



## La vitamina C disminuye la síntesis de MMP-9 inducida con peróxido de hidrógeno en un modelo de estudio *in vitro* de membranas corioamnióticas\*

César Ángel Hernández Guerrero, \*\* María Eugenia Frigolet Vázquez Vela, \*\*\* Tomás Herrerías Canedo, \*\*\*\*  
Héctor Flores Herrera,<sup>1</sup> Noemí Meraz Cruz<sup>1</sup>

### RESUMEN

**Objetivo:** evaluar la capacidad del peróxido de hidrógeno para inducir la síntesis de la metaloproteasas de matriz extracelular-9 en un modelo *in vitro* de membranas corioamnióticas.

**Material y métodos:** estudio experimental, con diseño transversal, de tipo analítico y prospectivo, donde a partir de membranas amnióticas (n = 13) provenientes de embarazos a término se realizaron explantes de membranas coriónicas y corioamnióticas, los cuales se estimularon con peróxido de hidrógeno a una concentración de 200 mcM. Se cultivó un grupo de explantes al que se agregó vitamina C (200 mcg/mcL) 48 horas antes de adicionar el peróxido. Veinticuatro horas después de agregarle el peróxido se recuperó el sobrenadante y se determinó la producción de la metaloproteasa-9, mediante zimografía.

**Resultados:** el peróxido indujo la síntesis de la metaloproteasa-9 en membranas coriónicas y corioamnióticas. El cultivo de las membranas en presencia de vitamina C, antes de agregar el peróxido, disminuyó la síntesis de la metaloproteasa-9 en forma estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ; método de Dunn).

**Conclusiones:** el peróxido de hidrógeno indujo la síntesis de la metaloproteasa-9 en membranas coriónicas y corioamnióticas en cultivo. El cultivo de explantes de corion y corioamnios en un medio con vitamina C, 48 horas antes de agregarle el estímulo de peróxido de hidrógeno, disminuye la síntesis de metaloproteasa-9.

**Palabras clave:** vitamina C, síntesis de MMP-9, peróxido de hidrógeno.

**Nivel de evidencia:** II-2

### ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the hydrogen peroxide ability to induce the synthesis of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in an *in vitro* chorioamniotic membrane model.

**Material and methods:** An experimental, transversal, analytic and prospective study was made. From amniotic membranes (n = 13) of term labour pregnant women chorionic and chorioamniotic explants were prepared; these were stimulated with hydrogen peroxide [200 mcM]. A group of explants were cultured with vitamin C, 48 hours prior to the hydrogen peroxide stimulus. Twenty-four hours after hydrogen peroxide stimulus the supernatants were collected and metalloproteinase-9 production was determined by zymography methods.

**Results:** Hydrogen peroxide induced the synthesis of metalloproteinase-9 in chorionic and chorioamniotic membranes. When chorionic and chorioamniotic membranes were cultured with vitamin C prior to the hydrogen peroxide stimulus, the MMP-9 production diminished ( $p < 0.05$ ; Dunn's method).

**Conclusions:** Hydrogen peroxide induced the synthesis of metalloproteinase-9 in chorionic and chorioamniotic membranes. When chorionic and chorioamniotic membranes were cultured with vitamin C, 48 hours prior to peroxide hydrogen stimulus, the metalloproteinase-9 production diminished with statistical significance.

**Key words:** vitamin C, matrix metalloproteinase-9, hydrogen peroxide.

**Level of evidence:** II-2

### RÉSUMÉ

**Objectif :** évaluer la capacité du peroxyde d'hydrogène pour induire la synthèse de la métalloprotéinase matricielle-9 dans un modèle de membranes chorio-amniotiques *in vitro*.

**Matériel et méthodes :** étude expérimentale, avec un dessin transversal, de type analytique et prospective, où à partir de membranes amniotiques (n=13) provenant de grossesses à terme on a réalisé des explants de membranes chorioniques et chorio-amniotiques,



lesquels ont été stimulés avec peroxyde d'hydrogène à une concentration de 200 mcM. Un groupe d'explants a été cultivé en présence de vitamine C (200mcg/mcL), 48 heures avant d'ajouter le peroxyde. Vingt-quatre heures après l'ajout du peroxyde on a récupéré le surnageant et on a déterminé la production de métalloprotéinase-9, au moyen de zymographie.

**Résultats :** le peroxyde a induit la synthèse de la métalloprotéinase-9 en membranes chorioniques et chorio-amniotiques. La culture des membranes en présence de vitamine C, avant d'ajouter le peroxyde, a diminué la synthèse de la métalloprotéinase-9 de façon statistiquement significative ( $p<0.05$  ; méthode de Dunn).

**Conclusions :** le peroxyde d'hydrogène a induit la synthèse de la métalloprotéinase-9 en membranes chorioniques et chorio-amniotiques en culture. La culture d'explants de chorion et chorioamnios en présence de vitamine C, 48 heures avant l'ajout du stimulus de peroxyde d'hydrogène, diminue la synthèse de métalloprotéinase-9.

**Mots-clé :** vitamine C, synthèse de MMP-9, peroxyde d'hydrogène.

**Niveau d' évidence :** II-2

## RESUMO

**Objetivo:** avaliar a capacidade do peróxido de hidrogênio para induzir a síntese da metaloproteasa de matriz extracelular-9 num modelo de membranas carioamnióticas *in vitro*.

**Material e métodos:** estudo experimental com desenho transversal de tipo analítico e prospectivo, onde a partir de membranas amnióticas ( $n = 13$ ) provenientes de gravidezes a termo se fizeram explantes de membranas coriônicas e carioamnióticas, os quais foram estimulados com peróxido de hidrogênio Numa concentração de 200 mcM. Cultivou-se um grupo de explantes em presença de vitamina C (200 mcg/mcL), 48 horas antes de adicionar o peróxido. 24 horas após de adicionar o peróxido recuperou-se o sobrenadante e se determinou a produção da metaloproteasa-9 mediante zimografia.

**Resultados:** o peróxido induziu a síntese da metaloproteasa-9 em membranas coriônicas e carioamnióticas. O cultivo das membranas em presença de vitamina C antes de adicionar o peróxido, diminuiu a síntese da metaloproteasa-9 em forma estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ; método de Dunn).

**Conclusões:** o peróxido de hidrogênio induziu a síntese da metaloproteasa-9 em membranas coriônicas e carioamnióticas em cultivo. O cultivo de explantes de córion e carioamnios em presença de vitamina C, 48 horas antes de adicionar o estímulo de peróxido de hidrogênio, diminui a síntese de metaloproteasa-9.

**Palavras chave:** vitamina C, síntese de MMP-9, peróxido de hidrogênio.

**Nível de evidência :** II-2

**L**as membranas corioamnióticas forman los límites anatómicos durante el desarrollo intrauterino del feto, éstas aíslan y protegen al producto.<sup>1</sup> El amnios es la membrana no vascularizada más cercana al feto, la cual está constituida por diversos componentes de matriz extracelular; los más abundantes son la colágena tipo IV, I y II. La organización de las fibras de colágeno otorga más del 80% de la

resistencia mecánica de la membrana amniótica.<sup>2</sup> En condiciones fisiológicas el colágeno sólo es digerido por un grupo de enzimas altamente específicas, denominadas metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs). Éstas son proteasas dependientes de  $Zn^{2+}$ , que degradan de manera específica los diferentes tipos de colágeno. La MMP-1 degrada el colágeno tipo I, II y III; mientras que la MMP-2 y MMP-9 degradan el colágeno IV y V. Se ha observado que este grupo de enzimas es sintetizado por diversas estirpes celulares presentes en las membranas fetales, como el corion, el amnios y los fibroblastos.

Estudios biológicos *in vitro* han identificado una relación inversa entre la producción de MMP-9 y la resistencia mecánica de las membranas; los sitios de mayor concentración de MMP-9 fueron los que tuvieron la menor resistencia mecánica.<sup>3</sup> Asimismo, se ha observado un incremento importante de la actividad de la MMP-9 y MMP-2 en el líquido amniótico y en las mujeres con trabajo de parto o con rotura prematura de membranas, en contraste con las mujeres que no están en trabajo de parto.<sup>4</sup> La expresión de la MMP-9 se aso-

\* Este trabajo obtuvo el primer lugar del Premio Dr. Eliseo Ramírez para trabajos científicos de investigación básica presentados por escrito en el 56 Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia.

\*\* Jefe del Departamento de Ultramicroscopía.

\*\*\* Licenciada en Nutrición; tesista del Departamento de Ultramicroscopía.

\*\*\*\* Jefe del Departamento de Tococirugía y Urgencias.

<sup>1</sup> Investigador del Departamento de Ultramicroscopía. Instituto Nacional de Perinatología.

Correspondencia: Dr. César Ángel Hernández Guerrero. Departamento de Tococirugía y Urgencias, Instituto Nacional de Perinatología. Montes Urales 800, colonia Lomas Virreyes, CP 11000, México, DF. E-mail: hehecatlzin@yahoo.com

La versión completa de este artículo también está disponible en internet: [www.revistasmedicasmexicanas.com.mx](http://www.revistasmedicasmexicanas.com.mx)

cia con la aparición de los mecanismos de trabajo de parto, ya que a lo largo del embarazo se encuentra en el líquido amniótico en concentraciones apenas detectables, con aumento de la cantidad y actividad alrededor de 48 horas antes de que inicie el mismo.

La síntesis de metaloproteasas de matriz extracelular puede inducirla el estado proinflamatorio, debido al aumento de la síntesis de citocinas, como: IL-1  $\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$ .<sup>5</sup> Este grupo de citocinas lo sintetizan las células fagocíticas mononucleares, una vez que se han activado en respuesta a la existencia de bacterias o sus productos. La activación y liberación de las citocinas proinflamatorias promueve y potencia que las células fagocíticas tengan un estallido respiratorio por el que se liberan grandes cantidades de radicales libres de oxígeno y nitrógeno (superóxido, peróxido de hidrógeno, óxido nítrico, radical hidroxilo, etc.), que tienen como objetivo destruir a los agentes bacterianos inductores, mediante el secuestro de un electrón de cualquier molécula que encuentre a su paso.<sup>6</sup> En los últimos años se describió que la función de los radicales libres no sólo se circumscribe a acciones de defensa y destrucción sino que participan en la activación de diversas señales de transducción. Estas últimas son las rutas utilizadas por las células para interpretar las señales que reciben del medio. Este mecanismo permite que las células aumenten, disminuyan, cesen o inicien funciones biológicas específicas, mediante el encendido y apagado de genes relacionados con la expresión de proteínas.<sup>7</sup> El radical superóxido puede difundirse rápidamente a través de las membranas celulares, y si no es neutralizado de manera adecuada por los mecanismos antioxidantes orgánicos (vitaminas C y E, enzimas antioxidantes) e inorgánicos (cinc, selenio, manganeso, etc.) induce la disminución del pH intracelular, que favorece la liberación de ácido araquidónico, precursor de prostaglandina E2.<sup>8</sup> El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) activa de forma directa a los factores transcripcionales NF $\kappa$ B (factor nuclear transcripcional beta) y AP1 (activador del promotor 1), los que al estar activos se unen al sitio promotor que regula la expresión de las metaloproteasas de matriz extracelular, lo que origina la síntesis de dichas enzimas.<sup>8</sup> También participa en el incremento de calcio intracelular, lo que hace posible la activación de la calmodulina, proteína involucrada en la activación e

inhibición de diversas tirosincinasas y fosforilasas, que activan y suprimen la función de diversos factores transcripcionales. Entre ellos se encuentran NF $\kappa$ B y AP1.<sup>9</sup>

Durante el embarazo las infecciones cervicovaginales son el factor más importante asociado con la rotura prematura de membranas. Los hallazgos relacionan la existencia de citocinas proinflamatorias con diversos mecanismos de trabajo de parto. Se cree que el estrés oxidativo presente en el microambiente amniótico o placentario, determinado por la existencia de moléculas oxidantes (radicales libres) y reductoras (antioxidantes),<sup>10</sup> puede tener participación directa en la activación de los mecanismos de trabajo de parto, ya que los radicales libres pueden promover la síntesis de metaloproteasas de matriz extracelular, enzimas decisivas implicadas en la degradación de los componentes de la matriz extracelular de este tejido.

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad del peróxido de hidrógeno para inducir la síntesis de metaloproteasas de matriz extracelular en un modelo *in vitro* de membranas corioamnióticas.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar, mediante zimografía en gel, la actividad de la MMP-9 sintetizada por explantes de membranas corioamnióticas en cultivo y estimuladas con peróxido de hidrógeno.

2. Determinar, mediante zimografía en gel, la actividad de la MMP-9 sintetizada por explantes de membranas corioamnióticas cultivadas en un medio con vitamina C y estimuladas con peróxido de hidrógeno.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Obtención de membranas corioamnióticas

La obtención de las membranas corioamnióticas se efectuó en el área de tococirugía del Instituto Nacional de Perinatología. Las membranas utilizadas provenían de mujeres que cumplían con los siguientes criterios de inclusión: 1) embarazos a término sin trabajo de parto,

a las cuales se les realizó cesárea electiva; 2) membranas provenientes de mujeres sin datos clínicos de infección; 3) sin antecedentes de enfermedades autoinmunitarias; 4) sin antecedentes de tabaquismo, drogadicción o alcoholismo actual; 5) que aceptaran y firmaran una carta para donar sus membranas amnióticas para el estudio. Los criterios de exclusión fueron: 1) membranas provenientes de mujeres con antecedentes de aborto, parto pretérmino, rotura prematura de membranas, preeclampsia e incontinencia cervical; 2) membranas con restos de meconio; 3) membranas con contaminación fúngica o bacteriana durante la realización del estudio; 4) membranas provenientes de mujeres con cáncer cervicouterino. Las membranas obtenidas en el área de tococirugía se transportaron al laboratorio en solución salina fisiológica adicionada con gentamicina. En condiciones de esterilidad se eliminó la decidua y con un sacabocados se realizaron explantes de 1.0 cm de diámetro. Se obtuvieron 13 explantes de corion y 13 de corioamnios. Los explantes se colocaron en cajas de cultivo de 12 pozos a los que se agregaron 2 mL de medio de cultivo DMEM (Dulbecco Medium Eagles Modified; GIBCO BRL, California, USA), y se incubaron a 37°C, en un ambiente con 80% de humedad y 5% de bióxido de carbono.

#### **Análisis de viabilidad de las membranas en cultivo**

Para establecer el posible efecto negativo del peróxido de hidrógeno en la viabilidad de las membranas amnióticas se determinó la existencia de la enzima lactato deshidrogenasa con un estuche comercial (Cytotoxicity Detection Kit, Roche, Germany). Dicha enzima se encuentra en compartimientos en el citoplasma celular, por lo que al ocurrir la muerte de las células que se encuentran en el tejido corioamniótico en cultivo se libera la enzima, de manera proporcional a la cantidad de células muertas.

La prueba basa su principio en la reducción de NAD+ a NADH2+, cuando el lactato se convierte en piruvato por medio de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) liberada al medio de cultivo. La LDH liberada por las células se determinó siguiendo los pasos y recomendaciones emitidos por el fabricante, a partir de alícuotas de 5 mL recuperadas del medio de cultivo de los explantes. Como testigo positivo de lisis celular se usó tritón X-100, el cual desestabiliza y des-

truye la membrana plasmática. A los explantes de corion y corioamnios se agregaron 100 mL de una solución con tritón al 1%, los cuales se expusieron a los mismos procedimientos realizados en los explantes experimentales, y se determinó la existencia de LDH.

#### **Síntesis de MMP-9 por parte de membranas en cultivo estimuladas con peróxido de hidrógeno**

Los explantes obtenidos se mantuvieron en incubación durante 48 horas con medio de cultivo DMEM, con la intención de conseguir condiciones basales metabólicas por parte del tejido. Una vez transcurrido este lapso se eliminó el medio de cultivo existente y se agregaron 2 mL de medio de cultivo fresco, más 100 mL de una solución de peróxido ( $H_2O_2$ ) a una concentración de 200 mcM. Las membranas estimuladas con peróxido de hidrógeno se incubaron durante 24 horas. Luego, el sobrenadante se recuperó y almacenó a -70°C, hasta realizar los experimentos de zimografía para identificar la producción de MMP-9 realizada por el tejido.

#### **Síntesis de MMP-9 por parte de membranas en cultivo estimuladas con peróxido de hidrógeno, en presencia de vitamina C**

Para comprobar el efecto del peróxido de hidrógeno en la inducción de la síntesis de MMP-9 en las membranas en cultivo, se utilizó vitamina C como agente antioxidante, por su capacidad de neutralizar al peróxido e inhibir su acción activadora de factores transcripcionales. Para ello, la vitamina C (SIGMA Aldrich, Missouri, USA) se utilizó en dos formas para neutralizar el efecto del peróxido. Un grupo de membranas se cultivó durante 48 horas en presencia de vitamina C, a una concentración de 200 mcg/mL antes de añadir el estímulo con peróxido de hidrógeno, con la intención de condicionar un estado reductor en el tejido, al permitir que las membranas tengan la reserva máxima de la vitamina, y evitar la síntesis de MMP-9.

A otro grupo de explantes de membranas se les añadió vitamina C, a una concentración de 200 mcg/mL, al momento de agregar el estímulo con peróxido de hidrógeno. Esto con la intención de corroborar la neutralización del peróxido que debería acaecer en el espacio extracelular, y disminuir la inducción de síntesis de MMP-9.

Ambos grupos de membranas se cultivaron durante 24 horas, a 37°C, en un ambiente con 80% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>. Luego, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -70°C, hasta el día en que se realizaron los ensayos para determinar la cantidad de MMP-9 liberada al sobrenadante.

#### Determinación de la actividad de MMP-9 mediante zimografía en gel

La síntesis de MMP-9 realizada por los explantes de membranas coriónicas y corioamnióticas se determinó mediante zimografía en gel. Esta técnica basa su principio en la separación de proteínas mediante electroforesis vertical (SDS-PAGE), la cual separa las proteínas en una muestra al aplicar un campo eléctrico. Para la realización de los experimentos de zimografía se agregó a los geles de acrilamida una concentración de gelatina porcina al 2%, previamente desnaturalizada. Las muestras obtenidas del medio de cultivo, provenientes de los explantes de membranas, se colocaron a una concentración estandarizada de 0.5 mcg de proteína total, y se realizó la corrida electroforética a 20 miliamperios de intensidad, con voltaje variable. Al terminar la corrida electroforética, el gel se incubó, durante 24 horas, a 37°C, en condiciones óptimas de actividad gelatinolítica para las metaloproteasas de matriz extracelular. Al término de la incubación se observó una banda de lisis en el gel/substrato en la región que corresponde al peso molecular de la MMP-9. La banda de lisis se analizó con un sistema de videoimagen, convirtiendo el área de lisis en el gel a unidades arbitrarias, con las cuales se realizaron los análisis estadísticos.

El diseño del estudio fue una investigación experimental, transversal, analítico y prospectivo. Las variables independientes fueron: ácido ascórbico y peróxido de hidrógeno; mientras que la variable dependiente fue la síntesis de MMP-9.

#### Aspectos éticos

Se contó con una carta de consentimiento escrita, en la que las mujeres participantes cedieron sus membranas corioamnióticas para realizar el estudio, después de que se les explicó el objetivo, alcance y mediciones que se llevarían a cabo. Se indicó que no existía riesgo alguno ni costo adicional por haber participado en el estudio.

#### Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante el paquete estadístico Sigma Stat 3.1. Se usó la prueba de análisis de variancia (ANOVA) y como prueba *post hoc* se utilizó el método de Dunn, para comparar los valores de los grupos con vitamina C con los valores de las membranas estimuladas únicamente con peróxido.

## RESULTADOS

#### Análisis de viabilidad de membranas coriónicas y corioamnióticas

Con la intención de evaluar si el peróxido de hidrógeno, usado como estímulo para promover la producción de metaloproteasas de matriz extracelular por las membranas en cultivo, tenía algún efecto citolítico a las concentraciones administradas se realizaron cinco ensayos de viabilidad de membranas coriónicas y corioamnióticas, a las cuales se les añadieron concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno (200, 500, 1,000 y 2,000 mcMolar). Los resultados demostraron que las dosis cercanas a las utilizadas para observar el efecto modular del peróxido (200 mcM) y las dosis 25 veces mayores (2,000 mcM) no causaron ningún efecto citolítico en las membranas amnióticas. La determinación de la enzima lactato deshidrogenasa, usada como marcador de lisis celular, no demostró diferencia estadística alguna con respecto a las membranas testigo, a las cuales no se les agregó peróxido de hidrógeno. En todos los casos fue posible observar diferencia estadística significativa con respecto a las membranas testigo positivo de lisis celular, a las cuales se les añadió Tritón X-100. Los resultados descritos se observaron en las membranas coriónicas (figura 1) y en las corioamnióticas (figura 2).

#### Determinación de síntesis de MMP-9 por membranas en cultivo

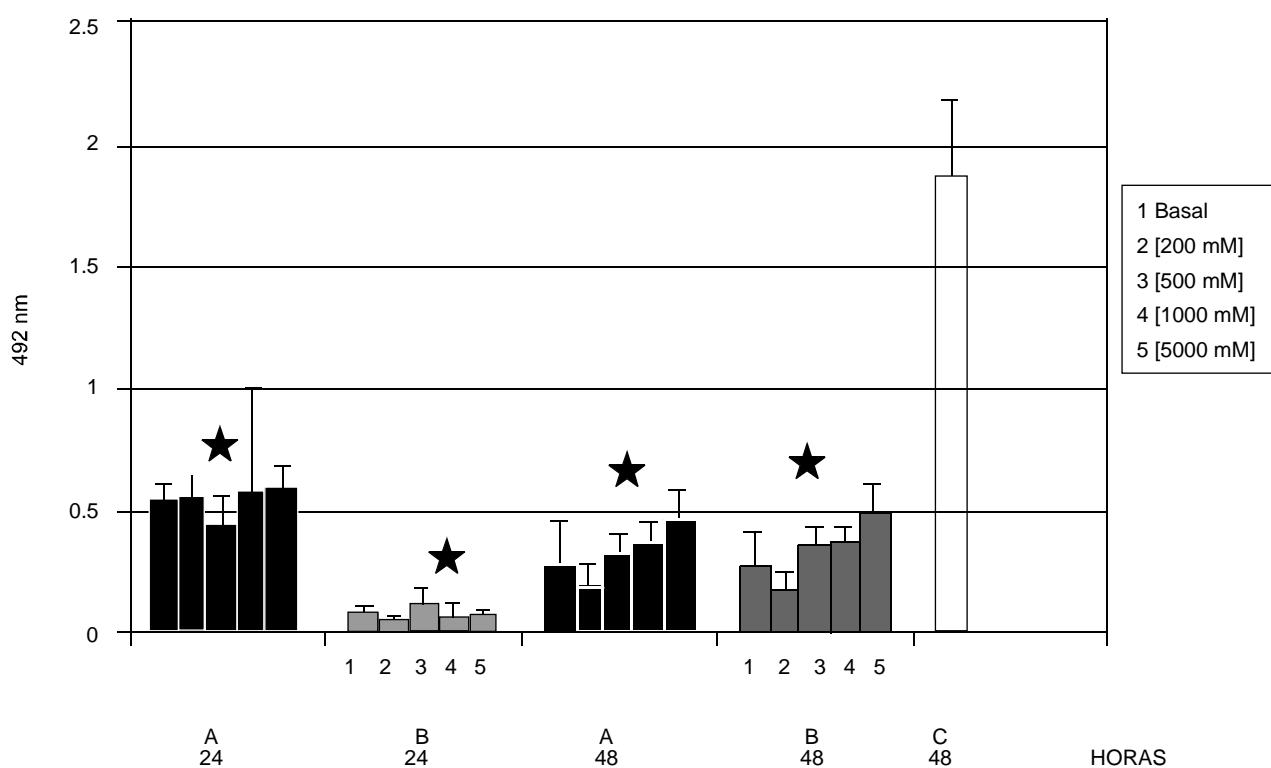
Se realizaron 13 experimentos de estimulación con peróxido de hidrógeno para evaluar la capacidad de esta molécula en la inducción de la síntesis de MMP-9 en membranas coriónicas y corioamnióticas. Los resultados de los experimentos independientes de síntesis de MMP-9 por parte de las membranas coriónicas se muestran en la figura 3, y el de las membranas corioamnióticas en la figura 4. En ambos grupos

de membranas y en todos los casos fue posible observar tendencia al aumento de la producción de MMP-9 al añadir peróxido de hidrógeno, en comparación con la síntesis realizada por membranas coriónicas o corioamnióticas previamente expuestas a vitamina C durante 48 horas o por las membranas donde al agregar peróxido se hizo concomitantemente con la vitamina C. Al analizar los datos en forma grupal fue posible observar una mayor síntesis, estadísticamente significativa, de MMP-9 en las membranas que recibieron el estímulo de peróxido en comparación con las membranas expuestas en forma previa a vitamina C, pero no así con las membranas a las que se añadió la vitamina C al mismo tiempo que se agregó el peróxido. No hubo diferencia estadística alguna en cuanto a la síntesis de MMP-9 entre las membranas que recibieron peróxido y vitamina C al mismo tiempo y las cultivadas

con vitamina C en forma previa. Lo anterior se apreció en las membranas coriónicas (figura 5) y en las corioamnióticas (figura 6).

#### COMENTARIO

Este estudio *in vitro* abarca el efecto que ejerce el peróxido de hidrógeno en la síntesis de MMP-9 en membranas coriónicas y corioamnióticas. Esto con la intención de tener un acercamiento molecular en la relación existente entre el estrés oxidativo y la degradación de los componentes de la matriz extracelular de dichas membranas. El desarrollo del modelo aquí presentado intenta recrear condiciones lo más parecidas posible a las que pueden suceder en forma fisiológica. Por un lado, se usó peróxido de hidrógeno, en un valor de concentración promedio al



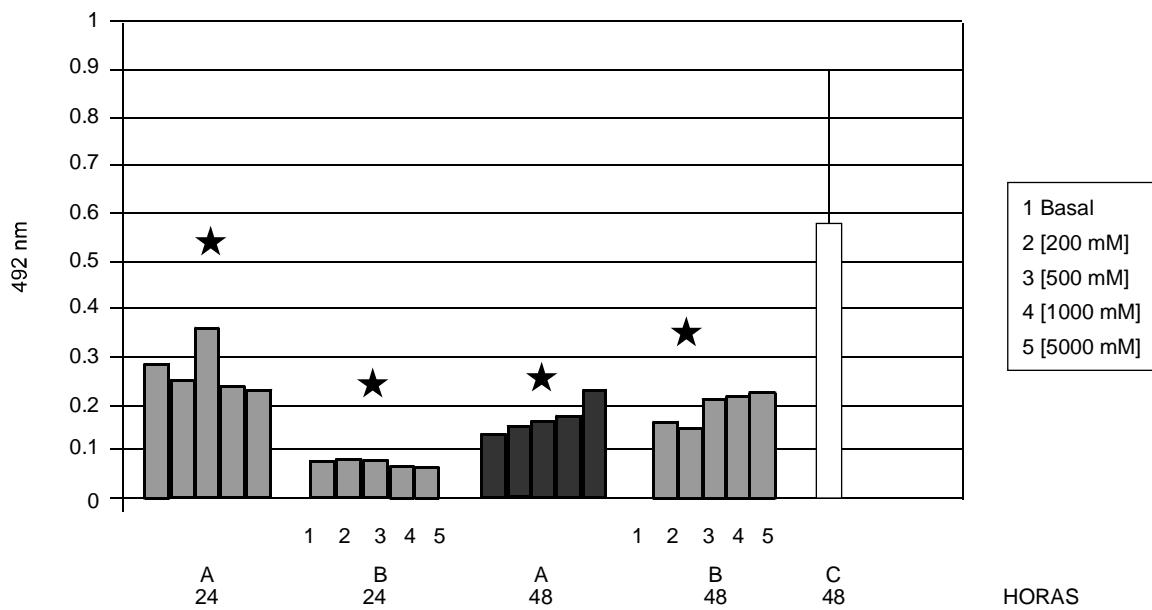
**Figura 1.** Viabilidad de explantes de membranas coriónicas a diferentes tiempos, bajo estímulo creciente de peróxido de hidrógeno (los datos de las concentraciones utilizadas aparecen en el recuadro).

A: explantes de membrana sin estímulo.

B: explantes de membrana con estímulo de peróxido a diferentes concentraciones.

C: testigo positivo de lisis celular (tritón X-100 al 1%).

\*  $p < 0.05$  (ANOVA; IC 95% y prueba post hoc de Dunn) vs grupo C.



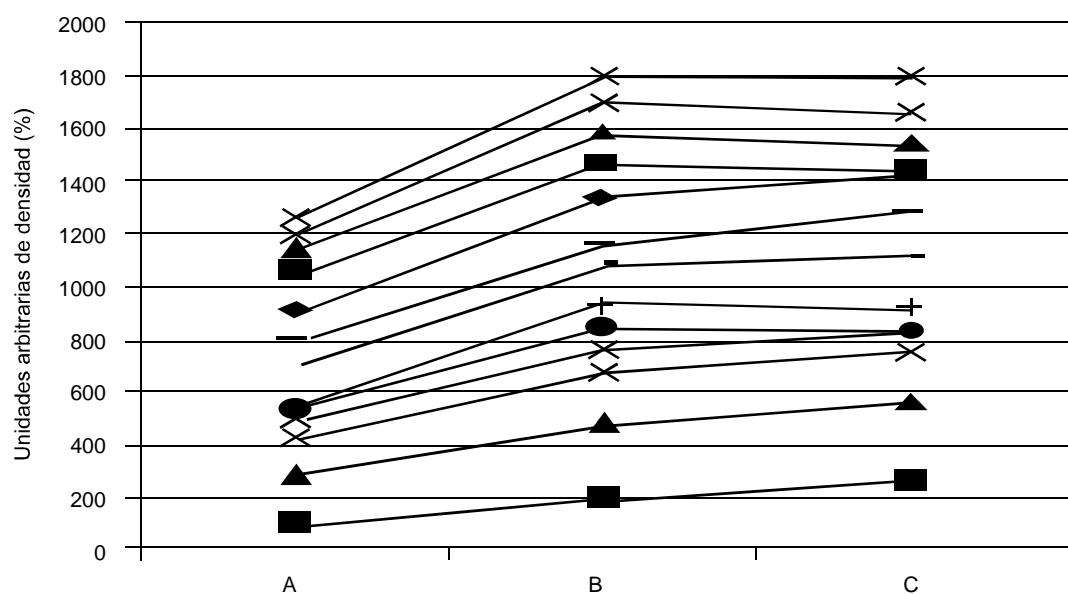
**Figura 2.** Viabilidad de explantes de membranas corioamnióticas a diferentes tiempos, bajo estímulo creciente de peróxido de hidrógeno (los datos de las concentraciones utilizadas aparecen en el recuadro).

A: explantes de membrana sin estímulo.

B: explantes de membranas con estímulo de peróxido a diferentes concentraciones.

C: testigo positivo de lisis celular (tritón X-100 al 1%).

\* p < 0.05 (ANOVA; IC 95% y prueba post hoc de Dunn) vs grupo C.

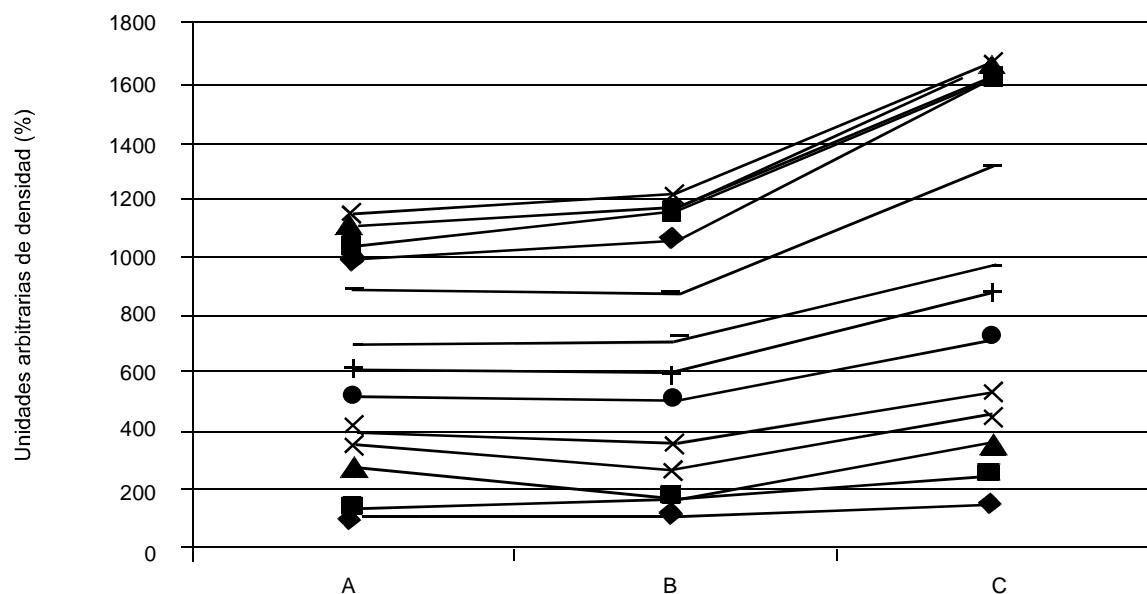


**Figura 3.** Actividad de MMP-9 proveniente de explantes de membranas coriónicas (n = 13).

A: membranas coriónicas cultivadas con vitamina C, 48 horas antes de añadir el estímulo de peróxido.

B: membranas coriónicas cultivadas con vitamina C agregada en el mismo momento de añadir el estímulo de peróxido.

C: membranas coriónicas cultivadas y estimuladas con peróxido.



**Figura 4.** Actividad de MMP-9 proveniente de explantes de membranas corioamnióticas (n = 13).

A: membranas corioamnióticas cultivadas con vitamina C, 48 horas antes de agregar el estímulo de peróxido.

B: membranas corioamnióticas cultivadas con vitamina C añadida en el mismo momento de agregar el estímulo de peróxido.

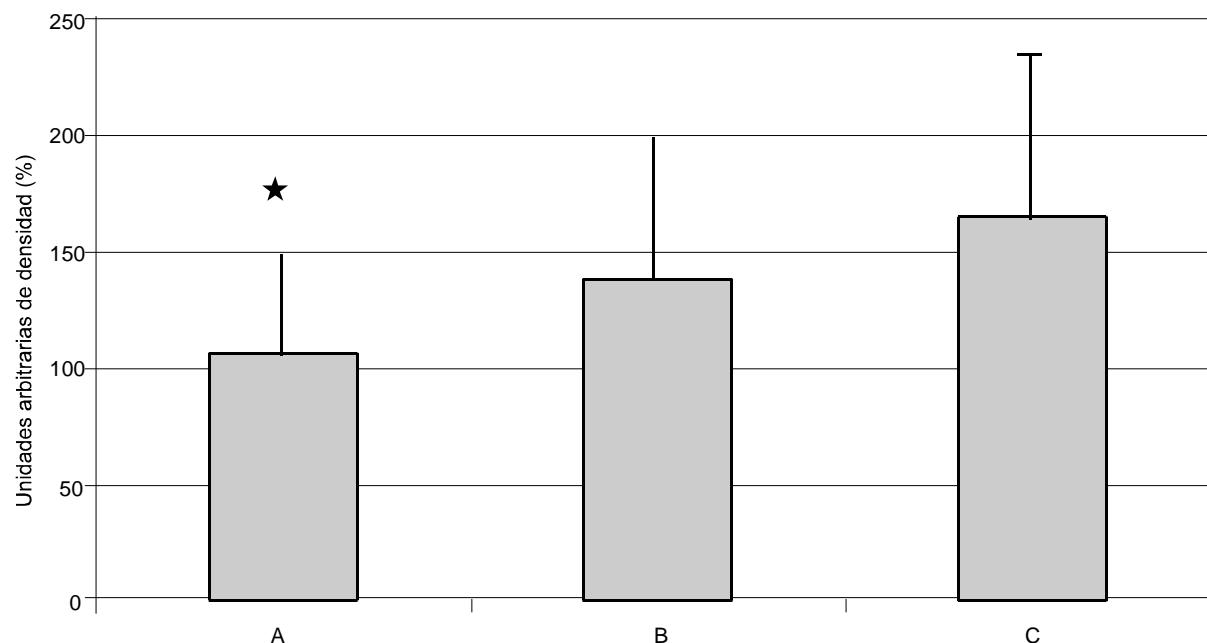
C: membranas corioamnióticas cultivadas y estimuladas con peróxido.

reportado en fluidos biológicos expuestos a estrés oxidativo o al manifestarse el estallido respiratorio, el cual sufren las células fagocíticas.<sup>5</sup> Por otro lado, se utilizó una concentración de vitamina C en un valor cercano al que se reporta en el líquido amniótico de mujeres en el tercer trimestre del embarazo. En las condiciones antes descritas fue posible demostrar el efecto que ejerce el peróxido de hidrógeno en la síntesis de MMP-9 por parte de los explantes coriónicos y corioamnióticos en cultivo, así como el efecto de disminución de síntesis de la MMP-9 que ejerce la vitamina C en dichas membranas.

Los hallazgos de este trabajo refuerzan las observaciones clínicas y experimentales apreciadas en diversas condiciones que favorecen la aparición de radicales libres, cuando sobreviene la rotura prematura de membranas. Este fenómeno se ha asociado con infección, sangrado en el segundo trimestre y administración de fármacos. Maymon demostró mayor actividad de MMP-9 en el líquido amniótico de pacientes con rotura prematura de membranas que manifestaron invasión de microorganismos en comparación con mujeres con trabajo de parto pretérmino con membranas intactas.<sup>10</sup>

Durante el proceso infeccioso se activan los mecanismos de respuesta inmunológica que originan un estado proinflamatorio, en el cual se libera gran cantidad de citocinas inflamatorias. En particular, el TNF- $\alpha$  junto con la IL-1 $\beta$  son capaces de inducir la síntesis de metaloproteasas de matriz extracelular al actuar en las células del corion, el amnios y la decidua. Asimismo, las citocinas proinflamatorias reclutan y activan en forma autocrina y paracrina células fagocíticas, las cuales liberan grandes cantidades de radicales libres al entrar en el proceso denominado estallido respiratorio.<sup>5</sup>

El exceso de radicales libres, que actúan por diferentes vías, puede disminuir la resistencia mecánica de las membranas amnióticas e inducir la peroxidación lipídica de las membranas celulares, lo cual puede inducir la muerte y destrucción de zonas del tejido amniótico. De igual forma, incrementan el calcio intracelular. Mediante la calmodulina se activan y desactivan diversas proteíncinasas y fosforilasas encargadas de activar e inhibir diversos factores transcripcionales, que entre sus funciones tienen la de promover la síntesis de diversas metaloproteasas y



**Figura 5.** Actividad promedio de MMP-9 proveniente de explantes de membranas coriónicas (n = 13).

A: membranas coriónicas cultivadas con vitamina C, 48 horas antes de añadir el estímulo de peróxido.

B: membranas coriónicas cultivadas con vitamina C agregada en el mismo momento de aunar el estímulo de peróxido.

C: membranas coriónicas cultivadas con el estímulo de peróxido.

\* p < 0.05 (ANOVA; IC 95% y prueba post hoc de Dunn) vs grupo C.

prostaglandinas e inducir la síntesis de MMP-9. Dicho sucesos, en suma, disminuyen la capacidad de resistencia mecánica de las membranas ovulares.

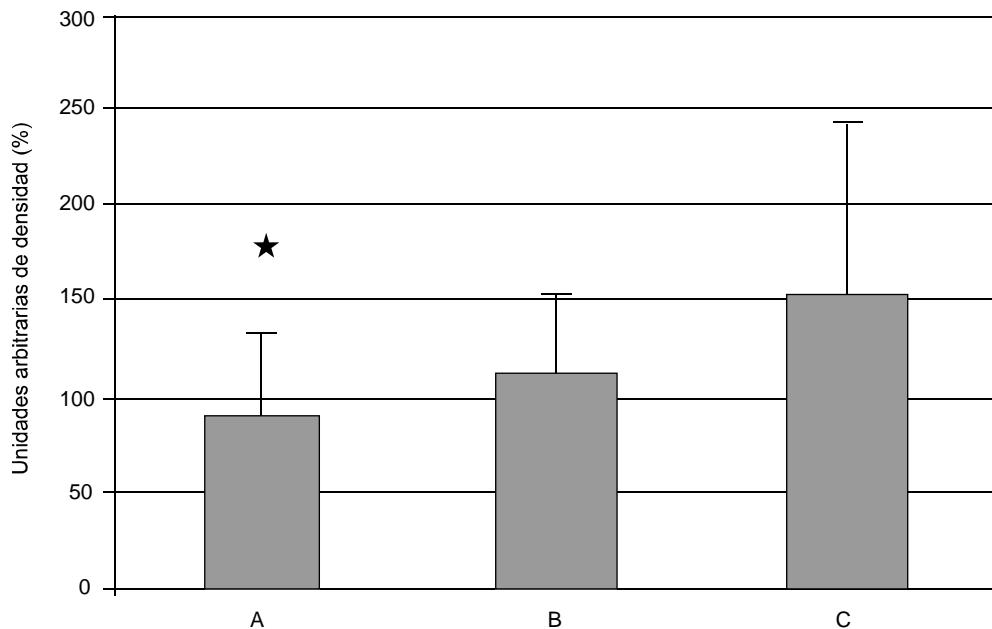
Con este esquema pueden vincularse los hallazgos que señalan hábitos, como el consumo de cigarrillos o abuso de drogas, con la capacidad de generar o inducir radicales libres (superóxido, peróxido de hidrógeno, iones hidroxilo y óxido nítrico) y su participación como factores de riesgo para rotura prematura de membranas.

Asimismo, y de acuerdo con los resultados aquí obtenidos, se ha identificado que el consumo de vitamina C es un factor de protección en contra de la rotura prematura de membranas.<sup>11</sup> En este rubro resalta el efecto que tuvieron las membranas cultivadas en vitamina C, las cuales disminuyeron significativamente la producción de MMP-9. Los resultados del modelo *in vitro* señalan que cuando el tejido tiene a su disposición la vitamina en forma previa, éste neutraliza el efecto oxidativo del peróxido. Guardando la proporción correspondiente es posible especular que el efecto

protector que se le adjudica a la vitamina C, para evitar la aparición de rotura prematura de membranas, tiene un componente importante en la neutralización de radicales libres y en sus efectos deletéreos. Más que en el proceso de biosíntesis de la colágena, donde la vitamina C participa como cofactor, y se ha propuesto que la deficiencia de este nutriente tiene que ver con la síntesis inadecuada de colágena por parte de las membranas amnióticas, volviendo al tejido de las membranas susceptible de romperse prematuramente.

Lo aquí expuesto abre vías alternas para el estudio de los mecanismos bioquímico/fisiológicos implicados en la degradación de los componentes de la matriz extracelular, fenómeno que representa un paso crítico, asociado con el origen de la rotura de las membranas amnióticas, tanto en forma normal como patológica.

El mejor entendimiento molecular de los sucesos relacionados con el adelgazamiento de las membranas amnióticas ayudará a proponer nuevas alternativas diagnósticas, pronósticas y terapéuticas para una de las enfermedades de mayor impacto en la morbilidad materna y fetal.



**Figura 6.** Actividad promedio de MMP-9 proveniente de explantes de membranas corioamnióticas (n = 13).

A: membranas corioamnióticas cultivadas en vitamina C, 48 horas antes de agregar el estímulo de peróxido.

B: membranas corioamnióticas cultivadas en vitamina C añadida en el mismo momento de agregar el estímulo de peróxido.

C: membranas corioamnióticas cultivadas con estímulo de peróxido.

\* p < 0.05 (ANOVA; IC 95% y prueba post hoc de Dunn) vs grupo C.

## CONCLUSIONES

El peróxido de hidrógeno indujo la síntesis de MMP-9 en explantes de corion y corioamnios. El cultivo de explantes de corion y corioamnios con vitamina C, 48 horas antes de estimularlo con peróxido de hidrógeno, disminuye de forma estadísticamente significativa la síntesis de MMP-9.

## REFERENCIAS

1. Arechavaleta-Velasco F, Mayon-González J, González-Jiménez M, Hernández-Guerrero C, Vadillo-Ortega F. Association of type II apoptosis and 92-kDa type IV collagenase expression in human amniochorion in prematurely ruptured membranes with tumor necrosis factor receptor-1 expression. *J Soc Gynecol Investig* 2002;9(2):60-67.
2. Parry S, Strauss JF. Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med* 1998;338:663-70.
3. Uchide I, Ueno H, Unoue M, et al. Matrix metalloproteinase-9 and tensile strength of fetal membranes in uncomplicated labor. *Obstet Gynecol* 2000;95:851-5.
4. Vadillo-Ortega F, Hernández A, González-Ávila 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;174:1371-6.
5. Woods J. Reactive oxygen species and preterm premature rupture of membranes. *Placenta* 2001;22:38-44.
6. González-Torres M, Betancourt-Rule M, Ortiz-Muñiz R. Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica* 2000;25:3-9.
7. Roitt M, Brostoff M, et al. *Immunology*. 4<sup>a</sup> ed. Barcelona: Times Mirror International Publishers, 1998.
8. Kamata H, Manabe T, Oka S, Kamata K, Hirata H. Hydrogen peroxide activates IKB kinases through phosphorylation of serine residues in the activation loops. *Science Direct* 2002;1(1):1-12.
9. Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J* 1996;10:709-20.
10. Maymon E, Romero R, Pacora P. Evidence of *in vivo* differential bioavailability of the active forms of matrix metalloproteinases 9 and 2 in parturition, spontaneous rupture of membranes, and intra-amniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:887-94.
11. Casanueva E, Ripio C, Tolentino M, Morales RM, Pfeffer F, Vilchis P, et al. Vitamin C supplementation to prevent premature rupture of the chorioamniotic membranes: a randomized trial. *Am J Clin Nutr* 2005;81(4):859-63.