduction Fertility.* 1999; 16: 43-49.
- ⁴⁴ Yonemoto H, Young CB, Ross JT, Guilbert LL, Fairclough RJ, Olson DM. Changes in Matrix Metalloproteinase (MMP) -2 and MMP-9 in the Fetal Amnion and Chorion During Gestation and at Term and Preterm Labor. *Placenta.* 2006; 27: 669-677.
- ⁴⁵ Nishihara S, Someya A, Yonemoto H, Ota A, Itoh S, Nagaoka I, Takeda S. Evaluation of expression and enzyme activity of matrix metalloproteinase-7 in fetal membranes during premature rupture of membranes at term in humans. *Reprod Sci.* 2008; 15(2): 156-165.
- ⁴⁶ Maymon E, Romero R, Pacora P, Gómez R, Athayde N, Edwin S, Yoon BH. Human neutrophil collagenase (MMP-8) in parturition, premature rupture of the membranes, and intrauterine infection. *Am J Obstet Gynecol.* 2000; 183(1): 94-99.
- ⁴⁷ Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
- ⁴⁸ Fisher S, Cui T, Zhang L, Hartman L, Grahl K, Guo-Yangs Z, Tarpey J, Damsky C. Adhesive and degradative properties of human placental cytotrophoblast cells *in vitro.* *J Cell Biol.* 1989; 109:891-897.
- ⁴⁹ <http://www.expasy.org/tools/aldente>.

⁵⁰ <http://www.matrixscience.com>

⁵¹ Ni M, Lee AS. ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Lett.* 2007; 581(19): 3641- 3651.

⁵² Ni M, Lee AS. ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Letter.* 2007; 581(19): 3641- 3651.

⁵³ Fu Y, Lee AS. Glucose regulated proteins in cancer progression, drug resistance and immunotherapy. *Cancer Biol Ther.* 2006; 5: 741–744.

⁵⁴ Hetz C, Russelakis CM, Maundrel K, Castilla J, Soto C. Caspace – 12 and endoplasmic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathological prion protein. *EMBO J.* 2003; 22(20): 5435- 5445.

⁵⁵ Li J, Lee AS. Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer. *Curr Mol Med.* 2006;6:45–54.

⁵⁶ Hoshino T, Nakaya T, Araki W, Suzuki K, Suzuki T, Mizushima T. Endoplasmic reticulum chaperona inhibit the production of amyloid- beta peptides. *Biochem J.* 2007; 402(3): 581- 589.

⁵⁷ Johnson S, Michalak M, Opas M, Eggleton P. The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space. *Trends Cell Biol.* 2001;11: 122–129.

⁵⁸ Gelebart P, Opas M, Michalak M. Calreticuline, a Ca²⁺ binding chaperone of the endoplasmic reticulum. *The International Journal of Biochemistry.* 2005; 37: 260-266.

⁵⁹ Eggleton P, Llewellyn DH. Pathophysiological roles of calreticulin in autoimmune disease. *Scand J Immunol.* 1999; 49: 466–473.

⁶⁰ Ellgaard L, Ruddock LW. The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO Rep.* 2005; 6: 28–32.

⁶¹ Uehara T, Nakamura T, Yao D, Shi ZQ, Gu Z, Ma Y, Masliah E, Nomura Y, Lipton SA. S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. *Nature.* 2006; 441: 513– 517.

⁶² Coppari S, Altieri F, Ferraro A, Chichiarelli S, Eufemi M, Turano C. Nuclear localization and DNA interaction of protein disulfide isomerase ERp57 in mammalian cells. *J Cell Biochem.* 2002; 85: 325– 333.

⁶³ Takano S, Ando T, Hiramatsu N, Kanayama A, Maekawa S, Ohnuma Y, Enomoto N, Ogawa H, Paton AW, Paton JC, Kitamura M, Nakao A. T cell receptor-mediated signaling induces GRP78 expression in T cells: The implications in maintaining T cell variability. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2008; 371: 762-766.

⁶⁴ Michalak M, Corbett EF, Mesaeli N, Nakamura K, Opas M.. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J.* 1999; 344: 281- 292.

⁶⁵ Qiu Y, Michalak M. Transcriptional control of the calreticulin gen in health and disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biol.* 2008.

⁶⁶ Nakamaru K, Robertson M, Liu G, Dickie P, Nakamura K, Guo JQ. Complete heart block and sudden death in mice overexpressing calreticulin. *J Clin Invest .* 2001a; 107: 1245-1253.

⁶⁷ Zoeller JJ, Iozzo RV. Proteomic profiling of endorepellin angiostatic activity on human endothelial cells. *Bio Med Central.* 2008; 6(7):1-8.

- ⁶⁸ Baksh S, Burns K, Andrin C, Michalak M. Interaction of calreticulin with protein disulfide isomerase. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.* 1995; 270(52): 31338- 31344.
- ⁶⁹ Caramelo JJ, Parodi AJ. Getting in and out from calnexin/ calreticulin cycles. *Journal of Biological Chemistry.* 2008; 283(16): 10221- 10225.
- ⁷⁰ Oliver JD, Roderick HL, Llewelyn DH, High S. ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin. *Molecular Biology of the Cells.* 1999; 10: 2573-2582.
- ⁷¹ Turano C, Coppari S, Altieri F, Ferraro A. Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. *J Cell Physiol.* 2002; 193: 154–163.
- ⁷² Fu Y, Lee AS. Glucose regulated proteins in cancer progression, drug resistance and immunotherapy. *Cancer Biol Ther.* 2006; 5: 741–744
- ⁷³ Johnson S, Michalak M, Opas M, Eggleton P. The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space. *Trends Cell Biol.* 2001; 11: 122–129.
- ⁷⁴ Weston BS, Wahab NA, Roberts T, Mason RM. Bacitracin inhibits fibronectin matrix assembly by mesangial cells in high glucose. *Kidney International.* 2001; 60: 1756-1764.
- ⁷⁵ Pap S, Fadel MP, Kim H, McCulloch A, Opas M. Calreticulin Affects Fibronectin-based Cell-Substratum Adhesion via the Regulation of c-Src Activity. *The Journal of Biological Chemistry.* 2007; 282(22): 16585- 16598.
- ⁷⁶ Ziegert M, Witkin SS, Sziller I, Alexander H, Brylla E, Härtig W. Heat Shock Proteins and Heat Shock Protein-Antibody Complexes in Placental Tissues. *Infectious diseases in Obstetric and Gynecology.* 1999; 7: 180-185.
- ⁷⁷ Chaiworapongsa T, Erez, Kusanovic JP, Vaisbuch E, Mazaki-Tovi S, Gotsch F, Than NG, Mittal P, Kim YM, Camacho N, Edwin S, Gomez R, Hassan SS, Romero R. Amniotic fluid heat shock protein 70 concentration in histologic chorioamnionitis, term and preterm parturition. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2008; 21(7): 449- 461.
- ⁷⁸ Yuan JX, Xiao LJ, Lu CL, Zhang XS, Liu T, Chen M, Hu ZY, Gao F, Liu YX. Increased expression of heat shock protein 105 in rats uterus of early pregnancy and its significance in embryo implantation. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2009; 7(23): 1-10.
- ⁷⁹ Nugents AE, Speicher DM, Gradiser I, McBurney DL; Baraga A, Doane KJ, Horton WE. Advanced osteoarthritis in humans is associated with altered collagen VI expression and up-regulation of ER-stress markers Grp78 and Bag-1. *JHC.* 2009:3-34.