

Evidencia de que las subpoblaciones de leucocitos periplacentarios al término de la gestación poseen propiedades funcionales relacionadas con la inducción del trabajo de parto*

Arturo Flores Pliego,* Jorge Beltrán Montoya,** Nardhy Gómez López,* Felipe Vadillo Ortega*

Nivel de evidencia: II-3

RESUMEN

Antecedentes: el aumento de la actividad colagenolítica en las membranas fetales, vinculado con la rotura prematura, se ha relacionado con actividad anormal de las metaloproteasas de matriz extracelular secretadas al espacio extracelular en forma de enzimas inactivas, que deben activarse para degradar selectivamente sus componentes.

Objetivo: analizar las propiedades funcionales de las subpoblaciones de leucocitos provenientes de la circulación de la placenta.

Material y métodos: estudio biomédico experimental en el que se cultivaron leucocitos de la circulación de la placenta y de sangre periférica durante 96 horas, de mujeres con embarazo a término sin trabajo de parto. Las subpoblaciones de leucocitos fueron inmunotipificadas por citometría de flujo. Los medios del cultivo fueron analizados con zimografía y el perfil de actividad enzimática de los medios se evaluó en presencia de inhibidores de proteasas.

Resultados: los leucocitos de la placenta se componen de linfocitos T, NK, B y monocitos, se comprobó aumento progresivo de la secreción de MMP-9 inactiva (92 kDa) y activación de la MMP-9 a una forma de 82 kDa desde las 48 horas. El perfil enzimático mostró predominio de metaloproteasas.

Conclusiones: los leucocitos que se encuentran en la sangre de la placenta mostraron capacidades funcionales diferentes a los de la circulación periférica de las embarazadas. Los leucocitos periplacentarios, casi todos linfocitos T, se caracterizan por capacidad específica para secretar y activar MMP-9, enzima que participa en la degradación de las membranas fetales. Esto sugiere que en el entorno de la placenta se reclutan células especializadas en la inducción de cambios relacionados con el trabajo de parto.

Palabras clave: placenta, leucocitos, MMP-9.

ABSTRACT

Background: The rise of collagenolytic activity in fetal membranes, associated to premature rupture, have been related to abnormal activity of the extracellular matrix metalloproteinases discharged to the extracellular space as inactive enzymes that have to be activated to selectively degrade its components.

Objective: To analyze the functional properties of leukocytes subpopulations coming from the placental circulation.

Material and methods: Biomedical experimental study in which placental and outlying blood leukocytes were cultivated during 96 hours, from women with pregnancy to term without labor. Leukocytes subpopulations were stained by flow cytometry. Culture media were analyzed with zymography and enzymatic activity profile was evaluated in presence of proteases inhibitors.

Results: Placental leukocytes are composed of T-, NK- and B-lymphocytes, and monocytes; it was documented a progressive increase of inactive MMP-9 secretion (92 kDa), accompanied by an 82 kDa form MMP-9 activation since 48 hours. Enzymatic profile mainly showed metalloproteasas.

Conclusions: Placental blood leukocytes showed functional capacities different from those that circulate in pregnant women's outlying circulation. Placental leukocytes, mainly T-lymphocytes, are characterized by the specific capacity to secrete and activate MMP-9; an enzyme that participates in fetal membranes degradation. It suggests that in placental surroundings are recruited cells specialized in labor changes induction.

Key words: placenta, leukocytes, MMP-9.

RÉSUMÉ

Antécédents : l'augmentation de l'activité collagène-lytique dans les membranes fœtales, attachée à rupture prématuée, a été liée avec l'activité anormale des métalloprotéases de matrice extracellulaire sécrétées à l'espace extracellulaire sous forme d'enzymes inactives et qui doivent être activées pour dégrader sélectivement leurs composantes.

Objectif : faire l'analyse des propriétés fonctionnelles des sous-populations de leucocytes provenant de la circulation du placenta.

Matériel et méthodes : étude biomédicale expérimentale dans laquelle on a cultivé des leucocytes de la circulation du placenta et du sang périphérique pendant 96 heures, de femmes avec grossesse à terme sans travail. Les sous-populations de leucocytes ont été identifiées par cytométrie en flux. Les milieux de culture ont été analysés avec zymographie et le profil d'activité enzymatique des milieux a été évalué en présence d'inhibiteurs de protéases.

Résultats : les leucocytes du placenta sont composés de lymphocytes T, NK, B et monolithes, on a prouvé augmentation progressive de la sécrétion de MMP-9 inactive (92 kDa) et activation de la MMP-9 à une forme de 82 kDa depuis les 48 heures. Le profil enzymatique a montré prédominance de métalloprotéases.

Conclusions : les leucocytes qui se trouvent dans le sang du placenta ont montré des capacités fonctionnelles différentes à ceux de la circulation périphérique des gestantes. Les leucocytes périplacentaires, presque tous lymphocytes T, sont caractérisés par capacité spécifique pour sécréter et activer MMP-9, enzyme qui participe de la dégradation des membranes fœtales. Ceci suggère que dans l'entourage du placenta sont recrutés des cellules spécialisées dans l'induction des changements liés au travail.

Mots-clés : placenta, leucocytes, MMP-9.

RESUMO

Antecedentes: O aumento da atividade colagenolítica nas membranas fetais, vinculado com a quebra prematura, está relacionado com a atividade anormal dos metilprotease de matriz extracelular secretadas ao espaço extracelular em forma de enzimas inativas, que se devem ativar para degradar selectivamente seus componentes.

Objetivo: Analisar as propriedades funcionais das subpopulações de leucócitos provenientes da circulação da placenta.

Material e métodos: Estudo biomédico experimental em que foi cultivado leucócito da circulação da placenta e do sangue periférico durante 96 horas, de mulheres com gravidez em término sem trabalho de parto. As subpopulações de leucócitos foram imunotipificadas por citometria de fluxo. Os meios de cultivo foram analisados com cimografia e o perfil de atividade enzimática dos meios foi avaliado com a presença de inibidores de proteases.

Resultados: Os leucócitos da placenta compõem-se de linfócitos T, NK, B e monócitos, que se comprovou um aumento progressivo da secreção de MMP-9 inativa (92 kDa) e ativação da MMP-9 a uma forma de 82 kDa desde 48 horas. O perfil enzimático mostrou predomínio de metilprotease.

Conclusões: Os leucócitos que se encontram no sangue da placenta mostraram capacidades funcionais diferentes das da circulação periférica das grávidas. Os leucócitos periplacentários, quase todos linfócitos T, se caracterizam por uma capacidade específica para secretar e ativar MMP-9, enzima que participa na degradação das membranas fetais. Isto sugere que o ambiente da placenta recluta células especializadas na indução de mudanças relacionadas com o trabalho de parto.

Palavras-chave: placenta, leucócitos, MMP-9.

- Este trabajo obtuvo el tercer 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: Flores PA, Beltrán MJ, Gómez LN, Vadillo OF. Evidencia de que las subpoblaciones de leucocitos periplacentarios al término de la gestación poseen propiedades funcionales relacionadas con la inducción del trabajo de parto. Ginecol Obstet Mex 2008;76(1):45-51.

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

El parto humano es resultado de múltiples sucesos fisiológicos que incluyen, al menos, la sincronización de las contracciones uterinas, la dilatación cervical y, finalmente, la rotura de las membranas fetales que, en conjunto, permiten el nacimiento del feto. No obstante, es posible que estas membranas se rompan sin los eventos mencionados, lo que se denomina rotura prematura de membranas; es decir, pérdida de continuidad de las membranas fetales con salida de líquido amniótico transvaginal en ausencia de trabajo de parto, y sucede en embarazos de más de 20 semanas.¹ Ésta es un grave problema de salud que condiciona un riesgo que depende directamente de la edad gestacional en que se manifieste y pone en peligro tanto la vida del feto, como la de la madre.² La rotura prematura de membranas es causa de la tercera parte

de los nacimientos prematuros que ingresan a terapia intensiva neonatal y la responsable directa de la quinta parte de las muertes de estos neonatos.³ Su frecuencia en nuestro país es, al menos, del 10%, y en el Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, su prevalencia es alta porque concentra a población con riesgo elevado (12% de los nacimientos).⁴

Hoy se considera que la etiopatogenia de la rotura prematura es multifactorial y el mecanismo exacto que la desencadena no ha sido completamente esclarecido. El mecanismo molecular relacionado con la rotura prematura supone diversos procesos bioquímicos, como la disminución del contenido de colágena en las membranas fetales,⁵ la alteración de su estructura⁶ y el incremento en la actividad colagenolítica.⁷

El aumento en la actividad colagenolítica de las membranas fetales que se asocia con rotura prematura se ha relacionado con la actividad anormal de una familia de enzimas denominadas metaloproteasas de matriz extracelular (MMP), las cuales son secretadas al espacio extracelular en forma de enzimas inactivas y requieren ser activadas para degradar selectivamente los componentes de la matriz extracelular de las membranas fetales.⁸

Estudios previos han demostrado que tanto en el líquido amniótico como en las células de las membranas fetales, el trofoblasto y las células deciduales, durante el trabajo de parto y la rotura prematura de membranas, algunas MMP se expresan como colagenasa intersticial (MMP-1),⁹ estromelisinas 1, 2 y 3 (MMP-3, 10 y 11),¹⁰ matrilisina (MMP-7)¹¹ y principalmente la colagenasa tipo IV de 92 kDa o MMP-9,¹² una enzima que se expresa de manera selectiva hacia el final de la gestación, por lo que se propone como un marcador bioquímico del evento de rotura.⁷

Hay datos de que otra fuente de la MMP-9 son las células inflamatorias y, dado que durante el trabajo de parto existe infiltrado de leucocitos en los tejidos gestacionales,¹³ diferentes células inmunológicas podrían desempeñar un papel importante como fuente de señales y mediadores que activan la degradación de la matriz extracelular de las membranas fetales, lo que contribuye a la creación de un microambiente de colagenolisis durante el trabajo de parto.¹⁴

En este estudio se analizan las propiedades funcionales de las subpoblaciones de leucocitos de la

circulación proveniente de la placenta y la producción en cultivo de pro MMP-9 y su activación por estas células inmunológicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras biológicas

Las muestras empleadas para este estudio se obtuvieron en el Departamento de Tococirugía del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, inmediatamente después del alumbramiento de mujeres con embarazo a término (37 a 40 semanas de gestación) sin trabajo de parto y con indicación de cesárea sin datos clínicos, ni microbiológicos de infección, ni enfermedad. Las placas se transportaron al laboratorio en condiciones de estricta esterilidad para su procesamiento.

Aislamiento de leucocitos

Se obtuvieron muestras de sangre de las mujeres estudiadas, que se colectaron mediante drenado de los cotiledones de la placenta, con lo que se obtuvo una muestra representativa de los leucocitos que circulaban localmente *in vivo*. Además, y con fines de comparación, se obtuvieron 10 mL de sangre periférica que fue recolectada en tubos heparinizados (vacutainer-heparina sódica, Becton-Dickinson, Rutheford, NJ). Las muestras de sangre se sometieron a un gradiente de densidad con el reactivo Lymphoprep® (Axis-Shield, Oslo, Noruega), para obtener los leucocitos de acuerdo con el protocolo sugerido por los fabricantes.

Una vez obtenidos los leucocitos, se contaron y se midió su viabilidad mediante el colorante vital azul tripano. Algunas células se procesaron para citometría de flujo y otras se destinaron a cultivo.

Cultivo de leucocitos

Los cultivos se hicieron con 1×10^5 leucocitos provenientes de la placenta o circulación periférica. Las células se sembraron en placas de cultivo de 12 pozos con 1 mL de medio RPMI 1640 complementado con SFB al 10% y antibiótico-antimicótico al 1% (Gibco-BRL, Gaithersburg, USA). Las células se mantuvieron en una estufa de cultivo a 37°C, con atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire, con humedad relativa del 80% durante 24 horas. Al término de este tiempo se

les sustituyó el medio por DMEM complementado con hidrolizado de lactoalbúmina al 1%, antibiótico-antimicótico al 1% y piruvato de sodio al 1%, y se cultivaron en las condiciones mencionadas durante 24, 48, 72 y 96 horas. Al término de cada uno de los tiempos de cocultivo se colectó el medio condicionado y se almacenó a -70 °C para su posterior análisis.

Tinción inmunofluorescente para antígenos de superficie

Para la caracterización inmunofenotípica de las células provenientes de la placenta y la detección de las distintas subpoblaciones de leucocitos se emplearon los siguientes anticuerpos monoclonales conjugados con diferentes fluorocromos: anti CD45-FITC; anti CD3-PC7; anti CD14-ECD; anti CD56-PE y anti CD19-PC5 (Beckman Coulter, Inc.), para identificar leucocitos, linfocitos T, monocitos, células NK y linfocitos B, respectivamente.

Las muestras se analizaron con citometría de flujo en un equipo de la serie CYTOMICS FC 500 (Beckman Coulter, Inc.), y el análisis de los datos se hizo con ayuda del software CXP.

Zimografía en gelatina

La actividad gelatinolítica de los medios condicionados del cultivo se detectó mediante geles/sustrato. Alícuotas de 5 µg de proteína de cada uno de los medios se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% con dodecil sulfato de sodio (SDS) copolimerizados con gelatina tipo A de piel porcina (Sigma, St. Louis, MO, USA) al 1% en condiciones no desnaturalizantes,^{7,15} mediante el uso de un sistema con formato de minigel (Bio-Rad, Richmond, CA). Las zonas de actividad enzimática aparecieron como bandas de lisis claras contra un fondo de sustrato no degradado. En cada corrida se incluyeron marcadores de actividad para MMP-2 y MMP-9 con el uso de sobrenadante obtenido de la línea celular de promielocitos U937.¹⁶ Las bandas obtenidas se analizaron con densitometría mediante analizador de imágenes (UVP, Southern, CA, USA) y se expresaron como actividad por área.

Perfil de proteasas en los medios de cultivo

Se colectaron alícuotas de 5 µg de los medios condicionados del cultivo celular de 72 horas, que tuvieron

la mayor cantidad de MMP-9 en forma activa, e incubaron durante dos horas a 37 °C con inhibidores específicos de familias de proteasas que incluyeron: ácido etilendiaminotetracético (EDTA), 5 mM para proteasas dependientes de iones metal; fluoruro de fenilmetsulfonilo (PMSF), 1 mM para proteasas de serina, y N-etilmaleimida (NEM), 2 mM para proteasas con residuos de cisteína. Los medios condicionados se incubaron con 500 µg de azocaseína (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) y se llevó a 1 mL con amortiguador Tris 0.1 M, pH 7.8. La mezcla se incubó durante 24 horas a 37°C con agitación constante. La azocaseína no digerida se precipitó con 200 µL de ácido tricloroacético en frío, después de 30 minutos se centrifugó a 12,000 rpm x g durante cinco minutos. Los valores de absorbancia de los sobrenadantes se leyeron a 336 nm mediante un espectrofotómetro (DU-800, Beckman, USA). La actividad se expresó como µg de azocaseína degradada/mg de proteína incubada.

Análisis estadístico

El cambio en la cantidad y actividad enzimática de la MMP-9 y en las distintas familias de proteasas se analizó mediante análisis de variancia (ANOVA) y se expresó como el promedio ± desviación estándar previo a un análisis de normalidad de los datos en cuestión. El valor de $p \leq 0.05$ se consideró significativo en cada caso.

RESULTADOS

La citometría de flujo de los leucocitos provenientes de la placenta mostró que esta población celular se compone, en su mayor parte, de subpoblaciones de linfocitos T (73.5% del total de la población celular), monocitos (16.2%), células NK (6%) y linfocitos B (4.2%). Estos resultados se encuentran dentro del rango descrito para nuestro laboratorio.¹⁷

Durante el análisis de la actividad gelatinolítica de los sobrenadantes del medio condicionado del cultivo de leucocitos provenientes de la placenta y leucocitos de la circulación periférica a las 24, 48, 72 y 96 horas, el ensayo mostró que a las 24 horas los leucocitos placentarios secretan, mayoritariamente, MMP-9 inactiva (92 kDa) ($1,917.37 \pm 318.03$, actividad por área), la cual aumenta su intensidad relativa a las

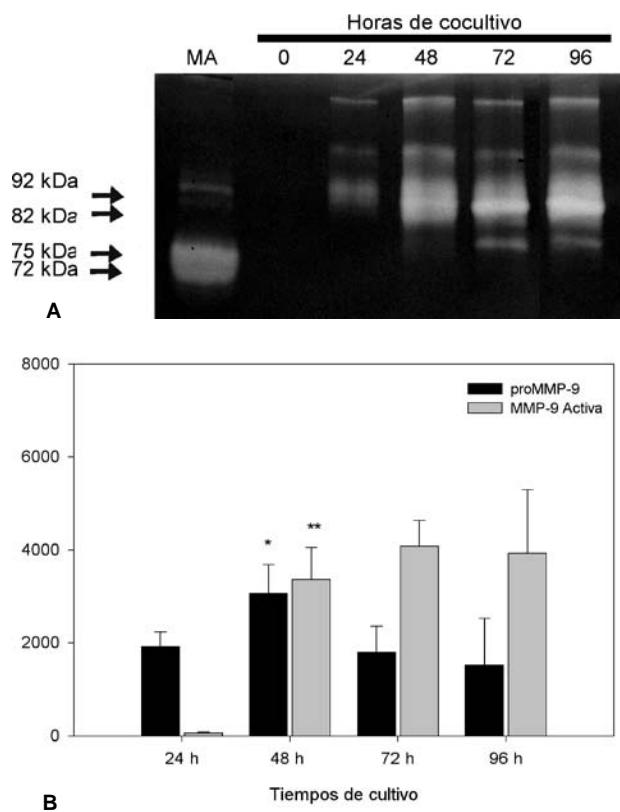


Figura 1. Zimografía en gelatina. A. Los medios del cultivo celular de leucocitos placentarios ($n=7$) se analizaron mediante zimografía con gelatina, y mostraron la generación de dos especies de gelatinas de diferente peso molecular formadas a lo largo del cultivo pro MMP-9 (92kDa) inactiva y MMP-9 activa (86 kDa), de acuerdo con el patrón de migración del marcador de actividad (MA). B. Análisis densitométrico de las MMP-9 inactiva (92kDa) y activa (86 kDa). La actividad gelatinolítica de los medios de cultivo durante el periodo experimental ($n=7$, * $p = 0.01$, ** $p = 0.001$) que fue comprobada mediante zimografía, se analizó con densitometría de bandas de las bandas de lisis y se expresó como actividad por área.

48 horas ($3,059.3271 \pm 621.46$, actividad por área; $p < 0.05$). Este aumento a las 48 horas se acompañó de la aparición de una banda de lisis correspondiente a una especie de MMP-9 de menor peso molecular (82 kDa), que corresponde a la MMP-9 activa ($3,366.03 \pm 685.04$, actividad por área; $p < 0.05$). La banda de actividad que correspondió a la forma activa de la enzima disminuyó a partir de las 72 horas y, en cambio, se comprobó aumento de la intensidad relativa de la MMP-9 activa, relación que se mantuvo hasta las 96 horas del cultivo. La disminución en la intensidad de la enzima inactiva correlaciona con la conversión a MMP-9 activa, lo que sugiere que la enzima inactiva

que se secreta al medio de cultivo es activada por factores secretados por el mismo cultivo (figura 1 A y B). Todo esto en contraste con lo que secreta el cultivo de leucocitos provenientes de la sangre periférica, sin cambios estadísticamente significativos en la cantidad de MMP-9 inactiva secretada; además, estas células no pudieron generar formas activas de MMP-9 a lo largo de todo el cultivo (figura 2 A y B). Los pesos moleculares de las bandas de lisis se calcularon de acuerdo con la migración relativa del U937 (MA).

Se ensayó la actividad de diferentes familias de proteasas secretadas a los medios condicionados por el cocultivo. La actividad basal de los medios de cultivo de 96 horas, que fueron los que mostraron la mayor cantidad de enzima activa, fue de 0.1005 ± 0.0069 mg de sustrato degradado/mg de proteína incubada. Cuando las muestras se trataron con los diferentes inhibidores se obtuvieron los valores y porcentajes de inhibición mostrados en el cuadro 1. La menor actividad enzimática se obtuvo cuando los medios de cocultivo se trataron con EDTA. Una proporción menor de inhibición se obtuvo con el PMSF, que sugiere la participación de proteasas de serina. La fracción minoritaria correspondió a las proteasas de cisteína.

DISCUSIÓN

Diversos estudios muestran que las membranas fetales secretan diferentes mediadores involucrados en la degradación de su tejido conectivo,¹⁸ también se ha demostrado que diferentes tipos de leucocitos que arriban a los tejidos gestacionales en el tercer trimestre del embarazo producen estos mediadores. Debido a que las membranas fetales son tejidos que carecen de vasos sanguíneos, el origen de los leucocitos que las infiltran debe ser el líquido amniótico o la circulación placentaria, la cual representa su entorno más cercano. Los leucocitos son capaces de producir citocinas y otras moléculas efectoras, como la MMP-9, enzima que se ha implicado en el proceso de rotura de las membranas fetales porque puede degradar colágeno tipo IV, fibronectina y proteoglicanos. Por esto, en este trabajo se inició la caracterización de las subpoblaciones de leucocitos que circulan en la placenta y se demostró que estas células tienen características funcionales peculiares, que no se encuentran en células equiva-

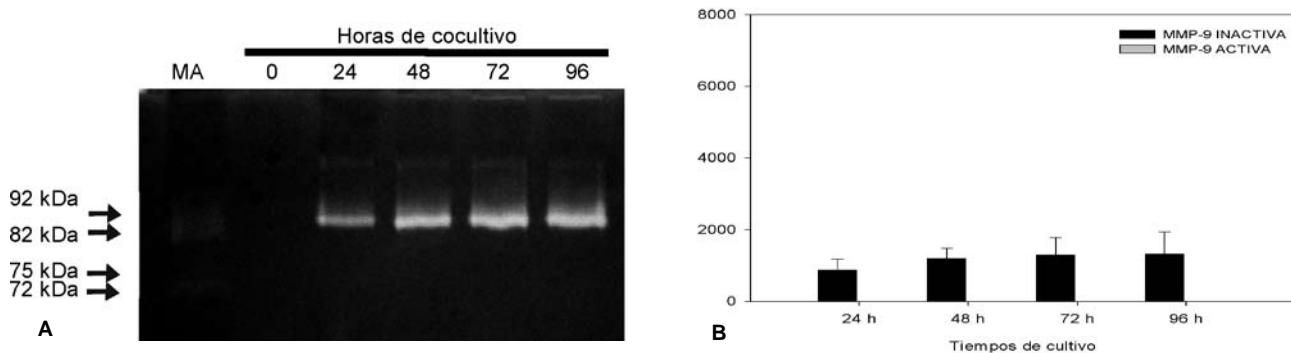


Figura 2. Zimografía en gelatina. *A*. Los medios del cultivo celular de leucocitos de la circulación periférica de embarazadas ($n = 7$) se analizaron mediante zimografía en gelatina, y mostraron una banda de lisis durante todo el tiempo de cultivo, misma que correspondió a la MMP-9 inactiva (92 kDa) de acuerdo con el patrón de migración del marcador de actividad empleado (MA). *B*. Análisis densitométrico de la MMP-9 inactiva (92 kDa). La actividad gelatinolítica obtenida de los medios condicionados durante todo el cultivo ($n = 7$) que se obtuvo por zimografía se analizó mediante densitometrías de las bandas de lisis y fue expresada como actividad por área.

lentes aisladas de la misma embarazada, pero sí en la circulación general. El hallazgo más notable señala que la cinética de secreción de MMP-9 por los leucocitos provenientes de la placenta se caracteriza por tener sólo la forma inactiva de la enzima en las primeras 24 horas. En las siguientes horas se incrementa progresivamente la secreción de la enzima, pero a partir de las 48 horas de cultivo hay aumento significativo de una especie de MMP-9 de 82 kDa, descrita en la bibliografía como la forma activa de la enzima.¹⁹ La transición del estado de enzima inactiva a activa continuó hasta las 96 horas de cultivo y se acompañó de disminución progresiva de la forma inactiva, de manera que al final del cultivo predominó la forma activa.

La aparición de la especie activa de MMP-9 (82 kDa) en cualquier sistema biológico es un suceso que ocurre sólo cuando se secretan los activadores específicos, que corresponden a diferentes proteasas con afinidad por la pro MMP-9. Esto significa que los leucocitos aislados de la placenta de embarazos a término expresan en cultivo no sólo la MMP-9, sino los activadores necesarios para darle función biológica. Son escasas las descripciones bibliográficas de las proteasas que realizan esta función *in vivo* y hasta el momento ninguna puede relacionarse con el sistema de las membranas fetales. Lo más llamativo de este hallazgo es que los leucocitos aislados de la sangre periférica de estas mismas mujeres no fueron capaces de incrementar la secreción de MMP-9 y en ningún momento se demostró su capacidad para activarla.

En este sentido, se observó que los leucocitos mononucleares de la sangre del entorno coriodecidual no son distintos fenotípicamente de los que se encuentran en la circulación periférica; sin embargo, los primeros tienen características funcionales diferentes que consisten en el aumento progresivo de la secreción de MMP-9 y la activación de la MMP-9 inactiva. Otros autores que han explorado la expresión de la MMP-9 en estos tejidos sólo fueron capaces de demostrar la forma inactiva de la enzima (92 kDa),²⁰ lo que es motivo de controversia, ya que la enzima necesariamente debe encontrarse en forma activa para poder ejercer su función.

Nuestro hallazgo comprueba la existencia de un mecanismo para reclutar células inmunológicas del entorno de la placenta y de las membranas fetales. Hallazgos complementarios en nuestro laboratorio señalan que estas mismas células pueden localizarse en el microambiente coriodecidual y con ello participar

Cuadro 1. Inhibidores específicos de clase de las proteasas

Inhibidor	μg de sustrato degradado/mg de proteína incubada	% de inhibición
EDTA	0.019 ± 0.0041	80.06
PMSF	0.094 ± 0.0149	6.6
NEM	0.105 ± 0.0033	1.2

El cuadro muestra las diferentes actividades y porcentajes de inhibición de cada una de las diferentes familias de proteasas contenidas en los medios de cultivo ($n = 4$).

de manera directa en el control de la degradación del tejido conectivo de estas estructuras.²¹

El análisis bioquímico mediante inhibidores específicos de proteinasas confirmó que las proteasas secretadas por los leucocitos de la placenta son, en su mayor parte, metaloproteasas, como las diferentes MMP, ya que el mayor porcentaje de inhibición se obtuvo al tratar los medios del cultivo de dichas células con EDTA, inhibidor de metaloproteasas.

CONCLUSIÓN

La placenta y sus tejidos anexos son capaces de reclutar poblaciones específicas de leucocitos o, bien, de condicionar a las subpoblaciones locales a mostrar capacidades funcionales específicas, como las mostradas en este trabajo, y que corresponden de manera directa con la inducción de la degradación del tejido conectivo de las membranas fetales. Con ello, se logra contar con células susceptibles de regulación que expresan mediadores conocidos del trabajo de parto. Ante estas pruebas experimentales es necesario que los estudios sucesivos se enfoquen a caracterizar el tipo de células específicas que participan en este fenómeno de secreción y activación de la MMP-9.

REFERENCIAS

1. Normas y Procedimientos de Ginecología y Obstetricia. Instituto Nacional de Perinatología, 2002.
2. Mercer BM. Preterm premature rupture of the membranes. *Obstet Gynecol* 2003;101(1):178-93.
3. Beltrán MJ, Enríquez PMM. Asistencia actual en la rotura prematura de membranas. En: Prematurez, un enfoque perinatal. México: ETM, 2004;pp:118-27.
4. Instituto Nacional de Perinatología (INPer). Anuario estadístico 2000.
5. Vadillo-Ortega F, González-Avila G, Karchmer S, et al. Collagen metabolism in premature rupture of amniotic membranes. *Obstet Gynecol* 1990;75(1):84-88.
6. Malak TM, Bell SC. Structural characteristics of term human fetal membranes: a novel zone of extreme morphological alteration within the rupture site. *Br J Obstet Gynecol* 1994;101(5):375-86.
7. Vadillo-Ortega F, Gonzalez-Avila G, Furth EE, et al. 92-kd type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) activity in human amniochorion increases with labor. *Am J Pathol* 1995;146(1):148-56.
8. Murphy G, Stanton H, Cowell S, et al. Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *APMIS* 1999;107(1):38-44.
9. Maymon E, Romero R, Pacora P, et al. Evidence for the participation of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase 1) in preterm rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183(4):914-20.
10. 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.
11. Maymon E, Romero R, Pacora P. Matrix metalloproteinase 7 in parturition, premature rupture of membranes, and intrauterine infection. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182(6):1545-53.
12. McLaren J, Taylor DJ, Bell SC. Increased concentration of pro-matrix metalloproteinase 9 in term fetal membranes overlying the cervix before: implications for membrane remodeling and rupture. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182(2):409-16.
13. Thomson JA, Telfer JF, Young A, et al. Leukocytes infiltrate the myometrium during human parturition: further evidence that labour is an inflammatory process. *Human Reprod* 1999;14(1):229-36.
14. Osman I, Young A, Ledingham MA, et al. Leukocyte density and pro-inflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term. *Mol Hum Reprod* 2003;9(1):41-5.
15. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* 1994;218(2):325-9.
16. Watanabe H, Nakanishi I, Yamashita K, Hayakawa T, Okada Y. Matrix metalloproteinase-9 (92 kDa gelatinase/type IV collagenase) from U937 monoblastoid cells: correlation with cellular invasion. *J Cell Sci* 1993;104(Pt 4):991-9.
17. Vega-Sánchez R, Estrada-Gutiérrez G, Cérbulo Vazquéz A, Beltrán-Montoya J, Vadillo-Ortega F. Caracterización del espacio corioidecidual como un microambiente rico en moléculas efectoras que inducen la rotura de las membranas corioamnióticas durante el trabajo de parto. *Ginecol Obstet Mex* 2004;72:593-601.
18. Xu P, Alfaidy 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.
19. Shapiro SD, Fliszar CJ, Broekelmann TJ, et al. Activation of the 92-kDa gelatinase by stromelysin and 4-aminophenylmercuric acetate. Differential processing and stabilization of the carboxyl-terminal domain by tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP). *J Biol Chem* 1995;270(11):6351-6.
20. Goldman S, Weiss A, Eyal V, Shalev E. Differential activity of the gelatinases (matrix metalloproteinases 2 and 9) in the fetal membranes and decidua, associated with labour. *Mol Hum Reprod* 2003;9(6):367-73.
21. Estrada-Gutierrez G, Zaga V, Gonzalez-Jimenez MA, et al. Initial characterization of the microenvironment that regulates connective tissue degradation in amniochorion during normal human labor. *Matrix Biol* 2005;24(4):306-12.