



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*

Noemí Meraz Cruz,** Jorge Beltrán Montoya,*** Guadalupe Estrada Gutiérrez,** Felipe Vadillo Ortega**

Nivel de evidencia: II-3

RESUMEN

Objetivo: las membranas corioamnióticas humanas o su equivalente en la rata, funcionan como barrera selectiva durante la gestación y su rotura es parte de los mecanismos implicados durante el trabajo de parto. Se desconocen los mecanismos moleculares que se realizan en este proceso.

Tipo de estudio: modelo animal experimental.

Material y métodos: se analizaron las membranas corioamnióticas (obtenidas al inicio del trabajo de parto) de ratas con embarazos programados y sincronizados. Se determinó la coexistencia y distribución tisular de la metaloproteasa de la matriz extracelular-3 (estromelisin) en estos tejidos.

Resultados: se identificó por primera vez la secreción y localización tisular de la metaloproteasa de matriz extracelular-3 en las membranas fetales. La metaloproteasa de matriz extracelular-3 fue inmunolocalizada en la capa compacta del amnios y su secreción (por las membranas) se confirmó por electroforesis, zimografía y Western blot. Por medio de microscopía confocal se comprobó que la metaloproteasa de matriz extracelular-3 se localiza en los mismos sitios que la metaloproteasa de matriz extracelular-9.

Conclusiones: La rotura de las membranas corioamnióticas se relaciona con la expresión y actividad local de las metaloproteasas de matriz extracelular. Se ha identificado la coexistencia de la metaloproteasa de matriz extracelular-3 en el amnios de la rata; este elemento se agrega al proceso bioquímico de rotura, ya que la metaloproteasa de matriz extracelular-3 es activador de la metaloproteasa de matriz extracelular-9. Es posible que la función fisiológica de esta enzima esté implicada de manera principal, en el proceso de rotura de las membranas corioamnióticas durante el parto.

Palabras clave: rotura de membranas corioamnióticas, metaloproteasa de matriz extracelular-3, membrana fetal de la rata.

ABSTRACT

Objective: Human corioamniotic membranes, or their equivalent in the rat, function as selective barrier during gestation and their rupture is part of the mechanisms implied in the labor. Molecular mechanisms carried out in this process are unknown.

Type of study: Experimental animal model.

Material and methods: Corioamniotic membranes (obtained at the beginning of the labor) of rats with programmed and synchronous pregnancies were analyzed. The coexistence and distribution of metalloproteinase of extracellular-3 matrix (estromelisin) in these tissues were determined.

Results: Secretion and tissue location of metalloproteinase of extracellular-3 matrix in fetal membranes were identified for the first time. Metalloproteinase of extracellular-3 matrix was immunolocalized in the compact layer of the amnion and its secretion (by the membranes) was confirmed through electrophoresis, zymography and Western blot. By confocal microscopy it was verified that metalloproteinase of extracellular-3 matrix is located in the same places of that of extracellular-9 matrix.

Conclusions: Rupture of corioamniotic membranes relates to the expression and local activity of the metalloproteinases of extracellular matrix. The coexistence of metalloproteinase of extracellular-3 matrix in the amnion of the rat has been identified; this element is added to the biochemical process of rupture, since metalloproteinase of extracellular-3 matrix is an activator of that of extracellular-9 matrix. It is possible that the physiological function of this enzyme is implied, of a main way, in the process of rupture of corioamniotic membranes during the childbirth.

Keywords: rupture of corioamniotic membranes, metalloprotease of extracellular-3 matrix, fetal membrane of the rat.

RÉSUMÉ

Objectif : les membranes chorio-amniotiques humaines ou leur équivalent dans le rat fonctionnent comme barrière sélective pendant la gestation et leur rupture fait partie des mécanismes impliqués pendant l'accouchement.

Type d'étude : modèle animal expérimental.

Matériel et méthodes : on a fait l'analyse des membranes chorio-amniotiques (obtenues au début de l'accouchement) de rats avec des grossesses programmées et synchronisées. On a déterminé la coexistence et distribution tissulaire de la métalloprotéinase de la matrice extracellulaire-3 (stro-mélysine) dans ces tissus.

Résultats : on a identifié pour la première fois la sécrétion et localisation tissulaire de la métalloprotéinase de matrice extracellulaire-3 dans les membranes fœtales. La métalloprotéinase de matrice extracellulaire-3 a été immunolocalisée dans la couche compacte de l'amnios et sa sécrétion (par les membranes) a été confirmée par électrophorèse, zymographie et Western blot. A l'aide de microscopie confocale on a prouvé que la métalloprotéinase de matrice extracellulaire-3 est localisée dans les mêmes sites que la métalloprotéinase de matrice extracellulaire-9.

Conclusions : la rupture des membranes chorio-amniotiques est liée à l'expression et activité locale des métalloprotéinases de matrice extracellulaire. On a identifié la coexistence de la métalloprotéinase de matrice extracellulaire-3 dans l'amnios du rat ; cet élément s'ajoute au processus biochimique de rupture, car la métalloprotéinase de matrice extracellulaire-3 active la métalloprotéinase de matrice extracellulaire-9. Il est possible que la fonction physiologique de cette enzyme soit impliquée de manière principale dans le processus de rupture des membranes chorio-amniotiques pendant l'accouchement.

Mots-clé : rupture de membranes chorio-amniotiques, métalloprotéase de matrice extracellulaire-3, membrane fœtale du rat.

RESUMO

Objetivo: as membranas corioamnióticas humanas ou seu equivalente na rata funcionam como barreira seletiva durante a gestação e sua ruptura faz parte dos mecanismos implicados durante a labor de parto. Desconhecem-se os mecanismos moleculares que se realizam neste processo.

Tipo de estudo: modelo animal experimental.

Material e métodos: analisaram-se as membranas corioamnióticas (obtidas ao começo da labor de parto) de ratas com gravidezes programadas e sincronizadas. Determinou-se a coexistência e distribuição tissular da metaloproteínase da matriz extra-celular-3 (estro-melissina) nestes tecidos.

Resultados: identificou-se pela primeira vez a secreção e localização tissular da metaloproteínase de matriz extra-celular-3 nas membranas fetais. A metaloproteínase de matriz extra-celular-3 foi imuno-localizada na capa compacta do amnios e sua secreção (pelas membranas) se confirmou por electroforese, zimografia e Western blot. A través da microscopia confocal se confirió que a metaloproteínase de matriz extra-celular-3 localiza-se nos mesmos lugares que a metaloproteínase de matriz extra-celular-9.

Conclusões: A ruptura das membranas corioamnióticas relaciona-se com a expressão e atividade local das metaloproteínases de matriz extra-celular no amnios da rata: este elemento se adiciona ao processo bioquímico de ruptura pois a metaloproteínase de matriz extra-celular-3 é ativador da metaloproteínase de matriz extra-celular-9. É possível que a função desta enzima esteja implicada, de maneira principal, no processo de ruptura das membranas corioamnióticas durante o parto.

Palavras chave: rotura de membranas corioamnióticas, metaloprotease de matriz extra-celular-3, membrana fetal da rata.

Las membranas corioamnióticas o su equivalente en la rata (membranas corioalantoideas) son estructuras formadas fundamentalmente por tejido conectivo, cuya fuerza de unión se relaciona con las propiedades biofísicas de los principales componentes moleculares (fibras de colágeno, principalmente las de tipo I y III).¹ Cuando estos elementos estructurales se unen con proteoglicanos, fibronectinas,

lamininas y otros tipos de colágeno (tipos genéticos IV, V y VI), conforman la capa compacta del amnios que soporta la mayor parte de la fuerza del tejido.² En la actualidad, se acepta que la rotura de las membranas corioamnióticas durante el parto se relaciona con aumento en la actividad enzimática de las metaloproteinasas de matriz extracelular (familia de enzimas que tienen por sustratos diferentes componentes del tejido conectivo).³ Se han señalado diferentes estímulos que afectan a las células de las membranas. Éstos producen la secreción de metaloproteinasas e inician la degradación de la matriz extracelular; con ello se pierde el soporte estructural y la subsiguiente rotura de las membranas corioamnióticas.⁴ Diferentes investigadores han aportado pruebas que apoyan la coexistencia de estas enzimas en la membrana corioamniótica de diferentes especies (incluida la del humano), las cuales se expresan de manera importante al final de la gestación.⁵⁻⁸ Se sugiere que una de estas enzimas, denominada "metaloproteínase de matriz

* Este trabajo obtuvo el tercer lugar del Premio Dr. Eliseo Ramírez para trabajos científicos de investigación básica presentados por escrito en el 57 Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia.

** Dirección de investigación.

*** Departamento de tococirugía y urgencias. Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes.

Correspondencia: Dr. Felipe Vadillo Ortega. Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes. Montes Urales 800, colonia Lomas de Virreyes, CP 11000, México, DF. Tel: 5202-9381. E-mail: fvadillo@servidor.inper.edu.mx

La versión completa de este artículo también está disponible en internet: www.revistasmedicasmexicanas.com.mx

extracelular-9", está implicada de manera selectiva al momento del parto; por lo tanto, puede utilizarse como marcador bioquímico para este suceso.⁹ Una investigación en ratas analizó la expresión y actividad de las metaloproteinasas de matriz extracelular (2 y 9; gelatinasas) en las membranas corioamnióticas a diferentes etapas de la gestación. Ésta demostró que la metaloproteína de matriz extracelular-9 se expresaba y secretaba sólo en la etapa cercana al trabajo de parto. Hasta la fecha se ha identificado en estado de proenzima y se desconoce el o los mecanismos de activación durante el parto.¹⁰ Los resultados sugieren que la membrana corioamniótica (en un microambiente) expresa los mecanismos de activación enzimática que pueden estar relacionados con otros sucesos durante el trabajo de parto para producir la rotura de las membranas fetales.

Los mecanismos fisiológicos de activación de las metaloproteinasas de matriz extracelular son poco conocidos. Las enzimas descritas en otros sistemas incluyen un miembro de la misma familia denominada: "metaloproteína de matriz extracelular-3 o estromelisin." Las estromelisininas son un subgrupo de las metaloproteinasas que comprenden: estromelisin-1 (metaloproteína-3), estromelisin-2 (metaloproteína-10), estromelisin-3 (metaloproteína-11) y matrilisin (metaloproteína-7). Estas enzimas son capaces de degradar componentes de la matriz extracelular como colágeno tipo IV, laminina y proteoglicanos. Además, la estromelisin-1 interviene en la activación de las procólagenas (como la prometaloproteína de matriz extracelular-1¹¹ y la prometaloproteína de matriz extracelular-9¹²). La estromelisin-2 influye en la activación de la prometaloproteína-8;¹³ se ha demostrado que las células epiteliales producen matrilisin (enzima que degrada los componentes de la matriz extracelular, como los proteoglicanos, elastinas no solubles y fibronectinas).¹⁴

La actividad proteolítica de las metaloproteinasas (gelatinasas y estromelisininas de las membranas corioamnióticas) degrada los componentes que forman la matriz extracelular de la membrana basal e interrumpen su integridad. Al encontrarlas en este tejido, es posible plantear que las estromelisininas y las gelatinasas estén implicadas de diferentes for-

mas en el proceso de rotura de las membranas. El propósito de este trabajo fue identificar el grupo de metaloproteinasas en extractos de tejido de membranas corioamnióticas, horas antes de que inicie el trabajo de parto en la rata.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras biológicas

Se utilizaron ratas de 250 g de peso de la cepa Wistar. Los animales recibieron la misma alimentación y agua *ad libitum*. Se sincronizaron con ciclos de luz-oscuridad 12/12, lo que permitió tener animales con 21 días de gestación. Se realizaron frotis vaginales diarios a todas las ratas para dar seguimiento a su ciclo estral. Se formaron grupos de cuatro ratas hembras (en etapa de proestro) por un macho y permanecieron juntos durante 24 horas. Al momento de retirar al macho se realizó citología vaginal y las ratas con espermatozoides se consideraron en el día uno de gestación.

Las ratas se sacrificaron en el día 21, aproximadamente 12 horas antes del trabajo de parto (periparto). Las membranas fetales fueron colectadas y colocadas en solución amortiguadora (mM): trizma base 50, CaCl₂ 20, NaCl 150 y azida de sodio al 0.02%, pH 7.4.

Se preparó el extracto por homogenización en polytron (Brinkman Instruments, USA); en el que se realizaron las determinaciones que se describen adelante. El tratamiento de las muestras se hizo a 4°C. Los homogenizados se centrifugaron a 10,000 x g durante 15 minutos; se colectó el tejido para tratarse en solución amortiguadora (mM): trizma base 50, EDTA 40 mM, NaCl 150 y azida de sodio al 0.02%, pH 7.4. Se colectó el sobrenadante y la concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford.¹⁵ El estándar de referencia fue albúmina bovina.

Zimografía

Para identificar las proteínas con actividad de gelatinasas, las alícuotas de extractos de tejido se corrieron en geles de poliacrilamida-SDS al 8%, copolimerizados con 1% de gelatina.⁹ Se utilizó sistema con formato de minigel (Bio-Rad, Richmond, CA, USA). Se aplicaron 10 µg de proteína/carril en condiciones no desnaturizantes.

Después de la electroforesis se lavaron los geles con tritón X-100 al 2.5% (2 x 15 min) y se incubaron durante la noche a 37°C en (mM): trizma base 50, CaCl₂ 20, NaCl 150, pH 7.4. Los geles idénticos se incubaron con 1,10- de ortofenantrolina (80 mM). Al finalizar la incubación fueron teñidos con azul de Coomassie R-250 y destañados en ácido acético al 7.5% y metanol al 5%.

Cada corrida incluyó un carril con sobrenadante de la línea celular U-937 (como control de la actividad para la metaloproteinasa-9 y 2). Las zonas de actividad enzimática se observaron como bandas claras de lisis contra el fondo azul; éstas se analizaron por densitometría (equipo UVP Bioluminescence System; Upland, CA. USA).

Para identificar la actividad enzimática de la estromelina se utilizaron geles de poli(acrilamida)-SDS al 8% que tuvieron como sustrato caseína, a concentraciones finales de 1 mg/mL.¹⁶ Después de la electroforesis se aplicó el mismo procedimiento para los geles con gelatina. Se corrieron de manera simultánea patrones de peso molecular con rangos de 0 a 200 kDa.

Electroforesis SDS y Western blot

Los extractos de las membranas se analizaron con la aplicación de 5 µg de la proteína (por carril) en geles de poli(acrilamida)-SDS al 10% en condiciones reductoras. Al término de la corrida se hizo la tinción con azul de Coomassie R-250 y destañaron con ácido acético al 7.5% y metanol al 5%.

La transferencia de proteínas (PVDF; Amersham Biosciences, NJ, USA) a las membranas se realizó en un periodo de 18 horas a 40 V (4°C).¹⁷ El revelado de las membranas se hizo con anticuerpos monoclonales específicos para metaloproteinasa-3 (Ab-1) y metaloproteinasa-9 (Ab-3)(Calbiochem, La Jolla, CA). Los anticuerpos primarios se detectaron con los reactivos del equipo VectaStain ABC (Vector, Burlingame, CA).

En todas las pruebas se utilizaron (como control) las enzimas recombinantes purificadas, específicas para cada una de las metaloproteinasas de matriz extracelular (Calbiochem, La Jolla, CA). El análisis de las bandas se realizó por densitometría con UVP Bioluminescence System (Upland, CA).

Inmunohistoquímica

Las membranas corioamnióticas se cortaron por fragmentos y se fijaron en formol al 10%; se incluyeron en parafina para procesarse por inmunohistoquímica con la utilización de anticuerpos anti-MMP-9 y anti-MMP-3 mediante el método de detección Envision (Dako Envision System-Peroxidase. CA; USA).

Microscopía confocal

Los fragmentos de membranas corioamnióticas se lavaron con PBS (pH 7.4), se fijaron en formol al 10% y se incluyeron en parafina para procesarse por inmunohistoquímica fluorescente. Se realizó doble tinción de las membranas corioamnióticas; se utilizó la combinación de los anticuerpos primarios: anti-MMP-9 (marcado con isotiocianato de fluoresceína) y anti-metaloproteinasa-3 (Calbiochem[®] Biochemicals, La Jolla, CA). Este último se identificó con anticuerpos secundarios, marcados con Alexa fluor 568 (Molecular Probes, Eugene, Oregon). Las preparaciones se colocaron en el reactivo Vectashield (Vector Laboratories, England) con cubreobjetos y se analizaron por microscopía confocal (Axiowert 100 M, Carl Zeiss, Germany).

RESULTADOS

La detección de las metaloproteinasas (en los sobrenadantes de las membranas corioamnióticas) se realizó con diferentes sustratos. La figura 1A muestra el zimograma obtenido al correrse el extracto de las mem-

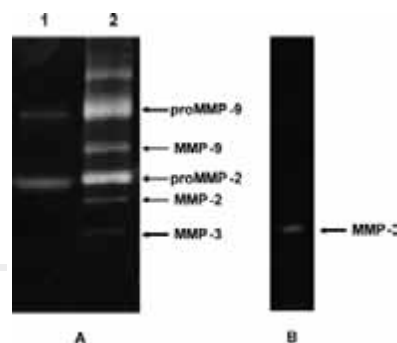


Figura 1. Alícuotas de los extractos de membranas corioamnióticas 12 horas antes del trabajo de parto, analizados por la técnica del zimograma. **Panel A.** Muestra la actividad obtenida sobre gelatina. El carril 1 corresponde a los marcadores de la actividad de la prometaloproteinasa-9 y prometaloproteinasa-2. El carril 2 muestra todas las metaloproteinasas que secretan las membranas corioamnióticas. **Panel B.** Se observa la misma muestra, corrida en gel de caseína (sustrato específico para la metaloproteinasa-3).

branas. Se observaron bandas con pesos moleculares de 92, 82, 72, 65 y 45 kDa (de acuerdo con el patrón de peso molecular y control de las células U-937). Las bandas corresponden a prometaloproteína-9, metaloproteína-9, prometaloproteína-2, metaloproteína-2 y metaloproteína-3. Se observaron también bandas de peso molecular elevado (115 kDa).

Para la detección de la última banda en el gel de gelatina (metaloproteína-3), la muestra se aplicó en gel de caseína (sustrato específico para esta enzima) y se observó la banda de lisis con mayor intensidad (figura 1). Las otras bandas mostraron poca actividad con este sustrato.

SDS-PAGE y Western blot

Las alícuotas de las membranas corioamnióticas se corrieron en geles de acrilamida. Estas mostraron bandas que, de acuerdo con el marcador de pesos moleculares, correspondieron a prometaloproteína-9, metaloproteína-9, prometaloproteína-2, metaloproteína-2 y metaloproteína-3 (figura 2A). La identificación de las metaloproteinasas se confirmó con el análisis de Western blot (figura 2B), en el cual se observó la banda correspondiente para la metaloproteína-3 en estado de proenzima.

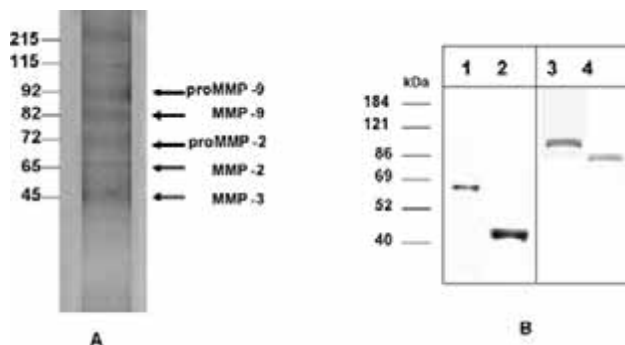


Figura 2. Panel A. 5 µg del extracto de membranas corioamnióticas se corrieron en geles de poliácridamida-SDS (en condiciones desnaturalizantes). En el gel se muestran las bandas obtenidas con sus pesos moleculares correspondientes. **Panel B.** Western blot de la misma muestra en el que se utilizaron anticuerpos monoclonales contra la metaloproteína-3 y 9. El carril 1 muestra la banda correspondiente para la prometaloproteína-3 y carril 2 corresponde a la metaloproteína-3. El carril 3 corresponde a la banda de proenzima de la metaloproteína-9 y el carril 4 muestra la banda para la enzima activa.

Se realizó el análisis densitométrico para efectos de cuantificación de las bandas cuyo fondo de la membra-

na se utiliza como blanco; el equipo asignó unidades de densidad a cada banda. La banda inmunorreactiva para la prometaloproteína-3 (figura 2B, carril 1) se observó cuatro veces más que la metaloproteína-3 (figura 2B, carril 2). La correlación entre proenzima y enzima activa para la prometaloproteína-9 fue de 2:1 (figura 2B; carril 3 y 4).

Inmunohistoquímica y microscopía confocal

En cada técnica se corrieron ensayos con fragmentos de membranas corioamnióticas para visualizar ambas enzimas. La figura 3A muestra las membranas corioamnióticas teñidas con hematoxilina y eosina. En la figura 3B y 3C se observa la inmunolocalización de la metaloproteína-3 y 9, respectivamente. Ambas enzimas se localizaron en la membrana basal y con mayor claridad en las células del amnios y corion. Estos resultados se verificaron con los cortes preparados para la microscopía confocal; la doble tinción fue positiva para las dos enzimas.

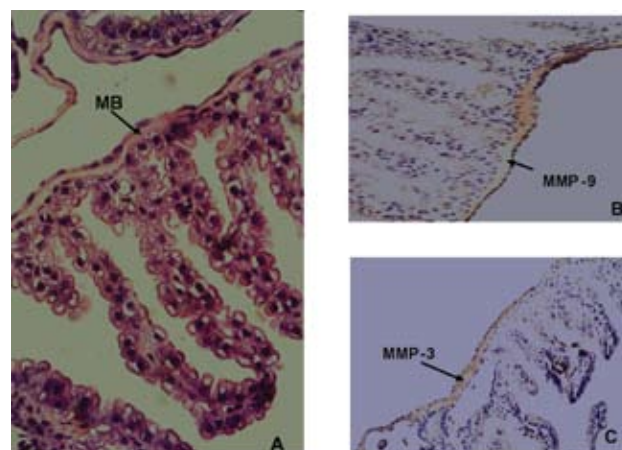


Figura 3. Análisis inmunohistoquímico de las membranas corioamnióticas, en el que se utilizaron anticuerpos para la metaloproteína-9 (panel B) y estromelina (metaloproteína-3; panel C). Muestra las dos enzimas en la membrana basal (MB). Las células de las membranas corioamnióticas muestran una señal muy débil. En el panel A se observa la estructura de las membranas corioamnióticas de la rata, teñidas con hematoxilina y eosina. (Ampliación de la fotografía 40X).

MMP-3 colocalizó con MMP-9, se observó la señal de forma clara en la membrana basal (figura 4D). La sensibilidad de esta técnica permite observar que las células de la membrana corioamniótica tienen cantidades menores de estas enzimas (figura 4B y 4C).

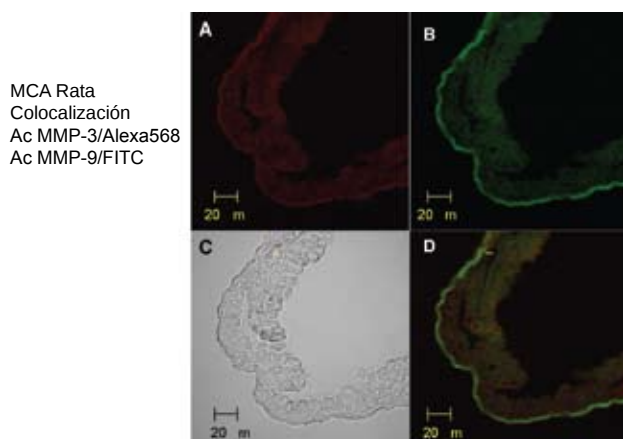


Figura 4. Microscopía confocal. Las membranas corioamnióticas se procesaron para analizarse con microscopía confocal. El panel A corresponde a la señal obtenida con el anticuerpo monoclonal anti-metaloproteinasas-3 (en color rojo). El panel B muestra la señal correspondiente a la anti-metaloproteinasas-9 (color verde). En el panel D se observa la señal obtenida en el tejido después de la aplicación de doble tinción para la búsqueda de ambas metaloproteinasas (color rojo y verde) en las membranas corioamnióticas. La señal en color amarillo-naranja corresponde a la confluencia de respuesta para ambos anticuerpos y muestra la ubicación de las metaloproteinasas en la membrana corioamniótica. El panel C corresponde a la microscopía de contraste de fase. Región de membrana corioamniótica que se procesó para la doble tinción. (Ampliación de la fotografía 63X).

DISCUSIÓN

La expresión de gelatinasas, estromelinas e inhibidores de las metaloproteinasas de matriz extracelular se ha observado en membranas fetales humanas.^{4,6,9,18,19} Por lo general, se les relaciona con infecciones intraamnióticas, cuya producción de enzimas (en la degradación la matriz extracelular) ocasiona el desequilibrio en la morfostasis tisular, aumento de la actividad proteolítica y en la mayor parte de los casos, rotura de las membranas. Este proceso se ha observado antes del término de la gestación y da origen a la rotura prematura de membranas.

Se ha comprobado que la metaloproteinasas-9 tiene función importante en el proceso bioquímico de la rotura de membranas; sin embargo, otras enzimas (como las estromelinas) intervienen en la reestructuración y degradación del tejido conectivo al utilizar diferentes vías. Las estromelinas degradan el colágeno tipo IV en las membranas basales e interrumpen la interacción entre las células del amnios y corion con

los componentes de la matriz extracelular. Además, intervienen directamente sobre los proteoglicanos, lamininas y elastinas, cuyas moléculas (en conjunto con las fibras de colágeno) proporcionan estabilidad estructural a la membrana.

Este estudio demuestra los resultados obtenidos en los extractos de la membrana corioamniótica de la rata. Se confirmó la secreción de las enzimas metaloproteinasas-2 y 9, además de otro miembro de las metaloproteinasas de la matriz extracelular que no se ha descrito en las membranas fetales: "la estromelina-1 o metaloproteinasas-3." Fue posible verificar su coexistencia por cuatro técnicas moleculares diferentes (zimografía en gelatina, caseína, SDS-PAGE y Western blot). Su identificación permite señalar que la metaloproteinasas-3 tiene función importante en la degradación de los componentes de la matriz extracelular y eventual reestructuración o destrucción de las membranas basales.

Varios reportes demuestran que la metaloproteinasas-3 es capaz de activarse a formas latentes de otras metaloproteinasas de la matriz extracelular. Esto abre la posibilidad de explicar los hallazgos relacionados con la metaloproteinasas-9 en estado de proenzima. Hasta hoy se desconocen los mecanismos implicados en el proceso de su activación durante el trabajo de parto.

En apoyo a la posible participación de la metaloproteinasas-3 en la activación de la metaloproteinasas-9 se encontró, mediante la técnica Western blot, que 12 horas antes del trabajo de parto existe mayor cantidad de la metaloproteinasas-3 en su forma activa, lo que coincide con la identificación de la mayor cantidad de la metaloproteinasas-9 tisular. Sólo durante el trabajo de parto puede detectarse en su forma activa. De acuerdo con el ensayo de inmunohistoquímica, las membranas corioamnióticas producen las metaloproteinasas-3 y 9. Éstas se secretan en la capa compacta donde hay mayor cantidad del sustrato, el cual debe degradarse para efectuar la rotura de las membranas.

Se ha demostrado, mediante otros modelos experimentales, que la metaloproteinasas-3 tiene función importante en el mecanismo de activación de la metaloproteinasas-9. Ogata y sus colaboradores²⁰ reportaron que la estromelina-1 reacciona con la gelatinasa de 92 kDa (metaloproteinasas-9) y la convierte a su forma

activa de 82 kDa. Por lo tanto, el microambiente de las membranas corioamnióticas (de ambas enzimas), hace posible su interacción para que la metaloproteínasa-9 se modifique de su estado de enzima latente a enzima activa.

Con esta información puede estudiarse el mecanismo que ocurre 12 horas antes del parto de la rata, con el propósito de identificar nuevas funciones relacionadas con la regulación del proceso de rotura de las membranas, el trabajo de parto normal o su participación alterada en la rotura prematura de las membranas corioamnióticas.

El uso de modelos animales permite conocer los mecanismos implicados en los tejidos humanos, que en comparación con los modelos animales, no es posible extraer muestras a diferentes tiempos de la gestación y del trabajo de parto.

REFERENCIAS

1. Malak TM, Ockleford CD, Bell SC, Dalglish, et al. Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V y VI and their ultrastructural organization in term fetal membranes. *Placenta* 1993;14:385-406.
2. Meinert M, Eriksen GV, Petersen AC, Helmiä RB, et al. Proteoglycans and hyaluronan in human fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184(4):679-85.
3. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Circ Res* 2003;92:827-39.
4. Vadillo OF, Hernández MA, Meraz CN, Monzón BF, et al. Participación de las metaloproteasas de matriz extracelular en la ruptura prematura de membranas fetales: un modelo fisiopatológico novedoso. *Ginec Obst Mex* 1992;60:79-85.
5. Maymon E, Romero R, Pacora P, Gervasi MT, et al. Evidence for the participation of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase 1) in preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:914-20.
6. Goldman S, Weiss A, Eyali V, Shalev E. Differential activity of the gelatinases (matrix metalloproteinases 2 and 9) in the fetal membranes and deciduas, associated with labour. *Mol Hum Rep* 2003;9:367-73.
7. Maymon E, Romero R, Pacora P, Gervasi MT, et al. Matrilysin (matrix metalloproteinase 7) in parturition, premature rupture of membranes, and intrauterine infection. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182:1545-53.
8. Angus SR, Segel SY, Hsu CD, to-cksmith GJ, et al. Amniotic fluid matrix metalloproteinase-8 indicates intra-amniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 2001;185:1232-8.
9. Vadillo Ortega F, González Ávila G, Furth EE, Lei H, et al. 92 kDa type-IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) activity in human amniochorion increases with labor. *Am J Pathol* 1995;146:148-56.
10. Meraz Cruz N, Molina DG, Vadillo Ortega F. Cambios secuenciales de metaloproteinasas de matriz extracelular durante la gestación y el trabajo de parto en el corioalantoides de la rata. *Rev Invest Clin* 2003;55:36-42.
11. Murphy G, Cockett MI, Stephens PE, Smith BJ, Docherty AJ. Stromelysin is an activator of procollagenase. A study with natural and recombinant enzymes. *Biochem J* 1987;248:265-8.
12. Shapiro SD, Fliszar CJ, Broekelmann TJ, Mecham RP, et al. Activation of the 92-kDa gelatinase by stromelysin and 4-aminophenyl-mercuric acetate. Differential processing and stabilization of the carboxyl-terminal domain by tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP). *J Biol Chem* 1995;270:6351-6.
13. Knauper V, Murphy G, Tschesche H. Activation of human neutrophil procollagenase by stromelysin-2. *Eur J Biochem* 1996;235:187-91.
14. Wilson CL, Matrisian LM. Matrilysin. An epithelial matrix metalloproteinase with potentially novel functions. *Int J Biochem Cell Biol* 1996;28:123-36.
15. 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;72:248-54.
16. Qin X, Garibay Tupas J, Chua PK, Cachola L, Bryant-Greenwood GD. An autocrine/paracrine role of human decidua relaxin. I. Interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) and tissue plasminogen activator. *Biol Rep* 1997;56:800-11.
17. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology* 1992;24:145-9.
18. Vettraino IM, Roby J, Tolley T, Parks WC. Collagenase-I, stromelysin-I, and matrilysin are expressed within the placenta during multiple stages of human pregnancy. *Placenta* 1996;17:557-63.
19. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Presence of four tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP-1,-2,-3,-4) in human fetal membranes. *Am J Reprod Immunol* 1998;40:395-400.
20. Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H. Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase-9. *J Biol Chem* 1992;267:3581-4.