



Identificación del perfil de metaloproteasas de matriz extracelular en membranas corioamnióticas de embarazos a término y pretérmino mediante microarreglos solubles*

Nardhy Gómez López,* Guadalupe Estrada Gutiérrez,* Jorge Beltrán Montoya,** Aurora Espejel Núñez,* Felipe Vadillo Ortega*

Nivel de evidencia: II-3

RESUMEN

Antecedentes: la rotura fisiológica y patológica de las membranas es un fenómeno complejo con diversos procesos bioquímicos, se sabe que en membranas de tejidos a término la actividad colagenolítica aumenta y el contenido de colágena disminuye respecto de las pretérmino. La identificación de estos procesos en el mecanismo de rotura permitió proponer que las membranas fetales y la decidua pueden responder a estímulos bioquímicos y mecánicos, y producir mediadores que degradan la matriz extracelular de las membranas.

Objetivo: identificar simultáneamente, mediante microarreglo soluble, diferentes metaloproteasas de matriz extracelular en extractos de membranas corioamnióticas de embarazos a término y pretérmino.

Pacientes y métodos: mediante estudio biomédico experimental se obtuvieron explantes de membranas corioamnióticas de cuatro grupos de mujeres (n = 6). Grupo 1: a término sin trabajo de parto espontáneo; grupo 2: a término con trabajo de parto espontáneo; grupo 3: a término con rotura prematura de membranas, y grupo 4: con parto pretérmino. Los explantes se incubaron durante 24 h, se homogeneizaron y filtraron. En los extractos simultáneamente hubo MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 12 y 13.

Resultados: las metaloproteasas más abundantes en todos los extractos de membranas corioamnióticas fueron la 8 y la 2. Sin embargo, la concentración de la 8 en el grupo 3 fue significativamente mayor respecto de los grupos 1 y 2 ($p = 0.01$), y mayor en el grupo 4 respecto del grupo 1 ($p = 0.01$).

Conclusiones: la activación de los procesos celulares que ocasionan la colagenólisis de las membranas corioamnióticas bajo condiciones fisiológicas es diferente en los casos de rotura prematura de membranas o parto pretérmino, y se caracteriza por altas concentraciones de MMP-8.

Palabras clave: microarreglo soluble, rotura de membranas, rotura prematura de membranas, metaloproteasas de matriz extracelular, membranas corioamnióticas.

ABSTRACT

Background: Physiological and pathological membrane rupture is a complex phenomenon with different biochemical processes; it is known that collagenolytic activity rises and collagen content diminishes within term tissue membranes in comparison to preterm membranes. Identification of these processes within rupture mechanism allows to suggest that fetal membranes and decidua can respond to biochemical and mechanical stimulus alike, and to produce mediators that degrade matrix of intracellular membranes.

Objective: To identify simultaneously, with a soluble microarray, different matrix metalloproteinases in extracts from amniochorion of pregnancies at term and preterm.

Patients and methods: Biomedical experimental study where amniochorion explants were obtained from four women groups. Group 1: at term with spontaneous labor; group 2: at term without labor; group 3: at term with premature rupture of membranes, and group 4: preterm labor. Explants were cultured for 24 h and then homogenized in their own culture media to obtain cell free extracts. MMP were identified in these extracts using a soluble microarray for MMPs that included: MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -12 and -13.

Results: MMP-8 and -2 were the enzymes most abundant in all the extracts of amniochorion. However, the concentration of MMP-8 in the extracts of group 3 (PROM) was significantly greater in comparison with the extracts of groups 1 and 2 ($p = 0.01$). The MMP-8 also was in greater concentration in the extracts of group 4 (preterm labor) in comparison with in the extracts of group 1 ($p = 0.01$).

Conclusion: Activation of cellular processes that lead to the degradation of connective tissue in the MCA under physiological conditions seems to defer in originating tissues from cases with PROM or preterm labor, and this activation is characterized by an increase in the concentration of MMP-8.

Key words: soluble microarray, rupture of membranes, premature rupture of membranes, matrix metalloproteinases, chorioamniotic membranes.

RÉSUMÉ

Antécédents : la rupture physiologique et pathologique des membranes est un phénomène complexe comportant des procès biochimiques divers, on sait que dans des membranes de tissus à terme l'activité collagène-lytique augmente et le contenu de collagène diminue au respect des avant-terme. L'identification de ces procès dans le mécanisme de rupture a permis de proposer que les membranes fœtales et la caduque peuvent répondre à des stimulus biochimiques et mécaniques et produire des médiateurs qui dégradent la matrice extracellulaire des membranes.

Objectif : identifier simultanément au moyen des puces à ADN solubles des différentes métaloprotéases de matrice extracellulaire en extraits des membranes chorioamniotiques de grossesses à terme et avant-terme.

Matériel et méthodes : au moyen d'étude biomédicale expérimentale on a obtenu des explants de MCA de quatre groupes de femmes ($n = 6$). Groupe 1 : à terme sans travail spontané, groupe 2 : à terme avec travail spontané, groupe 3 : à terme avec rupture prématurée des membranes et groupe 4 : avec accouchement avant-terme. Les explants ont été incubés pendant 24 h, ils ont été homogénéisés et filtrés. Dans les extraits il y a eu simultanément MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 12 et 13.

Résultats : les MMP les plus abondantes dans tous les extraits de MCA ont été la 8 et la 2. Cependant, la concentration de la 8 dans le groupe 3 a été significativement majeure au respect des groupes 1 et 2 ($p = 0.01$) et majeur dans le groupe 4 au respect du groupe 1 ($p = 0.01$).

Conclusions : l'activation des procès cellulaires qui provoquent la collagénolyse des MCA sous conditions physiologiques est différente dans les cas de RPM ou accouchement avant-terme et se caractérise par de hautes concentrations de MMP-8.

Mots-clés : puces à ADN solubles, rupture des membranes, rupture prématurée des membranes, métaloprotéases de matrice extracellulaire, membranes chorioamniotiques.

RESUMO

Antecedentes: A quebra fisiológica e patológica das membranas é um fenômeno complexo com diversos processos bioquímicos, sabe-se que em membranas de tecidos em términos da atividade colagenolítica aumenta e em pretérmino o conteúdo de colágeno diminui. A identificação desses processos em mecanismo de quebra permitiu propor que as membranas fetais e a decidua podem responder a estímulos bioquímicos e mecânicos, e produzir mediadores que degradam a matriz extracelular das membranas.

Objetivo: Identificar simultaneamente mediante micro reparo solúvel, diferentes metaloprotease de matriz extracelular em extratos de membranas corioamnióticas de gravidez em término e pretérmino.

Material e métodos: Através de estudo biomédico experimental obtiveram níveis de membranas corioamnióticas de quatro grupos de mulheres ($n = 6$). Grupo 1: em término sem trabalho de parto espontâneo; grupo 2: em término com trabalho de parto espontâneo; grupo 3: em término com quebra prematura de membranas; e grupo 4: com parto pretérmino. Os níveis foram incubados durante 24 horas, homogenizado e filtrado. Nos extratos tiveram MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 12 e 13, simultaneamente.

Resultados: Metaloprotease mais abundantes em todos os extratos de membranas corioamnióticas foram na 8 e na 2. Entretanto a concentração da 8 do grupo 3 foi significativamente maior em relação dos grupos 1 e 2 ($p = 0,01$), e maior no grupo quatro em relação ao grupo 1 ($p = 0,01$).

Conclusões: A ativação dos processos celulares que ocasionam a colagenólise das membranas corioamnióticas baixo condições fisiológicas é diferente nos casos de quebra prematura de membranas ou parto pretérmino, e caracteriza-se por altas concentrações de MMP-8.

Palavras-chave: micro reparo solúvel, quebra de membranas, quebra prematura de membranas, metaloprotease de matriz extracelular, membranas corioamnióticas.

- Este trabajo obtuvo el primer lugar del Premio Dr. Eliseo Ramírez otorgado por la Federación Mexicana de Ginecología y Obstetricia a los trabajos de investigación básica presentados en el 58 Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia celebrado en Monterrey, NL, octubre 2007. Se realizó con apoyo del Fondo Sectorial de Salud de CONACyT (Proyecto 7036).
- * Dirección de investigación.
- ** Departamento de especialidades médicas.
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

Este artículo debe citarse como: Gómez LN, Estrada GG, Beltrán MJ, Espejel NA, Vadillo OF. Identificación del perfil de metaloproteasas de matriz extracelular en membranas corioamnióticas de embarazos a término y pretérmino mediante microarreglos solubles. Ginecol Obstet Mex 2008;76(1):32-37.

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

Las membranas corioamnióticas o fetales son tejidos extraembrionarios, y constituyen el contenedor estéril que permite el crecimiento y desarrollo normal del feto y lo aíslan durante la gestación. Esta estructura funciona, además, como una importante barrera inmunológica y como sitio altamente especializado que permite la interacción entre madre y feto mediada por señales autocrinas y paracrinas en ambas direcciones. Las membranas están formadas por dos tejidos superpuestos (amnios y corion) que funcionan como una unidad estructural y funcional, están compuestos de distintos tipos celulares, incluidas células epiteliales, mesenquimatosas, inmunológicas y trofoblastos, embebidos en una matriz extracelular, que les proporciona sus propiedades biomecánicas y cuyo principal componente es la colágena. La composición específica señala que la colágena

intersticial, tipos I y III con pequeñas cantidades de tipos V, VI y VII, provee la mayor fuerza de tensión a estas estructuras. Sin embargo, la colágena de tipo IV distribuida en las distintas capas histológicas de las membranas conforma un contenedor tridimensional de las fibras de colágena tipos I y III. Esta composición y arreglo de la colágena le confiere a las membranas sus características de extensibilidad, elasticidad y retracción, que son fundamentales para el mantenimiento del feto hasta el final de la gestación.^{1,2}

La rotura de las membranas corioamnióticas, en forma sincrónica con las contracciones uterinas y la dilatación y el borramiento del cuello uterino, es un evento que se manifiesta en conjunto para facilitar la expulsión del feto; sin embargo, en algunas mujeres las membranas se rompen en ausencia de todos los demás eventos que caracterizan al trabajo de parto (rotura prematura de membranas). En la actualidad se ha demostrado que la rotura de las membranas, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, representa un fenómeno complejo que involucra diversos procesos bioquímicos entre los que se encuentran la secreción de diversos mediadores de inflamación y la alteración de la estructura de la colágena que les da soporte. En las membranas provenientes de tejidos a término la actividad colagenolítica está aumentada, y como consecuencia el contenido de colágena disminuye en relación con las membranas pretérmino.³⁻⁵ La identificación de estos procesos, en el mecanismo de rotura, ha permitido proponer que las membranas fetales y la decidua pueden responder a estímulos bioquímicos y mecánicos, para producir mediadores, como prostaglandinas, citocinas y enzimas que degradan la matriz extracelular de las membranas.^{4,6,7}

Las metaloproteasas de matriz extracelular (MMP, *matrix metalloproteinases*) son enzimas dependientes de iones como Ca^{2+} y Zn^{2+} .⁸ Estas enzimas pueden subagruparse estructuralmente, de acuerdo con la homología que muestran en sus dominios y con la especificidad por su sustrato, en colagenasas, gelatinasas, estromelisin, metaloproteasas de matriz tipo membrana (MT-MMP, *membrane-type matrix metalloproteinases*) y otras MMP, donde se encuentran enzimas que aún no han sido completamente caracterizadas.⁹ En la bibliografía se ha reportado la participación de diversas metaloproteasas, como las 1, 2, 3, 8, 9, 10 y 11, como constituyentes fisiológicos del microambiente que rodea a las membranas, y algunas de ellas vinculadas con casos de rotura prematura de membranas pretérmino.^{2,10}

El objetivo de este trabajo fue identificar simultáneamente diferentes metaloproteasas en extractos de membranas corioamnióticas mediante un microarreglo soluble (microesferas unidas a anticuerpos específicos) y encontrar la relación de su concentración con el trabajo de parto en condiciones fisiológicas y patológicas.

PACIENTES Y MÉTODOS

Pacientes

En la Unidad de Tococirugía del Instituto Nacional de Perinatología se obtuvieron membranas corioamnióticas de mujeres sin hallazgos clínicos o microbiológicos, o ambos, de infección con las siguientes características:

Grupo 1. Embarazos de 37 a 40 semanas de gestación con indicación de operación cesárea en los que se comprobó ausencia de trabajo de parto espontáneo.

Grupo 2. Embarazos de 37 a 40 semanas de gestación con trabajo de parto espontáneo.

Grupo 3. Embarazos de 37 a 40 semanas con rotura prematura de membranas corioamnióticas, sin importar la vía de resolución.

Grupo 4. Embarazos con trabajo de parto pretérmino, sin importar la vía de resolución.

Metodología

Obtención de extractos de membranas corioamnióticas

En la sala de expulsión, inmediatamente después de ser extraída la placenta, se tomó una muestra de toda la superficie de las membranas corioamnióticas, para análisis microbiológico y descartar infección. Las membranas corioamnióticas se transportaron al laboratorio en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con antibiótico-antimicótico al 1%, y una vez ahí y en condiciones de esterilidad se lavaron con solución salina fisiológica, se extendieron sobre una superficie plana y se hicieron explantes de 45 cm² que se cultivaron en 45 mL de DMEM complementado con 1% de piruvato de sodio y 1% de antibiótico-antimicótico. Después de esta incubación, los explantes se homogenizaron con un Polytron (KINEMATICA AG) en su medio condicionado, se centrifugaron a

4,000 rpm durante dos horas, se filtraron con una membrana de 0.22 μ (CORNING) y se conservaron a -20 °C hasta su uso.

Cuantificación de las metaloproteasas de matriz extracelular en los extractos de las membranas corioamnióticas

En los extractos de membranas corioamnióticas se identificaron diferentes metaloproteasas por medio de un microarreglo soluble de microesferas unidas a anticuerpos anti metaloproteasas, Bio-Plex™ Suspension Array System (Bio-Rad Laboratories). Con este microarreglo se pueden detectar ocho metaloproteasas: 1, 2, 3, 7, 8, 9, 12 y 13, mediante microesferas unidas a anticuerpos específicos y a fluorocromos. Cuando las metaloproteasas están unidas a su anticuerpo específico, el fluorocromo (ficoeritrina) se excita con un láser de 532 nm y se captura la luz emitida, a mayor fluorescencia mayor concentración de la metaloproteasa en la muestra. Las diferencias de intensidad de la fluorescencia de cada metaloproteasa permiten cuantificar la concentración de cada una de estas moléculas por fluorometría.

Análisis estadístico

Los datos no tuvieron distribución normal, por lo que se utilizaron pruebas no paramétricas (U de Mann-Whitney) para evaluar diferencias estadísticas.

RESULTADOS

Los resultados del microarreglo soluble anti metaloproteasas mostraron que en los cuatro grupos de estudio las metaloproteasas más abundantes en los extractos de membranas corioamnióticas fueron la 8 y la 2. Sin embargo, la concentración de metaloproteasa 8 en los extractos de membranas corioamnióticas provenientes de tejidos a término con rotura prematura de membranas fue significativamente mayor en comparación con los extractos de membranas corioamnióticas de tejidos a término, sin y con trabajo de parto ($p = 0.01$ en ambos casos). La metaloproteasa 8 también tuvo mayor concentración en los extractos de membranas corioamnióticas provenientes de tejidos pretérmino en comparación con los extractos de membranas corioamnióticas de tejidos a término sin trabajo de parto ($p = 0.01$, figura 1).

DISCUSIÓN

El mecanismo molecular que desencadena la rotura de las membranas corioamnióticas en condiciones fisiológicas y patológicas, aún no está totalmente establecido. Sin embargo, se ha demostrado que este episodio es muy complejo y comprende distintos procesos bioquímicos, principalmente la degradación de la matriz extracelular por las metaloproteasas de matriz extracelular.¹¹

Se sabe que la metaloproteasa 1 es una enzima que constituye fisiológicamente al líquido amniótico, y el incremento en su concentración se asocia con casos de rotura prematura de membranas pretérmino.¹⁰ En nuestro estudio no hubo diferencias significativas entre los grupos de estudio; sin embargo, hay tendencia a encontrarla en mayor concentración en los extractos de tejidos con rotura prematura de membranas y parto pretérmino.

La MMP-2 se encuentra en concentraciones constantes en el líquido amniótico y en los tejidos gestacionales a lo largo del embarazo, su expresión no tiene variaciones en las membranas corioamnióticas a término o pretérmino y se ha localizado en el amnios, en la capa de trofoblasto del corion y en la decidua.^{12,13} En nuestro estudio tampoco se encontraron variaciones en la concentración de esta enzima, y por ello se considera que no tiene participación en los procesos de degradación del tejido conectivo relacionados con el trabajo de parto.

La expresión de MMP-3 y MMP-7, junto con otras estromelisinases, se ha comprobado en membranas fetales, placenta y líquido amniótico, por lo que se considera que estas enzimas son capaces de degradar componentes de la matriz extracelular, incluidas la colágena tipo IV, laminina, elastina y los proteoglicanos.¹⁴ En nuestro análisis no se comprobaron cambios significativos de MMP-3 o MMP-7 al activarse el trabajo de parto, ni en las condiciones de rotura prematura de membranas y parto pretérmino.

En su mayor parte la MMP-8 es producida por células del corion en las membranas fetales; sin embargo, se sabe que su concentración aumenta hasta en cinco veces en los tejidos de mujeres con trabajo de parto, respecto de los de aquellas sin trabajo de parto, y también que durante el trabajo de parto aumenta la expresión del ARNm de esta enzima.¹⁵ Nuestros resultados no confirman estos hallazgos, y aunque existe un incremento en la cantidad de metaloproteasa 8 detec-

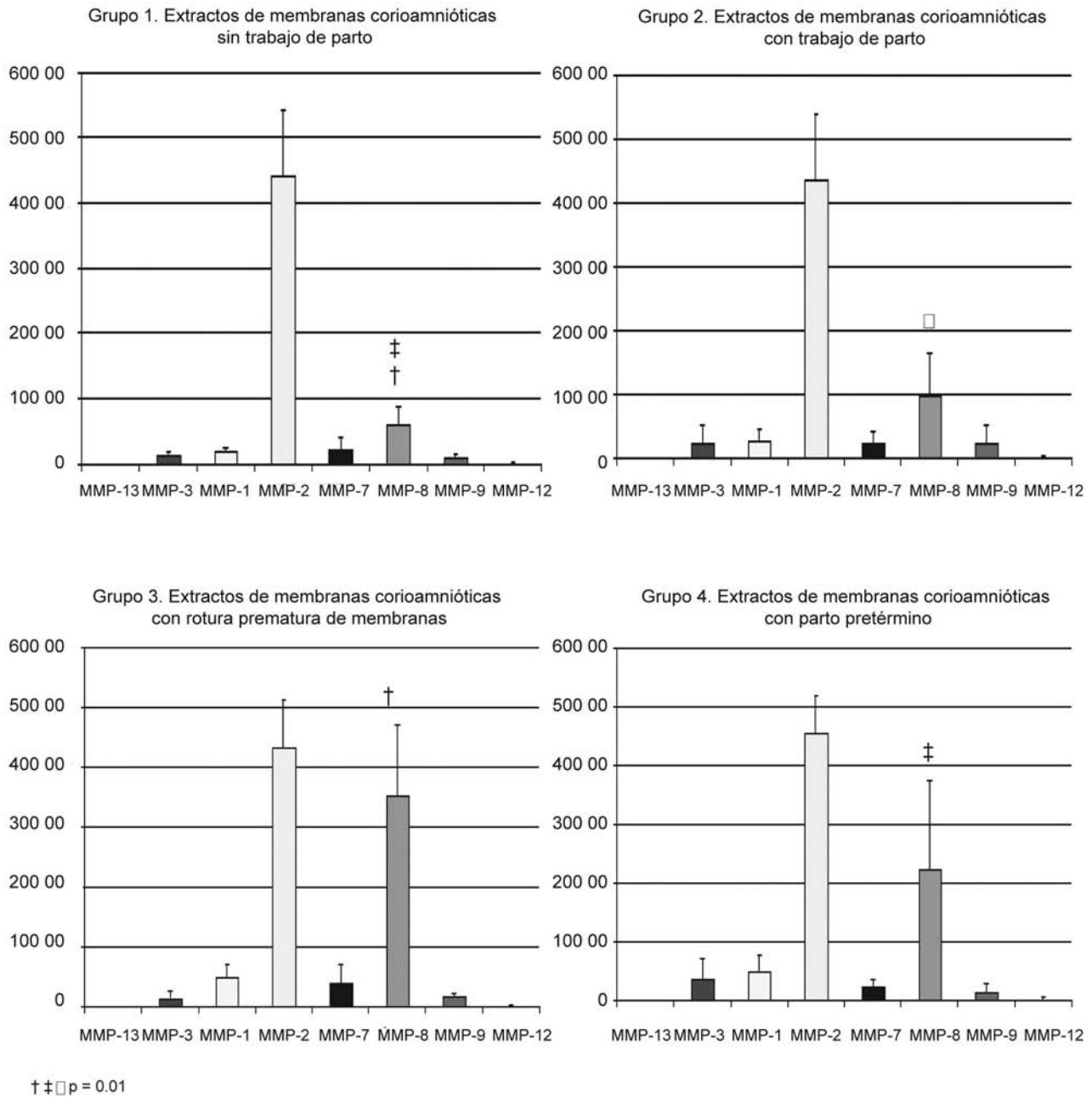


Figura 1. Microarreglo soluble de microesferas unidas a anticuerpos anti metaloproteasas (Bio-Plex™ Suspension Array System). Las metaloproteasas 8 y 2 fueron las dos enzimas más abundantes en todos los extractos de membranas corioamnióticas. Sin embargo, la metaloproteasa 8 se encontró en mayor concentración en los extractos con rotura prematura de membranas y parto pretérmino respecto de los demás grupos. Las barras representan el promedio de los datos y la DE ($n = 6$, cada grupo).

tada en los extractos de las membranas con trabajo de parto, no es significativo. No obstante, al compararse los extractos de las membranas afectadas con rotura prematura de membranas y parto pretérmino con los de sin trabajo de parto, sí hubo diferencias.

Tanto en el epitelio amniótico como en el corion se ha comprobado la expresión de la metaloproteasa 9; sin embargo, se sabe que ésta aumenta en el momento del trabajo de parto. También se han relacionado concentraciones elevadas de esta enzima en el líquido

amniótico durante el trabajo de parto y la rotura prematura de membranas.^{5,11,16} Nuestros resultados no arrojaron diferencias en las concentraciones de esta enzima en cualquiera de las condiciones exploradas, lo que pudo deberse a que la metaloproteasa 9 es capaz de formar un complejo estable imposible de disociarse en las condiciones en que fue preparado el extracto.

La metaloproteasa 12 es producida principalmente por macrófagos y se ha asociado con diversas enfermedades, no obstante, se conoce poco de esta enzima en los tejidos gestacionales.¹⁷ En el presente estudio se encontró en concentraciones muy bajas y sin diferencias entre los grupos, lo que explica su poca o nula relevancia en el embarazo.

La metaloproteasa 13 es expresada y producida por las membranas fetales y es un constituyente fisiológico del líquido amniótico. Esta enzima no se ha vinculado con el parto pretérmino.¹⁸ En nuestro sistema esta enzima no se detectó en ninguno de los cuatro grupos de trabajo, lo que se contrapone con lo descrito en la bibliografía.

CONCLUSIÓN

Las membranas corioamnióticas y las células inmunitarias infiltradas en estos tejidos podrían participar en la rotura de las membranas, al producir e inducir la producción de metaloproteasas y otros mediadores, por esto es relevante cuantificar las metaloproteasas secretadas por las membranas corioamnióticas.

En este estudio se analizó de manera simultánea la concentración relativa de todas las metaloproteasas relevantes para la degradación del tejido conectivo del corioamnion en cuatro condiciones diferentes asociadas con el trabajo de parto normal o anormal. El uso de estas técnicas proteómicas confiere un enfoque que hasta ahora no se había intentado en el análisis de secreciones complejas, que permite vislumbrar en el futuro inmediato su utilización en el estudio clínico del problema del parto pretérmino y la rotura prematura de membranas. Así se podrá intentar el análisis de la composición del perfil de este grupo de enzimas en secreciones cervicovaginales para, con un enfoque más amplio, proponer el uso de perfiles de este tipo de moléculas en la identificación de la progresión normal y anormal del trabajo de parto.

REFERENCIAS

1. Bryant-Greenwood GD. The extracellular matrix of the human fetal membranes: structure and function. *Placenta* 1998;19(1):1-11.
2. Parry S, Strauss JF. Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med* 1998;338(10):663-70.
3. Vadillo OF, Bermejo ML, Pfeffer F. Ruptura prematura de membranas: mecanismos de la enfermedad. *Perinatol Reprod Hum* 1994;8(4):180-9.
4. Vadillo-Ortega F, Gonzalez-Avila G, Furth EE, et al. 92-kd type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) activity in human amnio-chorion increases with labor. *Am J Pathol* 1995;146(1):148-56.
5. Vadillo-Ortega F, Hernandez A, Gonzalez-Avila G, et al. Increased matrix metalloproteinase activity and reduced tissue inhibitor of metalloproteinases-1 levels in amniotic fluids from pregnancies complicated by premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174(4):1371-6.
6. Lamont RF, Rose M, Elder MG. Effect of bacterial products on prostaglandin E production by amnion cells. *Lancet* 1985;2(8468):1331-3.
7. Svanborg C, Godaly G, Hedlund M. Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence. *Curr Opin Microbiol* 1999;2(1):99-105.
8. Fata JE, Ho AT, Leco KJ, Moorehead RA, Khokha R. Cellular turnover and extracellular matrix remodeling in female reproductive tissues: functions of metalloproteinases and their inhibitors. *Cell Mol Life Sci* 2000;57(1):77-95.
9. McCawley LJ, Matrisian LM. *Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!* *Curr Opin Cell Biol* 2001;13(5):534-40.
10. Maymon E, Romero R, Pacora P, et al. Evidence for the participation of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase 1) in preterm premature rupture of the membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183(4):914-20.
11. Vadillo-Ortega F, Gonzalez-Avila G, Karchmer S, Cruz NM, Ayala RA, Lama MS. Collagen metabolism in premature rupture of amniotic membranes. *Obstet Gynecol* 1990;75(1):84-88.
12. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Collagenolytic enzymes (gelatinases) and their inhibitors in human amniochorionic membrane. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177(4):731-41.
13. Xu P, Alfaiy N, Challis JR. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in human placenta and fetal membranes in relation to preterm and term labor. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(3):1353-61.
14. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Stromelysins in placental membranes and amniotic fluid with premature rupture of membranes. *Obstet Gynecol* 1999;94(3):435-40.
15. Arechavaleta-Velasco F, Marciano D, Diaz-Cueto L, Parry S. Matrix metalloproteinase-8 is expressed in human chorion during labor. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190(3):843-50.
16. Harirah H, Donia SE, Hsu CD. Amniotic fluid matrix metalloproteinase-9 and interleukin-6 in predicting intra-amniotic infection. *Obstet Gynecol* 2002;99(1):80-4.
17. Shapiro SD, Kobayashi DK, Ley TJ. Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *J Biol Chem* 1993;268(32):23824-9.
18. Fortunato SJ, LaFleur B, Menon R. Collagenase-3 (MMP-13) in fetal membranes and amniotic fluid during pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2003;49(2):120-5.