

11281

12
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

MODELO FUNCIONAL DE MODULACION DE
METABOLISMO DE COLAGENA SEGUN
BIODISPONIBILIDAD DE VITAMINA C EN
CELULAS CORIOAMNIOTICAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

PRESENTA:

FRANIA PFEFFER BURAK

DIRECTOR DE TESIS

DR. FELIPE VADILLO ORTEGA

MEXICO, D. F

270003

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A MI FAMILIA:

Julio y Sonia,

Jorge, Iris, Shani, Saar y Lior.

Vivian y Leonardo.

A mi BOBE, siempre estarás en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor: Dr. Felipe Vadillo Ortega.

A mis co-tutores: Dr. Ruy Perez Tamayo y Dr. Alfonso Torre Blanco.

A los miembros del jurado:

Presidente: Dr. Ruy Perez Tamayo.

Secretario: Dr. Lino Diaz de Leon.

Primer Vocal: Dr. Felipe Vadillo Ortega.

Segundo Vocal: Dr. Moises Selman Lama.

Tercer Vocal: Dra. Annie Pardo Semo.

Suplente: Dr. Armando Tovar Palacios.

Suplente: Dr. Gerardo Gamba Ayala.

A Perla Ovseiovich.

A Esther Casanueva.

A Hector Avila Rosas.

A Cesar Hernández, Noemi Meraz, Fabian Arachavaleta, Alejandra Guerra, Otilia Perichart y Jacobo Kamar.

A todos mis compañeros de trabajo y amigos del INPer.

Al personal del Departamento de Biología de la Nutrición del INNSZ en especial a Carlos Timossi.

Al personal de la UNAM, en especial a la Dra Martínez Kuri.

INDICE

	Pag
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Generalidades	3
Ruptura prematura de embranas.....	5
Las membranas corioamnióticas	6
Estructura de la colágena	12
Vitamina C, colágena y RPM.....	16
Degradación de matriz extracelular y RPM	21
Objetivo	26
Objetivos específicos	26
Hipótesis	27
Hipótesis específicas	27
Material y métodos	28
Cultivo celular	28
Obtención de sondas: crecimiento de bacterias transformadas y digestión de plásmidos	30
Cuantificación de vitamina C	32
Metabolismo de colágena	34
Extracción de RNA para colágenas tipo I y III	34
Northern Blot. Determinación de la expresión de los mRNA para colágena tipo I y III	35
Actividad mezclada de metaloproteinasas	37
Actividad gelatinolítica de geles sustrato o zimografía	37
Inmunotransferencia o western blot	39
Determinación de RNAm para MMP-2 o northern blot	40
Ensayo de Run-on	41
Resultados	42
Cultivo celular e identificación de células	42
Vitamina C intracelular	42
Determinación de los mRNA para colágenas tipo I y III por northern blot	44
Actividad mezclada de metaloproteinasas	44
Actividad gelatinolítica en geles sustrato o zimografía	49
Western blot y northern blot para MMP-2	49
Ensayo de run-on para MMP- 2	50
Discusión	55
Referencias	68

INDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Figura		Pag
1	Distribución de los diferentes tipos de colágena en las membranas corioamnóticas.....	13
2	Representación esquemática de los dominios de la familia de las MMPs.....	22
3a, b y c	Inmunohistoquímica, morfología y ultraestructura de las células derivadas de amnios humano	43
4.	Vitamina C intracelular	45
5	Autorradiografía. Expresión de mRNA de Col I y III.....	46
6	Actividad gelatinolítica.....	48
7	Actividad gelatinolítica en gel sustrato (zimografía)	51
8	Geles sustrato de gelatina.....	52
9	Western blot y Northern blot.....	53
10	Ensayo de Run-on.....	54
Cuadro		
1	Clasificación, función y tipos de colágena	12
2	Metaloproteinasas de matriz extracelular	23
3	Descripción de los plásmidos	32
4	Promedio de áreas relativas \pm desviación estándar de los resultados obtenidos de las membranas de colágena I.....	47
5	Promedio de áreas relativas \pm desviación estándar de los resultados obtenidos de las membranas de colágena III	47

Resumen.

Para investigar el efecto que los nutrimentos tienen sobre el desarrollo fetal y placentario se han realizado numerosos estudios, los cuales han mostrado que los factores ambientales como la dieta, tienen efecto sobre la expresión génica.

De esta manera se ha establecido que el bien conocido efecto de la vitamina C sobre la síntesis de colágena - durante la gestación- puede expresarse como un aumento en el riesgo de ruptura prematura de membranas corioamnióticas (RPM), en tanto que éstas están constituidas fundamentalmente por colágena.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el posible efecto de esta vitamina sobre el metabolismo de la colágena especialmente sobre la degradación, utilizando un modelo *in vitro* y midiendo el efecto de la vitamina C en la síntesis de algunos tipos de colágena y en la actividad y expresión de la metaloproteinasas de 72 kDa (MMP-2) en células residentes del amnios humano.

Se utilizaron tanto células primarias como una línea celular WISH de epitelio corioamniótico humano. Las células fueron estimuladas con diferentes dosis de vitamina C y fueron analizadas por medio de: actividad gelatinolítica, zimografía, western blot en donde se utilizaron anticuerpos específicos para MMP-2, northern blot en donde se extrajeron los RNAs totales y mensajeros y se hibridaron con sondas marcadas para colágena tipo I (Col-I), colágena tipo III (Col-III), MMP-2, inhibidor tisular de la metaloproteinasas-1 (TIMP-1) y β -actina como control y ensayo de run-on en donde se extrajeron los núcleos y se analizaron para cuantificar la tasa de transcripción para MMP-2.

La línea celular se comportó de modo semejante a las células primarias por lo que se validó su uso para este tipo de estudios. Aunque en esta investigación encontramos que la vitamina C regula en alguna medida la síntesis de colágena encontramos un nuevo efecto del ácido ascórbico actuando como modulador de la MMP-2. Esta vitamina reguló la expresión y actividad de la MMP-2 en las células utilizadas y esta regulación se efectuó a nivel transcripcional.

Las metaloproteinasas están involucradas en la remodelación tisular y nuestros resultados nos permiten sugerir un mecanismo molecular que relaciona una baja disponibilidad de vitamina C durante el embarazo y el desarrollo de RPM.

Abstract.

Extensive research has been done to investigate the effect of nutrients on placental and fetal development. It is now evident that environmental factors such as diet may exert a profound effect on gene expression during pregnancy. A low vitamin C intake during pregnancy has been linked to a higher risk of premature rupture of the membranes (PROM) due to its well-known role in collagen biosynthesis.

The objective of this study was to evaluate the possible effect of this vitamin on collagen metabolism specially on collagen degradation using an in vitro model and measuring the effect of vitamin C on the synthesis of some collagen types and on the activity and expression of the 72 kDa collagenase (MMP-2) in human amnion resident cells. Primary epithelial cells as well as a human amniotic epithelial cellular line (WISH) were utilized. Cells were stimulated with different doses of vitamin C and were analyzed by: metalloproteinase mixed activity, gel substrate gelatinolytic activity, western blotting, northern blotting hybridized with labeled probes for type I collagen, type III collagen, MMP-2, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and β -actin and a run-on assay where nuclei were extracted and analyzed to quantify MMP-2 transcription rate.

The use of the cellular line was validated for this type of studies as this cells behaved similar to primary cells.

Even though in this study we found that vitamin C regulates to a certain extent collagen synthesis here we report a new effect of ascorbic acid acting as a modulator of the 72-kDa type IV collagenase (matrix metalloproteinase -2; MMP-2). MMP-2 expression/activity is down-regulated by vitamin C in human amnion culture cells. This regulatory effect is exerted at the transcriptional level and is specific for MMP-2.

Matrix metalloproteinases are involved in tissue remodeling and these results allow to suggest a molecular mechanism that relates a poor vitamin C availability during pregnancy and the development of PROM.

Introducción.

Generalidades.

La ruptura de las membranas corioamnióticas es un evento que sucede durante el trabajo de parto normal y que coincide con una serie de procesos encaminados a la expulsión del producto de la gestación entre los que se encuentran la dilatación del cuello uterino, entre otros.

Durante el trabajo de parto normal existe una secuencia de eventos que guardan sincronía entre sí. Sin embargo, existen situaciones en las que este equilibrio se pierde, los sucesos se desfazan y se pueden presentar situaciones patológicas como la ruptura prematura de membranas (RPM).

La RPM es la salida del líquido amniótico a través de una solución de continuidad de las membranas ovulares en embarazos mayores de 20 semanas y por lo menos dos horas antes de la iniciación del trabajo de parto (1). Al romperse las membranas se pierde la barrera que mantiene aislado al producto y se establece una vía directa de comunicación con el exterior.

La RPM es la causa identificada más frecuente de parto pretérmino en nuestro medio (2). Esta situación aporta un tercio de los prematuros que ingresan a una

terapia intensiva neonatal y según cifras informadas en el Instituto Nacional de Perinatología (INPer) ésta es la causa materna número uno de mortalidad en el neonato (2). En general se considera que si la RPM se presenta hacia el final de la gestación y el parto se desencadena después de algunas horas, la ruptura no repercute ni en la madre ni en el feto. El riesgo para el producto aumentará en relación a qué tan temprano en la gestación suceda la RPM. Si sucede antes de la semana 32, el riesgo de inmadurez pulmonar es muy elevado y se puede desarrollar el síndrome de insuficiencia respiratoria del neonato. En cuanto al tiempo de duración de la RPM antes de que se inicie el trabajo de parto, mientras más tiempo pase, aumenta el riesgo de complicaciones tanto para la madre como para el producto. Estas complicaciones se refieren casi exclusivamente a la presencia de infecciones (3-4).

Las frecuencias informadas de RPM varían de un país a otro y de un centro hospitalario a otro. En un estudio realizado en el INPer se encontró que la frecuencia de RPM fue de 9.2% (5), mientras que en el ISSSTE Ahued y col (6) reportaron una frecuencia de 10.7%, en Estados Unidos se han encontrado frecuencias mucho más bajas que están entre 1 y 5% (7).

A pesar de la frecuencia con la que se puede presentar la RPM y los elevados riesgos de morbilidad por prematuridad del producto, por infección materna o perinatal, aún existe controversia en cuanto a su definición, manejo, etiología,

factores desencadenantes y asociados (2,7).

Ruptura prematura de membranas y factores asociados.

Se desconoce con precisión el mecanismo que condiciona el rompimiento de las membranas corioamnióticas, sin embargo, hasta ahora se ha aceptado que se asocia al aumento de la presión intrauterina generada por las contracciones de este órgano y se cree, que las membranas que se rompen prematuramente son más débiles que las que se rompen a término. Sin embargo, esto no explica todos los casos ya que hay membranas que se rompen en ausencia de contracciones y en algunas condiciones experimentales las membranas pueden resistir fuerzas superiores a las que se dan durante el trabajo de parto (8,9), lo que sugiere que hay otros factores asociados.

Las maniobras quirúrgicas locales como el cerclaje que pueden lesionar de manera directa o provocar un proceso inflamatorio que desencadene la ruptura. También, se ha asociado a la incompetencia ístmico-cervical, ya que la función mecánica de soporte es responsabilidad tanto de las membranas como del cuello, y cuando éste es incompetente las membranas tienen que desempeñar esta función por sí mismas y al llegar a cierta edad gestacional cuando aumentan el peso del producto y la presión del líquido éstas podrían romperse (10).

Existen algunos factores predisponentes identificados para la RPM. como son, edad avanzada, multiparidad, carencia de control prenatal y condiciones raciales (5,7,11,12). Sin embargo, es probable que estos factores por si mismos no sean los desencadenantes de la RPM, sino que de alguna manera constituyan indicadores indirectos de una condición socioeconómica desfavorable.

Las infecciones locales y sistémicas también se han identificado como asociadas a RPM (13). Las teorías actuales que vinculan a la infección con la RPM o el parto pretérmino, proponen tres mecanismos: 1) Que las manifestaciones sean efecto directo de productos bacterianos o, 2) que sean consecuencia de la respuesta inmune o 3) que sean una mezcla de ambos. Sin embargo, a pesar de que la explicación de que la RPM por factor infeccioso ha sido muy difundida, no todas las RPM cursan con infección, ni todas las mujeres que se infectan desarrollan RPM y en muchos casos no se sabe si la RPM es consecuencia de la infección o si la infección es consecuencia de la RPM (14).

Las membranas corioamnióticas.

Las membranas corioamnióticas son los límites anatómicos para el feto durante su desarrollo intrauterino. Desde etapas muy tempranas de la vida embrionaria las membranas corioamnióticas juegan un papel muy importante en el desarrollo y protección fetal (15).

En años recientes se ha acumulado evidencia de que estas membranas no solo funcionan como una barrera mecánica o de protección para el feto sino que llevan a cabo diferentes funciones durante el embarazo como son: 1) la modulación local de la liberación de hormonas, 2) la regulación del crecimiento y la diferenciación celular y 3) la regulación de la contractibilidad uterina.

En este sentido se ha encontrado que las membranas son capaces de producir y metabolizar hormonas como la oxitocina, la β -endorfina (β -END), el neuropéptido Y (NPY), el factor liberador de corticotropina (CRF), además de su proteína acarreadora (CRF-BP) y servir como órganos endócrinos cuando contienen receptores como es el caso de los receptores para oxitocina.

En cuanto a los factores de crecimiento se ha encontrado que las membranas expresan mRNA para inhibina, activina, folistatina, factor de crecimiento transformante- α (TGF- α), factor de crecimiento epidermal (EGF), factores parecidos a la insulina I y II (IGF-I y II) y sus respectivas proteínas acarreadoras (IGFBP1 y 2). A su vez, las membranas tienen receptores para algunos de estos factores. Se ha encontrado que el corion expresa mRNA para interleucina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral α y β (TNF- α y β) y se ha encontrado presencia de interferón α (INF- α). Algunos de estos péptidos como la oxitocina, el CFR, la activina, el TGF- α y la IL-6 estimulan la liberación de prostaglandinas en las

membranas corioamniótica (16).

Actualmente existe la hipótesis de que la distensión mecánica que se va dando en las membranas en el transcurso del embarazo puede tener como resultado cambios en la respuesta autócrina-parácrina de éstas y causar cambios en la matriz extracelular. Esto puede determinar la pérdida y formación de contactos célula-matriz entre los receptores celulares de integrinas, fibronectinas y lamininas y la inducción de algunas enzimas que degradan moléculas de la matriz extracelular. Estas enzimas pertenecen a la familia de las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) que entre otras sustancias está regulada por hormonas, citocinas, factores de crecimiento, la misma matriz extracelular y sus fragmentos de degradación. En situaciones normales esto da lugar a un recambio continuo (síntesis/degradación) de la matriz extracelular (17). Por todo lo descrito anteriormente se puede concluir que las membranas están involucradas en los procesos de implantación, regulación del crecimiento fetal y en las señales de iniciación del trabajo de parto entre otros (16).

En cuanto a su estructura anatómica las membranas fetales son dos, el amnios y el corion. La membrana amniótica es la membrana interna y está en contacto directo con el líquido amniótico. No presenta vasos sanguíneos, músculo, vías linfáticas definidas, ni nervios. Mide aproximadamente entre 0.08-0.12 mm, es de 1/3 del grosor del corion y sin embargo ofrece más de la mitad de la fuerza tensil

de las membranas. Consiste de 5 capas histológicas.

1. **El epitelio** que es la más cercana al feto, es una monocapa celular en contacto con el líquido amniótico del cual obtiene los nutrimentos al igual que el resto de los componentes celulares de las membranas fetales, ya que el amnios es avascular, a excepción de las zonas más cercanas a la placenta (18). Las células amnióticas epiteliales y los fibroblastos que se encuentran en la capa número 4 (ver abajo) producen los componentes de la matriz extracelular de la capa compacta acelular y la lámina basal (colágenas tipo I, III y IV, fibronectina y laminina) y continúan produciendo matriz extracelular hasta el parto (19,20)
2. **Membrana basal** compuesta de fibras reticulares. Está compuesta principalmente por colágena tipo IV aunque también contiene laminina.
3. **La capa compacta** que casi no contiene células y que está constituida casi en su totalidad por matriz extracelular, es relativamente resistente a la infiltración leucocitaria. Esta capa es la que le otorga la mayor parte de la fuerza tensil a las membranas. Está constituida por colágenas I, III y V (18,20)
4. **La capa de fibroblastos** que le da al amnios su mayor grosor y permite la distensibilidad del amnios cuando está bajo presión.
5. **La capa esponjosa** que actúa como intermediaria entre el amnios y el corion, está formada de una red reticular de matriz colagenosa además de diferentes poblaciones celulares como son fibroblastos, trofoblastos y macrófagos tisulares embebidos en la matriz extracelular.

El corion es un tejido complejo rico en tejido conectivo, es tres veces más grueso que el amnios pero bastante más débil, mide entre 0.04-0.4 mm y contiene 4 capas histológicas.

1. **La capa celular** que contiene fibroblastos, está presente durante la fase temprana del embarazo y tiende a desaparecer conforme avanza éste.
2. **La capa reticular** que es la más gruesa del corion, está formada por algunos fibroblastos y por una red de fibras reticulares que se extienden hacia el trofoblasto para pegarlo al útero.
3. **La membrana pseudo-basal** que forma un tipo de basamento (tejido conectivo) para los trofoblastos.
4. **El trofoblasto** que varía en su profundidad y no se distingue muy bien de la decidua a la cual se une.

El corion contiene algunos vasos sanguíneos provenientes de la placenta para soporte y nutrición, pero tampoco hay evidencia de inervación, estos vasos parecen atrofiarse al progresar el embarazo (18).

La matriz extracelular forma la red estructural de los diferentes tejidos que conforman la membrana. Esta matriz está formada especialmente por proteínas fibrosas que se ensamblan a una red y que están inmersas en un gel de proteoglicanos. Se considera que la colágena presente en las membranas es la responsables de la elasticidad y fuerza tensil de éstas (8, 21).

En las membranas corioamnióticas se han encontrado diferentes tipos de colágena. Las tipo I y III están asociadas y se encuentran distribuidas en las capas compacta, de fibroblastos, esponjosa y reticular. Aparentemente largas bandas fibrosas de colágena tipos I y III forman el esqueleto fibroso de la matriz extracelular (22) y probablemente sean las responsables de la mayor parte de la fuerza tensil de las membranas (17).

La colágena tipo IV es considerada como un componente fundamental de las membranas basales (23) pero también se ha demostrado su presencia en tejido no perteneciente a estas membranas y en estos tejidos puede estar teniendo la misma función que en las membranas basales que es la de fijar las células al estroma y en el estroma formar puntos anclados para conectar fibras y filamentos.

Recientemente se ha detectado una red extensa de este tipo de colágena en el corioamnios y se ha sugerido que en éste juega un papel importante en el desarrollo y mantenimiento de la estructura de la matriz (17).

También se han encontrado colágena tipos V y VI pero en menor cantidad, éstas tienen una estructura filamentosa que conecta a las colágenas fibrilares con las membranas basales epiteliales y con las estructuras de tejido conectivo que las rodean (22).

La distribución de los diferentes tipos de colágena en las membranas corioamnióticas detectada por inmunofluorecencia y la presencia de componentes no colagenosos se presenta en la figura 1 (17-22).

Estructura de la colágena.

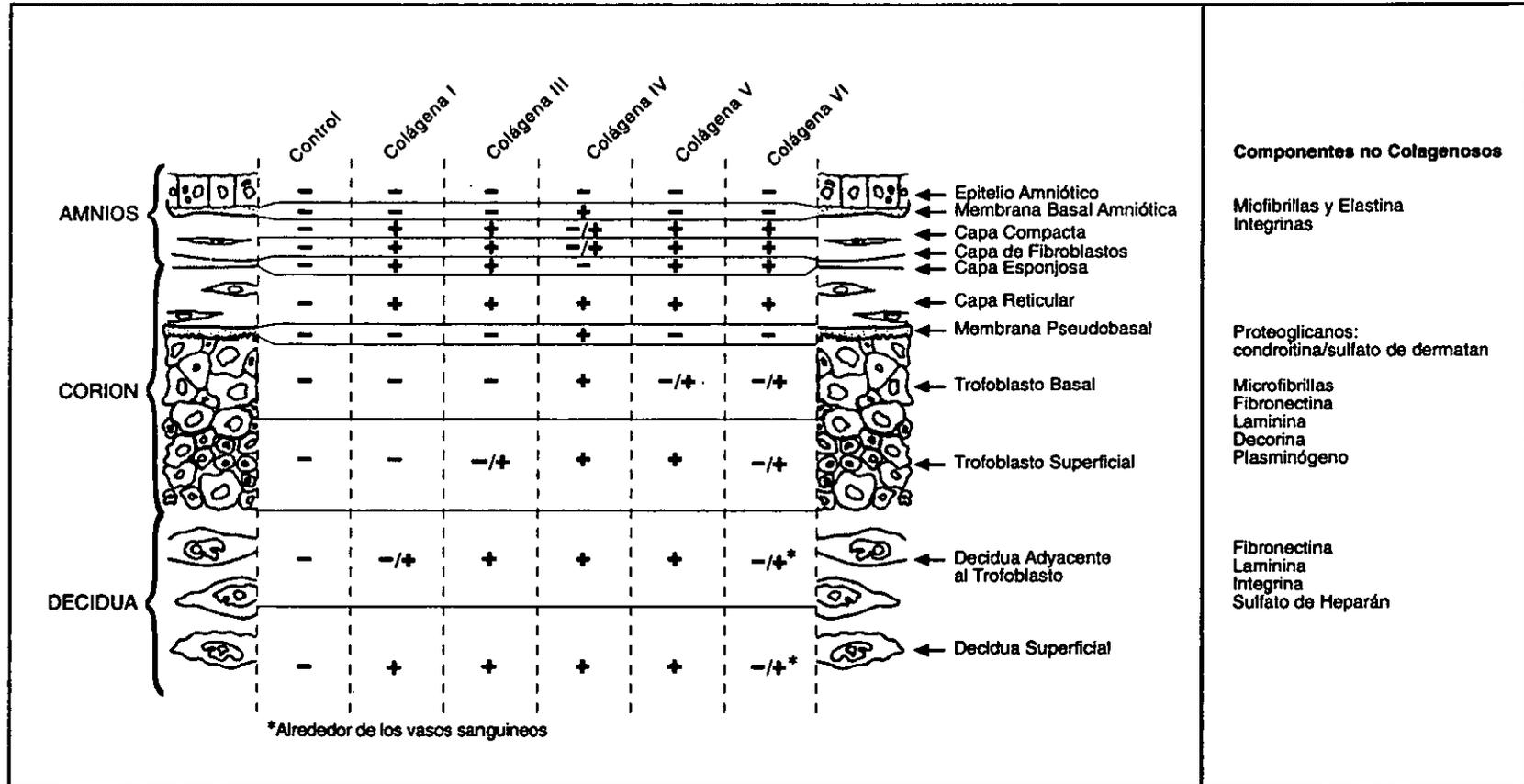
La colágena se encuentra ampliamente distribuida en el organismo. Se han identificado hasta la fecha 19 tipos genéticamente diferentes (24), que solían clasificarse en dos grandes grupos: fibrilares y no fibrilares (25) y que actualmente se clasifican en los siguientes grupos:

Cuadro 1. Clasificación, función y tipos de colágena

CLASIFICACIÓN	FUNCIÓN	TIPOS DE COLÁGENA
Colágenas formadoras de fibras	fuerza tensil al tejido conectivo	I, II, III, V, XI
Colágenas formadoras de láminas	componentes estructurales de membranas basales	IV, VIII, X
Colágenas formadoras de filamentos con agrupaciones globulares tipo abalorios	enlaza la colágena con otros componentes de la matriz extracelular	VI
Colágenas formadoras de fibras de anclaje	une membranas basales a fibras de colágena del entorno	VII
Colágenas asociadas a fibras con interrupciones en las triple hélices. FACIT	conectan fibras a otros elementos de la matriz extracelular	IX, XII, XIV
Colágenas transmembranales	punteo entre células basales y el estroma	XIII, XVII
Colágenas multiplexinas	no se conoce	XV, XVI, XVIII, IX

Ref :24-26

Figura 1. Distribución de los diferentes tipos de colágena detectada en las membranas corioamnióticas.



Tomado de: Malak T. y Col. Placenta 1993; 14:385-406
 Bryant-Greenwood G. Placenta 1998; 19:1-11

Entre los tipos que mayoritariamente se encuentran en las membranas corioamnióticas las colágenas tipo I y III son fibrilares y la IV es no fibrilar o formadora de láminas. La diferencia entre ambos grupos es que las fibrilares se agregan formando filamentos resistentes a la tracción y las formadoras de láminas forman redes en la membrana basal (25).

La estructura común de la colágena es una triple hélice, en la que tres hélices levógiras (cadenas α) giran alrededor de si mismas para formar una superhélice dextrógira, cada uno de estos péptidos contiene aproximadamente 1000 residuos de aminoácidos. La secuencia que siguen estos aminoácidos es muy regular. Casi cada tercer residuo es glicina (Gly), entre el 10 y 30 % de los otros residuos X o Y de la secuencia repetida Gly-X-Y son prolina e hidroxiprolina siendo ésta última muy difícil de encontrar en otros péptidos (26,27). La prolina y la glicina son muy importantes en la formación de la triple hélice de colágena.

La prolina por su estructura cíclica estabiliza la conformación de una cadena helicoidal levógira que es mucho más abierta que la hélice α y la glicina por ser el aminoácido más pequeño permite que las 3 cadenas helicoidales α se unan para formar la triple hélice final de colágena (27). Estos residuos junto con la hidroxiprolina son indispensables para formar puentes hidrógeno necesarios para la estabilidad de la hélice.

En condiciones fisiológicas la principal propiedad biológica de la colágena es su autoensamble espontáneo. Los aminoácidos hidrofóbicos y cargados de la colágena dirigen el autoensamblado y empieza por una fase intracelular en donde se sintetiza la cadena de procolágena por traducción de los mRNAs, conforme las cadenas pasan al retículo endoplásmico rugoso ocurren modificaciones post-traduccionales. Se eliminan los péptidos señal de las tres cadenas y los residuos de prolina y lisina que están en la posición Y se convierten en hidroxiprolina e hidroxilisina respectivamente (26). Posteriormente se forman las triple hélices uniéndose las cadenas formando puentes de hidrógeno y enlaces covalentes entre monómeros (25). La primera asociación entre cadenas se da principalmente entre los propéptidos C-terminales (24).

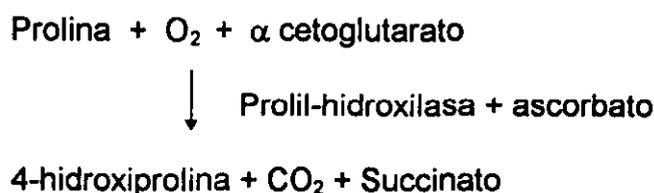
La colágena es secretada al espacio extracelular y esta secreción es directamente proporcional a la hidroxilación de la prolina (28). En la fase extracelular las peptidasas eliminan a los propéptidos de los extremos amino y carboxilo. La hidrólisis se da en los extremos no helicoidales dando como resultado la tropocolágena (24,28). Se presenta un arreglo escalonado de los haces de tropocolágena, con la formación de enlaces cruzados y teniendo como resultado la fibra madura (25).

Vitamina C, colágena y RPM.

Se han encontrado algunas asociaciones entre la RPM y factores relacionados a nivel socioeconómico bajo, que a su vez puede estar relacionado con desnutrición o deficiencias marginales de algunos nutrimentos específicos (29).

Se sabe que algunos nutrimentos participan en el metabolismo de la colágena y entre éstos se encuentra la vitamina C. La participación de la vitamina C en la biosíntesis de la colágena se conoce desde 1934 (30).

Existen algunos estudios en donde se ha encontrado resistencia mecánica disminuida y concentraciones bajas de colágena en muestras de membranas con ruptura prematura (8,31) y esto a su vez se ha relacionado con la vitamina C (32), esta relación se establece a partir del descubrimiento de que el ácido ascórbico es un factor indispensable para la hidroxilación de la prolina y la lisina (27).



Las prolinas de las cadenas α son hidroxiladas. Uno de los oxígenos que se une

al C-4 de la prolina proviene de O_2 (oxígeno molecular), el otro átomo de oxígeno es tomado por el α -cetoglutarato, que es convertido a succinato. Esta reacción es catalizada por la enzima prolil-hidroxilasa en presencia de un ion de Fe^{2+} que está unido a la enzima y necesita activar el O_2 . La enzima también convierte el α -cetoglutarato en succinato sin hidroxilar la prolina. En esta reacción parcial se forma un complejo de $Fe^{3+}-O^-$ que inactiva a la enzima, para volverla a activar se necesita al ascorbato para reducir al ion férrico. En el proceso de recuperación el ascorbato es oxidado a ácido dehidroascórbico, o sea que el ácido ascórbico funciona como un antioxidante específico.

La hidroxiprolina estabiliza la triple hélice de la colágena formando enlaces de hidrógeno intercatenarios (27). En ausencia de hidroxiprolina la colágena es inestable y aunque se forman enlaces disulfuro intercatenarios entre los propéptidos carboxílicos, las cadenas se desnaturalizan, aumenta la degradación y la colágena no es secretada en tasas normales (28).

La hidroxilación de la lisina se lleva a cabo en forma similar nada más que se utiliza la enzima lisil hidroxilasa, durante las modificaciones postraduccionales de la colágena se insertan moléculas de hidratos de carbono que se unen covalentemente a los residuos de hidroxilisina, la cantidad de éstos que se una dependerá del tipo de colágena. Las fibrilares contienen relativamente pocos azúcares mientras que las laminares son ricas en éstas moléculas. Por otra parte,

la colágena se estabiliza por medio de la formación de enlaces cruzados covalentes, las uniones dentro de una misma molécula de tropocolágena y entre dos moléculas distintas corren a cargo de los residuos de lisina e hidroxilisina, teniendo como resultado un enlace cruzado de hidroxipiridinio, estos enlaces cruzados confieren fortaleza mecánica a las fibras de colágena (27).

Actualmente se sabe que esta relación es más compleja ya que se han desarrollado varios modelos celulares en donde la estimulación con vitamina C induce *per se* la síntesis de algunos tipos de colágena como los tipo I, IV y X (33). Se ha visto que el ácido ascórbico incrementa la transcripción, traducción y estabilidad de los RNAs mensajeros (mRNA) de algunas procolágenas, además de estimular su secreción hacia el espacio extracelular (34,35). En cuanto a la expresión de colágena tipo I la tasa de transcripción aumenta hasta tres veces con la adición de vitamina C a células en cultivo (fibroblastos) y que esta estimulación induce un incremento de mRNA de hasta 6 veces en 12 horas. En cuanto a la colágena tipo IV la estimulación con vitamina C incrementa la producción de ésta en cultivos celulares en estado preconfluyente (33). Houglum y col (36) sugieren que el ácido ascórbico induce la peroxidación de lípidos y que ésta a su vez incrementa la transcripción genética y los niveles de mRNA para la colágena.

Actualmente es difícil encontrar una deficiencia franca de vitamina C (Escorbuto),

por lo que la hipótesis que se maneja es que la deficiencia subclínica de esta vitamina, exacerbada por las necesidades aumentadas por el embarazo, podría manifestarse en la cantidad y calidad de la colágena sintetizada a lo largo del embarazo.

El primer estudio a este respecto fue realizado por Wideman y cols (37) en 1964 quienes encontraron que en las mujeres con concentraciones bajas de vitamina C en plasma durante el último trimestre de la gestación, se presentaba un porcentaje mayor de RPM y mortalidad perinatal. Cabe mencionar que el grupo estudiado estuvo compuesto por mujeres con nivel socioeconómico bajo.

En el Instituto Nacional de Perinatología (INPer) México, se realizó un estudio transversal en donde se midió la concentración de vitamina C en leucocitos en un grupo de mujeres con y sin RPM en el posparto inmediato. Se encontró que la mujeres con concentraciones más bajas de vitamina C rompieron membranas prematuramente con más frecuencia (38). La importancia de evaluar las concentraciones de vitamina C en leucocitos radica en que estas células son un indicador de memoria y acopio de ácido ascórbico y dehidroascórbico (39).

Con base en estos resultados se diseñó un estudio prospectivo en donde a un grupo de mujeres embarazadas se les determinó la concentración de vitamina C en leucocitos cada 4 semanas desde la semana 20 hasta la 36 de gestación. En

estew estudio se identificó a la semana 28 como el período que presentó mayor valor predictivo al riesgo de RPM, estableciendo un punto de corte de $15.02 \mu\text{g}/10^8$ células como una concentración marginalmente baja ya que las concentraciones normales se consideran arriba de $16 \mu\text{g}/10^8$ células. Se estudiaron 30 mujeres de las cuales 8 presentaron RPM y todas estuvieron por debajo del punto de corte establecido a la semana 28 de gestación (40).

En Suiza se realizó una investigación semejante en la que se encontró que la concentración de ácido ascórbico en líquido amniótico era significativamente menor en las mujeres con RPM. En este estudio los autores plantean que el efecto protector de la vitamina C se relaciona con las características antioxidantes del ascorbato y el posible papel de este nutrimento en la inhibición de fenómenos de degradación tisular por estrés oxidativo (41).

Para poder establecer el mecanismo a través del cual las concentraciones marginales de vitamina C se asocian a un mayor riesgo de presentar RPM, es necesario utilizar modelos que permitan explorar los mecanismos moleculares involucrados en esta asociación. Pues solo de esta manera se podrá establecer si se trata de un fenómeno de modulación de la síntesis/degradación de la colágena o si el papel de la vitamina C se limita a la inhibición de los fenómenos oxidativos.

Degradación de matriz extracelular y RPM.

La degradación de la matriz extracelular requiere una serie compleja de actividades enzimáticas, las principales enzimas responsables de ésta son las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs). Las MMPs son una familia de enzimas que muestra gran selectividad por su sustrato y se pueden clasificar en diferente subfamilias (cuadro 2) (42-45).

Las MMPs comparten algunas características: los miembros de esta familia son proteinasas que contienen zinc, son secretadas en forma latente o de zimógenos y activadas in situ (46), deben mostrar actividad proteolítica sobre elementos de la matriz extracelular, normalmente funcionan fuera de la célula a un pH neutro, aunque algunas funcionan mejor a un pH un poco más ácido como es el caso de la estromelisina-1 (44) y son inhibidas por inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs) con los que forman complejos inactivos en una relación 1:1 (46). Además, de compartir un conjunto de dominios (figura 2) entre los que se encuentran:

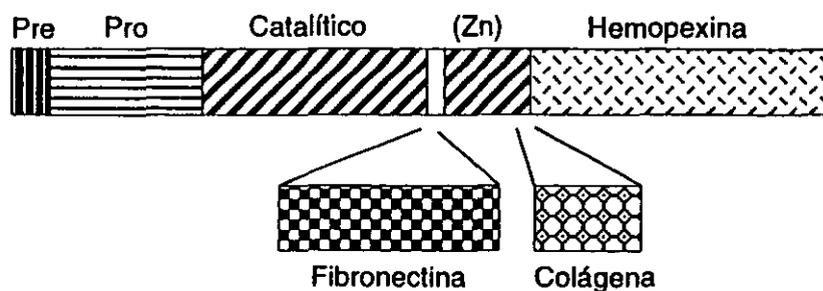
- Un dominio propeptídico responsable de la latencia de las proenzimas y que contiene un residuo de cisteína que forma un enlace coordinado con el Zn^{2+} presente en el dominio catalítico y que bloquea el sitio activo de las proenzimas.
- Un dominio catalítico que incluye un dominio de unión a Zn^{2+} esencial para la

actividad enzimática, además de éste, las MMPs contienen un segundo átomo de zinc estructural.

- Entre el dominio de unión de zinc y el dominio tipo hemopexina existe una región variable tipo bisagra, rica en prolina, que permite al carboxilo terminal doblarse sobre el dominio catalítico.
- Un sitio carboxilo terminal con un dominio tipo hemopexina/vitronectina que es importante en la unión de las MMPs con sus sustratos e inhibidores. (43,44,46).

Las gelatinasas A y B (72 y 92 kDa respectivamente) contienen dominios adicionales con secuencias similares a las proteínas de la matriz extracelular. Un dominio tipo fibronectina que se puede encontrar en las dos gelatinasas y un dominio parecido a la colágena V que se encuentra en la gelatinasa de 92 kDa.

Figura 2. Representación esquemática de los dominios de las MMPs



* Tomado de Matrisian L. BioEssay 1992;14:455-462

Cuadro 2. Metaloproteasas de matriz extracelular

Nombre genérico	Nº de MMP	Sustrato
COLAGENASAS Colagenasa Intersticial Colagenasa de PMN Colagenasa -3	MMP-1 MMP-8 MMP-13	Colágena I, II, III, VII, VIII y X Colágena fibrilar, gelatina y fibronectina Colágena fibrilar, colágena tipo IV, IX, X, XI, proteoglicanos y fibronectina
GELATINASAS Gelatinasa de 72 kDa (A) Gelatinasa de 92 kDa (B)	MMP-2 MMP-9	Colágenas tipo IV, V, gelatina y elastina. Colágenas tipo IV, V, VII, X y fibronectina.
ESTROMELISINAS Estromelisina-1 Estromelisina-2 o Transina-2 Estromelisina-3	MMP-3 MMP-10 MMP-11	Proteoglicanos, fibronectina y elastina. Colágenas tipo IV, V, IX, X y lamininas.
Matrilisina o Metaloproteinasa uterina	MMP-7	Proteoglicanos, fibronectina, colágena IV, gelatina y elastina
Elastasa de macrófagos o Metaloelastasa	MMP-12	Proteoglicanos, elastina, fibronectina, gelatina y colágena IV.
	MMP-19	Sustratos sintéticos para las MMPs.
Enamelisina	MMP-20	Proteína dental.
MT MMPs MT-1 MMP MT-2 MMP MT-3 MMP MT-4 MMP	MMP-14 MMP-15 MMP-16 MMP-17	Colágena fibrilar, gelatina. Pro-gelatina. Gelatina y caseína. Colágena fibrilar.

(42-45).

Hoy en día se sabe que las membranas corioamnióticas cuentan con un sistema local de degradación de matriz extracelular que involucra a algunas de las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) (17-47).

En las membranas corioamnióticas se ha encontrado la presencia constitutiva de MMP-2 durante toda la gestación (48,49) mientras que la presencia de MMP-9 se ha encontrado cuando se inicia el trabajo de parto o en situaciones de RPM (17-49). Se ha visto que estas MMPs son sintetizadas principalmente por las células del epitelio amniótico y en menor medida por las células del trofoblasto y la decidua. La presencia de MMP-2 y MMP-9 tanto en amnios como en corion sugiere que la degradación se puede realizar desde 2 sitios diferentes (17,48-49).

La actividad de las MMPs puede estar regulada a diferentes niveles: a nivel génico, a nivel de secreción, a nivel de activación del zimógeno, pero una vez que éste es activado la regulación va estar dada por los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP 1,2,3 y 4) (44,50), es importante hacer notar que los TIMPs además de funcionar como inhibidores también son factores activos en la estimulación del crecimiento(44). Se ha visto que el TIMP-1 inhibe a la MMP-9 y el TIMP-2 a la MMP-2, el TIMP-3 se ancla firmemente a la matriz y a demás de inhibir a las MMPs se ha visto que al igual que el TIMP-1 y 2 tiene la propiedad adicional de estimular el crecimiento celular y promover que células

transformadas se despeguen de la matriz (44); el TIMP-4 es el que se ha encontrado más recientemente y el que menos se ha estudiado pero actualmente se sabe que se une a la Progelatinasa A y que podría modular la activación de superficie celular de ésta al igual que el TIMP-2 (50). Se ha observado que el TIMP-1 está disminuido en el líquido amniótico de mujeres con RPM o en el trabajo de parto que es cuando también se eleva la expresión de la MMP-9 (10).

Dado que la colágena es el principal soporte estructural de las membranas y la que le proporciona la fuerza tensil, cualquier evento que disminuya la cantidad o calidad de ésta en el amnios podría estar involucrado en el mecanismo fisiopatogénico de la RPM, en este sentido y en relación a los descrito con anterioridad se podría estar dando un aumento en la degradación de la colágena, una disminución en la biosíntesis o una combinación de ambos factores, con la consecuente disminución en la cantidad y/o calidad de la colágena teniendo como resultado una RPM. A pesar de la frecuencia con la que se presenta esta patología y su impacto potencial en la morbilidad perinatal, su etiopatogenia no está bien definida y la mayoría de los reportes en esta tema hablan del manejo de ésta más que de la prevención, en este sentido, el poder definir los mecanismos moleculares que involucrados en este problema nos podría permitir establecer modelos de intervención.

Objetivo.

Evaluar el efecto que diferentes concentraciones de ácido ascórbico tienen sobre la expresión de algunos tipos de colágena y las metaloproteinasas presentes en las células epiteliales residentes de la membrana amniótica como un modelo de estudio de la modulación que esta vitamina tiene sobre el anabolismo y catabolismo de la matriz extracelular presente en estas membranas.

Objetivos específicos.

- Establecer un modelo *in vitro* para el estudio del metabolismo de la colágena en células humanas derivadas de amnios.
- Establecer la asociación que existe entre la concentración de vitamina C y la tasa de expresión de Col-I, Col-III y MMP-2 en células derivadas del amnios humano en cultivo.

Hipótesis general.

La vitamina C es un modulador del metabolismo de colágena en las membranas corioamnióticas.

Hipótesis específicas.

- La vitamina C estimula la expresión de los genes de Col I y III en células derivadas del epitelio amniótico.
- La vitamina C inhibe la expresión del gen de MMP-2 en células derivadas del epitelio amniótico.

Materiales y métodos.

Cultivo celular.

Se decidió utilizar células epiteliales derivadas de amnios humano ya que se sabe que producen los componentes de la matriz extracelular de la capa compacta acelular y de la lámina basal (colágena tipos I, III, IV, fibronectina y laminina) y continúan produciendo matriz extracelular hasta el parto (19,20) y por el otro, también se ha visto que las MMPs presentes en las membranas son sintetizadas principalmente por estas células y en menor medida por las células del trofoblasto y la decidua (47).

Se aislaron células de epitelio amniótico humano de amnios provenientes de pacientes sometidas a cesárea en embarazos a término. Las células se disgregaron con tripsina al 0.25% preparada en solución salina de Hanks' libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} .

La identificación positiva de las células epiteliales se hizo por ultraestructura e inmunohistoquímica. Para la ultraestructura las células aisladas se fijaron en glutaraldehído en buffer de cacodilatos durante 10 minutos a temperatura ambiente y se incluyeron en resina Epon 812 para cortes semifinos y microscopía electrónica. Para la inmunohistoquímica las células se crecieron en portaobjetos de vidrio y se inmunotipificaron con anticuerpos primarios policlonales anti-

citoqueratina (detección de células epiteliales), anti-prolactina (detección de células deciduales) y monoclonal de anti- β hCG (detección de células del trofoblasto) (Dakopats Glostrup, Denmark). Los complejos antígeno-anticuerpo fueron revelados con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC, Vectastain, Vector, Burlingame, CA), para los policlonales se agregó un segundo anticuerpo anticonejo biotinilado (anti-inmunoglobulinas de conejo) y para el monoclonal se agregó un segundo anticuerpo antiratón (anti IgG de ratón).

También se utilizó la línea celular WISH ATCC-CCL5 (American Type Culture Collection) extraída de epitelio amniótico humano en 1958 por L. Hyflick. Esta línea celular se estableció a partir de colonias alteradas que aparecieron en un subcultivo de una monocapa primaria de células amnióticas después de 35 días de cultivo *in vitro* y fue incluida en la ATCC en junio de 1963 en su pase número 163 (51).

Las células primarias y la línea celular WISH (American Type Culture Collection, ATCC CCL5) se cultivaron en cajas de 25 cm² en medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con 10% de suero fetal de ternera (Hyclone, EUA), 25mM HEPES, 110 mg/L de piruvato de sodio y 20 mM de L-glutamina. Las células se mantuvieron en una estufa de cultivo a 37°C con atmósfera húmeda con 95% aire/ 5% CO₂. Las células no adherentes se separaron al cabo de 24 horas y el resto se dejó llegar a confluencia. A las células confluentes se les cambió el medio de

cultivo por medio libre de suero de ternera y suplementado con 0.2% de hidrolizado de lactoalbúmina para evitar que los componentes del suero fetal, incluyendo la vitamina C, pudieran tener alguna influencia en los resultados y las células se incubaron por otras 24 horas.

Con el objeto de analizar la respuesta al ácido ascórbico, se cambió una vez más el medio de cultivo con hidrolizado de lactoalbúmina, por medio fresco libre de suero inmediatamente antes del experimento y se agregó ácido ascórbico en un intervalo de 10 a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En cada experimento se incluyeron controles en los que no se agregó vitamina C y otros en los que se agregó 29.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, que corresponde a la concentración fisiológica de esta vitamina encontrada en el líquido amniótico (52), aunque otros autores han reportado concentraciones más bajas (18.49 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (41). Después de una incubación de 4 horas se rescataron los medios de cultivo y las células para llevar a cabo los ensayos que se describen a continuación.

Obtención de sondas: crecimiento de bacterias transformadas, purificación y digestión de plásmidos.

Las bacterias transformadas se obtuvieron de la ATCC en forma liofilizada, para la Col-I, ATTC 57322 (E. coli), para Col-III, ATTC 61324 (E. coli HB101), para TIMP 1, ATTC 59666 (E. coli HB101) y para β actina, ATTC 65128 (E. coli XLI-Blue). Para la MMP-2 (plásmido donado por el Dr. Goldberg, (53)), se usaron

bacterias competentes (*E. coli* DH5 α , Max efficiency DH5TH, Gibco BRL Life Technology, EU) las cuales fueron transformadas por el método de Hanahan (54) utilizando CaCl₂ 100mM. Una vez teniendo todas las bacterias transformadas se sembraron en medio LB estéril con antibiótico (ampicilina, 50 μ g/mL), se incubaron en agitación a 37°C durante 4-24 horas. La turbidez del medio es un indicador del crecimiento bacteriano, las bacterias se dejaron proliferar hasta que al realizar una lectura espectrofotométrica a 600 nm, la absorbancia fue aproximadamente 1.0.

La purificación de las sondas se realizó utilizando la técnica de Plasmid Midi Kit (Quiagen, EU) (55). La técnica utiliza la lisis alcalina de las bacterias, seguida de la adhesión del plásmido a una resina de intercambio aniónico. El RNA, las proteínas, las impurezas de bajo peso molecular y demás componentes celulares, son removidos mediante un lavado, el plásmido se eluye con un buffer de alta concentración salina y finalmente se precipita eliminando las sales con isopropanol. El plásmido, fue digerido por una hora a 37°C con la enzima de restricción correspondiente para obtener el inserto en cuestión (56). (Cuadro 3)

Se separaron los fragmentos de DNA resultantes de la digestión por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Se observaron las bandas de DNA teñidas con bromuro de etidio y se cortó el pedazo de gel con el inserto de donde se extrajo utilizando la técnica de GeneClean II kit (BIO 101, EU) (57). La matriz

del gel de agarosa se deshizo en presencia de NaI a 55°C. Posteriormente se utilizó una matriz de sílica para adherir selectivamente el DNA se lavó con una solución de agua, etanol (20%) y NaCl 0.4M y el inserto se eluyó con TE.

Cuadro 3. Descripción de los plásmidos (ATCC).

PLASMIDO	ORIGEN	VECTOR	MARCADOR RESISTENCIA	ENZIMAS RESTRICCIÓN	TAMAÑO INSERTO
Col-I	Humano	pBR222	Ampicilina	EcoRI	3.55 Kb
Col-III	Fibroblasto humano	pBR322	Ampicilina	EcoRI/HindIII	1.3 Kb
MMP-2	Epitelio bronquial humano	pGEM-3	Ampicilina	EcoRI/BamHI	1.7Kb
TIMP-I	Humano	PTZ	Ampicilina	BglII	3.9 Kb
β actina	Hipocampo humano	pBluescript SK-	Ampicilina	EcoRI	1.1 Kb

Cuantificación de vitamina C.

Algunas de las células antes mencionadas fueron cultivadas en cajas de 24 pozos para poder cuantificar el ácido ascórbico a diferentes tiempos (0 a 4 horas) para asegurar que la vitamina C estuviera presente dentro de las células bajo las condiciones de experimentación utilizadas. El medio de cultivo y las células se precipitaron con ácido perclórico 0.35 M y los filtrados obtenidos se procesaron por HPLC. La cromatografía se llevo a cabo según Lee y col. (58) utilizando un equipo de cromatografía de líquidos (Perkin Elmer, EU) empleando una bomba isocrática modelo LC-250 y un detector amperométrico LC-4C equipado con dos electrodos, uno de carbono vidriado capa fina y otro de referencia de Ag/AgCl (Bioanalytical Systems, EU). La fase móvil empleada fue un amortiguador de

acetato de sodio 8.0 mmol/L pH 4. El estándar de trabajo se preparó con ácido ascórbico en ácido perclórico 50 mmol/L y con esta solución se prepararon los siguientes puntos 2.5, 5.0, 10.0, 15.0 y 20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El estándar interno que se utilizó fue hidrobromuro de 3,4 dihidroxibencilamina preparado con ácido perclórico 50 mmol/L.

Para la curva estándar las concentraciones finales de ácido ascórbico en los 20 μL que se inyectan correspondieron a 0.02, 0.04, 0.08, 0.12 y 0.16 $\mu\text{g}/20 \mu\text{L}$ y la concentración del estándar interno fue de 0.08 $\mu\text{g}/20 \mu\text{L}$ inyectados. La columna empleada en el análisis fue una $\mu\text{Bondapak C}_{18}$ de 3.9 X 300 mm (Waters. EU). Tamaño de partícula de 10 μm irregular, con un flujo de 1 mL/min, el detector se ajustó con un potencial de + 0.7 V y un intervalo de 0.1 μA . El volumen de muestra se corrigió conforme al número de células; para ajustar el número de células, el ácido ascórbico intracelular se normalizó a 50 μg de DNA. El total de DNA por pozo se cuantificó de acuerdo al método de Burton (59) en donde se extrajo el DNA de las células lavando cada pozo con solución salina, posteriormente se llevaron a cabo varios pasos de extracción e hidrólisis utilizando ácido perclórico (HClO_4) 0.35N, 0.2N, 0.1N, 0.5N y NaOH 3N. Se resuspendió el botón en HClO_4 0.5N y se calentó durante 15 minutos a 90°C para hidrolizar el DNA. Se centrifugó y se retuvo el líquido sobrenadante. Para cuantificar el DNA se preparó una curva estándar con 5, 10, 25 y 50 μg de DNA por tubo, tomados de un estándar de DNA (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se agregó a los tubos

HClO₄ 0.5N el cual también se utilizó como blanco, se agregó a todos los tubos 4 mL de la solución de Burton (difenilamina + acetaldehído) y se incubaron a temperatura ambiente para posteriormente analizarlos espectrofotométricamente a 600 nm.

Una vez ajustado el número de células y realizada la cuantificación de la vitamina C por HPLC, el cálculo de la concentración de vitamina C se realizó con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{altura A.A.}}{\text{altura S.I.}} \times 0.775682 \times \frac{0.08 \mu\text{g}}{\# \text{ cels}}$$

En donde: altura A.A. es el pico de ácido ascórbico, altura S.I. es el pico del estándar interno y 0.775682 es el factor de respuesta que da el aparato al analito determinado.

Metabolismo de colágena

Extracción de RNA para colágenas tipo I y III.

Para la extracción del RNA total se utilizó el reactivo TRIzol™ (Gibco, BRL Life Technologies, EUA) (60), que es una solución de fenol e isotiocianato de guanidina que mantiene la integridad del RNA, mientras rompe la células y altera la solubilidad de los otros componentes celulares. En pasos subsecuentes, el cloroformo y la centrifugación separaron la solución en dos fases: una acuosa y

otra orgánica, rescatándose el RNA de la fase acuosa y precipitándolo con isopropanol. La muestra extraída se guardó en 100 μ L de agua con dietilpicrocarbonato (DEPC).

Se realizaron algunos Northern Blots con estos RNAs totales pero las bandas que se obtuvieron eran muy tenues por lo que se decidió obtener los mRNA para ver si las bandas eran más fácilmente cuantificables.

A partir de los RNAs totales se ajustaron las muestras a 0.5M de LiCl con LiCl 10M. Se prepararon columnas de oligo dTcelulosa (0.5g de oligo dTcelulosa, 3 mL de NaOH 0.1M). Las columnas fueron equilibradas con dos lavados de solución amortiguadora (poli(A)loading buffer, LiCl 0.5M, Tris-HCl 0.01M pH 7.5, EDTA 1mM y SDS 0.1%). La muestra se colocó en las columnas y se lavó 2 veces, posteriormente se centrifugó y se lavó con LiCl 0.15M y Tris-HCl 0.01M pH 7.5., volvió a centrifugarse y se lavó con EDTA 2mM/SDS 0.1% y se volvió a centrifugar. Se le agregó 2.5 volúmenes de etanol se guardó a -70°C por 30 minutos se volvió a centrifugar y se resuspendió en 50 μ L de agua con DEPC (56)

Determinación de la expresión de los mRNA para colágena tipos I y III por Northern Blot.(56)

Se tomaron 1-5 μ g poli-A de los mRNAs extraídos, se desnaturalizaron 15 minutos a 65°C y 5 minutos en hielo después se corrieron por electroforesis en

geles de agarosa al 8%, al terminar la corrida se lavaron los geles con SSC 10X y con agua con DEPC para eliminar el formaldehído y se transfirieron a membranas de polivinilideno Inmobilon-N (Millipore, Medford, USA), una vez transferidos los mRNA se fijaron con luz ultravioleta con un UV Crosslinker (Stratagene, EU). Para bloquear los espacios donde la sonda pudiera pegarse de manera inespecífica estas membranas se dejaron en agitación a 42°C toda la noche en una solución de prehibridación (12.5 mL de formamida, 2.5 mL de solución de Denhart 50X, 0.25 mL de SDS 10%, 7.5 mL SSC 20X y 0.50 mL de esperma de salmón desnaturalizado) y posteriormente se hibridaron de la misma forma con sondas para Col I, Col III y β actina como control, que fueron marcadas con P^{32} -CTP utilizando el método de Random Primers (Gibco BRL, Life Technologies, Inc. EU), en donde cada inserto se desnaturalizó y se expuso a la presencia de hexámeros de nucleótidos al azar, al P^{32} CTP y a la enzima polimerasa (fragmento de Klenow), posteriormente se purificó la sonda utilizando columnas de Sephadex.

Una vez separada la sonda de los fragmentos se determinó la cantidad de marca incorporada disolviendo una alícuota de la sonda en líquido de centelleo y sometiénola al detector de centelleo Liquid Scintillation Analyzer 1900 TR TRI-CARB (Packard, EU), se consideró como satisfactoria una actividad específica de 5×10^9 dpm/ μ g de DNA. De las membranas hibridadas se realizaron autorradiografías las cuales se cuantificaron con un densitómetro Eagle Eye (Stratagene, La Jolla, Ca). La expresión relativa de las bandas se comparó contra

la expresión de las bandas de mRNA de β actina.

Actividad mezclada de metaloproteinasas.

Para evaluar los cambios en la actividad de metaloproteinasas en los medios de cultivo de las células estimuladas con vitamina C, se cuantificó la actividad gelatinolítica incubando 10 μ g de proteína de cada uno de los medios de cultivo en presencia de un buffer de Tris-HCl pH 7.4 (Tris-HCl 50mM, NaCl 0.15 M y CaCl_2) y utilizando como sustrato 10 μ g de colágena tipos I y III marcadas radioactivamente (gelatina- ^3H) desnaturalizadas térmicamente a 37°C durante 24 horas de acuerdo al método de Terato y col (61). Cada muestra se ensayó por duplicado en condiciones basales y luego de ser tratada con un activador de metaloproteinasas (Acetato aminofenil mercúrico, APMA 1.0 mM), la actividad de metaloproteinasas se calculó al considerar la actividad inhibible por EDTA y se expresó como actividad específica en μ g de gelatina degradada/mg de proteína incubada/24 horas a 37 °C.

Actividad gelatinolítica en geles-sustrato o zimografía.

10 μ g de proteína de los medios de cultivo estimulados fueron aplicados por carril y fueron sometidos a zimografía utilizando geles de poliacrilamida en formato pequeño (Biorad, Richmond, CA) preparados de acuerdo a técnicas ya descritas (49) y co-polimerizados con gelatina de piel de cerdo (1 mg/mL). Las muestras se corrieron a corriente constante de 10 mA y después los geles fueron lavados con

Tritón X-100 al 2.5% durante 30 minutos a temperatura ambiente para eliminar el SDS. Los geles sustrato fueron incubados en Tris-HCl 50 mM pH 7.4 a 37 °C durante 24 horas y luego fueron teñidos con azul de Coomassie R-250. En cada corrida se incluyó un marcador estándar de peso molecular de 200 a 14 kDa y estándar purificado de pro-MMP-2 obtenido de los medios en donde se cultivaron las células WISH y purificado como se explica más adelante.

Este mismo ensayo se corrió con las células estimuladas con cantidades equimolares de glutatión, éste es un tripéptido que contiene un grupo sulfhidrilo que participa en sistemas de oxido-reducción celular, es muy abundante en el citoplasma, núcleo y las mitocondrias y se podría considerar el antioxidante mayoritario en estas fracciones celulares (27-62). Se llevó a cabo este ensayo para descartar la posibilidad de que cualquier hallazgo encontrado con la vitamina C tuviera que ver con su acción como oxido-reductor.

Para evaluar el efecto directo de la vitamina C en la actividad de MMP, la pro-MMP-2 se obtuvo de los medios en donde se cultivaron las células WISH y se purificó de la siguiente manera: se precipitó utilizando sulfato de amonio al 60%, las sales fueron eliminadas por diálisis y la pro-MMP-2 fue purificada por medio de cromatografía de afinidad en columnas de Sepharosa 6B-gelatina e inmunoprecipitada con un anticuerpo monoclonal dirigido contra MMP-2 (Oncogene, Abi) y agarosa-proteína G (63); se llevó a cabo una incubación

directa de la pro-colagenasa tipo IV de 72 kDa humana purificada con cantidades equivalentes de ácido ascórbico a las utilizadas en la estimulación de las células. Para esto se corrieron muestras de Pro-MMP-2 purificadas en las condiciones antes mencionadas, una vez obtenidas las bandas de lisis cada carril fue cortado e incubado por separado en un buffer con concentraciones de ácido ascórbico equivalentes a las usadas en la estimulación (0, 10, 29, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Todas las bandas de lisis encontradas en estos experimentos fueron analizadas por densitometría (Eagle Eye, Stratagene, La Jolla, Ca).

Inmunotransferencia o Western blot.

Se agregaron 10 μg de proteína de los medios estimulados en cada carril de un gel de poliacrilamida al 10% bajo condiciones reductoras. La electrotransferencia de la proteína a membranas Inmobilon-P (Millipore, Medford, USA) usando un sistema semi-seco se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Towbin y col (64), posteriormente la membrana fue bloqueada con leche descremada al 5% en un buffer de TTBS (Tris-HCl 100 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, Tween 20 0.1%, pH 7.5) por una hora. El revelado de las membranas se realizó agregando 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anticuerpos policlonales monoespecíficos contra colagenasa tipo IV de 72 kDa (MMP-2) donadas por el Dr. William Stetler-Stevenson del NIH, Bethesda (48). Los anticuerpos primarios fueron detectados con el método ABC (Vectastain, Vector, Burlingame, CA), el cual contiene un segundo anticuerpo biotinilado al

cual se le une el complejo avidina- peroxidasa formando un complejo el cual al agregarle Diaminobencidina (DAB) produce bandas color café que posteriormente fueron analizadas por densitometría (Eagle Eye, Stratagene, La Jolla, Ca).

Determinación de mRNA para MMP-2 o Northern Blot.

Las células sometidas a las diferentes concentraciones de ácido ascórbico fueron procesadas para extracción de RNA total usando Trizol (Gibco BRL, Gaithersburg, USA) (60).

Los RNAs extraídos fueron corridos por electroforesis en geles de agarosa al 8%, como se describe con anterioridad nada más que por ser RNAs totales se agregó al preparar las muestras hasta 25 µg. Al terminar la corrida se lavaron los geles y se transfirieron a membranas de polivinilideno conocidas como Inmobilon-N (Millipore, Medford, USA), una vez transferidos los mRNA se fijaron con luz ultravioleta con un UV Crosslinker (Stratagene, EU). Estas membranas se prehibridaron y posteriormente se hibridaron con sondas para MMP-2 , TIMP-1 y β actina como control. Las sondas se marcaron con P³²-CTP utilizando el método de "Random Primers" y se realizó la autorradiografía. Las autorradiografías se cuantificaron con un densitómetro Eagle Eye (Stratagene, La Jolla, Ca). La expresión relativa de las bandas se comparó contra la expresión de las bandas de mRNA de β actina.

Ensayo de Run-on.

Se extrajeron los núcleos de las células estimuladas con diferentes concentraciones de vitamina C con Nonident P-40 y se almacenaron a -70 °C en alícuotas de 2 a 5 por 10^7 núcleos aproximadamente. Se tomó una alícuota y los RNAs nacientes fueron elongados *in vitro* en presencia de ^{32}P -UTP, seguidos por la purificación de los RNAs marcados.

2 μg de las sondas de cDNA para MMP-2 y β actina fueron inmovilizadas en filtros de nitrocelulosa utilizando el Slot blot. Los RNAs marcados con ^{32}P fueron hibridados al filtro bajo condiciones donde los RNAs marcados se unieron a su DNA complementario. Se lavaron los filtros y se revelaron por autorradiografía. La tasa de transcripción se determinó comparando las bandas de la MMP-2 en los distintos puntos con el basal, la β actina se utilizó como control de la cantidad de RNAs nacientes que fueron cargados. Las determinaciones se llevaron a cabo utilizando un densitómetro Eagle Eye (Stratagene, La Jolla, Ca) (65).

Resultados.

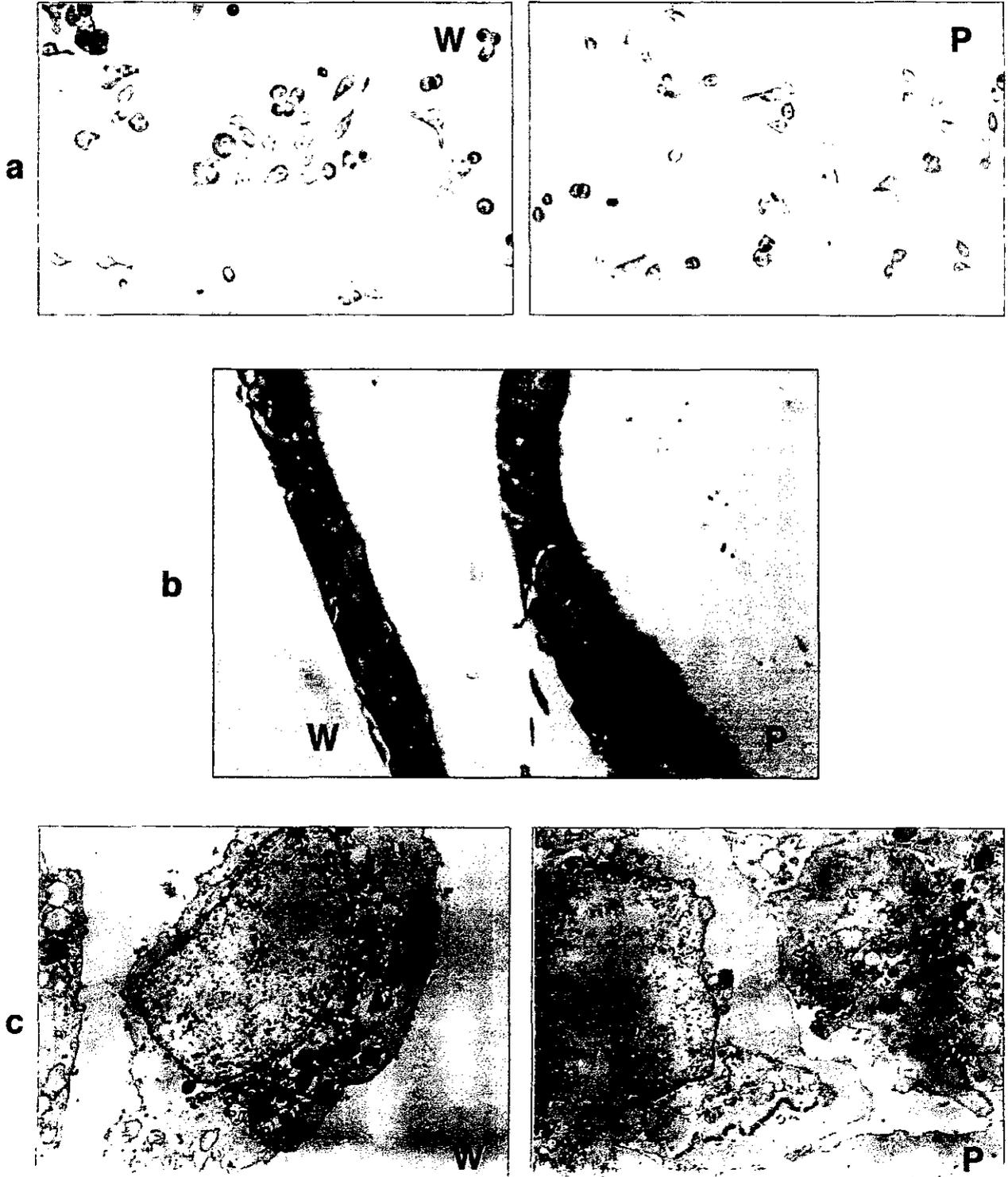
Cultivo celular e identificación de las células

Se utilizaron los medios de cultivo tanto de las células primarias (P) como de la línea WISH (W). Se validó el uso de la línea celular por medio de inmunohistoquímica, morfología y ultraestructura (Figura 3a, b y c). Los dos tipos celulares dieron tinción positiva contra el anticuerpo anti-citoqueratina (tinción color sepia) y negativa para prolactina y β hCG. Los cortes semifinos mostraron tamaño y forma equivalente, núcleos centrales, citoplasma con inclusiones (gránulos de glucógeno) y microvellosidades en ambas células, la única diferencia entre unas células y otras fue que las primarias mostraron mayor cantidad de material citoplásmico (glucógeno), al igual que en la ultraestructura en donde se muestra tamaño equivalente y núcleos similares en ambas células pero mayor cantidad en el tamaño y en el contenido de gránulos del citoplasma en las células primarias. Viendo la similitud de los patrones de comportamiento en los ensayos como se muestra adelante, se procedió a realizar los demás ensayos con la línea celular.

Vitamina C intracelular.

Una incubación de 4 horas de las células en presencia de vitamina C fue suficiente para obtener el máximo efecto en los experimentos realizados. Al

FIGURAS 3 a, b, y c. Inmunohistoquímica, morfología y ultraestructura de las células derivadas de amnios humano. (W=WISH y P=Células Primarias)



cuantificar la concentración intracelular de vitamina C al agregar 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante este tiempo (figura 4) casi todo el ácido ascórbico (86%, intervalo de 83.0 a 88.3, $n = 8$) permaneció en el espacio extracelular bajo estas condiciones experimentales.

Determinación de los mRNA para colágena tipo I y III por northern blot.

Se encontró que la expresión de los mRNA de Colágenas I y III tuvo tendencia a aumentar en relación a la concentración de vitamina C, no sucediendo esto con las bandas de β actina (figura 5). La intensidad densitométrica relativa de las bandas, se calculó comparándolas y corrigiéndolas con la expresión de las bandas de β actina, se llevaron a cabo 4 experimentos para colágena I y 2 para colágena III. No se realizó un análisis estadístico ya que los coeficientes de variación de las áreas relativas encontrados entre los diferentes ensayos fueron muy grandes (Cuadro 4 y 5).

Actividad mezclada de metaloproteinasas.

La actividad gelatinolítica en los medios de cultivo primarios y de las células WISH activados con APMA mostraron una dependencia inversa con las dosis de vitamina C, siendo la dosis más alta de ascorbato la que se relacionó con la actividad gelatinolítica más baja (figura 6). La actividad específica de la gelatinasa fue de (media \pm DE, $n=8$) 124.3 ± 4.9 μg de gelatina degradada/mg de proteína. La actividad gelatinolítica disminuyó progresivamente con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de vitamina C

FIGURA 4. Vitamina C intracelular. Se agregaron 200 $\mu\text{g/ml}$ de vitamina C a las células en cultivo y posteriormente cada hora hasta llegar a cuatro, la vitamina C intra y extra celular fue cuantificada en las condiciones experimentales utilizadas.

VITAMINA C INTRACELULAR

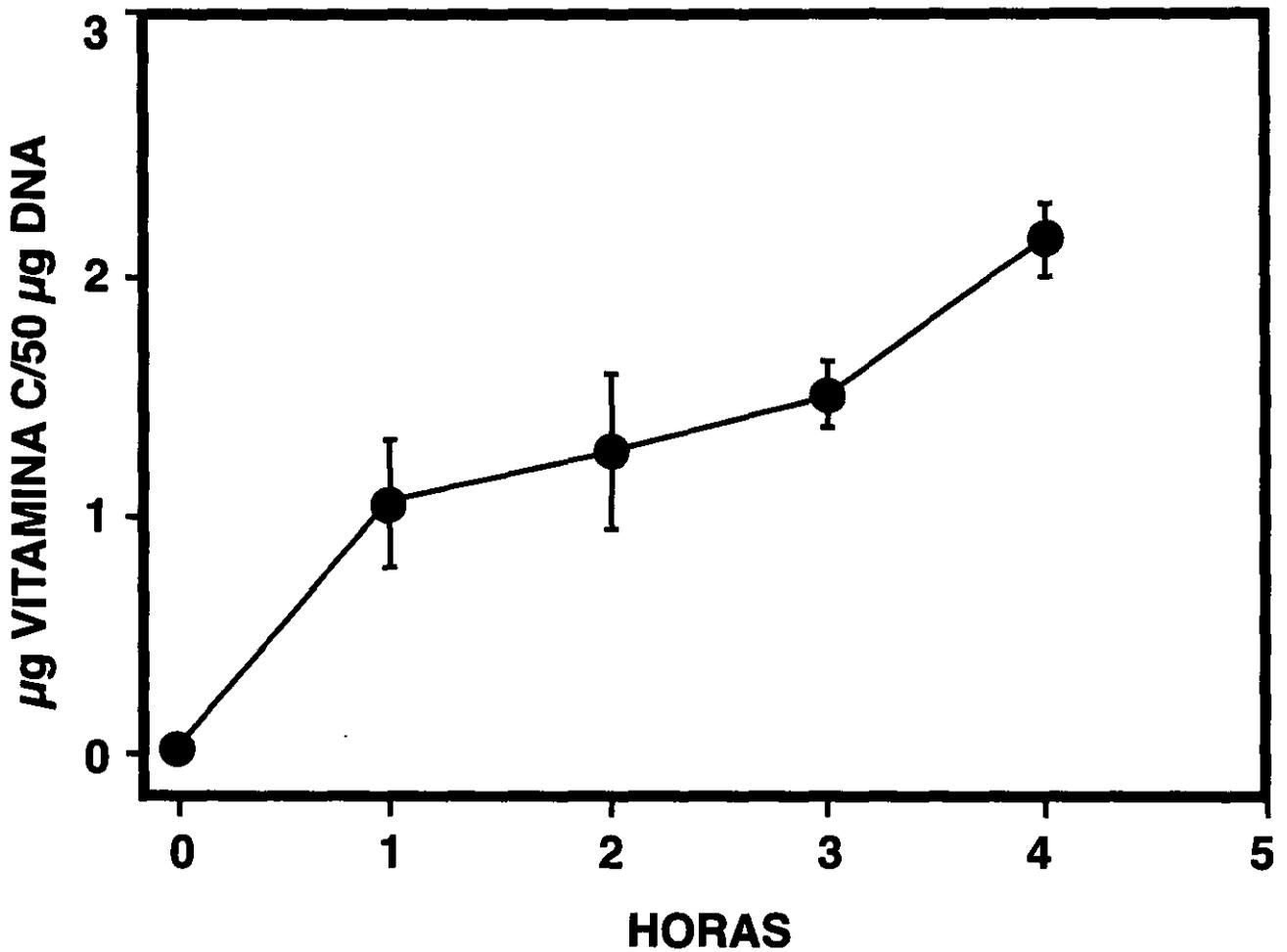
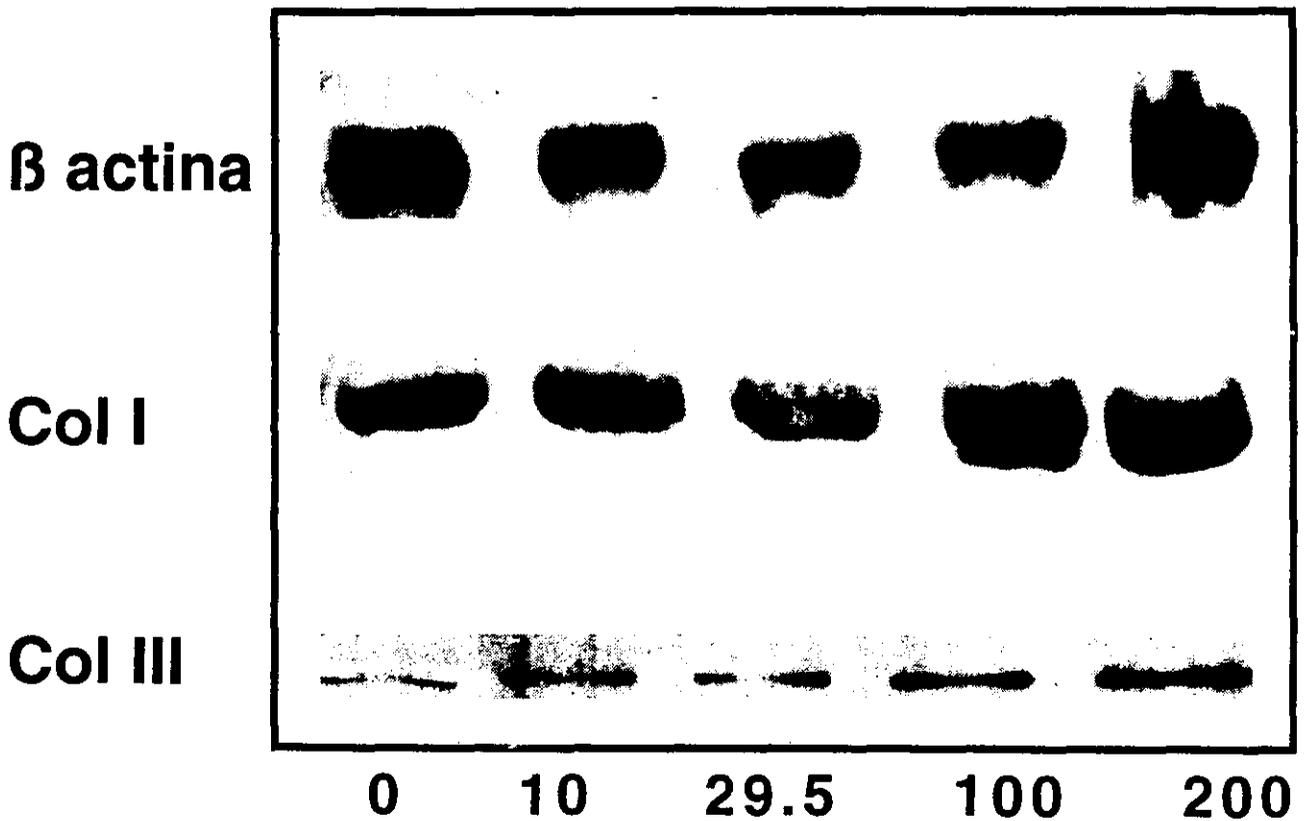


FIGURA 5. Autorradiografía. Expresión de mRNA de β actina, Col I y Col III. Las células estimuladas con 0, 10, 29.5, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de vitamina C (carriles 1, 2, 3, 4 y 5) no mostraron diferencias significativas en la expresión de los mRNA de Col I y Col III.



Cuadro 4. Promedio de áreas relativas \pm desviación estándar (DE) de los resultados obtenidos de las membranas de colágena I.

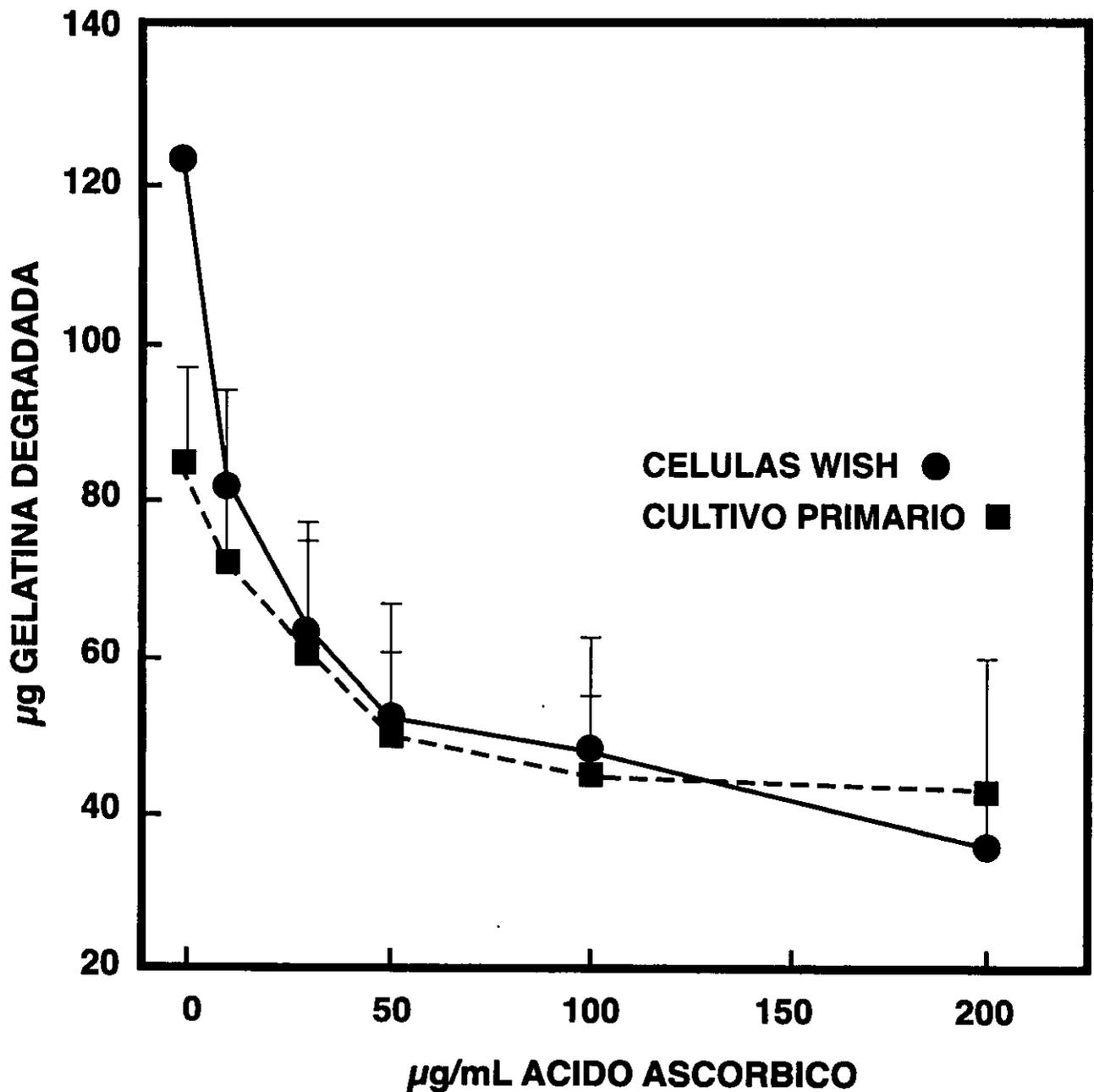
Concentración de vitamina C ($\mu\text{g/mL}$)	Número de muestra (n)	Promedio áreas relativas \pm DE	Coefficiente de variación (%)
0	4	1	
10	4	1.37 ± 0.56	40.9
29.5	3	1.59 ± 0.58	36.6
100	3	1.80 ± 0.35	19.2
200	3	1.76 ± 0.66	37.4

Cuadro 5. Promedio de áreas relativas \pm desviación estándar (DE) de los resultados obtenidos de las membranas de colágena III.

Concentración de vitamina C ($\mu\text{g/mL}$)	Número de muestra (n)	Promedio áreas relativas \pm DE	Coefficiente de variación (%)
0	2	1	
10	2	1.37 ± 0.46	34.0
29.5	2	1.23 ± 0.41	33.3
100	1	1.87	
200	2	1.74 ± 0.38	21.8

a 82.1 ± 9.7 , con 29.5 $\mu\text{g/mL}$ a 63 ± 7.8 , con 50 $\mu\text{g/mL}$ a 52.6 ± 9.6 , con 100 $\mu\text{g/mL}$ a 47.8 ± 6.1 y con 200 $\mu\text{g/mL}$ a 37.2 ± 6.1 . Todas las concentraciones de vitamina C disminuyeron la actividad gelatinolítica (ANOVA, $p < 0.01$) considerando la ausencia de vitamina C como la actividad basal.

FIGURA 6. ACTIVIDAD GELATINOLITICA. Las células (cultivo primario y línea celular) fueron estimuladas con diferentes dosis de vitamina C (0, 10, 29.5, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se midió la actividad gelatinolítica en los medios de cultivo activados con APMA utilizando un sustrato radioactivo. La actividad gelatinolítica disminuyó al aumentar la dosis de vitamina C tanto en los medios de cultivo de las células primarias como en los de la línea celular.



Actividad gelatinolítica en geles sustrato o zimografía

El análisis de geles sustrato mostró la presencia de una banda de lisis con un peso molecular estimado de 71 kDa que corresponde a la MMP-2 para los dos tipos de cultivo celular utilizados de acuerdo a la migración relativa de un estándar purificado (figura 7).

La intensidad de las bandas de lisis encontradas en los ensayos realizados con los medios de cultivo de las células primarias fue mayor. La intensidad relativa de las bandas de lisis de los medios utilizados disminuyó al aumentar la dosis de la vitamina C (figura 8a). Las cantidades equimolares de glutatión utilizadas no afectaron la expresión basal de la MMP-2 (figura 8b). Al realizar un análisis densitométrico semi-cuantitativo y tomando los medios libres de vitamina C como el 100% de actividad, la actividad residual fue aproximadamente de 60% en la dosis de 29.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (intervalo de 53 a 72%, $n = 8$) y del 18 % en los medios con 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de vitamina C (intervalo de 15 a 30%, $n = 8$). El ANOVA de intervalos mostró diferencias significativas entre todas las dosis ($p < 0.0001$). Al realizar la incubación directa de la pro-colagenasa tipo IV de 72 kDa con la vitamina C no se encontró que esta tuviera ningún efecto sobre la actividad enzimática (figura 8c).

Western blot y northern blot para MMP-2

El ensayo de Western blot de los medios de los cultivos celulares utilizados reveló la presencia de una banda de 71 kDa detectada con el anticuerpo para

MMP-2. La intensidad relativa de estas bandas disminuyó a 72% con 29.5 $\mu\text{g/mL}$ (intervalo de 70 a 78%, $n = 8$) y a 55.6% con 200 $\mu\text{g/mL}$ de vitamina C (intervalo de 45 a 65.1%, $n = 5$) comparada con la de las células incubadas en ausencia de vitamina C (figura 9a). El ANOVA de intervalos mostró diferencias significativas entre todos los grupos ($p < 0.001$).

La expresión de los mRNA de MMP-2 disminuyó cuando la concentración de la dosis de vitamina C aumentó, no sucediendo esto con las bandas de β actina (figura 9b), la intensidad densitométrica relativa disminuyó a 63% con 29.5 $\mu\text{g/mL}$ de vitamina C (intervalo de 58 a 72, $n = 4$) y a 8.7% con 200 $\mu\text{g/mL}$ (intervalo de 6 a 11%, $n = 4$). Las diferencias estadísticas alcanzaron una $p < 0.0001$ entre los grupos. No se encontró expresión de los mRNA de TIMP-1.

Ensayo de run-on para MMP-2.

La tasa de transcripción para MMP-2 evaluada por medio del ensayo de Run-on y medida por la intensidad densitométrica relativa de las bandas disminuyó a 13% (intervalo de 11 a 17, $n = 3$) en los núcleos obtenidos de las células estimuladas con 200 $\mu\text{g/mL}$ de vitamina C comparados con el intervalo basal obtenido en ausencia de vitamina C. (figura 10).

Figura 7. ACTIVIDAD GELATINOLITICA EN GEL SUSTRATO (ZIMOGRAFIA). Las células fueron estimuladas con las diferentes dosis de vitamina C, 0 (carril 1), 10 (carril 2) 29.5 (carril 3), 50 (carril 4), 100 (carril 5) y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (carril 6), los medios de cultivo (de las células primarias y de la línea celular) se corrieron en un gel de poliacrilamida en el cual la gelatina fue copolimerizada e incubada. Las bandas de lisis para los medios de las células cultivadas (P =células primarias y W = línea celular) que correspondieron a un peso molecular de 72 kDa o Pro- MMP-2 disminuyeron en intensidad al aumentar la dosis de vitamina C agregada.

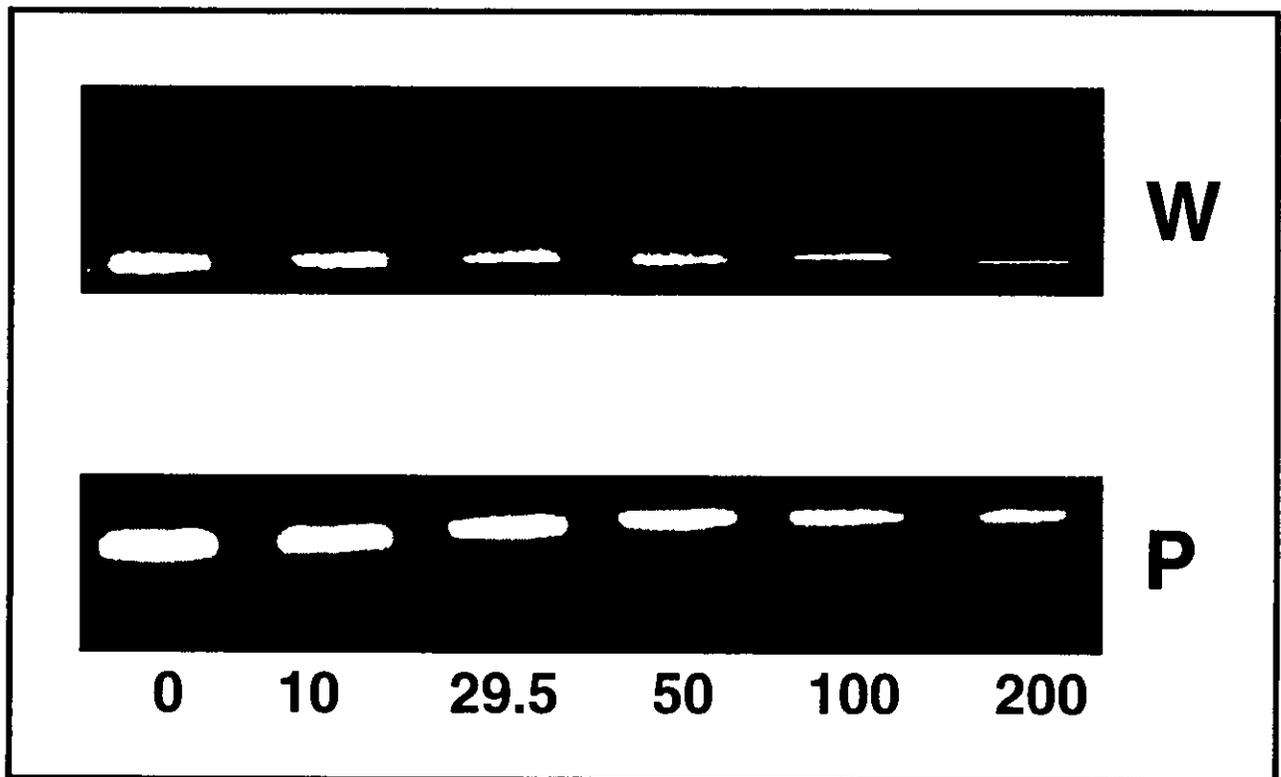


Figura 8. GELES SUSTRATO DE GELATINA. Los carriles 1 al 5 corresponden a la actividad gelatinolítica de los medios de cultivo de las células WISH estimuladas con 0, 10, 29.5, 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$ de vitamina C (figura A) o cantidades equimolares de glutatión (Figura B). Un estándar purificado de pro-MMP-2 se encuentra en el carril 6. Se detectó una disminución progresiva en la actividad en las células tratadas con vitamina C., no así en las tratadas con glutatión. En la figura C, 5 carriles fueron cargados y corridos con pro-MMP-2 purificada, cada carril fue cortado e incubado individualmente en un buffer suplementado con las mismas concentraciones de vitamina C mencionadas anteriormente. No se pudo documentar un efecto directo de la vitamina C sobre la actividad enzimática.

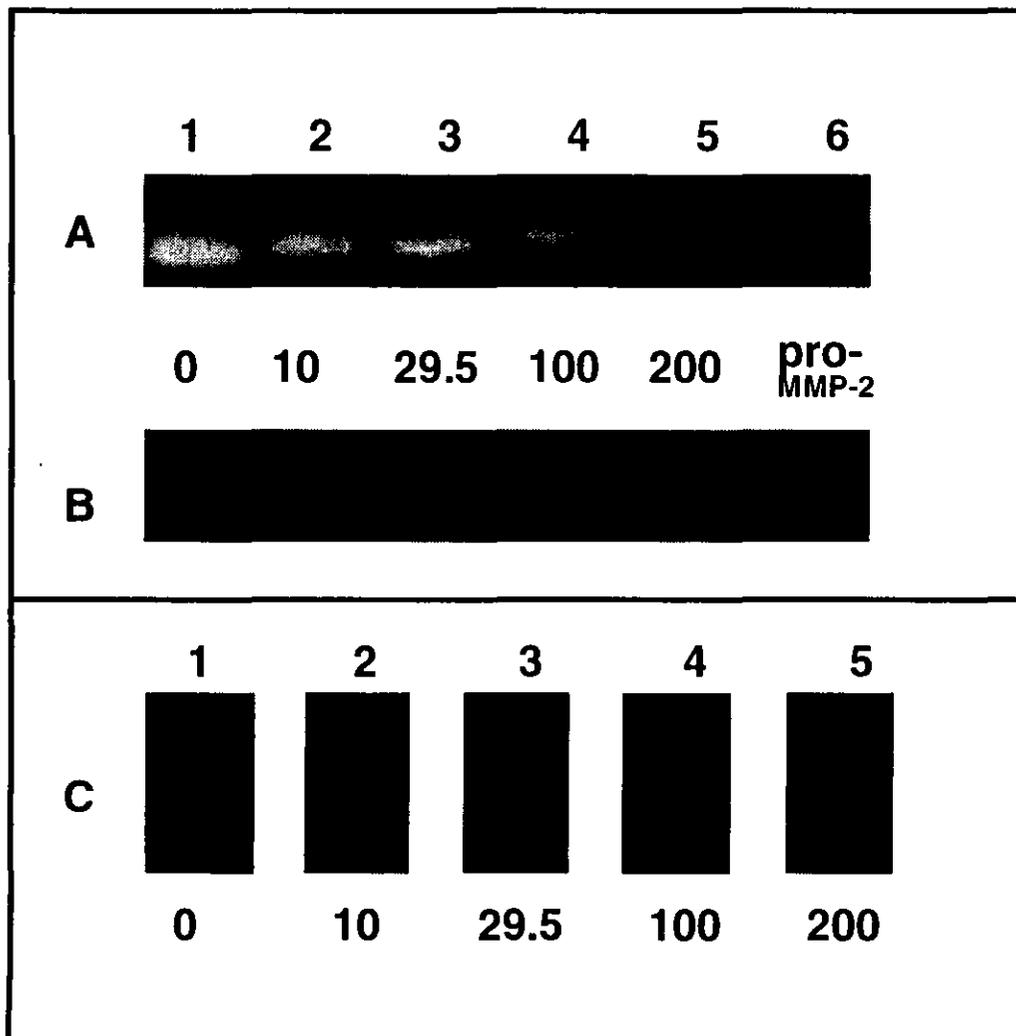


Figura 9. WESTERN Y NORTHERN BLOT. Figura a. La MMP-2 inmunoreactiva disminuyó en el medio de cultivo de las células WISH estimuladas con vitamina C. Los carriles 1 al 5 contenían 0,10, 29.5, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de vitamina C respectivamente. Figura b. La expresión basal de los mRNA de MMP-2 (carril 1) disminuyó en las células estimuladas con 29.5, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de vitamina C (carriles 2,3 y 4). No se encontró ningún efecto sobre la β actina.

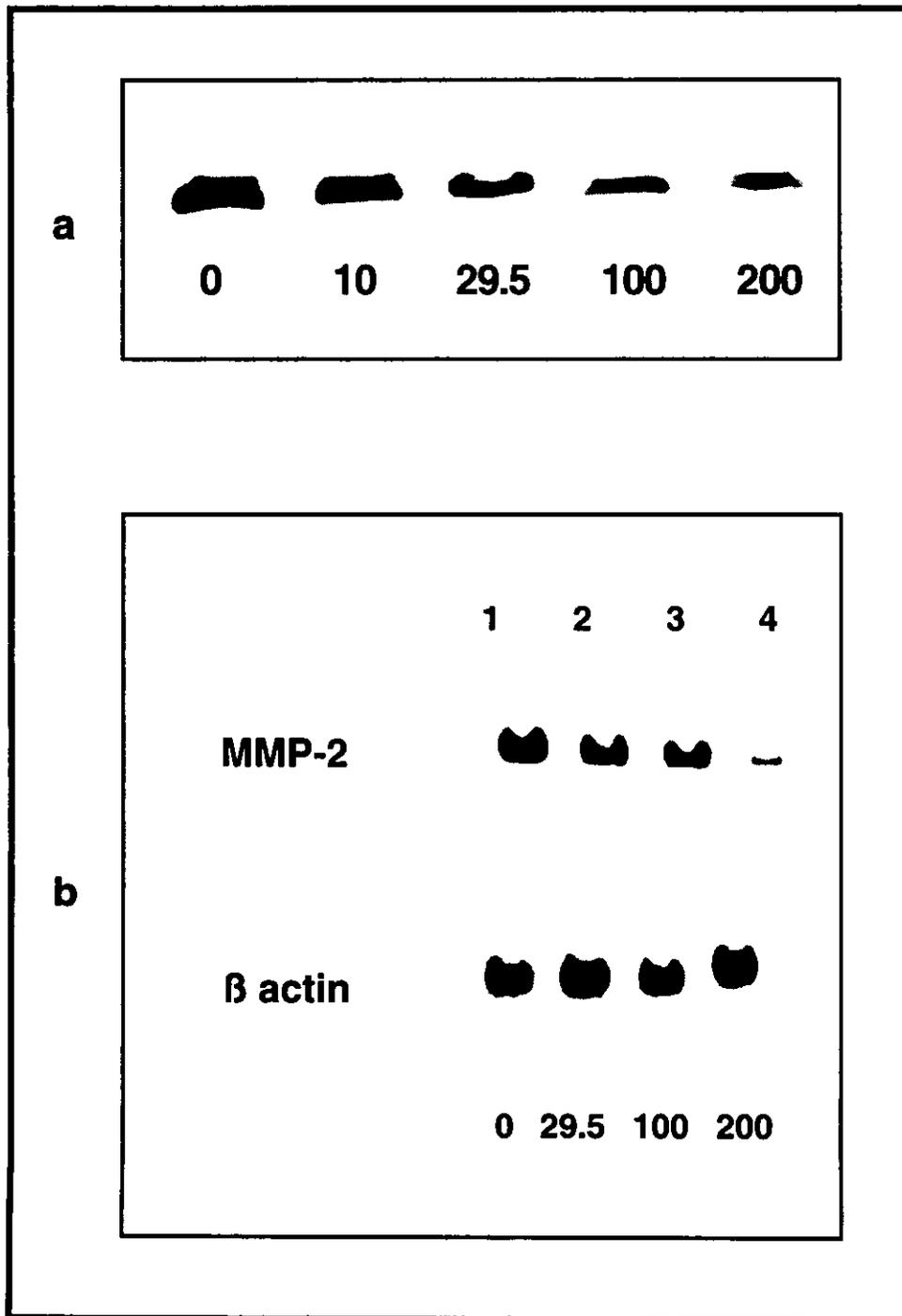
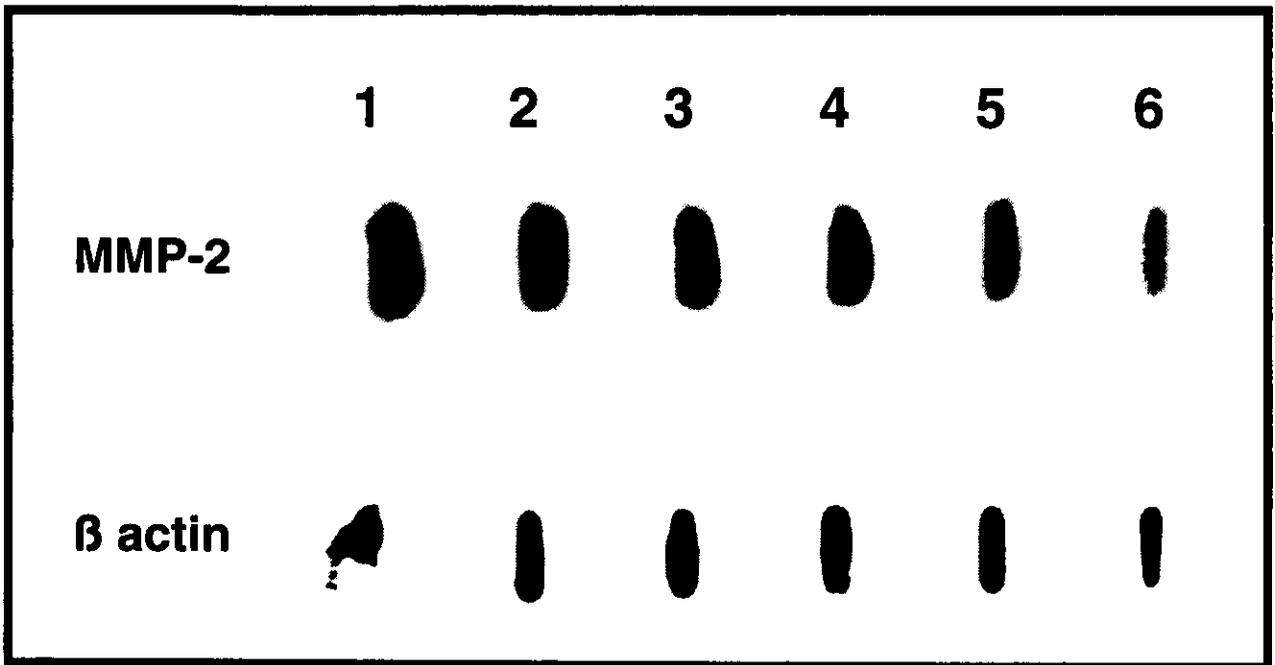


FIGURA 10. ENSAYO DE RUN-ON. Las células WISH fueron estimuladas con 0, 10, 29.5, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$ de vitamina C (carriles 1 al 6), y los RNAs nacientes fueron hibridados con sondas marcadas de β actina y MMP-2 fijadas a las membranas. Se observó una disminución progresiva en la tasa de transcripción de los RNA de MMP-2 dependiente de la dosis de vitamina C.



Discusión.

Las colágenas tipo I, III y IV son los principales constituyentes estructurales de las membranas corioamnióticas y son las responsables de las propiedades mecánicas (resistencia, flexibilidad y fuerza) de estas membranas (22). La participación del ácido ascórbico como cofactor en la síntesis de colágena se describió desde hace años ya que interviene en reacciones de hidroxilación de prolina y lisina (27), recientemente también se describió el hecho de que esta vitamina participa en la expresión génica de algunos tipos de colágena como son la I, III y X (33) y debido a esto se ha sugerido que la deficiencia en la disponibilidad de esta coenzima podría afectar la calidad o cantidad de la colágena sintetizada por el corioamnios durante el embarazo. En este sentido, se ha propuesto al embarazo como una prueba de esfuerzo para la disponibilidad de vitamina C y Casanueva y col (38,40) han demostrado que existe asociación entre concentraciones marginales de ácido ascórbico en leucocitos y la RPM.

En términos de los mecanismos moleculares que podrían explicar esta asociación se ha propuesto que la poca disponibilidad de ácido ascórbico podría condicionar una baja hidroxilación de residuos de prolina y lisina en la molécula de colágena sintetizada de novo o en síntesis disminuida de las colágenas tipo I y III que están presentes en el corioamnios (10, 28,32) manifestándose como colágena defectuosa incapaz de brindar un soporte mecánico normal. Al disminuir el

mencionado soporte, las fuerzas mecánicas que normalmente actúan sobre las membranas corioamnióticas durante el embarazo como son el crecimiento fetal, el volumen del líquido amniótico, contracciones de Braxton-Hicks, etc, podrían generar la RPM.

Es importante mencionar que en la actualidad es difícil definir un consumo adecuado de vitamina C durante el embarazo ya que la recomendación (RDA) para esta vitamina durante este estado fisiológico fue obtenida de la extrapolación de la recomendación dada para hombres adultos, por lo que actualmente se desconoce cual es realmente el requerimiento de esta vitamina en embarazadas (66).

Hasta la fecha se había considerado que la deficiencia marginal o total de la vitamina C tenía repercusiones directas sobre la biosíntesis de colágena, sin embargo, en esta investigación aunque encontramos un ligero aumento en la expresión de los mRNA de las colágenas tipo I y III al aumentar la concentración de vitamina C esto no fue significativo, más aún, en algunos experimentos previos realizados en nuestro laboratorio no se encontró expresión de mRNA de colágena tipo IV en estas células. Esto podría deberse a las condiciones empleadas en el estudio, o sea a que 4 horas de estimulación no fueron suficientes , y/o a que en estas membranas los amniocitos solo secretan una porción pequeña de la colágena siendo los principales responsables de esto, los fibroblastos (22,33).

Así, el principal hallazgo de este estudio fue que bajo las condiciones experimentales empleadas el efecto principal y más significativo de la vitamina C estuvo dado sobre el brazo de degradación de la matriz extracelular. El efecto regulador de la vitamina C en relación con la degradación fue sobre la colagenasa tipo IV de 72 kDa o MMP-2.

La MMP-2 es secretada por las células WISH y por las células primarias de epitelio amniótico bajo condiciones experimentales, es por esto que estas células son un buen modelo para estudiar la actividad y expresión de la MMP-2 en el amnios.

La presencia de la MMP-2 en líquido amniótico y membranas fetales durante la gestación sugiere que esta MMP juega un papel importante en la remodelación y recambio normal de la matriz extracelular de las membranas corioamnióticas (49,67,68). La MMP-2 degrada colágena tipo IV y gelatina en condiciones fisiológicas, la colágena tipo IV se encuentra normalmente en membranas basales pero en el corioamnios está ampliamente distribuida en forma de red (22).

La vitamina C es utilizada por las células en cultivo bajo las condiciones experimentales y aunque se encontraron concentraciones intracelulares bajas, se pudo demostrar el efecto sobre la expresión de la MMP-2. El hecho del bajo consumo de la vitamina C disponible en el medio por las células puede explicarse

por el uso de medio libre de suero fetal de ternera (SFT) La vitamina C puede ser transportada hacia las células por medio de dos sistemas: uno con un transportador dependiente de Na^+ estereoespecífico y saturable y otro independiente de sodio que necesita del transportador de la glucosa Glut1 (69,70) y estos podrían ser proporcionados por la insulina contenida en el SFT. La ausencia del SFT es necesaria para poder documentar la actividad enzimática de la MMP-2, ya que éste contiene cantidades diversas de vitamina C y varias MMPs e inhibidores, que pueden enmascarar el efecto de la vitamina sobre la actividad y expresión de la MMP-2 (71).

La vitamina C no desactivó directamente a la MMP-2 como se vio en el experimento en donde ésta se incubó directamente con la vitamina, sino que tuvo un efecto sobre la expresión génica de la enzima, como nos muestran los resultados de los ensayos de western blot, northern blot y run-on. Esta regulación ocurrió a las concentraciones de vitamina C agregadas, a pesar de que en las condiciones experimentales utilizadas las células sólo incorporaron aproximadamente el 14% del ácido ascórbico agregado. Un efecto no específico de la vitamina C en la expresión génica, mediado por cambios en el potencial óxido-reducción de la célula puede ser descartado ya que cantidades equimolares de glutatión no tuvieron el mismo efecto y por la falta de cambios en la expresión del gen de β -actina observados paralelamente.

La regulación de la expresión del gen de MMP-2 por la vitamina C se podría estar dando en alguno de los pasos que se presentan en la expresión de un gen, como la iniciación de la transcripción, el procesamiento del transcrito precursor, el transporte del mRNA maduro hacia el citoplasma, la estabilidad del mRNA, la traducción del mensaje a proteína y el control de los cambios post traduccionales. Los hallazgos de este estudio indican que la vitamina C parece estar modulando a la MMP-2 transcripcionalmente, esto impondría la necesidad de definir el lugar específico sobre el cual la vitamina C actúa. Para que la transcripción inicie, se requiere que las proteínas reguladoras (elementos trans) formen complejos con elementos del DNA (cis) como son los promotores y amplificadores (enhancers) para que la RNA polimerasa II se posiciona en el sitio de inicio y empiece la transcripción (72,73).

La MMP-2 se comporta en forma diferente a otras MMPs en cuanto a su regulación transcripcional. Los promotores de casi todas las MMPs tienen una caja TATA clásica en la posición -30 ± 2 y un elemento AP-1 en la posición -70 ± 4 . El elemento AP-1 se une al factor de transcripción AP-1, que consiste en un complejo proteico que incluye miembros de la familia c-fos y c-jun. Estos promotores también tienen ya sea uno o dos elementos de transcripción PEA-3 localizados entre las primeras 300 bases del AP-1 (43). El 13-acetato-12-O-tetradecanoilforbol (TPA) induce la expresión de la familia de proteínas transactivadoras AP-1 que se unen a un elemento que responde a TPA (TRE) e

inicia la transcripción de las MMPs menos la de la MMP-2. La diferencia más clara entre la organización genómica de la gelatinasa A y de las otras MMPs es que su promotor no tiene TRE. Además la región promotora de la MMP-2 contiene una caja TATA no canónica, dos sitios SP1 y no contiene el elemento de respuesta PEA-3 usado por la familia de transactivadores c-ets, proteína que interactúa con el AP-1 y que estimula la expresión de las otras MMPs como la MMP-1, 3 y 9 (45).

La vitamina C podría tener algún efecto sobre el promotor de la MMP-2 o sobre algún otro de los factores que intervienen en la transcripción como podrían ser los factores generales de la transcripción o los factores estimuladores o inhibidores que por lo regular son proteínas (27).

Los promotores se encuentran localizados en la misma hebra de DNA que el gen estructural que codifica a los mRNA, por lo que se les conoce como factores de activación cis, y son regulados por factores de activación trans, que son el producto de otros genes. Los factores de activación trans son regularmente proteínas aunque no siempre. Los promotores compiten por estos factores y de acuerdo a su capacidad de usarlos se clasifican en dos niveles: los genes que son activos río abajo y que a excepción de algunos no contienen una caja TATA, pero contienen múltiples sitios de afinidad al factor SP1, y aunque algunas veces se pensó que estos genes se expresan en forma constitutiva ahora se cree que están sujetos a múltiples controles, éstos se conocen como "housekeeping

genes", y los genes que son totalmente activos y que se transcriben en tasas más altas, contienen una caja TATA y responden activamente a señales moleculares como hormonas o segundos mensajeros (74), el promotor de la MMP-2 podría caer dentro de la primera categoría ya que tiene muchas de las características de un "housekeeping gene" o promotor constitutivo (75).

Es importante mencionar que no es la primera vez que la vitamina C es mencionada en relación a la expresión de algún gen, también ha sido involucrada en la expresión génica de algunos tipos de colágeno aumentando su expresión, las explicaciones que se dan en este sentido es que o bien la vitamina C se une a algún factor que a su vez se une a la región promotora y se estimula la transcripción, o que se establece un sistema de retroalimentación alrededor de la poza metabólica de mRNA de procolágena disponibles, en este caso cuando la disponibilidad de los mRNA se agota debido a su participación en el complejo traduccional esto podría desencadenar que se aumentara la transcripción de los mRNA (33). Sin embargo, esto último no se relaciona con los resultados obtenidos en este estudio ya que en este caso la vitamina C está disminuyendo tanto la expresión de los mRNA como la tasa de transcripción, por lo que no parece haber un sistema de retroalimentación en donde al disminuir los mRNA aumente la tasa de transcripción. Lo que se ha mencionado en la literatura es que en general los mecanismos mediante los cuales las MMPs son inducidas se regulan a nivel transcripcional, aunque existe evidencia de que la regulación para

estromelisina, colagenasa y gelatinasa A también se da a nivel de estabilidad de los mRNA (75)

En cuanto a otros estudios que se han hecho en la literatura en este sentido, en donde un nutrimento regula la tasa de transcripción de algún gen, se encontró en una revisión hecha por Klip y cols (76) que en modelos animales el transportador Glut4 está regulado por concentraciones circulantes altas de glucosa en células musculares pero no en adipocitos y esta regulación es independiente de la regulación de la transcripción. En contraste, en los adipocitos la hiperglicemia reguló las concentraciones de los mRNA para Glut4 ya que la insulina es un estimulante potente y esencial de la transcripción del Glut4. En estudios con cultivos celulares se encontró que concentraciones altas de glucosa conllevaron expresiones más bajas del Glut1, las concentraciones de glucosa no afectaron la cantidad de Glut4. Los mecanismos para la regulación de los mRNA para Glut1 no se han definido pero es posible que algunos metabolitos de la glucosa repriman o inhiban la transcripción del gen del Glut1, aunque no se puede descartar una desestabilización de los mRNA del transportador.

El ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$) y la glucosa ($C_6H_{12}O_6$) se parecen, por lo que podrían actuar en forma similar en los procesos de transcripción, el problema es que no se sabe todavía en donde podrían estar actuando. En este sentido se recomendaría realizar algunos estudios en un futuro en donde se pudiera

investigar la posible regulación directa del ácido ascórbico sobre el promotor de la MMP-2 o sobre alguno de los otros factores involucrados en el procesos de transcripción, también se podría pensar que el ácido ascórbico podría estar involucrado en la regulación del sistema de transducción que antecede a la transcripción sin embargo para esta MMP aún se están estudiando sus sistemas de transducción y transcripción.

El modelo celular utilizado tiene ciertas ventajas y desventajas, entre las desventajas se tiene que la células de epitelio amniótico no participan en forma importante en la fase de síntesis de colágena. Como muestran nuestros resultados, en estas células la expresión de los mRNA de colágena tipo I fue muy baja y de colágena tipo III fue todavía menor, de hecho se trató de llevar a cabo algunos ensayos preliminares hibridando para sonda de colágena tipo IV pero no se encontró expresión de los mRNA, por lo que se podría pensar que estas células no sintetizan este tipo de colágena. Debido a esto, este modelo no resulta muy bueno para estudiar el brazo de la síntesis de la colágena.

Desde la perspectiva de la degradación estas células tampoco sintetizan TIMP-1 que es el inhibidor de la MMP-1 y MMP-9 entre otras; El inhibidor de la MMP-2 es el TIMP-2 y se sabe que estos se encuentran en forma de un complejo (45), pero dado que carecíamos de la sonda para éste, no pudimos estudiar si en un momento dado la vitamina C tiene algún efecto sobre el TIMP-2 o sobre el

complejo que forma con la MMP-2, sin embargo, en el caso de los hallazgos obtenidos en este estudio los efectos inhibitorios de la vitamina C sobre la MMP-2 estuvieron dados a nivel de la expresión génica de la enzima por lo que el efecto encontrado podría tener relación con el TIMP-2 o su unión con la MMP-2 .

Entre las ventajas de este modelo tenemos que esta células expresan las enzimas que parecen ser las más importantes en la degradación de la matriz extracelular de las membranas corioamnióticas y podría arrojar alguna luz de como se comporta el amnios durante la gestación en ausencia de trabajo de parto o RPM ya que la MMP-2 se sintetiza durante la gestación (48, 49, 67); el hallazgo más importante de este estudio es que a pesar de que esta enzima es sintetizada por estas células en forma constitutiva, esta síntesis fue regulada por la vitamina C. Además, la población celular estudiada tiene contacto espacial con la porción de tejido conectivo del amnios que es la que aporta el 75% del soporte mecánico de la membrana y por lo tanto la modulación de la expresión de las enzimas en estas células podría tener una repercusión directa en la calidad mecánica de la membrana.

El modelo muestra que la degradación de tejido conectivo en las membranas fetales es un proceso orquestado entre los distintos tipos celulares y debe existir un proceso muy complejo de señalización.

En este sentido se sabe que los cultivos celulares no necesariamente se comportan como los tejidos, por lo que sería interesante estudiar en un futuro si la vitamina C tiene estos mismos efectos en explantes de membrana corioamniótica, de ser así se podría plantear un modelo hipotético en donde una baja disponibilidad de vitamina C durante el embarazo podría incrementar la actividad de la MMP-2 resultando en una degradación incrementada y acumulativa de colágena tipo IV teniendo como consecuencia una RPM. No se puede descartar el hecho de que la colágena sintetizada en condiciones de baja disponibilidad de vitamina C podría tener contenidos disminuidos de hidroxiprolina e hidroxilisina y esto significaría una colágena menos resistente, por lo que la pérdida de resistencia de las membranas que se rompen prematuramente podría ser producto de estos dos mecanismos.

La RPM es una de las complicaciones del embarazo con mayor repercusión perinatal y a pesar de la frecuencia con que se puede llegar a presentar (aproximadamente 10% en México) (5,6), aún existe controversia en cuanto a su definición, manejo, etiología, factores desencadenantes y asociados (7,11).

La RPM es una patología multicausal que se ha asociado a condiciones que prevalecen en países en vías de desarrollo, y que se asocian a condiciones socioeconómicas bajas, entre los factores de riesgo asociados a estas condiciones podríamos tener una dieta deficiente durante el embarazo lo que

condiciona que las mujeres transcurran esta etapa que podría considerarse una prueba de esfuerzo con concentraciones marginales de algunos nutrimentos como podría ser la vitamina C. Además, estas poblaciones se caracterizan por una prevalencia aumentada de infecciones que se sabe que por si solas pueden activar algunos mecanismos que desencadenan la RPM, pero también hay evidencia que durante los procesos infecciosos hay un consumo extra de vitamina C (77) por lo que estos dos factores podrían actuar en forma sinérgica y acelerar el proceso de degradación de la matriz colagenosa de las membranas fetales; una hipótesis general de lo que podría estar pasando sería que la MMP-2 se encuentra presente durante toda la gestación encargándose del recambio normal de la matriz extracelular colginosa de las membranas, sin embargo cuando hay una deficiencia aunque sea marginal de vitamina C su expresión se aumenta resultando en una mayor degradación de esta matriz; esto, aunado a otros factores como podrían ser en un momento dado las infecciones, podrían explicar el desarrollo de la RPM.

Sin embargo para poder validar el papel de la vitamina C en la RPM es necesario implementar otros estudios desde diferentes perspectivas.

Desde el punto de vista molecular se podría estudiar a que nivel de la transcripción de la MMP-2 podría tener su efecto la vitamina C, la relación con las infecciones y otras MMPs y si cambiando las condiciones de experimentación y

utilizando otros modelos celulares se podría ver un mayor efecto en la síntesis de colágena.

Desde el punto de vista tisular se podría evaluar el efecto de la vitamina C sobre el metabolismo de la colágena utilizando un modelo de membranas corioamnióticas.

A nivel clínico se podrían realizar estudios de seguimiento y suplementación con vitamina C en embarazadas para conocer los patrones en las concentraciones de esta vitamina durante la gestación y su efecto sobre la RPM.

Referencias.

1. Normas y técnicas de Ginecología y Obstetricia. INPer 1990.
2. Unidad de Registro y Bioestadística y Comité de Mortalidad Perinatal. Instituto Nacional de Perinatología.
3. Naeye RL, Peters EL. Causes and consequences of premature rupture of fetal membranes. *Lancet* 1980; 1: 192-4.
4. Christensen K. A study of complications in preterm deliveries after prolonged premature rupture of the membranes. *Obstet Gynecol* 1976; 48: 680-7.
5. Pfeffer F, Magaña L, Avila H, Casanueva E. Factores de riesgo de ruptura prematura de membranas. *Perinatol Rep Hum* 1988; 2: 179-84.
6. Ahued JR, Guerra PF, Segura MA, et al, Ruptura prematura de membranas. Análisis de 520 casos. *Ginecol Obstet Mex* 1986; 54: 159-163.
7. Harger JH, Hsing AW, Toupmala RE, Gibbs RS, et al. Risk factors for premature rupture of the membranes. A multi-center case-control study. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163: 130-7.
8. Artal R. The mechanical properties of prematurely and non prematurely ruptured membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1976; 125: 655-9.
9. Polishuk WZ. The physical properties of fetal membranes. *Obstet Gynecol* 1962; 20:204-210.
10. Vadillo-Ortega F, Bermejo- Martínez L, Pfeffer F. Ruptura prematura de membranas. Mecanismos de la enfermedad. *Perinatol Rep Hum* 1994; 8: 180-9.
11. Gun GC, Mishell DR, Morton DG. Premature rupture of the membranes. A review. *Am J Obstet Gynecol* 1970; 106: 469-82.
12. Lanier R, Scarbrough RW, Fillingim DW, et al. Incidence of maternal and fetal complications associated with rupture of the membranes before onset of labor. *Am J Obstet Gynecol* 1965; 93: 398-402.
13. Romero R, Mazor M. Infection and preterm labor. *Clin Obstet Gynecol* 1988; 31: 553- 84.
14. Minkoff HL, Grunenbaum AN, Schwarz RH. Risk factors of prematurity and premature rupture of membranes: a prospective study of the vaginal flora in

- pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 150: 965-72
15. Lavery P. The human placenta. Aspen Publishers Inc. Rockville 1987: 267-79.
 16. Petraglia F, Pasquale F, Nappi C, Genazzani A. Peptide signaling in human placenta and membranes: autocrine, paracrine and endocrine mechanisms. *Endocrin Rev* 1996; 17: 156-86.
 17. Bryant-Greenwood GD. The extracellular matrix of the human fetal membranes: structure and function. *Placenta* 1998; 19:1-11.
 18. Bourne G. The microscopic anatomy of human amnion and chorion. *Am J Obstet Gynecol* 1960; 79: 1070-73.
 19. Artal R, Burgeson R, Hobel C, Hollister D. An in vitro model for the study of enzymatically mediated biomechanical changes in the chorioamniotic membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1979; 133: 656-59.
 20. Aplin JD, Campbell S, Allen TD. The extracellular matrix of human amniotic epithelium: ultrastructure, composition and deposition. *J Cell Sci* 1985; 89: 119-36.
 21. Hoyes AD. Fine structure of human amniotic epithelium following short-term preservation in vitro. *J Anat* 1972; 3: 43-54.
 22. Malak TM, Ockleford CD, Bell SC, Dalgleish R, Bright N, MacVicar J. Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV and V and their ultrastructural organization in term human fetal membranes. *Placenta* 1993; 14: 385-406. *Obstet Gynecol* 1996; 174: 1371-6.
 23. Risteli L, Von Koskull H, Autio-Hammainen H, Risteli J. Amniotic fluid laminin and type IV collagen in normal and pathological pregnancies. *Clin Chem Acta* 1985; 147: 283-90.
 24. Brown J, Timple R. The collagen superfamily. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 107: 484-90.
 25. Van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *FASEB J* 1991; 5: 2814-23.
 26. Weckman AL, Cabral A. Novedades moleculares y clínicas de las fibroblágenas. *Rev Invest Clin* 1996; 48: 207-21.
 27. Strayer L. *Bioquímica*. 3a edición, Barcelona: Reverte 1990:267-286

ESTA TESIS
 SALIR EL
 BIBLIOTECA
 ESTE NO DEBE

28. Peterkovsky B. Ascorbate requirements for hydroxylation and secretion of procollagen: relation to inhibition of collagen synthesis in scurvy. *Am J Clin Nutr* 1991; 54(suppl): 1135S-40S.
29. Gibbs RS, Blanco JD. Premature rupture of membranes. *Obstet Gynecol* 1982; 60: 671-79.
30. Barnes MJ. Function of ascorbic acid in collagen metabolism. *Ann NY Acad Sci* 1975; 258: 264-77.
31. Skinner J, Campos G, Liggins G. Collagen content of human amniotic membranes: effect of gestation length and premature rupture. *Obstet Gynecol* 1981; 57: 487-9.
32. Aplin J, Campbells S, Donnai P, Bard A. Importance of vitamin C in maintenance of the normal amnios. An experimental study. *Placenta* 1986; 7: 377-89.
33. Schwarz R. Role of ascorbate in regulating the collagen pathway. En Berdanier C, Hargrove J editores. *Nutrition and gene expression*. CRC Press. EUA 1993: 483-506.
34. Padh H. Vitamin C: newer insights into its biochemical function. *Nut Res* 1991; 49: 65-70.
35. Anónimo. Stereospecific effect of vitamin C on collagen synthesis is determined by differences in cell transport. *Nut Res* 1991; 49: 26-7.
36. Houghlum KP, Brever DA, Chojkler M. Ascorbic acid stimulation of collagen biosynthesis independent of hydroxylation. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 1141-43.
37. Wideman GL, Baird GH, Bolding T. Ascorbic acid deficiency and premature rupture of fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1964; 88: 592-5.
38. Casanueva E, Pfeffer F, Magaña L, Baez A. Incidence of premature rupture of the membranes in pregnant women with low leukocyte levels of vitamin C. *Europ J Clin Nutr* 1991; 45: 401-7.
39. Jacob R. Vitamin C. En: Shils M, Olson J, Shike M editores. *Modern nutrition in health and disease*. 8a edición; Philadelphia: Lea Fabiger 1994; Vol 1: 432-46.
40. Casanueva E, Polo E, Tejero E, Meza C. Premature rupture of amniotic membranes as functional assessment of vitamin C status during pregnancy.

Ann NY Acad Sci 1993; 678: 369-70.

41. Barret B, Sowell A, Gunter E, Wang M. Potential role of ascorbic acid and β -carotene in prevention of preterm rupture of fetal membranes. *Internat J Nutr Res* 1994; 64: 192-7.
42. Compilación de información aportada por Prof. Gillian Morphy, University of East Anglia, U.K. 1997.
43. Matrisian LM. The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessay* 1992; 14: 455-60.
44. Woessner JF. The family of matrix metalloproteinases. *Ann NY Acad Sci* 1994; 732: 11-21
45. Corcoran ML, Hewitt RE, Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. MMP-2 expression, activation and inhibition. *Enzyme Protein* 1996; 49: 7-19.
46. Van Wart H, Birkedal-Hansen H. The cystein switch: A principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87: 5578-5582.
47. Vadillo-Ortega F, Gonzalez-Avila G, Karchmer S, Meraz N, Ayala A, Selman M. Collagen metabolism in premature rupture of amniotic membranes. *Obstet Gynecol* 1990; 75: 84-8.
48. Fernández P, Merino M, Nogales F, Ckaronis A, Stetler-Stevenson W, Liotta L. Immunohistochemical profile of basement membrane proteins and 72 kDa type IV collagenase in implantation of placental site. An integrated view. *Lab Invest* 1992; 66: 572-79.
49. Vadillo-Ortega F, Gonzalez-Avila G, Furth E, Lei H, Muschel R, Stetler-Stevenson W, Strauss J. 92 kDa type-IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) is mostly present in human term amniochorion as a latent enzyme which is activated with labor. *Am J Pathol* 1995; 146: 148-56.
50. Bigg H, Shi E, Liu Y, Steffensen B, Overall Ch. Specific high affinity binding of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-4 (TIMP-4) to the COOH- terminal hemopoxin-like domain of human gelatinase A. *JBC* 1997; 272: 15496- 500.
51. Hay H, Caputo J, et al, editores. Cell line and hybridomas. 8a edición; Maryland; American Type Culture Collection (ATCC) 1994: 17-18.
52. Berger H. Significance of cord blood values from newborn. New York: Vitamins and minerals in pregnancy and lactation. Nestle Nutrition Series

- 1988; 16: 61-69.
53. Goldberg G. H-Ras oncogene transformed human bronchial epithelial cell (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. *J Biol Chem* 1980; 263: 6579-87.
 54. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 1983; 166: 557-589.
 55. Birinboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acid Res* 1979; 7:1513-22.
 56. Ausbel F, Brent R, Kingston R, Moore D, et al. Short protocols in Molecular Biology: A compendium of methods from current protocols in Molecular Biology. 2a edición, John Wiley & sons; Nueva York 1989: 3.5, 4.13.
 57. Wilson UG. A rapid procedure for removal of excess linkers. *Bio Techniques* 1988; 6: 733.
 58. Lee W, Hamernyink P, Hutchinson M, Raisys V, Labbe R. Ascorbic acid in lymphocytes: cell preparation and liquid-chromatographic assay. *Clin Chem* 1982; 28: 2165-69.
 59. Burton K. Determination of DNA concentration with diphenylamine. *Method Enzymol* 1967; 105: 163-66.
 60. Chomezynsky P, Sacci P. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-59.
 61. Terato K, Nagai Y, Kawanishi K, Yamamoto S. A rapid assay method of collagenase activity using ¹⁴C labeled soluble collagen as substrate. *Biochem Biophys Acta* 1976; 445: 753-62.
 62. Thomas JA. Oxidative stress, oxidant defense and dietary constituents. En Shils M, Olson J, Shike M editores. *Modern Nutrition in Health and disease*. 8a edición. Lea & Fabiger USA 1994; 1: 501-12.
 63. Murphy G, Crabbe T. Gelatinases A and B. *Method Enzymol* 1995; 248: 470-84.
 64. Towbim H, Stahelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 4350-4.

65. Davis LG, Kuehl WM, Battey JF. Basic methods in molecular biology. Appleton & Lange; 1994: 384-95.
66. Levine M, Dhariwal KR, Welch RW, Wang Y, Park JB. Determination of optimal vitamin C requirements in human. *Am J Clin Nutr* 1995; 62: 1347S-56S.
67. Vadillo-Ortega F, Hernandez A, Gonzalez G, Bermejo G, Iwata K, Strauss J. Increased matrix metalloproteinase activity and reduced tissue inhibitor of metalloproteinases-1 level in amniotic fluid from pregnancies complicated by premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174: 1371-76.
68. Lei H, Vadillo-Ortega F, Paavola L, Strauss J. 92 kDa gelatinase (matrix metalloproteinase-9) is induced in rat amnion immediately prior to parturition. *Biol Reprod* 1995; 53: 339-344.
69. Wolf G. The mechanisms of uptake of ascorbic acid into osteoblasts and leukocytes. *Nut Rev* 1996; 54: 150-152.
70. Rybakowski C, Mohar B, Wohlers S, Leichweiß HP, Schröder H. The transport of vitamin C in isolated near-term placenta. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1995; 62: 107-114.
71. Vadillo-Ortega F, Pfeffer F, Bermejo L, Hernández M, Beltran J, Tejero E, Casanueva E. Factores dietético y ruptura prematura de membranas. Efecto de la vitamina C en la degradación de colágena en el corioamnios. *Ginecol Obstet Mex* 1995; 63: 158-162.
72. Tjian R. Molecular machines that control genes. *Sci Am* 1995; Feb: 38-45
73. Torres N, Bourges H, Tovar A. Regulación de la expresión génica por nutrimentos. *Arch Latinoam Nutr* 1996; 46: 89-96.
74. Hargrove JL, Berdavier CD. Nutrient receptors and gene expression. En: Berdavier C, Hargrove J editores. *Nutrition and gene expression*. CRC Press; EUA 1993: 2-22.
75. Matrisian LM. Matrix metalloproteinase gene expression. *Ann NY Acad Sci* 1994; 732: 42-50.
76. Klip A, Tsakiridis T, Marette A, Ortiz P. Regulation of expression of glucose transporters by glucose: a review of studies in vivo and in cell cultures. *FASEB J* 1994; 8: 43-52.
77. Casanueva E, Reyes L, Luna A, Tejero E, Pfeffer F, Meza C. Vitamin C and

cervico-vaginal infections in pregnant women. *Nutr Res* 1998; 18: 939-944.