

122 L.P. Rossal^a
J. Gaytán^a
J. Bellver^a
C. Lara^a
A. Pellicer^{a,b,c}
J. Remohí^{a,c}
V. Serra^{a,c}

^aInstituto Valenciano de Infertilidad. Valencia.

^bHospital Universitario Dr. Peset. Valencia.

^cDepartamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología.
Facultad de Medicina. Universidad de Valencia. España.

Correspondencia:

Dr. V. Serra Serra.

Unidad de Medicina Materno-Fetal.

Instituto Valenciano de Infertilidad.

Plaza de la Policía Local, 3. 46015 Valencia. España.

Correo electrónico: ummf@ivi.es

Fecha de recepción: 2/9/02

Aceptado para su publicación: 3/12/02

Radicales libres de oxígeno y su relación con enfermedades específicas del embarazo

Relationship between oxygen free radicals and pregnancy- related conditions

L.P. Rossal, J. Gaytán, J. Bellver, C. Lara, A. Pellicer,
J. Remohí, V. Serra. Radicales libres de oxígeno y su relación con
enfermedades específicas del embarazo.

RESUMEN

De forma reciente se han publicado estudios que relacionan los radicales libres de oxígeno con enfermedades específicas del embarazo. En el parto pretérmino, el óxido nítrico puede estar involucrado en la quiescencia fisiológica del útero y la colagenólisis asociada con el reblandecimiento tisular del cérvix. Respecto a la rotura prematura de membranas, se conoce que la fuerza del amnios deriva del colágeno; que su degradación es controlada por las metaloproteinasas de la matriz, y que una alteración del balance entre los pro y los antioxidantes aumenta la actividad de éstas últimas. En la preeclampsia, la placentación defectuosa produce vasoconstricción, con baja perfusión placentaria, y se cree que ésta estimula la liberación de factores que llevan a una alteración funcional del endotelio vascular; así, los radicales libres han emergido como probables promotores de esta alteración funcional. Se revisa el papel potencialmente preventivo de los antioxidantes (vitaminas C y E) para intentar regularizar el balance redox, en la prevención de las citadas enfermedades.

PALABRAS CLAVE

Radicales libres de oxígeno. Parto prematuro.
Rotura prematura de membranas. Preeclampsia.

SUMMARY

Recent studies have implicated oxygen free radicals with various pregnancy-related conditions. In preterm delivery, nitric oxide may be involved in the physiologic maintenance of uterine quiescence and collagen lysis associated with cervical ripening. With respect to premature rupture of membranes, the strength of the amnion is derived from collagen, its lysis is controlled by matrix metalloproteinases, and an imbalance between pro- and antioxidants increases the activity of these enzymes. In preeclampsia, an abnormal placentation leads to vasospasm and poor placental perfusion, releasing factors causing endothelial dysfunction. Oxygen free radicals may promote endothelial dysfunction. The potential prophylactic role of antioxidants (vitamins C and E) in

regulating the redox balance and thus in preventing the development of these obstetric problems is reviewed.

KEY WORDS

Oxygen free radicals. Preterm delivery. Premature rupture of membranes. Preeclampsia.

INTRODUCCIÓN

La paradoja del oxígeno es conocida en biología desde hace tiempo, pero sólo se ha comprendido de forma reciente. A pesar de que el oxígeno es esencial para la vida, demasiada cantidad o un metabolismo inapropiado de éste puede ser tóxico para las células y el organismo¹. Los radicales libres de oxígeno y especies reactivas de oxígeno (ERO) son atributos normales de la vida aeróbica y son de particular importancia en los organismos vivos, ya que se encuentran involucrados en la génesis de gran variedad de enfermedades y procesos fisiológicos, como la duración de la vida y el envejecimiento². De forma reciente se han publicado estudios que relacionan los efectos de las reacciones oxidativas con enfermedades específicas del embarazo, como el trabajo de parto prematuro, la rotura prematura de membranas y la hipertensión inducida por el embarazo. El propósito de esta revisión es proveer una base para el entendimiento del impacto fisiopatológico de las reacciones iniciadas por los radicales libres y cómo éstas se pueden relacionar con síndromes clínicos específicos del embarazo.

EL ÓXIDO NÍTRICO

En 1980 Furchgott y Zawadzki^{3,4} descubrieron que para que se produjera la relajación vascular *in vitro* era necesaria la presencia del endotelio, relación que podía atribuirse a la acción de la prostaglandina I₂ (PGI₂)⁵. Estos autores concluyeron que esta relajación era el resultado de la liberación de una sustancia liberada por el endotelio que se denominó factor de relajación liberado por el endotelio (EDRF) y que era dependiente del aumento del

guanosín monofosfato cíclico (GMPc) en las células musculares lisas⁶. En 1987, Palmer et al identificaron el EDRF como el óxido nítrico (NO) y posteriormente, estos mismos investigadores explicaron que el NO se sintetizaba a partir de L-arginina, y que dicha síntesis se inhibía de forma competitiva por derivados estructurales, como la N-monometil-L-arginina (LNMA), la N^G-nitro-L-arginina metiléster (LNAME) y otros^{7,8}.

El NO es un factor de acción paracrina, cuyas principales acciones son la relajación del músculo liso vascular, la inhibición de la agregación plaquetaria, la inhibición del crecimiento y la proliferación de las células del músculo liso, así como la inhibición de la adhesión de monocitos y leucocitos al endotelio. Como consecuencia, el NO desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la función, la estructura y la integridad vasculares. Los defectos en la producción de NO contribuyen a la patología de la hipertensión, la trombosis vascular, la aterogénesis, la reestenosis y la lesión postangioplastia^{3,4,9,10}.

La enzima que sintetiza el NO es la NO sintetasa (NOS), de la que se conocen actualmente tres isoformas: NOS_e, NOS_n, y NOS_i; esta última se expresa en muchos sistemas orgánicos en desarrollo del feto en ausencia de inflamación¹¹ (fig. 1).

El NO se libera de las células endoteliales en respuesta a numerosos factores tanto físicos como de tipo humoral. El principal factor físico responsable de la liberación de NO es la presión ejercida por la sangre sobre el endotelio vascular¹², pero numerosos factores humorales también tienen la capacidad de liberar NO del endotelio vascular (acetilcolina [Ach], bradicinina [Bk], catecolaminas, angiotensina II, adenosín trifosfato [ATP], etc.). El NO actúa como mediador local de los denominados vasodilatadores dependientes del endotelio, como la Ach y la Bk, o como mediador de la acción vasodilatadora producida en procesos inflamatorios en respuesta a la histamina o a la Bk. La liberación de NO en respuesta a ciertas hormonas, como la angiotensina II, la vasopresina y las catecolaminas, podría ser responsable de la vasodilatación inducida por éstas sobre territorios vasculares específicos y modelaría su acción constrictora producida por su interacción con receptores AT₁, V₁ o α₁ situados en las células musculares lisas^{9,13}. El NO participa, junto con la PGI₂, en la inhibición de la agregación plaquetaria; por ello, agen-

- NOSe (constitutiva) presente en las células endoteliales vasculares
- NOSn (constitutiva) presente en el tejido nervioso y en estructuras medulares renales
- NOSi (inducible) presente en macrófagos activados y células musculares lisas

Formas constitutivas

- Sus actividades son dependientes de las concentraciones locales de calcio
- Produce concentraciones pequeñas de NO y participan en procesos fisiológicos o reguladores

Forma inducible

- No es dependiente de las concentraciones de calcio y es inducido por citocinas o endotoxinas, como el lipopolisacárido (LPS) de *E. Coli*
- Produce grandes cantidades de NO que participa en procesos inmunitarios, de lesión o toxicidad celular

Figura 1. Isoformas de la enzima óxido nítrico sintetasa.

tes relacionados con ésta y con la coagulación, como el adenosín difosfato (ADP), la trombina, la serotonina y el factor activador plaquetario (PAF) liberan NO, lo que explica por qué la presencia de endotelio vascular supone una protección frente a la formación de trombos⁹.

La degradación del NO ocurre como consecuencia de la oxidación producida por un radical libre de oxígeno, el anión superóxido (O_2^-), que da lugar al peroxinitrito ($ONOO^-$), que, a su vez, se degrada a otro agente oxidante, el anión hidroxilo (OH^-), y a nitrato¹. La NOS también puede ser una fuente significativa de O_2^- ; así, el NO es al mismo tiempo un radical libre y un mediador importante de muchas funciones biológicas en los sistemas cardiovasculares, nerviosos, reproductivos, respiratorios, gastrointestinales e inmunológicos¹⁴. Todas las isoenzimas de la NOS catalizan la conversión de L-arginina a NO y L-citrulina, reacción que es dependiente de la presencia de varios cofactores, entre los que se incluye la tetrahidrobiopterina. En su ausencia, o con valores bajos, la NOS produce O_2^- en lugar de NO, y la isoforma NOSe es especialmente dependiente de su cofactor, así como de la disponibilidad de tioles intracelulares, que lo mantienen en el estado funcional reducido⁹.

RADICALES LIBRES

El ATP celular se produce por reducción del oxígeno molecular hasta formar agua. Este proceso se lleva a cabo añadiendo cuatro electrones en una reducción controlada por el sistema de transporte de electrones de las mitocondrias: aproximadamente el 98% del oxígeno captado por las células entra en las mitocondrias, donde se reduce hasta formar agua.

Sin embargo, algunas fugas en el sistema de transporte de electrones de las mitocondrias permiten al oxígeno aceptar menos de cuatro electrones, con lo que se forma un radical libre¹⁵, que es un átomo, molécula o grupo de moléculas con un electrón no apareado en su órbita más externa. Son moléculas inestables que se generan continuamente, y entre las reacciones que llevan a la formación de metabolitos reactivos del oxígeno se incluyen las del O_2^- , el peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , que es un intermediario parcialmente reducido o especie de oxígeno reactivo no radical) y el radical hidroxilo (OH), que se denominan colectivamente ERO. Estas moléculas tienen una elevada reactividad y su liberación da como resultado una lesión oxidativa a sistemas biológicos, como los lípidos, que forman parte de las membranas celulares, y las proteínas de la pared vascular y del tejido miocárdico. El OH es el más reactivo y dañino para las células, y el H_2O_2 también es reactivo para los tejidos y tiene, además, la capacidad de generar un radical OH^15 .

Los radicales libres se producen constantemente de manera endógena como resultado de procesos biológicos y metabólicos normales, y las dos fuentes más comunes de ERO son la filtración de electrones del sistema de transporte en la membrana interna de la mitocondria durante la respiración celular y la liberación por células inmunes que rodean y luego matan a la bacteria. Los neutrófilos activados generan O_2^- para destruir microorganismos, y las ERO pueden formarse en el metabolismo de la citocromo P-450, en la producción del NADPH y en el metabolismo del ácido araquidónico. Por otro lado, en condiciones de isquemia, la xantina oxidasa es formada desde xantina deshidrogenasa, que reacciona con hipoxantina formando O_2^- y otros radicales libres que causan peroxidación lipídica. Tras la is-

quemia, los neutrófilos se acumulan en los tejidos reperfundidos, liberando O_2^- y otros radicales libres. Finalmente, la mitocondria, el retículo endoplásmico y las membranas nucleares producen O_2^- tras la oxidación de los componentes de la cadena de transporte eléctrico. Como se ha mencionado anteriormente, los radicales libres de oxígeno participan en la degradación del NO^{1,15,16}, y otras fuentes de radicales libres son la ionización y la radiación ultravioleta, aunque también se producen como consecuencia de una gran variedad de reacciones químicas. Por otro lado, ciertas enzimas también pueden generar radicales libres, como la ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2), las prostaglandinas (PGE₂ y PGF_{2α}), el tromboxano y las citocinas.

Una ERO inflige daño tisular con el fin de establecer un estado estable, retirando un electrón de una molécula cercana para aparearla con el electrón ya existente en su órbita más externa. Además, éstas tienden a involucrarse en reacciones de transferencia de electrones (reacciones redox) para estabilizar su estado energético con moléculas de componentes celulares locales. Por ello, los átomos de hidrógeno con su electrón disponible son un blanco atractivo, e incluso extrayendo el átomo de hidrógeno, los enlaces químicos son interrumpidos. El daño tisular generado por las ERO puede ser amplio; así, son capaces de iniciar la peroxidación lipídica, incrementando el Ca²⁺ intracelular libre, dañando el ADN¹⁶⁻¹⁸, liberando enzimas catalíticas destructivas y dañando las membranas celulares. Asimismo, son la causa de la toxicidad del oxígeno y de la mutagenicidad¹, y una vez formados, los radicales libres participan en cadenas de reacciones redox que generan otros radicales¹⁹.

IMPLICACIONES CLÍNICAS EN EL EMBARAZO

Hay entidades clínicas del embarazo en las que los radicales libres de oxígeno se han implicado como posibles contribuyentes o desencadenantes, como el parto pretérmino, la rotura prematura de membranas y la preeclampsia.

Parto pretérmino

El nacimiento prematuro es un problema importante de salud pública, cuya etiología sigue siendo

desconocida. Como posibles causas se han propuesto infecciones intrauterinas²⁰ y sistémicas²¹; así, los radicales libres de oxígeno pueden actuar como transductores de señal mediante la modificación indirecta de la biodisponibilidad de otro radical libre, el NO²². El embarazo se caracteriza por una regulación al alza de NO y del GMPc (el producto de la actividad guanilato ciclasa y uno de los segundos mensajeros del NO)²³. Una desviación en el balance redox con el gasto consecuente del NO hacia la formación de ONOO⁻ podría producir efectos relacionados con una relativa falta de NO para sus papeles fisiológicos durante el embarazo, así como también la formación directa de ONOO⁻².

En muchas especies existe una producción aumentada de NO por los vasos sanguíneos y el miometrio con diversas vías de regulación²⁴. Como el sistema del NO es regulado en el miometrio o la placenta, sobre todo durante la gestación, se ha sugerido que la generación de NO durante la gestación podría contribuir al mantenimiento de la quiescencia uterina, mientras que si es retirado antes del parto podría desencadenarlo. Aunque la inhibición de la NOS en ratas no causa parto prematuro *per se*, sí que se potencia el efecto de un antagonista del receptor de la progesterona en la inducción de trabajo de parto pretérmino²⁵. A este respecto, se ha demostrado que el útero de la rata expresa tanto la NOS_e como la NOS_i, pero esta última isoforma de la enzima es la que durante el embarazo se regula más²⁶. En cambio, este escenario se invierte en el cérvix de la rata con una alta producción de NO, casi exclusivamente producto de la NOS_i, que ocurre durante el trabajo de parto y que modula la colagenólisis asociada con maduración cervical²⁷. La inyección de lipopolisacáridos (LPS) a las ratas durante el embarazo regula al alza la NOS_i en el cérvix, alcanzando valores de NO similares a los observados durante el trabajo de parto a término. De cualquier forma, los LPS no afectan la producción de NO en el útero gestante, lo que puede sugerir que la producción de NO en el útero ya se encuentra regulada al alza al máximo de su capacidad²⁷. Estos hallazgos son indicativos de que el NO puede tener diferentes efectos en tejidos reproductivos adyacentes: la quiescencia fisiológica en el útero y la colagenólisis asociada con el reblandecimiento tisular del cérvix.

Las células inflamatorias producen grandes cantidades de O_2^- , de NO y, por tanto, de ONOO⁻, lo

126 que contrasta con la generación de NO en el útero durante el embarazo, donde sólo se producen cantidades mínimas de O_2^- , y la mayor parte debidas a una baja actividad de una xantina oxidasa endógena. Con la infección intrauterina o corioamnionitis, la formación de ONOO⁻ puede hacer que el NO se desvíe de su papel fisiológico y, así, convertirse en un iniciador crítico de acontecimientos que llevan a procesos que terminan en parto pretérmino y en resultados fetales adversos².

Todos estos estudios sugieren que los radicales de oxígeno están involucrados en la fisiopatología que lleva al parto pretérmino. De este modo, la prevención o la neutralización de radicales de oxígeno podría ser el blanco terapéutico ideal para prevenir el parto pretérmino y el compromiso fetal asociado, con el ambiente intrauterino hostil, que se traduce en morbilidad fetal y perinatal².

Rotura prematura de membranas (RPM)

Composición de la membrana corioamniótica

El amnios es un tejido complejo: es el tejido más profundo, adyacente al líquido amniótico, y tiene una capa simple de células cuboides no ciliadas y una membrana basal gruesa. Además, presenta una capa de tejido conectivo compuesta de fibras acelulares densas por debajo de la cual hay fibroblastos. Bajo el amnios hay una capa esponjosa compuesta de gran cantidad de fibrillas sueltas o libres. El grueso de esta capa es el corion, compuesto de una lámina reticular de fibras, una membrana basal y, finalmente, células trofoblásticas. Por debajo de éste se encuentra la decidua materna, compuesta por células epiteliales especializadas, que permiten la separación del corioamnios de las capas endometrial y miometrial²⁸.

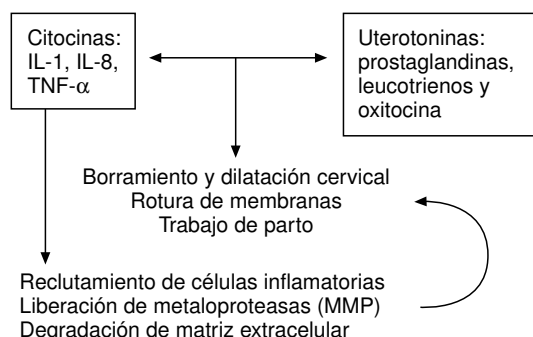
Las metaloproteasas de la matriz (MMP) son una familia de endopeptidasas que, en conjunto, se adhieren a casi todos (sino a todos) los constituyentes de la matriz extracelular. Los principales miembros de esta familia incluyen la colagenasa intersticial (MMP-1), la colagenasa 72-kDa tipo IV (MMP-2, 72-kDa gelatinasa), la estromelisina (MMP-3) y la colagenasa 92-kDa tipo IV (MMP-9, 92-kDa gelatinasa). Las enzimas son secretadas en el compartimiento intercelular como pro-MMP y requieren una unión de

una secuencia propeptídica o una perturbación de su conformación por un agente activador. Procesos autocatalíticos, con una unión posterior a una secuencia propeptídica, de cómo resultado una enzima completamente activa².

La fuerza del amnios deriva del colágeno. El cuerpo humano tiene más de 12 tipos de colágeno, y al menos cinco de ellos se encuentran en el corioamnios. Los tipos I, III, V y VI están organizados en triples hélices, y están constituidos por tres cadenas α ²⁹. La fuerza del colágeno deriva de los puentes cruzados de la hélice de hidroxiprolina e hidroxilisina. El colágeno tipo IV no está presente en la banda fibrosa y tiene una estructura globular, similar a una malla. En cuanto a su estructura, los colágenos se distribuyen en el corioamnios por su función: las capas compacta y fibrosa tienen colágeno de tipos I, III, V y VI; la fuerza del corioamnios, principalmente, se atribuye al colágeno tipo I; las capas esponjosa y reticular contienen los tipos I, III, IV, V y VI, y la membrana basal del corion tiene solamente colágeno tipo IV, y el corion tiene tipos IV y V³⁰.

La activación de las MMP (particularmente MMP-9) es una característica general de muchos procesos inflamatorios caracterizados por una alta secreción de citocinas. Muchos experimentos *in vitro* indican una relación causal en la expresión y actividad entre muchas citocinas (interleucina [IL] 1, 6 y 8, y factor de necrosis tumoral alfa [TNF- α]) o LPS, y la MMP-9. Adicionalmente, el estado redox del ambiente local altera la actividad de las MMP directamente, así como la magnitud de la respuesta inducida por las citocinas. De forma específica, un aumento en los prooxidantes o una disminución en los antioxidantes aumenta la actividad MMP en muchos tipos celulares. Además, la activación de las MMP es inhibida en los tejidos por los agentes reductores que contienen tiol (glutación reducido y NAC), pero no por los que no lo contienen, y aumenta la inhibición tisular de la expresión de MMP en células transformadas².

La degradación del colágeno dentro del corioamnios es controlada por las metaloproteinasas de la matriz. La matriz de MMP-1 degrada los tipos de colágeno I, II y III, mientras que las MMP-2 y 9 degradan el colágeno de tipo IV³¹. Las MMP-3, 10, 11 y 7 tienen una amplia especificidad de sustrato, y la liberación de las metaloproteinasas de la matriz está



Situaciones probablemente involucradas en el trabajo de parto relacionado con la infección

Figura 2. Liberación de citocinas inflamatorias por mecanismo de defensa del huésped.

modulada por los tejidos inhibitorios de metaloproteinasas (TIMPS), de los que ahora se conocen cuatro tipos²⁹. El mantenimiento del corioamnios durante la gestación normal requiere un balance entre la síntesis de colágeno por los fibroblastos y la actividad colagenolítica por respuestas controladas de enzimas, que se expresan en las membranas fetales.

Muchas MMP (MMP-1, 2, 3, y 9) son expresadas en las membranas fetales, y la actividad de la MMP-9 se eleva en el líquido amniótico, las membranas fetales humanas y el plasma humano durante el trabajo de parto espontáneo a término. Por otro lado, el trabajo de parto pretérmino y la rotura prematura pretérmino de membranas (RPPM) se asocian a un incremento aún mayor de la actividad de la MMP-9 en el líquido amniótico, el amnios y el corion².

Papel de la infección en la rotura prematura pretérmino de membranas

Las bacterias desempeñan un papel significativo en el parto pretérmino y en la RPM. Se ha publicado que las MMP producidas por bacterias, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Bacteroides melaninogenicus*, son capaces de alterar el colágeno amniótico³². En este estudio *in vitro* la presión de rompimiento, la elasticidad y el trabajo para la rotura de la membrana fetal disminuyó en respuesta a concentraciones incrementadas de colagenasa. La exposición a *P. aeruginosa* produjo un

adelgazamiento de la membrana, exponiéndola a un riesgo de RPM. Utilizando técnicas similares *in vitro* para evaluar la tensión de rompimiento del corioamnios, el trabajo de la rotura y la elasticidad ante *S. aureus* y *Streptococcus* tipo B (GBS) disminuyeron las tres mediciones del estatus del corioamnios de modo similar a la hallada cuando se agregó elastasa a la preparación de la membrana. La exposición a neutrófilos activó también el adelgazamiento de las membranas, efecto que se incrementó, además, en presencia de *S. aureus* pero no ante el GBS³³.

La invasión microbiana de la cavidad amniótica se confirma con un cultivo en el 10% de las mujeres con trabajo de parto pretérmino con membranas intactas y en el 38% de las mujeres con RPM³⁵. Las técnicas biológicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que tienen mayor sensibilidad que el cultivo, detectan material genómico bacteriano en el 60% de los embarazos complicados con un trabajo de parto pretérmino, y el que se relaciona con infección probablemente involucre la liberación de citocinas inflamatorias, por el mecanismo de defensa del huésped (p. ej., LPS) (fig. 2). Se cree que las citocinas proinflamatorias (IL-1, 8, TNF- α , etc.) estimulan la producción y la liberación de uterotoninas (agentes endógenos que causan contracciones), como las prostaglandinas, los leucotrienos y la oxitocina, por parte de la decidua y membranas fetales, que llevan, eventualmente, al trabajo de parto. Las citocinas también pueden desencadenar mecanismos locales para la maduración cervical y de las membranas fetales: la maduración cervical requiere el reclutamiento de células inflamatorias, la liberación de MMP y, finalmente, la degradación de matriz extracelular, provocando borramiento y dilatación cervical y/o rotura de membranas².

Evidencia de actividad colagenolítica alterada en pacientes con rotura prematura de membranas y rotura prematura pretérmino de membranas

Se han descrito alteraciones en el balance de metaloproteinasas y tejidos inhibidores en pacientes con RPM y RPPM. Muestras de corioamnios de pacientes con rotura de membranas ocurrida entre las semanas 29 y 39 evidenciaron un incremento de 10 a 40 veces en la actividad proteolítica sobre las muestras de membranas de pacientes que tuvieron parto sin RPM. Aunque en este estudio el tipo de

128 metaloproteinasas podría no haberse identificado de forma individual, el peso molecular estimado sugirió un incremento en los valores de MMP-9 y 3³⁴.

En un estudio se ha confirmado que el corioamnios es capaz de expresar las colagenasas de la matriz de MMP 2 y 9³⁰. En este estudio las membranas fetales se obtuvieron de cesáreas electivas o de mujeres con corioamnionitis, y la MMP-2 de la matriz se halló en ambos grupos de membranas. En cambio, la MMP-9 sólo se encontró en asociación con infección o cuando las membranas se cultivaron con LPS de *E. coli* o de *Streptococcus*. Otros autores, utilizando cultivos de amniocitos, examinaron los efectos de dos citocinas inflamatorias (IL-1 y TNF- α), sobre las concentraciones en cultivo de MMP, TIMP y PGE₂. Se demostró que el TNF- α incrementó la producción de MMP y PGE₂ y suprimió los TIMP, mientras que la IL-1 estimuló las MMP, los TIMP y las PGE₂. Juntos, produjeron un incremento sinérgico en MMP y una disminución de los TIMP³⁶.

De forma reciente, se describieron las diferencias en las concentraciones de líquido amniótico de MMP-3 entre pacientes a término y las que experimentaron RPPM. Los valores de MMP-3 cuando fueron identificados por ELISA y absorción colorimétrica fueron aproximadamente 2,5 veces mayores en pacientes con RPPM (media de 31 semanas de gestación) que en las pacientes de control (media de 38 semanas)³⁸. En otro estudio se examinó el papel de la MMP-1 en el líquido amniótico en pacientes que experimentaron parto a término y pretérmino con o sin trabajo de parto. En cambio, sólo con trabajo de parto, ya sea a término o pretérmino, no hubo asociación con valores elevados de MMP-1 en el líquido amniótico. Por otro lado, las pacientes con RPPM exhibieron valores de MMP-1 en el líquido amniótico estadísticamente más elevados que las pacientes a término, y la detección de bacterias en el líquido amniótico también se relacionó con una concentración elevada de MMP-1. Los valores más elevados de MMP-1 se detectaron en madres con RPPM en asociación con bacterias detectables en el líquido amniótico³⁸.

El corionamnios: un blanco para el daño por las especies reactivas de oxígeno

Se ha demostrado que el colágeno, en varios tejidos, es un blanco primario de las ERO. Además, el

corioamnios es una membrana biológicamente activa en la que las enzimas colagenolíticas son vulnerables a la estimulación de éstas. Cuando segmentos de corioamnios a término en cultivo se exponen a superóxidos, se incrementa la actividad de MMP-9 pero no la de MMP-2, y este incremento inducido por las ERO es suprimido por la superóxido dismutasa o el precursor de la glutatión N-acetilcisteína³⁹.

La exposición *in vitro* de amniocitos cultivados a las ERO demuestra evidencia adicional de alteraciones en la biología intracelular, que podrían predisponer a la RPPM. Cuando se exponen a superóxido, los amniocitos exhiben un incremento del Ca²⁺ y del pH, una disminución en el Mg²⁺, y una liberación de ácido araquidónico, precursor de la PGE₂. Por otro lado, cuando se impide un aumento en el Ca²⁺, no se observa un incremento en la liberación de ácido araquidónico. Debido a que éste es dependiente del incremento de Ca²⁺, que a su vez es dependiente de la disminución de Mg²⁺, se sugiere que el superóxido u otras ERO desencadenan esta cascada de acontecimientos biológicos. Este concepto contrasta con lo observado *in vitro* sobre las citocinas inflamatorias que, liberadas por fagocitos en respuesta a la inflamación, estimulan la producción de prostaglandinas⁴⁰.

Otros modelos de membrana amniótica expuestos proveen evidencia adicional de la capacidad de las ERO de alterar la biología del corioamnios. A este respecto, se ha publicado un modelo amniótico acelular, en el que los neutrófilos sobre un lado de la membrana fueron activados por un péptido quimiotáctico (FMLP) o acetato de forbolmiristato (PMA). La lesión se midió por la liberación de fibronectina fetal y la presencia de superóxido. Los resultados indicaron que los PMN inducidos por PMA causan la liberación de superóxido y elastasa (que degrada el colágeno IV), que puede llevar a la solubilización de las membranas y a la rotura de la membrana basal⁴¹.

El ácido hipocloroso (OHCl) es un factor potencial de RPPM, y ahora es considerado la ERO predominante. Este ácido, formado por neutrófilos, activado por exposición a bacteria o complemento, libera mieloperoxidasa. En presencia de H₂O₂ se forma un compuesto que, a través de la cloronización, genera OHCl⁴². Se ha demostrado que el OHCl inicia la peroxidación lipídica de lipoproteínas y lisosomas fosfolipídicos. La filtración de OHCl dentro de

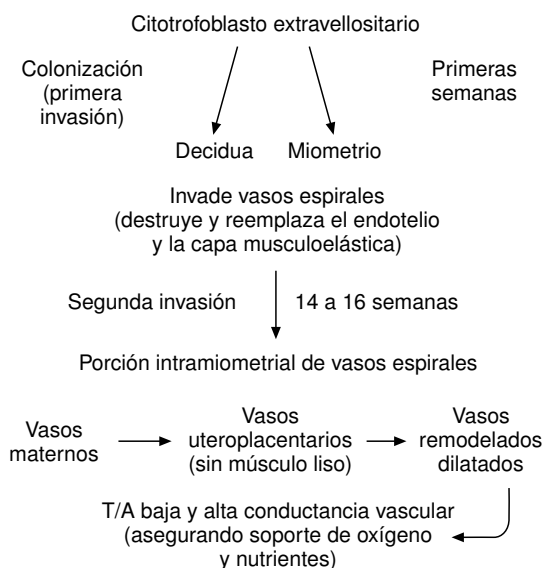


Figura 3. Invasión trofoblástica normal.

la matriz mantenida por los neutrófilos adyacentes al corioamnios, en respuesta subclínica a las bacterias, podría adelgazar la membrana fetal. Se ha demostrado que el ácido hipocloroso estimula la liberación de procólagenasa e inhibe la actividad de TIMP-1, dos acontecimientos que podrían resultar en daño del colágeno en el corioamnios⁴³.

En resumen, la bibliografía indica que la RPPM podría resultar de un daño del epitelio amniótico o del colágeno en el corioamnios, inducido por las ERO. Esta hipótesis está apoyada por: *a*) estudios epidemiológicos que enlazan condiciones clínicas conocidas que producen las ERO o reducen la protección antioxidante a la RPPM; *b*) estudios *in vitro* en los que los segmentos de membrana expuestos a ERO exhiben alteraciones tisulares consistentes con RPPM, y *c*) estudios clínicos que evidencian que las muestras del corioamnios y del líquido amniótico obtenido de pacientes con RPPM exhiben excesiva degradación del colágeno. El papel del antioxidante para proteger el corioamnios del daño de las ERO es sugerido por un estudio reciente *in vitro*⁴³.

Preeclampsia

La preeclampsia se ha definido clásicamente por la tríada de hipertensión, proteinuria y edema du-

rante el embarazo. Una disparidad entre el trofoblasto fetal y el tejido materno es el elemento central de muchas teorías para explicar esta afección. Por tanto, entender la placentación puede ser un factor clave para comprender esta entidad. Durante la placentación humana normal (fig. 3), el citotrofolasto extravellositario coloniza de forma extensiva la decidua y el miometrio adyacente en las semanas iniciales de la gestación. El citotrofolasto invade la capa interna de los vasos espirales, destruyendo y reemplazando el endotelio de los vasos maternos. Este proceso continúa con la invasión de las paredes de las arterias espirales, donde se reemplazan sus estructuras elásticas y musculares. Después de una fase de descanso, entre las semanas 14 y 16 de gestación, se produce una segunda oleada de migración trofoblástica endovascular a la porción intramiometrial de las arterias espirales hasta su origen en las arterias radiales. Los vasos maternos con paredes engrosadas se convierten en vasos uteroplacentarios de músculo liso. Así, estos vasos remodelados son dilatados para dar abasto al aumento del flujo sanguíneo que se requiere para un embarazo normal y no responde a los estímulos humorales o neurogénicos tradicionales para protección del feto. Así, la población extravellositaria de las células trofoblásticas desempeña un papel clave en establecer una baja presión y una alta conductancia vascular que asegure un soporte constante de oxígeno y nutrientes a la placenta y el feto².

Una proporción significativa de arterias placentarias ponen de manifiesto una ausencia completa de trofoblasto endovascular en mujeres que desarrollan preeclampsia. Además, se produce un fallo del trofoblasto en el avance a la porción miometrial de las arterias. La persistencia de la pared muscular, que permite la posibilidad de vasoconstricción, da como resultado una restricción en el flujo a la placenta. Otras anomalías estructurales en la capa placentaria de las mujeres con preeclampsia incluyen la abundancia de citotrofolasto vellositario y el engrosamiento irregular de la membrana basal del trofoblasto vellositario. La consecuencia de esta placentación alterada es una hipoxia fetoplacentaria y la subsiguiente vasoconstricción. Otro escenario posible es que la hipoxia afecte a la función del citotrofolasto, ya que si se disminuye la tensión de oxígeno en un medio de cultivo *in vitro* se inhibe la invasión y la diferenciación del citotrofolasto en la gestación hu-

130 mana temprana, por la expresión de integrinas adhesivas que limitan la invasión. Estas teorías adolecen de pruebas acerca de que la oxigenación placentaria se reduce en mujeres con preeclampsia, lo que constituye un motivo de preocupación².

La incapacidad de las células trofoblásticas para invadir y remodelar de forma apropiada las arterias espirales uterinas se ha asociado con la preeclampsia, y aunque la causa precisa de ésta no se ha determinado, hay evidencia de que el eslabón inicial del desarrollo de esta enfermedad podría ser una respuesta materna inmune aberrante. En este sentido, algunos autores han demostrado que la invasión trofoblástica y el remodelado de las arterias uteroplacentarias son impedidos cuando un gran número de macrófagos infiltran el segmento miometrial de estos vasos, cuya sección en la preeclampsia se caracteriza por la presencia de gran número de macrófagos pero un bajo grado de invasión trofoblástica. Sin embargo, los respectivos segmentos arteriales de tejido normal del tercer trimestre tienen un alto grado de invasión trofoblástica, estando en gran parte libres de macrófagos⁴⁴.

Lo citado anteriormente apoya la teoría según la cual el compromiso placentario produce sustancias que llevan a la preeclampsia, ya que en ella la invasión del trofoblasto es defectuosa y la circulación uteroplacentaria queda en un estado de alta resistencia. Así, se cree que la baja perfusión placentaria persistente estimula la liberación de factores que, aumentando el acceso a la circulación materna, llevan a una disfunción vascular. Fundamentalmente, la enfermedad vascular materna y las influencias genéticas materna o paterna no identificadas podrían conferir susceptibilidad. En este sentido, varios estudios han demostrado que el endotelio vascular materno es el objetivo fundamental, y hay evidencia de que el papel protector normal de esta capa celular se compromete de forma importante. Una síntesis de prostaciclina endotelial menor de lo normal, una disminución de la biodisponibilidad del NO, una mayor permeabilidad celular y un incremento en la expresión endotelial de la adhesión celular de las moléculas y factores protrombóticos podrían contribuir al síndrome materno, ya que todos estos cambios son consistentes con la activación celular del endotelio⁴⁵.

Por otro lado, los radicales libres han emergido como probables promotores de la disfunción vascular materna. Las ERO, particularmente los O₂⁻, evo-

can la activación celular del endotelio a través de muchas vías. Así, en el plasma de mujeres con preeclampsia los marcadores de la peroxidación lipídica, entre los que se incluyen el malondialdehído y la 8-epiprostaglandin-F_{2α}, están incrementados; además, las bajas concentraciones de antioxidantes hidrosolubles y liposolubles en el plasma y la placenta sugieren un estado de estrés oxidativo⁴⁵.

La peroxidación lipídica normalmente ocurre con bajas concentraciones en todas las células y tejidos, e involucra la conversión de ácidos grasos insaturados a hidroperóxidos lipídicos. Este proceso es iniciado por los radicales libres, y siguiendo la interacción entre los lípidos y un radical libre, la reacción de peroxidación viene perpetuada por sí misma, ya que el lípido peroxihidrógeno induce la formación de más peroxihidrógeno. Los valores bajos de peróxidos lipídicos son esenciales y actúan endógenamente como mensajeros intracelulares. Sin embargo, bajo ciertas circunstancias, los mecanismos protectores son abrumadores, y elevan los valores tisulares de peróxidos lipídicos².

Durante el embarazo humano normal, los valores séricos de los productos de peroxidación lipídica están elevados, pero contrarrestados por una actividad antioxidativa incrementada. La preeclampsia está asociada con un incremento de los peróxidos lipídicos circulantes en comparación con un embarazo normal. Aunque hay controversia sobre si la actividad antioxidativa circulante está alterada en mujeres con esta enfermedad, la existencia de un desequilibrio entre fuerzas pro y antioxidantes parece clara. Más aún, algunos estudios sugieren que la fuente de peróxidos lipídicos es la placenta, y el objetivo es el endotelio materno, aunque si la hipoxia placentaria es la causa de este desequilibrio aún no se ha demostrado².

De forma reciente, se demostró que la inhibición competitiva crónica de la síntesis de NO con análogos de L-arginina (L-NAME) en ratas podía causar hipertensión, proteinuria y restricción del crecimiento fetal intrauterino sin afectar a la duración de la gestación. Además, se observó un daño glomerular y cambios histopatológicos en la capa placentaria similar a los encontrados en la preeclampsia en humanos. El incremento en la presión sanguínea y la restricción del crecimiento fetal son revertidos por una infusión simultánea de L-arginina pero no de D-arginina (que no es un sustrato para la NOS), y los

Tabla 1 Mecanismos de defensa antioxidante

Superóxido dismutasa (SOD)
Catalasas
Glutación peroxidadas
Glutación reducido
β-carotenos
Ácido úrico
Vitamina C (ácido ascórbico)
Vitamina E (α-tocoferol)

fetos de ratas tratadas con L-NAME con frecuencia exhiben una necrosis distal de miembros. Un reciente estudio sugiere que una inhibición crónica del NO promueve un estado de estrés oxidativo, con daño en el ADN mediado por el OH. Asimismo, recientes hallazgos revelan que algunas colonias de ratas son refractarias a la inhibición del NO, y los síntomas de preeclampsia no ocurren a pesar de una infusión continua de L-NAME durante el embarazo. Esto sugiere de forma contundente que la extensión de las manifestaciones clínicas en la preeclampsia podría reflejar la interacción de una gran cantidad de mecanismos antioxidantes y de vasodilatación que pueden compensarse por otra de cualquier extensión. En este sentido, se ha sugerido que el polimorfismo en genes, como NOSe, glutación S-transferasa P1 o angiotensinógeno, podría explicar las diferentes potencias por las que las distintas vías regulatorias, como el NO o el glutación, participan en los retos de la homeostasis redox y vascular del embarazo. Para sustentar esta conclusión, en un estudio aleatorio reciente en mujeres con riesgo para preeclampsia se llegó a la conclusión de que la suplementación con vitaminas C y E era eficaz en la prevención de la preeclampsia de inicio temprano².

DEFENSA ANTIOXIDANTE

La mayoría de los organismos vivos han desarrollado mecanismos de defensa antioxidante bien integrados, que consumen radicales libres (tabla 1); el balance entre éstos (oxidantes) y los antioxidantes se conoce como el balance redox¹⁵, que es constantemente puesto a prueba por el ambiente interno y externo, y desempeña un papel importante en el mantenimiento la homeostasis redox del sistema vi-

vo². En condiciones normales, las ERO son neutralizadas por las enzimas protectoras superóxido dismutasas (SOD), catalasa y peroxidasa, por lo que no producen daño. Sin embargo, cuando las ERO aumentan de forma considerable, sobrepasan el sistema de enzimas protectoras y alteran las funciones celulares oxidando lípidos de membrana, proteínas celulares, ADN y enzimas¹⁵.

A pesar de sus efectos dañinos potenciales en células huésped, los radicales libres se utilizan para inactivar bacterias patógenas y células tumorales, causando directamente apoptosis y necrosis⁴⁶. Por un lado, las células inflamatorias activadas generan radicales libres como lo demuestran los monocitos, los neutrófilos, los eosinófilos y los macrófagos de todos los tipos, a través de cascadas enzimáticas intracelulares (NADPH oxidasa o xantina oxidasa) durante la ráfaga oxidativa. Otro mecanismo aniquilante usado por los neutrófilos (pero no por los macrófagos) es la enzima mieloperoxidasa, que utiliza H₂O₂ producida por la dismutación de O₂⁻ para oxidar iones clorhídricos en HOCl, un poderoso agente antibacteriano, que oxida los grupos tiol. De este modo, los tioles con baja masa molecular como el glutación reducido (GSH) o la N-acetilcisteína (NAC; un precursor y efectivo antioxidante directo) son muy efectivos en la protección contra el daño antioxidativo del HOCl².

Para mantener la homeostasis redox, el organismo debe detectar la cantidad de radicales libres formados y regular la expresión de los genes antioxidantes. Aunque estos mecanismos se conocen de manera incompleta, se sabe que algunos factores transcritores (proteínas que unen pequeños fragmentos de ADN e inician o modulan la transcripción), como el factor-κB (NF-KB)⁴⁷, la proteína activadora-1 (AP-1)⁴⁸ u otros reguladores oxidativos, como la proteincinasa mitógena-activada (MAP-cinasa), regulan la transcripción y la transducción de señales en respuesta al estado redox².

Enzimas antioxidantes

El cuerpo utiliza varios antioxidantes endógenos y derivados de la dieta para reducir el riesgo de daño tisular inducido por los radicales libres. En términos generales, éstos sirven para: prevenir el inicio de la formación de ERO; detener la progresión por

132 la que las ERO desencadenan la formación de otras ERO, o capturar cofactores que, de otra manera, podrían catalizar la formación de ERO⁴⁹.

Las SOD, que existen en todas las células, son capaces de transformar al radical libre O_2^- a H_2O_2 , que a su vez, a través de la actividad de la enzima catalasa y la glutatión peroxidasa, es convertido en agua⁵⁰. Las enzimas antioxidantes también previenen la progresión de ERO débiles, como O_2^- , a ERO más dañinos, como el OH. El hierro libre (Fe^{++}) cataliza la formación del OH del H_2O_2 , y las proteínas del hierro añadido, como la transferrina, que se une al hierro en estado Fe^{+++} , y la seruloplasmina, que convierte el Fe^{++} en Fe^{+++} , son antioxidantes plasmáticos importantes. Por otro lado, el ácido úrico, la bilirrubina y la albúmina también son poderosos antioxidantes, cuyas acciones protectoras se cree que son el resultado de sus habilidades para unirse a los metales traza, como el cobre y el hierro, reduciendo así los riesgos de la formación del radical hidroxilo^{6,9}.

Antioxidantes exógenos

La vitamina C, o ácido ascórbico, se considera uno de los antioxidantes esenciales hidrosolubles en el plasma más importantes. Funciona como un agente reducido por liberación de un átomo de hidrógeno con un electrón hacia una ERO, que, ahora con electrones apareados, se estabiliza. El ácido ascórbico, a su vez, se convierte en una ERO débil, llamada ácido dehidroascórbico y es eliminado por la orina⁴⁹.

Además, el ácido ascórbico está involucrado en varios de los pasos bioquímicos que llevan a la síntesis y a la protección del colágeno: estimula los fibroblastos a sintetizar procólgeno y luego actúa como un cofactor que refuerza el colágeno, promoviendo la formación de enlaces cruzados de hidroxiprolina dentro de la triple hélice⁵¹. También estabiliza el colágeno, por la protección de los TIMP de la degradación por las ERO. Así, clínicamente, las bajas concentraciones plasmáticas de vitamina C se han asociado con un riesgo incrementado de rotura prematura de membranas⁵².

La vitamina E es uno de los antioxidantes esenciales más liposolubles. Consiste en un grupo de compuestos llamados tocoferoles, de los que se conocen cuatro esteroisómeros (designados como α , β ,

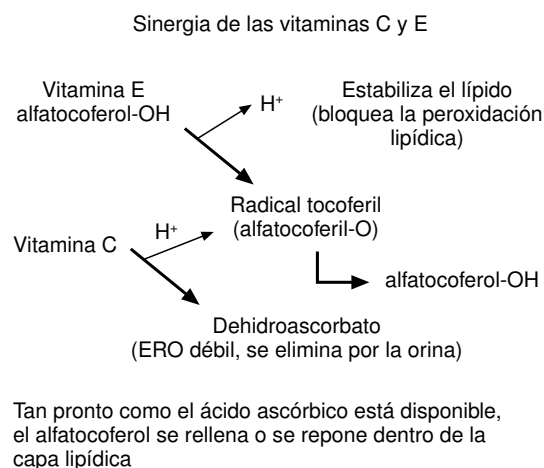


Figura 4. Sinergismo de las vitaminas C y E.

y, λ) y cuatro esteroisómeros de tocotrienoles, que se diferencian de los grupos metilo solamente en el número y posición sobre una cadena pítel saturada unida a un anillo de cromo. El α -tocopherol presenta su efecto antioxidante principalmente como un agente que se reduce para impedir la peroxidación lipídica inducida por las ERO. Dentro de las capas lipídicas de las membranas celulares, los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), con su disponibilidad de átomos de hidrógeno, son blanco para las ERO, ya que buscan un balance de los electrones de sus órbitas más externas. Una vez se retira un átomo de hidrógeno, las alteraciones generadas obligan a la formación de una nueva ERO en el lípido de membrana, en el que busca un electrón adyacente de una molécula cercana. Esta reacción en cadena fragmenta el lípido, y conlleva una lesión celular. El α -tocopherol provee un átomo de hidrógeno, por lo que estabiliza el lípido y finaliza la reacción en cadena.

Estudios *in vitro* han demostrado que las vitaminas C y E trabajan de forma sinérgica (fig. 4), y se ha observado que la vitamina E (α -tocopherol-OH) actúa reduciendo el agente para bloquear el proceso de peroxidación lipídica. De esta manera, se convierte en un radical tocoferil (α -tocopheril-O). La vitamina C, por su parte, reduce el radical tocoferil a α -tocopherol-OH en la interfase lipídica acuosa y se excreta por la orina como dehidroascorbato, y tan pronto como está disponible, el α -tocopherol se rellena o se repone dentro de la capa lipídica⁵³.

CONCLUSIONES

Los radicales libres son productos metabólicos inherentes a los seres aeróbicos, a los que el organismo se adapta con relativo éxito en condiciones normales, logrando de esta forma un equilibrio redox, vital para lograr la homeostasis en los seres vivos. La gestación ocasiona un aumento de la producción de las ERO que, en condiciones normales, son bien contrarrestadas por los mecanismos redox de la madre; pero, en caso de no funcionar de forma adecuada por efectos externos o deficiencias intrínsecas, pueden ser sobrepasados y ocasionar una o varias de las complicaciones obstétricas previamente mencionadas. El abordaje preventivo mediante antioxidantes

exógenos es una opción viable y debe considerarse en todas las pacientes gestantes, sobre todo porque no existe evidencia de que la suplementación vitamínica o las dietas ricas en vitaminas C y E tengan efectos nocivos sobre la gestante ni sobre el feto. A este respecto faltan estudios prospectivos aleatorios que valoren de manera adecuada la efectividad de la terapia antioxidante durante el embarazo.

Las dosis a las que estas vitaminas se han administrado son: 1.000 mg/día de vitamina C (se ha demostrado que la saturación en el plasma ocurre a esta dosis)⁵⁴ y 400 U/día de vitamina E⁴⁵ (los efectos benéficos de esta dosis se han demostrado en pacientes con enfermedad coronaria-vascular establecida)⁵⁵.

BIBLIOGRAFÍA

1. Navarro-Cid J, Cachafeiro V, Maeso R, Lahera V. Fisiología de la pared vascular. En: Tresguerres JAF, editor. Fisiología humana. 2.^a ed. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana, 1995; p. 531-9.
2. Buhimschi I, Weiner CP. Oxygen free radicals and disorders of pregnancy. *Fetal Maternal Med Rev* 2001;12:273-98.
3. Furchgott RF. Introduction to EDRF research. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;22(Suppl 7):S1-2.
4. Furchgott RF. A research trail over half a century. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995;35:1-27.
5. Furchgott RF. An historical survey and prospects of research on EDRF. *Nippon Heikatsukin Gakkai Zasshi* 1987;23:435-40.
6. Furchgott RF, Martin W. Interactions of endothelial cells and smooth muscle cells of arteries. *Chest* 1985;88(4 Suppl):S210-3.
7. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-6.
8. Moncada S. The first Robert Furchgott lecture: from endothelium-dependent relaxation to the L-arginine: NO pathway. *Blood Vessels* 1990;27:208-17.
9. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 1989;3:2007-18.
10. Rongen GA, Smits P, Thien T. Endothelium and the regulation of vascular tone with emphasis on the role of nitric oxide. *Physiology, pathophysiology and clinical implications. Neth J Med* 1994;44:26-35.
11. Forstermann U, Schmidt HH, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, et al. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol* 1991;42:1849-57.
12. Naruse K, Sokabe M. Involvement of stretch-activated ion channels in Ca^{2+} mobilization to mechanical stretch in endothelial cells. *Am J Physiol* 1993;264:C1037-44.
13. Toda N, Okamura T. Endothelium-derived relaxing factor (EDRF). *Nippon Yakurigaku Zasshi* 1990;95:295-308.
14. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-42.
15. Rhoades RA, Tanner GA. Circulación pulmonar. Relación ventilación-perfusión. Fisiología Médica. Madrid: Masson-Little, Brown, 1997; p. 431-47.
16. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Biol Med* 1998;25:434-56.
17. Ward JF. The complexity of DNA damage: relevance to biological consequences. *Int J Radiat Biol* 1994;66:427-32.

- 134 18. Kim PK, Zamora R, Petrosko P, Billiar TR. The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. *Int Immunopharmacol* 2001;1: 1421-41.
19. Aruoma EI. Nutrition and healthy aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem Tox* 1994;32:671-83.
20. Dudley DJ. Preterm labor: an intra-uterine inflammatory response syndrome? *J Reprod Immunol* 1997;36:93-109.
21. Gibbs RS, Romero R, Hillier SL, Eschenbach DA, Sweet RL. A review of premature birth and subclinical infection. *Am J Obstet Gynecol* 1992 May;166:1515-28.
22. Beckman JS, Crow JP. Pathological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite formation. *Biochem Soc Trans* 1993;21:330-4.
23. Weiner CP, Knowles RG, Nelson SE, Stegink LD. Pregnancy increases guanosine 3',5'-monophosphate in the myometrium independent of nitric oxide synthesis. *Endocrinology* 1994;135:2473-8.
24. Buhimschi IA, Sadee GR, Chwalisz K, Garfield RE. The nitric oxide pathway in preeclampsia: pathophysiological implications. *Hum Reprod Update* 1998;4:25-42.
25. Yallampalli C, Izumi H, Byam-Smith M, Garfield RE. An L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate system exist in the uterus and inhibits contractility during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170:175-85.
26. Sladek SM, Kanbour-Shakir A, Watkins S, Berghorn KA, Hoffman GE, Roberts JM. Granulated metrial gland cells contain nitric oxide synthases during pregnancy in the rat. *Placenta* 1998;19:55-65.
27. Buhimschi IA, Yallampalli C, Dong IL, Garfield RE. Involvement of a nitric oxide-cGMP pathway in control of human uterine contractility during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:1577-84.
28. Malak TM, Ockleford C, Bell S, Dalgleish R, Bright N, Macivar J. Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes. *Placenta* 1993;14:385-406.
29. Murray RK, Kelley FW. The extracellular matrix. En: *Harper's biochemistry*. Connecticut: Appleton and Lange, 1993; p. 634-46.
30. Fortunato SJ, Menon R, Lonbardi SJ. Collagenolytic enzymes (gelatinases) and their inhibitors in human amniochorionic membrane. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:731-41.
31. Woessner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991;5:2145-54.
32. McGregor JA, French JL, Lawellin D, Franco-Buff A, Smith C, Todd JK. Bacterial protease-induced reduction of choroamniotic membrane strength and elasticity. *Obstet Gynecol* 1987;69:167-74.
33. Schoonmaker JN, Lawellin D, Lunt B, McGregor JA. Bacteria and inflammatory cells reduce choroamniotic membrane integrity and tensile strenght. *Obstet Gynecol* 1989;74:590-6.
34. Drapper D, McGregor JA, Hall J, Jones W, Beautz M, Heine RP, et al. Elevated protease activities in human amnion and chorion correlate with preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173:1506-12.
35. Romero R, Ávila C, Brekus CA, Mazor M. The role of systemic and intrauterine infection in preterm parturition. En: Garfield RE, editor. *Uterine contractility*. Sero Symposium. Norwell: 1990; p. 319-54.
36. So T. The role of matrix metalloproteinases for premature rupture of membranes. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi-Acta. Obstet Gynecol Japonica* 1993;45:227-33.
37. Fortunato SJ, Menon R, Lonbardi SJ. Stromelysins in placental membranes and amniotic fluid with premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1999;94:435-440.
38. Maymon E, Romero R, Pacora P, Gervasi M-T, Bianco K, Ghezzi F, et al. Evidence for the participation of interstitial collagenase in preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:914-20.
39. Buhimschi IA, Kramer WB, Buhimschi CS, Thompson LP, Weiner CP. Reduction-oxidation state regulation of matrix metalloproteinase activity in human fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182:458-64.
40. Romero M, Mazor R, Wuy K, Ávila C, Oyarzun E, Mitchell MD. Bacterial endotoxin and tumor necrosing factor stimulate prostaglandin production by human decidua. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1989;37:183-6.
41. Sibille Y, Lwebuga-Mukasa JS, Polomskii L, Merrill WW, Ingbar DH, Gee JBL. Can in vitro model for polymorphonuclear leukocyte-induced injury to an extracellular matrix. *Ann Rev Respiratory Disease* 1986;134:134-40.
42. Winterbourn GL, Essman WB. Neutrophil oxidants: production and reactions. In: Das DK, Essman WB, editors. *Oxygen radicals: systemic events and disease processes*. New York: Karger, 1990; p. 31-70.
43. Woods JR Jr. Reactive oxygen species and preterm premature rupture of membranes-a review. *Placenta* 2001;22(Suppl A):S38-44.
44. Postovit IM, Adams MA, Graham CH. Does nitric oxide play a role in the aetiology of pre-eclampsia? *Placenta* 2001;22 (Supp A):S51-5.
45. Chappell LC, Seed PT, Briley AL, Kelly FJ, Lee R, Hunt BJ, et al. Effect of antioxidants on the occurrence of pre-eclampsia in women at increased risk: a randomised trial. *Lancet* 1999;354:810-6.
46. Agha AM, El-Khatib AS, Al-Zuhair H. Modulation of oxidant status by meloxicam in experimentally induced arthritis. *Pharmacol Res* 1999;40:385-92.
47. Rossi GP, Seccia TM, Nussdorfer GG. Reciprocal regulation of endothelin-1 and nitric oxide: relevance in the physiology and pathology of the cardiovascular system. *Int Rev Cytol* 2001;209:241-72.
48. Khachigian IM, Collins T, Fries JW. N-acetyl cysteine blocks mesangial VCAM-1 and NF-kappa B expression in vivo. *Am J Pathol* 1997;151:1225-9.

49. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992;119:598-620.
50. Squadrito GL, Pryor WA. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radic Biol Med* 1998;25:392-403.
51. Gessin JC, Darr D, Kaufman R, Murad S, Pinnel SR. Ascorbic acid specifically increases type I and Type III procollagen messenger RNA levels in human skin fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1988;90:420-4.
52. Casanueva E, Ávila-Rosas H, Polo E, Tejer E, Narcio-Reyes MC, Pfeffer F. Vitamin C status, cervico-vaginal infection and premature rupture of amniotic membranes. *Arch Med Res* 1995;26:5149-52.
53. Sharma MK, Buettner GR. Interaction of vitamin C and vitamin E during free radical stress in plasma: an ESR study. *Free Rad Biol Med* 1993;14:649-53.
54. Levine M, Conry-Cantilena C, Wang Y, Welch RW, Washiko PW, Dhaziwal KR, et al. Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93: 3704-9.
55. Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 1996;347:781-6.