

68



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

CAMPUS IZTACALA

"DESARROLLO DE BLASTOCISTOS SOBRE UNA
MATRIZ EXTRACELULAR OBTENIDA DEL
ENDOMETRIO DEL RATON".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

LICENCIATURA EN BIOLOGIA

P R E S E N T A :

MARCELA HERNANDEZ PADILLA

DIRECTOR DE TESIS: DOCTOR LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN



IZTACALA

288083

DICIEMBRE 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Este trabajo se realizo en el Laboratorio de Biología del Desarrollo de la Unidad de Morfología de la ENEP- Iztacala Bajo la asesoría del Dr. Luis Arturo Baiza Gutman.
Se contó con la Beca y apoyo del PAPIT DGAPA, UNAM Proyecto IN212400.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres.

Gracias por toda una vida de esfuerzos y sacrificios, por brindarme su apoyo, comprensión y cariño; por esto y muchas cosas más, deseo de todo corazón que mi triunfo profesional lo sientan como suyo.

A mis hermanos (Sonia, Estela, Eduardo y Monserrat).

Gracias por todos los momentos que hemos compartido juntos, por la ayuda que me han brindado, durante mis estudios, por comprenderme y estar conmigo.

A Vicente.

Por su infinita comprensión, apoyo y cariño; que me distes durante estos momentos de mi vida, por que gracias a tu presencia mi camino fue más fácil de andar.

A la familia Vargas Berra.

Por toda la ayuda brindada durante mis estudios, por su apoyo y comprensión, que han sido muy importantes.

A mis amigas (Carmen y Rita).

Por toda la ayuda recibida para la realización de este trabajo, por todos los momentos compartidos.

Por esto y por muchas cosas más les doy las gracias.

MARCELA HERNÁNDEZ PADILLA

INDICE

I.-	RESUMEN-----	1
II.-	INTRODUCCIÓN-----	3
1.-	Implantación embrionaria-----	5
2.-	Integrinas-----	9
3.-	Matriz extracelular-----	9
3.1.-	Colágena-----	10
3.2.-	Proteoglicanos-----	11
3.3.-	Glicoproteínas extracelulares-----	11
3.3.1.-	Fibronectina-----	11
3.3.2.-	Laminina-----	12
4.-	Proteínas que degradan la matriz extracelular-----	12
III.-	ANTECEDENTES-----	14
IV.-	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA-----	17
V.-	OBJETIVOS-----	18
VI.-	METODOLOGÍA-----	19
1.-	Obtención de los blastocistos y del endometrio de ratón-----	19
2.-	Obtención de la matriz extracelular del endometrio-----	19
3.-	Análisis electroforético y zimografía-----	22
4.-	Eliminación de metaloproteasas-----	22
5.-	Detección de fibronectina por "western blot"-----	23
6.-	Detección de colágena-----	23
7.-	Procesamiento de la matriz para su utilización en los cultivos-----	24
8.-	Cultivo de blastocistos-----	24
9.-	Determinación de grupos carbonilos-----	25
10.-	Análisis estadísticos-----	26
VII.-	RESULTADOS-----	27
1.-	Caracterización de la matriz-----	27
2.-	Cultivo de blastocistos de ratón-----	33
2.1.-	Cinética de cultivos-----	43
2.2.-	Efecto de la sonicación sobre el contenido de grupos carbonilo en la matriz extracelular del endometrio-----	47
VIII.-	DISCUSIÓN-----	48
IX.-	CONCLUSIÓN-----	51
X.-	BIBLIOGRAFÍA-----	52

I.- RESUMEN

La implantación embrionaria se refiere a la adquisición de una posición fija del embrión en el útero; el embrión se une al epitelio luminal y en algunos casos penetra a distintas profundidades de la pared uterina, esto último se conoce como invasión.

Para que dicha invasión se de, la membrana basal y el estroma endometrial sufren la actividad mecánica y fagocítica del trofoblasto, además de que participan algunas enzimas proteolíticas que degradan a la matriz extracelular y que son producidas tanto por el trofoblasto como por los tejidos uterinos activador del plasminógeno y colagenasas. Dicha matriz extracelular esta formada por colágena, proteoglicanos, glicoproteínas como la fibronectina y la laminina, la interacción que se da entre dichos componentes culmina con la formación de una red que además de servir de soporte a los tejidos desempeña funciones importantes durante la preñez y el desarrollo embrionario. Para la degradación de la matriz extracelular se requiere de la participación de las metaloproteasas de matriz extracelular (MMP) que se caracterizan por requerir de un ión divalente para su actividad, en ellas se incluyen una variedad de enzimas que degradan a la colágena. Sin embargo, *in vivo* las proteínas de la matriz no actúan en forma aislada y la matriz extracelular difiere en composición entre los distintos tejidos u órganos y entre las derivadas de las células normales o transformadas. Por lo anterior, este trabajo se trató de aislar y caracterizar una matriz extracelular que se obtendrá del endometrio de ratón al cuarto día de preñez, y se compararon sus características con una matriz extracelular comercial: el matrigel, para su posterior utilización, en el estudio del desarrollo de los blastocistos del ratón.

Para este propósito se llevo a cabo la técnica de extracción de la matriz extracelular descrita por Armant y Kameda (1994). En la caracterización de dicha matriz se utilizo la electroforesis con geles al 7.5 %, y geles adicionados con gelatina para la zimografia y detectar las metaloproteasas; la detección de fibronectina se realizó con la técnica de Western blot, y la colágena por medio de rojo sirio.

Los blastocistos se cultivaron con medio NCTC-135, suplementado con la matriz extracelular en fibras o sonicada y con matrigel utilizando como control el medio suplementado con suero.

Los resultados encontrados muestran que la matriz extracelular tiene una composición de laminina, fibronectina, colágena vimentina y entactina principalmente. Se determino

la presencia de metaloproteasas tanto en la matriz extracelular como en el matrigel un preparado comercial, las cuales son difíciles de separar de las muestras. En cuanto al desarrollo de blastocistos se observó que los embriones no se adhieren a las fibras de la matriz si no a la superficie de cultivo, y cuando se sonicó la matriz los embriones murieron por la generación de carbonilos en el medio lo cual se comprobó con la prueba de MTT. En el matrigel se adhirieron al medio pero no se da una extensión como tal en el medio sino se da una penetración al medio.

Por lo cual se puede determinar que la extracción de la matriz extracelular fue adecuada al encontrar las mismas proteínas que otros autores, la cual contiene metaloproteasas estrechamente relacionadas con los componentes de la matriz y del matrigel.

El cultivo de blastocistos se da un desarrollo embrionario diferente dependiendo de los medios de cultivo, en los cuales se da una adhesión y extensión del blastocisto, y en otros se da el rompimiento de la zona pelúcida pero no un desprendimiento de ella.

II.- INTRODUCCION

La viviparidad en los mamíferos ha producido diversas y variadas adaptaciones, que incluyen modificaciones en el desarrollo embrionario y la adquisición de procesos de interacción entre el embrión y los tejidos maternos. En ellos el primer tejido que se diferencia durante el desarrollo ontogenético es el trofotodermo; se le denomina así por estar constituido de una sola capa de células localizada en la parte más externa del blastocisto, este tejido además de que establece la interacción con los tejidos maternos, da origen al ectodermo del corión, que participa en el establecimiento de la conexión íntima con el endometrio y llega a ser el principal constituyente de la placenta. También se le conoce con el nombre de trofoblasto, este término es más genérico y se usa para el trofotodermo y sus derivados (Gilbert, 1994) figura 1.

El desarrollo embrionario del ratón antes de la implantación, culmina cuatro días después de la fertilización con la formación del blastocisto. En él se distinguen dos poblaciones celulares: las del trofotodermo y las de la masa celular interna, ambas rodean una cavidad llena de líquido, el blastocelo; a todo este conjunto lo protege una cubierta resistente, la zona pelúcida (ZP). Al trofotodermo que se encuentra recubriendo la masa celular interna (MCI) se le conoce como polar, y al que rodea al blastocelo como mural (Izquierdo, 1986). De la masa celular interna se originan los tejidos del embrión (Gilbert, 1994).

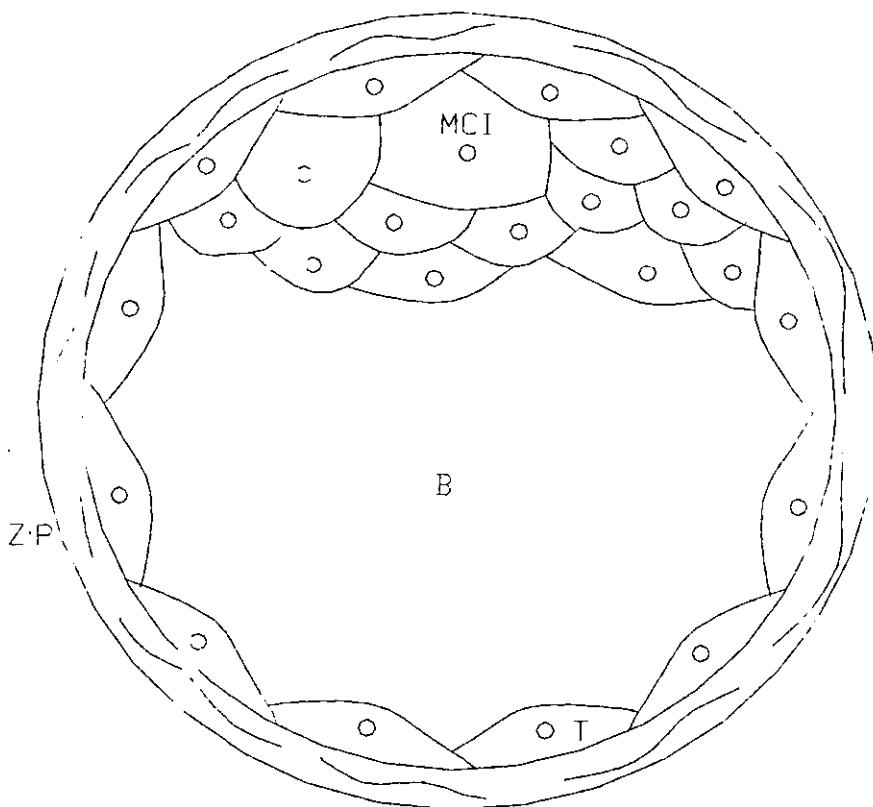


Figura 1: Estructura del blastocisto al día 4 de preñez. El blastocisto está formado por dos poblaciones celulares, la de la masa celular interna (MCI) y la del trofotodermo (T), ambos rodean a la cavidad del blastocelo (B). En su conjunto, el blastocisto está protegido por una cubierta de glicoproteínas, la zona pelúcida (ZP).

Los blastocistos se forman después de que las mórulas entran al útero, se distribuyen uniformemente a lo largo de los cuernos uterino y se ubican en el lugar en que ocurrirá la implantación, en los roedores el blastocisto se dirige hacia la región antimesometrial; este evento se conoce como orientación, y está dado por las contracciones del miometrio (Boving, 1971).

De manera simultánea, los blastocistos se liberan de la zona pelúcida, la cual es disuelta por componentes enzimáticos de las secreciones uterinas (Rosenfeld y Joshi, 1977). Después de esto se implanta en el endometrio, la implantación del blastocisto marca por tanto, el inicio de una asociación estrecha entre dos tejidos de constitución genética distinta y es un proceso clave en los organismos que se desarrollan dentro de la madre y cuya nutrición depende de ella (Flamigny y col. 1991).

El proceso de implantación en los mamíferos incluye la unión del blastocisto al epitelio uterino seguido por la invasión de las células gigantes del trofoblasto al estroma uterino (Armant y Kameda, 1993).

1.- IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA.

La implantación embrionaria se refiere a la adquisición de una posición fija del embrión en el útero, el embrión se une al epitelio luminal y en algunos casos penetra a distintas profundidades de la pared uterina, esto último se conoce como invasión.

Los eventos asociados a la implantación del blastocisto en los diversos animales varían dependiendo del grado de interacción de las células trofoblásticas con el endometrio (Schlafke & Anders, 1975).

En los primeros días de embarazo en el caso de roedores, entre la fertilización y el comienzo de la implantación, el endometrio sufre una preparación para permitir la implantación embrionaria (Martin y Finn, 1968, 1969). adquiriendo la receptividad al embrión, esta fase es transitoria y de corta duración (24 h para la rata y el ratón) y sólo durante ella el útero acepta al blastocisto y es capaz de responder a sus señales. Esta

fase depende de la acción de los estrógenos y de la progesterona sobre el útero y también se adquiere en animales pseudopreñados (Psychoyos, 1986; Weitlaf, 1988; Guzmán-Grenfell y col., 1993).

En los roedores, para la adquisición del estado receptivo uterino se requiere de la acción de los estrógenos sobre un útero previamente expuesto a la progesterona.

FASES IMPLANTACIÓN

Según Enders (1970) durante el proceso de implantación pueden distinguirse las siguientes etapas.

- 1) Distribución: los blastocistos se encuentran en la luz uterina y son trasladados hacia el lugar en el cual se lleva a cabo la implantación; para el transporte del blastocisto se deben de dar movimientos contractiles del músculo liso del útero.
- 2) Orientación: Es el proceso por el cual el blastocisto se sitúa próximo a la porción del endometrio donde se lleva a cabo la implantación. En la rata y el ratón, el blastocisto se ubica hacia la parte antimesometrial del endometrio, con el polo embrionario dirigido hacia la parte mesometrial. Durante este proceso se pierde la zona pelúcida (Psychoyos, 1973).
- 3) Contacto o aposición: es la yuxtaposición entre las superficies del trofotodermo y el epitelio luminal uterino; este proceso puede ocurrir por diversos mecanismos:
 - a) Por envolvimiento: el endometrio uterino se hincha y rodea al blastocisto dándose el contacto del trofotodermo con el epitelio uterino (reacción de ataque epitelial), este mecanismo ocurre en la rata y el ratón (Enders,1970; Psychoyos, 1973).
 - b) Por expansión: el blastocisto se expande, aumenta de volumen y llena la luz uterina; esto ocurre en el conejo, el cerdo, animales carnívoros y algunos monos (Psychoyos, 1973).
 - c) Por acercamiento activo: está dado por la aproximación activa del blastocisto a la mucosa uterina, se da en el cobayo, el chimpancé y el humano (Psychoyos, 1973).

En este periodo las microvellosidades del trofotodermo y del epitelio luminal uterino, se interdigitan (Psychoyos, 1973). En el ratón esto se da en el trofotodermo mural. El blastocisto envía señales al endometrio, antes de unirse a él, y el útero empieza a experimentar cambios en respuesta a estas señales.

- 4) Adhesión: Se establece la unión firme entre el trofotodermo y el epitelio endometrial (Enders, 1970). Se establece una interacción estrecha entre las superficies de membrana, mediante moléculas de adhesión y desmosomas (Schlafke y Enders, 1975; Enders, 1976).
- 5) Penetración o invasión: el trofoblasto se funde o penetra al epitelio uterino y se introduce a capas más profundas del endometrio.

El grado de invasión varia en diferentes especies y va desde la simple adhesión de los epitelios, a la penetración de capas profundas del endometrio, en algunos casos, incluso las vellosidades coriónicas que se originan del trofotodermo quedan bañadas directamente por la sangre materna.

Durante la invasión las células trofablásticas se transforman e interactúan con el tejido materno, éstas, de una forma aplanada y con un núcleo con apariencia de huso, se convertirán en células gigantes y poliploides (rata y ratón) o formarán un sincicio (sinciciotrofoblasto en el humano o el cobayo).

La penetración del epitelio ocurre por tres mecanismos: Desplazamiento, fusión o intrusión.

- a) Desplazamiento: cuando se da la adhesión se presenta la muerte y el desprendimiento del epitelio luminal uterino, lo cual facilita la interacción del trofoblasto con la lamina basal y la penetración del estroma, ésta ha sido descrita para la rata y el ratón (Schlafke y Enders, 1975; Denker, 1990). La muerte del epitelio es por apoptosis (Parr y col, 1985).

- b) Fusión: se da en el conejo y en los rumiantes; la membrana apical del trofoblasto se funde con la del epitelio uterino, formando una mezcla sincicial de origen materno y embrionario (Schlafke y Enders, 1975; Denker 1990).
- c) Intrusión: se presentan pequeñas prolongaciones del citoplasma del sinciciotrofoblasto que penetran entre las células epiteliales uterinas; además de que ocurren eventos de fusión, esto se presenta en el humano, el hurón y algunos carnívoros (Schlafke y Enders, 1975; Denker, 1990).

En la penetración de la membrana basal y el estroma endometrial se han implicado la actividad mecánica y fagocítica del trofoblasto, además de la participación de algunas enzimas proteolíticas que degradan a la matriz extracelular y que se producen tanto por el trofoblasto como por los tejidos uterinos, activador del plasminógeno y colagenasas (Sherman y Salomon, 1975; Strickland y col., 1976; Brenner y col., 1989).

Es además importante la interacción de la superficie del trofoblasto con diversas moléculas de la matriz extracelular y con otras células presentes en el estroma del endometrio (Guzmán-Grenfell y col., 1993). En la invasión del trofoblasto las células repetidamente se adhieren, degradan y migran a través de la matriz extracelular, en forma parecida a lo que ocurre durante la invasión de tejidos por un tumor metastásico (Yagel y cols, 1989; Shuterland, y cols 1988, Armant, y cols 1986).

El tejido endometrial participa como regulador del proceso invasivo; ya que por una parte lo facilita al ocurrir la regresión controlada del tejido decidual subyacente al trofoblasto, y por otra evita que el trofoblasto vaya más allá del estroma, debido a la gran producción de tejido decidual, así como también por la secreción de factores químicos que inhiben la invasividad del trofoblasto (Sherman y Salomon, 1975). Entre los que se encuentra el factor de crecimiento transformante β (TGFB). En estudios recientes se han encontrado glicoproteínas y proteoglicanos del epitelio uterino y del trofoblasto, los cuales están fuertemente relacionadas con la implantación.

Así también se tienen datos de la expresión de receptores para moléculas de la matriz extracelular en el trofoblasto invasivo, se puede esperar que estos receptores jueguen un papel funcional durante la fase de invasión, que se da después de la penetración del epitelio uterino.

Dichos receptores son llamados integrinas, al menos se ha demostrado la participación en la implantación embrionaria de dos de estas proteínas una de ellas tiene afinidad a la fibronectina y otra a la laminina (Asgerally,1997).

2.- INTEGRINAS

Las integrinas son proteínas heterodiméricas localizadas en la membrana celular y que participan en la adhesión células entre sí y con la matriz extracelular. Se encuentran en constantes cambios en el endometrio durante el ciclo menstrual de las mujeres(Lessey y cols. 1994; Ruck y cols. 1994).

La matriz extracelular esta ligada por estos receptores que probablemente juegan un papel importante durante la diferenciación del endometrio para que este sea receptivo (Asgerally,1997).

Dichas moléculas se han estudiado en primates para ver cual es el papel que desempeñan durante la cascada de eventos moleculares que están ligados con la implantación; la expresión de las integrinas esta asociada con los cambios que se dan en la matriz extracelular durante el ciclo menstrual y la preñez (Lessey y cols. 1994; Ruck y cols. 1994).

Recientemente se ha demostrado que la ventana de implantación en el humano y la decidualización del estroma endometrial, se asocian con cambios específicos en la expresión de las integrinas (Lessey y cols. 1994; Ruck y cols. 1994). Los cambios en la expresión de integrinas en el endometrio, pueden sugerir que estas proteínas tienen un posible papel en la cascada de eventos moleculares ligados al proceso de la implantación.

3.- LA MATRIZ EXTRACELULAR.

La matriz extracelular (MEC), además de proveer de un soporte estructural a las células también influye en sus características básicas como su morfología, proliferación, diferenciación y metabolismo (Carnegie y Cabaca, 1993). Consiste de macromoléculas secretadas por las células dentro de su medio ambiente, estas moléculas interactúan para formar una red insoluble que puede jugar varios papeles durante el desarrollo

embrionario y la preñez. La MEC puede servir como el sustrato sobre el cual las células migran y además participar en la inducción de la diferenciación de ciertos tipos celulares. Hay dos tipos principales de matrices extracelulares; las membranas basales y la matriz de tipo intersticial. Las primeras están constituidas de dos capas, una debajo de los epitelios; producidas por éstos; y una capa reticular o lamina reticulosa, producida por las células del tejido conectivo. La matriz extracelular esta formada por colágena, proteoglicanos, glicoproteínas como la fibronectina y la laminina; a estas últimas se les denomina como sustrato de adhesión molecular. La interacción que se da entre dichos componentes culmina con la formación de una red que además de servir de soporte a los tejidos desempeña funciones importantes durante la preñez y el desarrollo embrionario (Gilbert, 1994).

3.1.- COLAGENA:

Las colágenas forman una familia glicoproteínas que contienen un gran porcentaje de residuos de glicina y prolina. Es el mejor soporte estructural de casi todos los órganos en los animales y constituye casi la mitad de las proteínas del cuerpo (Gilbert, 1994).

La colágena se encuentra agrupada en 19 tipos de ellas mencionaremos a las más comunes:

Tipo I: se encuentra en la matriz extracelular de la piel, los tendones y los huesos y constituyen un 90% de la colágena que se encuentra en todo el cuerpo.

Tipo II: Se encuentra principalmente en el cartilago, pero también en la notocorda y el cuerpo vitreo del ojo.

Tipo III: Se encuentra en los vasos sanguíneos.

Tipo IV: Se encuentra en las membranas basales cerca de las células epiteliales (Vuorio, 1986).

Existen otros tipos de colágenas en el cuerpo especialmente en el cartilago. La colágena es importante para la formación de la lamina basal, y esta también implicada en inducir

la ramificación de los tubos epiteliales en la glándulas salivales, el pulmón y otros órganos (Gilbert, 1994).

3.2.- PROTEOGLICANOS:

Estos son tipos específicos de glicoproteínas en los cuales el peso de los carbohidratos es más alto que el peso de las proteínas, la cadena lineal de los carbohidratos esta compuesta de repeticiones de disacáridos. Usualmente uno de los azúcares de cada disacárido estos se puede unir a un grupo amino, así la unidad repetida es llamada glicosaminoglicano. (Gilbert, 1994).

La interacción de proteínas y carbohidratos forma una red propia de la matriz y en muchos tipos celulares móviles, los proteoglicanos rodean a las células.

La constitución de la matriz extracelular depende de la proporción de colágena y de proteoglicanos. En la lamina basal predominan los proteoglicanos que forman un tamiz con la función de proveer un soporte estructural.

Los proteoglicanos también pueden ser importantes en la mediación de las conexiones entre los tejidos adyacentes de un órgano.

3.3.- GLICOPROTEÍNAS EXTRACELULARES:

La matriz extracelular contienen una gran variedad de moléculas especializadas como la fibronectina, la laminina, la trombospodina y la entactina, estas grandes glicoproteínas probablemente son responsables de la organización de la colágena, los proteoglicanos y de las células para dar un orden estructural (Gilbert, 1994).

3.3.1.- FIBRONECTINA:

Es una glicoproteína grande (460 kDa), es un dímero sintetizado por los fibroblastos, los condrocitos, las células endoteliales, los macrófagos y ciertas células epiteliales (como los hepatocitos y los amniocitos) una de las funciones de la fibronectina es servir como un enlace general a varios sustratos para la adhesión celular; al igual que la colágena y los proteoglicanos, la fibronectina también organiza a la matriz extracelular. La

interacción con las moléculas apropiadas tiene como resultado la alineación de las células con su matriz extracelular (Gilbert, 1994).

3.3.2.- LAMININA:

Es el mayor componente de la lamina basal, esta formada de tres cadenas de péptidos y como la fibronectina, puede unirse a la colágena, los glicosaminoglicanos y las células (Gilbert, 1994).

4.- PROTEÍNAS QUE DEGRADAN A LA MATRIZ EXTRACELULAR

Las enzimas proteolíticas juegan un papel importante durante diversos procesos celulares, estas enzimas degradan por la hidrólisis total o parcial a las proteínas.

Para la clasificación de las proteasas se utilizan tres criterios que son:

- Tipo de reacción catalizada.
- La naturaleza química del sitio catalítico.
- Evolución y relación del sitio de acción en referencia a su estructura..

Utilizando el segundo criterio se dividen en cuatro grupos, que son:

- Metaloproteasas.
- Serin-proteasas.
- Cistein-proteasas.
- Asparto-proteasas.

Las metaloproteasas de matriz extracelular (MMP) se caracterizan por requerir de un ión divalente para su actividad, ello incluyen una variedad de enzimas que degradan a la colágena. Entre los iones que se requieren para su activación están el Zn^{+2} , el Mg^{+2} y el Ca^{+2} .

Los activadores del plasminógeno (AP), la plasmina y las metaloproteasas, intervienen en la degradación de las matrices extracelulares. Por lo tanto, en los procesos que

implican la remodelación de la matriz extracelular o su penetración. Estas enzimas actúan en forma cooperativa (Pardo y Selman, 1996).

El trofoblasto invasivo, tiene la capacidad para producir enzimas que degradan a las matrices extracelulares.

Las MMP se subdividen según su habilidad para degradar algunos de los componentes de las matrices extracelulares como la colágena, la gelatina, la fibronectina, la laminina, o los proteoglicanos. Por lo general se secretan como proenzimas inactivas (Pascal y col., 1987).

Los activadores fisiológicos potenciales de las MMP, incluyen a otras proteasas como la plasmina, la catepsina B y G, y la elastasa de los neutrófilos (Tabibzadeh y Babaknia., 1995).

Algunos miembros poseen la habilidad adicional de activar formas latentes de otras metaloproteasas, por ejemplo: la MMP-3 que es una estromelisina, activa a la MMP-1, una colagenasa y a la MMP-9, una gelatinasa (Tabibzadeh y Babaknia., 1995).

La actividad de las MMP en los tejidos, es regulada por inhibidores endógenos, los llamados inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs), producidos localmente como el TIMP-1, 2 y 3. El TIMP-3 se ha identificado en el útero y la decidua peri-implantacional en el ratón (Lala y Hamilton., 1996).

Los activadores del plasminógeno pertenecen a las serin-proteasas; ya que en su sitio activo se presenta un residuo de serina, indispensable para su actividad catalítica. Degradan al plasminógeno para formar plasmina y aunque la plasmina actúa directamente sobre las proteínas de la matriz extracelular, su actividad sobre ellas es limitada y participa principalmente como componente de la cascada proteolítica, que activa la forma latente de las metaloproteasas (Harvey y cols., 1995).

Localmente también se producen inhibidores de los activadores del plasminógeno el PAI-1 y el PAI-2 que regulan la actividad de estas enzimas (Lala y Hamilton., 1996).

III.- ANTECEDENTES

Los blastocistos de ratón cultivados *in vitro* experimentan una serie de cambios similares a los que le ocurren en el útero durante la implantación. Son capaces de romper la zona pelúcida, adherirse a diferentes sustratos por medio del trofoblasto mural, además, las células trofoblásticas migran, crecen en extensión y originan células gigantes poliploides.

Las células del trofoblasto polar, a diferencia de lo que ocurre en el útero, se separan de la masa celular interna (MCI), migra sobre el cultivo y se sitúan entre el crecimiento trofoblástico y la MCI, permanecen diploides y no aumentan de tamaño; mientras, que los derivados de la MCI quedan como un grupo de células sobremontadas en el centro (Wilson y Jenkinson, 1974; Sherman y Salomon, 1975; Gonda y Hsu, 1980).

El destino de la MCI es variable; prolifera creciendo como una masa desorganizada de células y sólo en algunos casos se forman cuerpos vesiculares con ectoblasto y endoblasto (Wilson y Jenkinson, 1974; Sherman y Salomón, 1975; Gonda y Hsu, 1980).

Se han establecido ya las condiciones básicas del cultivo para las distintas fases de la implantación *in vitro*. Para que se lleve a cabo la adhesión y sea más estable, y que ocurra la extensión del trofoblasto, es necesario complementar el medio de cultivo con aminoácidos y suero de bovino fetal (SBF) (Gwatkin, 1966a). Este enriquecimiento con suero puede ser sustituido por el co-cultivo con otras células (Salomon y Sherman, 1975; Sherman y Salomon, 1975) o por la adición de proteínas de la matriz extracelular (Wilson y Jenkinson, 1974; Armant y col., 1986a; Armant, 1991) o por el empleo de fetuina (Gwatkin, 1966b, Rizzino y Sherman, 1979; Sellens y Sherman, 1980).

Los blastocistos son capaces de implantarse *in vitro* sobre monocapas de diversos tipos celulares, derivados del ratón y del humano, del criceto y de la rata; sean o no de tejido uterino (Salomon y Sherman, 1975; Sherman y Salomon, 1975).

La acción del SBF es en gran parte debida a que contienen fibronectina; ya que anticuerpos contra ella inhiben la extensión del trofoblasto en cultivos en presencia de suero (Baiza, 1994).

El trofotodermo adquiere la capacidad de adherirse y extenderse a superficies cubiertas con proteínas de la matriz extracelular (Wilson y Jenkinson, 1974; Jenkinson, 1977; Sherman y Atienza-Samols, 1978; Armant y col., 1986a). Esto sucede por la adquisición de moléculas que interactúan con la matriz extracelular como integrinas (Armant y col., 1986b; Sherman y col., 1988; Armant, 1991) ó proteoglicanos de heparan sulfato (Farach y col., 1987).

Durante el proceso de adhesión y extensión, el trofoblasto se diferencia y expresa diversas proteínas como: la fosfatasa alcalina (Sherman, 1972a); la esterasa A (Sherman, 1972 b), la $\Delta^5\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β HED) (Chew y Sherman, 1973 y 1975; Sherman y Salomon, 1975), el activador del plasminógeno (Strickland y col., 1976; Sherman, 1980), la β -glucuronidasa (Sellens y Sherman, 1980), y la subunidad A de la lactato deshidrogenasa (LDH) (Sellens y Sherman, 1980); también se modifica el patrón de síntesis de proteínas de secreción (Nieder, 1990, Baiza, 1994).

Durante la penetración del endometrio el trofoblasto entra en contacto con matrices extracelulares de distinta composición y es posible que su diferenciación sea influida por esta interacción, esto es factible; ya que las matrices extracelulares no sólo son un factor físico al que se anclan las células de los tejidos, sino que muchos de sus componentes interactúan con receptores de la superficie celular y a través de ellos afectan la características metabólicas del trofoblasto (Sutherland, y cols 1988, Armant, 1986 a).

Diversos componentes de la matriz extracelular son sintetizados durante la decidualización (Wewer y cols 1986; Kisalus y cols 1987), donde se producen a las proteínas fibronectina, colágena tipo IV, laminina, entactina y proteoglicanos de sulfato de heparina.

También las proteínas de la matriz extracelular (fibronectina, laminina, colágena tipo IV, vitronectina, entactina) promueven y favorecen la adhesión y extensión de blastocistos de ratón *in vitro* aún sin el empleo de suero (Armant y col 1986 a, b; Carson, y cols., 1988; Sutherland y cols., 1988; Yelian y cols., 1993).

La matriz extracelular obtenida del endometrio, utilizada en forma de fibras sostiene la adhesión del trofoblasto y es penetrada por éste (Armant y Kameda, 1994); sin embargo, en este sistema es difícil la observación de los blastocistos, por lo que se pretende en este trabajo emplearla de una manera que pudiera permitir un mejor manejo del sistema de cultivo.

IV.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Debido a que la implantación en los mamíferos es un proceso complejo *in vivo*, y prácticamente inaccesible para el control de los experimentos, se han establecido sistemas para el estudio del desarrollo del trofoblasto en cultivo, lo que nos permite estudiar la respuesta de este tejido a distintas variables experimentales.

En el estudio de la acción de la matriz extracelular sobre las células se han empleado proteínas componentes de la misma como la fibronectina, la laminina y la colágena, o preparados de la membrana basal derivadas del sarcoma de Engelbreth Holm – Swarm del ratón o matrigel. Sin embargo, *in vivo* las proteínas de la matriz no actúan en forma aislada y la matriz extracelular difiere en composición entre los distintos tejidos u órganos y entre la derivada de células normales o transformadas.

En este trabajo se pretende aislar y caracterizar una matriz extracelular que se obtendrá del endometrio de ratón al cuarto día de preñez. y se compararán sus características con una matriz extracelular comercial: el matrigel. Para su posterior utilización en forma de gel o de fibras, en el estudio del desarrollo de los blastocistos del ratón, se tratará asimismo de hacer un preparado más homogéneo mediante el empleo de la técnica de sonicación.

Se ha demostrado que diferencias en la composición de los sustratos de adhesión para cultivo de células influyen en la morfología y la migración celular; debido a ello es que se trata de utilizar como sustrato a una matriz compleja obtenida del endometrio, al tiempo en que el útero es receptivo.

V.- OBJETIVOS

General:

Estudiar el desarrollo de blastocistos de ratón cultivados sobre una matriz extracelular obtenida del endometrio.

Particulares:

- 1.-Aislar la matriz extracelular del endometrio de ratón de cuatro días de preñez.
- 2.-Caracterizar la matriz extracelular obtenida y compararla con el matrigel en cuanto a:
 - a)
 - a) Patrón electroforético de las proteínas que lo constituyen.
 - b) Presencia de gelatinasas.
- 3.-Observar el desarrollo de blastocistos de ratón sobre la matriz extracelular obtenida.
 - a) Analizar la forma mas adecuada de preparar a la matriz para su uso en el cultivo.
 - b) Evaluar el desarrollo de los blastocistos sobre la matriz del endometrio en cuanto a :
 - Ruptura de la zona pelúcida.
 - Adhesión y extensión al sustrato.
 - Colapso de la cavidad del blastocele.

VI.- METODOLOGIA

1.- Obtención de los blastocistos y del endometrio de ratón.

Se utilizaron ratonas de la cepa CD1, las cuales se indujeron a superovular por medio de la administración vía intraperitoneal de 5 UI de gonadotropinas del suero de yegua preñada (PMSG), seguida 48 h después por la administración de 5 UI de gonadotropina coriónica humana (hGC). Se aparearon con machos de la misma cepa y al día siguiente se revisó la vagina para detectar la presencia del tapón vaginal, que indica el primer día de preñez.

Al cuarto día entre las 17 y 18 h se extirparon los úteros y después se obtuvieron los embriones mediante el lavado de los cuernos uterinos con medio de Biggers. Los úteros se cortaron longitudinalmente, colocándolos en papel filtro con la parte interna hacia arriba, se congelaron a -70°C , y posteriormente se liofilizaron en una liofilizadora marca LABCOF. El endometrio se obtuvo por medio de un raspado con agujas de 27X13 mm con la punta doblada (Esquema 1)

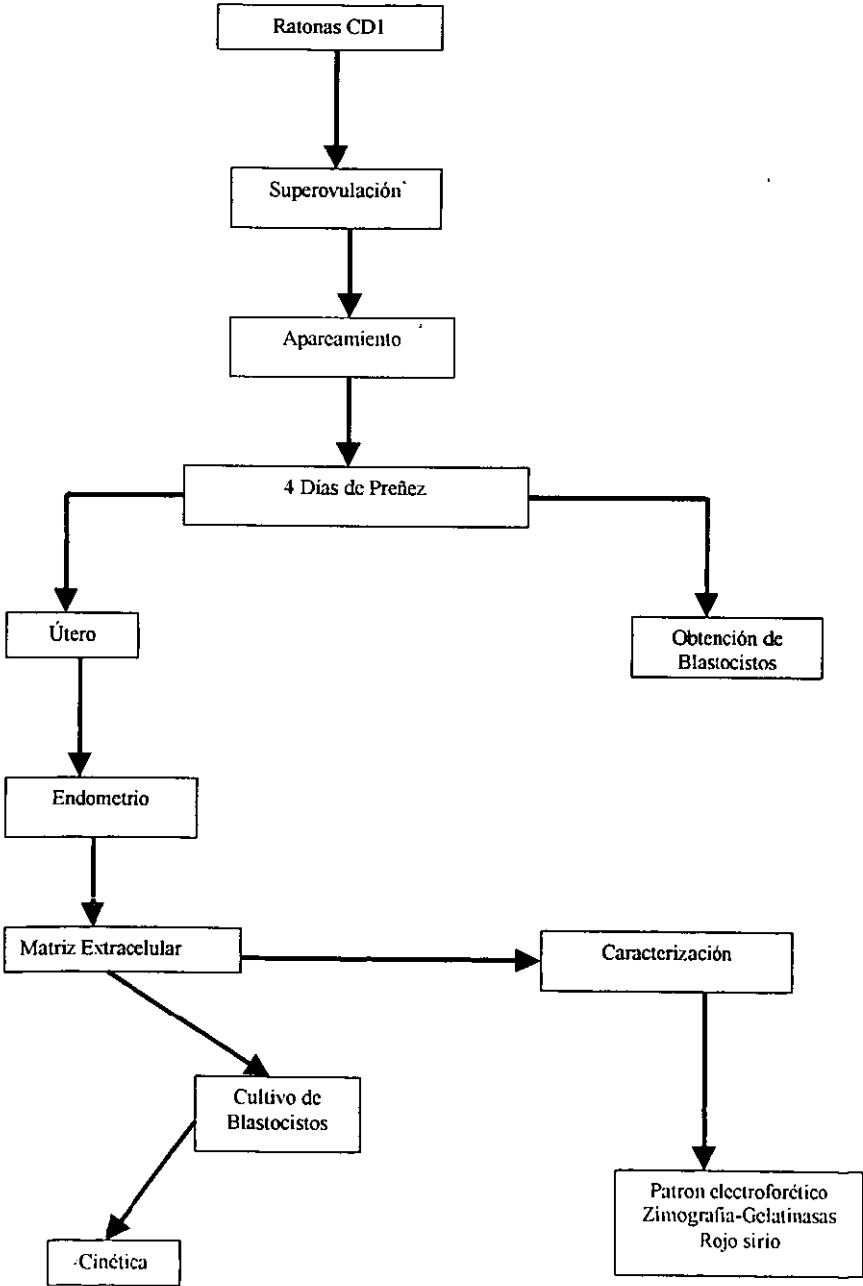
2.- Obtención de la matriz extracelular.

Para obtener la matriz extracelular del endometrio, se hicieron extracciones sucesivas por el procedimiento descrito por Armant y Kameda (1994). El endometrio liofilizado se suspendió en Nonidet P40 al 0.5 % más una mezcla de inhibidor de proteasas (PIC) (NP40-PIC), en una proporción de 10 mg/mL de tejido seco. El PIC está formado por aprotinina 25 mg/mL, leupeptina 1 mg/mL, antipaina 2 mg/mL, benzamidina 10 mg/mL, quimiostatina 1 mg/mL y pepstatina 1 mg/mL. El PIC que se utiliza al principio para solubilizar el endometrio, también contuvo P-metilsulfonil fluoruro (PMSF) 0.3 mg/mL.

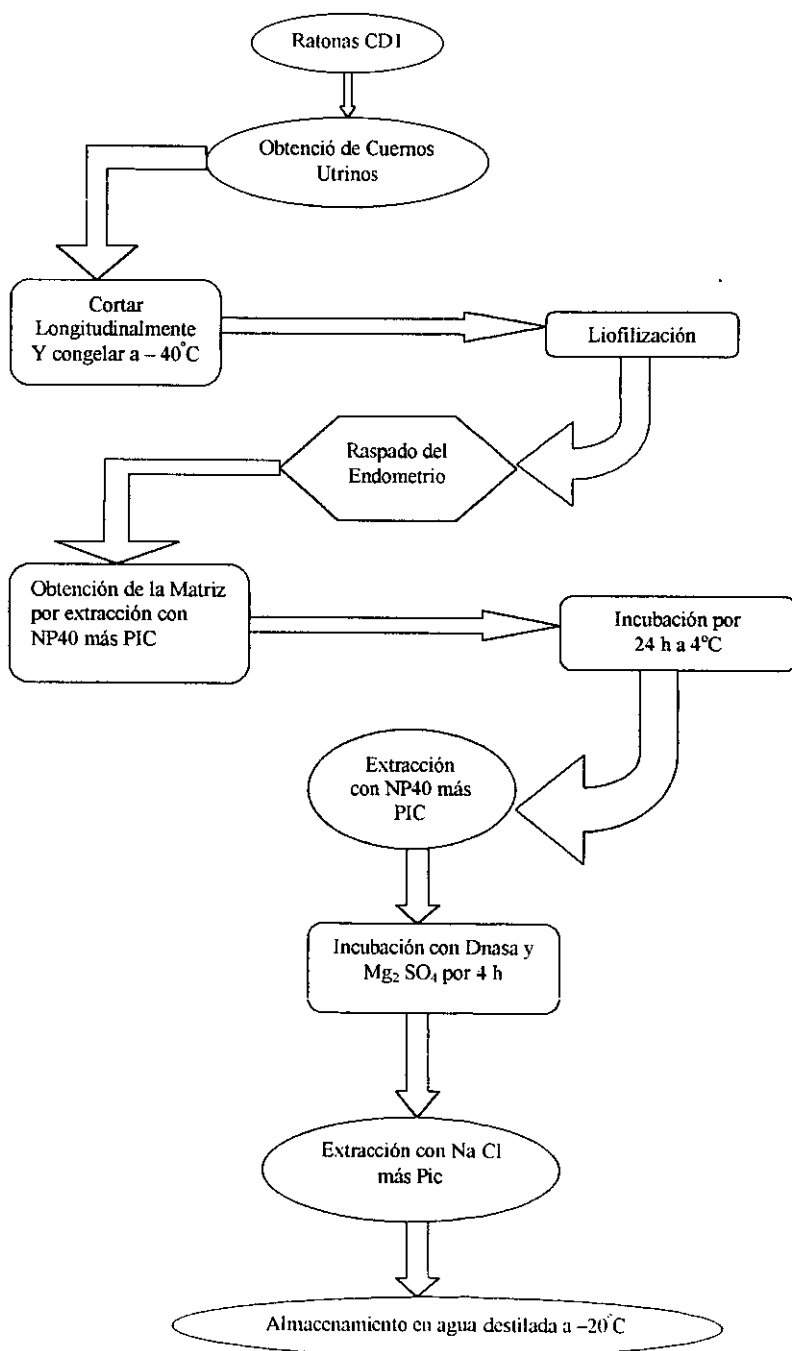
Se centrifugó por 10 minutos a 1000 rpm, el procedimiento se llevó a cabo en cuatro ocasiones y la pastilla se dejó incubando con NP40 - PIC durante toda la noche a 4°C ; al día siguiente se centrifugó a 11 000 rpm resuspendió la pastilla en 2ml de amortiguador de acetato de sodio 25 mM a un pH de 5.0, Mg_2SO_4 5 mM y 200 U/mL

de DNAsa tipo I, y se incubó por 3 horas, a temperatura ambiente. Después de centrifugar el sedimento de resuspendió con NaCl 1.0 M con PIC, se lavó y resuspendió

Esquema Metodológico General 1



Esquema de la obtención de la Matriz Extracelular 2



en NaCl 1.0 M en 3 ocasiones más, enjuagando posteriormente con agua destilada en 5 ocasiones y la matriz obtenida se almacenó con agua destilada a -20 °C hasta su uso Esquema 2 (Armant y Kameda, 1994).

3.- Análisis electroforético y zimografía.

Para el análisis electroforético de las proteínas que constituyen a la matriz obtenida se utilizaron geles de poliacrilamida al 7.5 % en presencia de SDS al 10 %, se corrieron alícuotas de 10 µL de la matriz obtenida, después de disolverse en un amortiguador de muestra 2X y quedando una proporción de tejido liofilizado de 30 mg/mL, y una cantidad igual de matrigel (matriz comercial de membrana basal). Se empleó un estándar de proteínas con pesos moleculares conocidos. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie al 10 %.

La misma cantidad de muestra, fue utilizada para la prueba de zimografía para gelatinasas, la cual se elaboró con PAGE-SDS al 7.5 %, copolimerizados con gelatina al 0.1%, en condiciones no reductoras; después del corrimiento electroforético, los geles se incubaron por 30 minutos con Tritón X-100 al 2.5% a 37 °C; luego se lavaron y se incubaron en un amortiguador de Tris 1.0 M, más cloruro de sodio 0.15 M, cloruro de calcio al 0.1 mM, y azida de sodio al 0.02%, con un pH de 7.4, por 48 horas, al cabo de este tiempo, se tiñeron con azul de Coomassie al 10 % por dos horas. Las bandas claras indican la presencia de proteasas que degradan gelatina, otras geles procesados se incubaron paralelamente con EDTA 40 mM, para discriminar las proteasas que requieren de metales para su actividad.

4.- Eliminación de Metaloproteasas.

Se trató la matriz extracelular con tres diferentes soluciones para la eliminación de las metaloproteasas: a) cloruro de calcio 5 M, b) cloruro de calcio 5mM, y c) una mezcla de cloruro de calcio 5 mM más urea 6M. se utilizaron 10 mg de la matriz, en 2 mL de la solución, los cuales se dejaron incubarse durante 2 h y se lavaron con agua destilada en una centrifuga refrigerada a 4°C a 11000 rpm por 5 min.

5.- Detección de fibronectina por "Western blot".

Después del corrimiento electroforético el gel se colocó en un aparato de electrotransferencia, en el cual se utilizó una hoja de papel de nitrocelulosa del tamaño del gel y ambos se colocaron sobrepuestos en una solución de transferencia previamente enfriada, y se sometieron durante toda la noche a una corriente eléctrica de 45 miliamperes, para que se transfirieran las proteínas del gel al papel, posteriormente se tiñó con rosa de Ponceau para observar la presencia de bandas de proteínas, al cabo de esto se cortó el papel de nitrocelulosa en carriles para hacerles la detección inmunohistoquímica, la cual consiste en lavar la banda de papel con una solución de Tritón X100 al 2.5 % y leche Sveltti descremada al 5 % más PBS durante una hora a 37°C y en agitación, posteriormente se lavó con PBS-Triton X100 al 1%, y luego se colocó el primer anticuerpo antifibronectina en una dilución de 1/ 400 (10 µl del anticuerpo en 15 ml de leche), este anticuerpo fue obtenido en el laboratorio en un conejo Nueva Zelanda usando fibronectina de suero de cobayo como antígeno y se incubó por 1 h a 37° C en agitación, luego se lavó con PBS-Tritón, y a continuación se adicionó el segundo anticuerpo 1/10000 (6µl del anticuerpo en 15ml de leche), incubándose durante una hora a 37° C, posteriormente se lavó con PBS y luego con un amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 7.4, y después se le adicionó el sustrato de diaminobenzidina (0.5 mg/mL) mas cloruro de níquel (0.3mg/mL) y cloruro de cobalto (0.3mg/mL), se incubó por 10 minutos y luego se reveló en la misma mezcla mas peróxido de hidrogeno al 0.005%.

6.- Detección de colágena.

Después de la electroforesis, el gel fue fijado durante 30 minutos con una solución de ácido tricloroacético, pasado este tiempo se lavó con agua destilada en o las que fueran necesarias hasta que se removiera el exceso de ácido. Entonces se procedió a teñir el gel durante 1 h con una solución de rojo sirio F3BA, preparada en una solución acuosa de ácido picrico saturado. Al cabo de la hora se lavó con una solución de ácido acético, metanol, y agua, en una proporción de 7:30:63 respectivamente, hasta que no quedara

rastros del colorante, y se conservó en agua destilada a 4 °C. En estas condiciones puede durar hasta 60 días.

7.- Procesamiento de la matriz para su utilización en los cultivos.

La matriz extracelular se empleó en forma de fibras para el cultivo de blastocistos o se procesó de la siguiente manera.

Fragmentos de 20 mg de la matriz extracelular obtenida fueron sonicados durante 40 segundos en un tubo Eppendorf con 1 mL de agua en un sonicador Branson Sunifiel 250, de esta muestra se tomó la mitad del volumen para ser centrifugado durante 2 minutos a 11 000 rpm en una micro centrifuga Eppendorf para sedimentar las fibras insolubles de la matriz, obteniéndose posteriormente el sobrenadante y el precipitado.

Se probaron diferentes formas de cubrir las cajas de cultivo con la matriz sonicada:

- a) Cubierta por secado: Del sobrenadante y la suspensión se tomaron 10 µL de la muestra y se colocaron en una caja Falcón dejando secar por 2 horas para que se forme una capa en la superficie de la caja, después se lavaron en 5 ocasiones, con el medio de cultivo NCTC-135 suplementado con antibióticos.
- b) Gelificación bajo aceite mineral: En cajas de cultivo se colocaron gotas de 20 µL del sobrenadante o de la suspensión procesada, y se incubaron por 4 h a 37 °C; posteriormente se lavaron 5 veces con el mismo medio de cultivo.

Preparación de la cubierta de matrigel: Sobre la caja de cultivo se colocaron gotas de 10 µL de matrigel concentrado que tiene una concentración de proteínas de 12 mg/ mL, en medio de cultivo NCTC-135, y así observar como es el desarrollo de los embriones en dichas capas, estos medios se incubaron por 4 h a 37 °C, y posteriormente se lavaron en cinco ocasiones con el medio de cultivo a emplear.

8.- Cultivo de blastocistos.

Los blastocistos se cultivaron en medio de Biggers conteniendo albúmina de suero de bovino (BSA) al 0.4% y antibióticos (penicilina G 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL y kanamicina 100µg/mL) en gotas de 20 µL en cajas Falcon bajo aceite mineral y se incubaron a 37 °C durante 24 horas, posteriormente los blastocistos fueron transferidos a los medios de cultivo experimentales en gotas de 20 µl de medio NCTC-135 suplementado con BSA y antibióticos a las concentraciones ya indicadas. Estos blastocistos se cultivaron en grupos de 10 en gotas bajo aceite mineral, sobre las cubiertas de la matriz extracelular obtenida o de matrigel, y se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda y con 5 % de CO₂, en una incubadora Revco. Las cajas para el cultivo fueron pre-equilibradas mínimo por 4 horas antes de adicionar los blastocistos. Adicionalmente y como control, se cultivaron blastocistos en meddio Nctc-135 suplementado con SBF al 10%.

Los cultivos se observaron diariamente en un microscopio estereoscópico para establecer el porcentaje de blastocistos con ruptura de la zona pelúcida, con adhesión y extensión al sustrato y que posean blastocele aparente con respecto al numero de blastocistos cultivados según el procedimiento de Sherman (1978) durante un periodo de 4 días. Para determinar los blastocistos que estuvieron adheridos se agitó la caja de cultivo para observar cuantos blastocistos se encuentran aún libres, después de 4 días de cultivo

9.- Determinación de grupos carbonilos en la matriz extracelular sonicada.

Se tomaron fragmentos de 2.4mg de la matriz extracelular obtenida anteriormente, se suspendio en 0.5mL de agua y se procesaron en un sonicador Brandoson Sonifieer 250 durante 20 segundos, en un tubo eppendorf de 0.5ml, en presencia de manitol 0.5mM, o sin el.

La posible modificación oxidativa de las proteína debida a la sonicación se evaluó por la reacción de la 2,4 dinitrofenilhidrazina, para determinar los grupos carbonilo de las proteínas oxidadas acorde con Levine y col. (1990), con el siguiente procedimiento.

A tubos de microcentrífuga se les adicionaron 0.5 mL de la matriz sonicada o sin sonicar (2.4mg/0.5mL) de matriz más 0.5ml de 2,4 dinitrofenilhidrazina 10mM en HCl 2M, se dejaron reposar por una hora a temperatura ambiente, se mezcló en un vortex y se agitó cada 10 a 15 minutos y posteriormente se les adicionó 5ml de ácido tricloroacético al 20% y se centrifugó a 11,000 g por 3 minutos en una microcentrífuga Eppendorf y se tiró el sobrenadante. El sedimento de la proteína se disolvió en 1ml de solución de guanidina 6M en 20mM de fosfato de sodio monobásico a pH de 2.3 (ajustado con HCl) incubando por 30 min a 37° C y se removió el material insoluble centrifugado a 11 000 g por 3 minutos. Posteriormente se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 327 nm, para hacer el cálculo de la concentración de los grupos carbonilos se empleó el coeficiente de absorción molar de 22.000 M⁻¹ cm⁻¹.

10.- Análisis estadístico.

Se analizaron los datos de la cinética de los cultivos por análisis de varianza de 2 factores seguida de la prueba de Tukey.

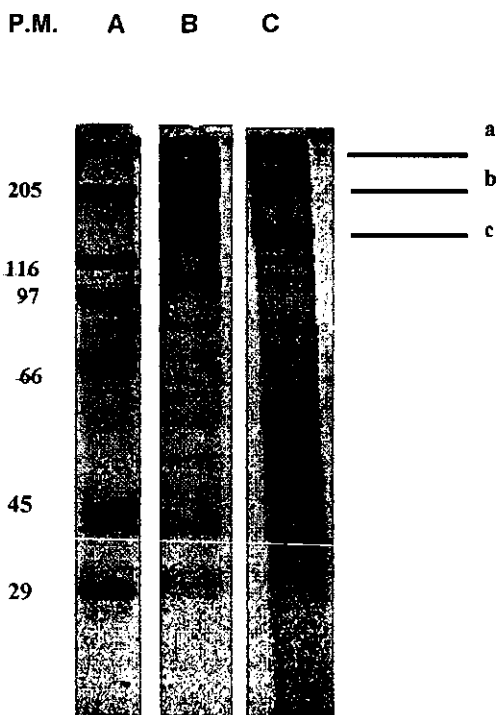
Se empleo el método estadístico de ANOVA utilizado una prueba para concluir con una probabilidad de $P \leq 0.05$.

Los datos en porcentaje fueron transformados a su arcoseno antes del análisis estadístico.

VII.- RESULTADOS

Después de la obtención de la matriz extracelular del endometrio por medio de la técnica de Armant y Kameda, se procedió a realizar la caracterización de dicha muestra, por medio de electroforesis, en la cual se detectaron diversas bandas de proteínas, que corresponde con el patrón electroforetico encontrado por los mismos autores y que podrían pertenecer a las correspondientes a la matriz extracelular; ya que su peso molecular se encuentra oscilando en el rango correspondiente a la proteína la fibronectina, la laminina, la colágena tipo IV y la entactina, entre otras (figura 1).

Figura 1
PATRON ELECTROFORETICO DE PROTEINAS PARA LA MATRIZ EXTRACELULAR DEL
ENDOMETRIO (Carril C) Y DEL MATRIGEL (Carril B).



El patrón observado para matrogel corresponde al encontrado por otros autores, y esta compuesto por: laminina (a), fibronectina (b), colágena tipo IV (c). la presencia de fibronectina se comprobó por "Western blot". Se utilizó una mezcla de proteínas estándar de los siguientes pesos moleculares 205 (miosina), 116 (galactosidasa), 97 (fosforilasa B), 66 (albumina bovina), 45 (albumina de huevo), y 29 kDa (anhidrasa carbónica).

La composición de la matriz obtenida se dedujo del patrón electroforético de las proteínas y de lo reportado por Armant y Kameda (1994) y se presentan en la tabla 1.

Tabla 1: Composición de proteínas de la matriz extracelular del endometrio.

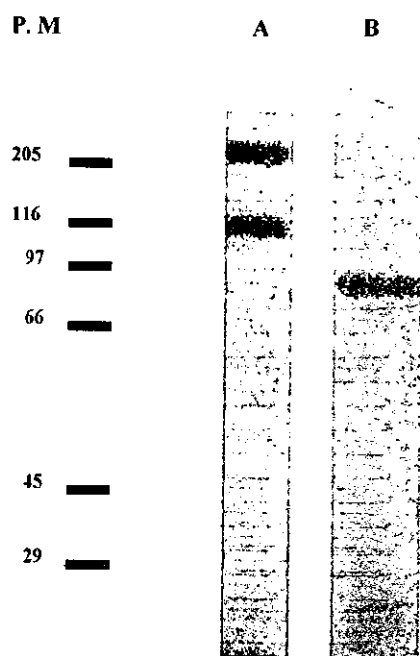
MATRIZ EXTRACELULAR	
Nombre	PM (kDa)
Laminina	300
Fibronectina	250 y 230
Colágena	146
Vimentina	42

En la tabla se muestran las proteínas obtenidas de la matriz extracelular del endometrio por medio de la técnica de Armant y Kameda. Encontrándose la presencia de laminina, dos bandas de fibronectina, colágena, y vimentina.

Para confirmar que algunas de estas bandas pertenecen a la fibronectina y a la colágena, se llevaron a cabo dos diferentes técnicas ya antes mencionadas; Una de ellas fue la de "Western blot" con un anticuerpo de conejo contra fibronectina sérica de cobayo. Dando una reacción positiva en la banda de 250 kDa (datos no mostrados).

La presencia de colágena se corroboró por medio de la coloración con rojo sirio F3BA, esta técnica es selectiva para esta proteína (Rodkin, 1994). En la muestra de la matriz extracelular obtenida del endometrio y en el matrigel la tinción con rojo sirio se encontró positiva, para el primer caso en la banda de 146 kDa, y en el segundo en las bandas de 255, 221, 146 y 97 kDa. La coloración más intensa fue detectada en la banda más gruesa (figura 3).

Figura 3: Determinación de colágena en la matriz extracelular del endometrio.



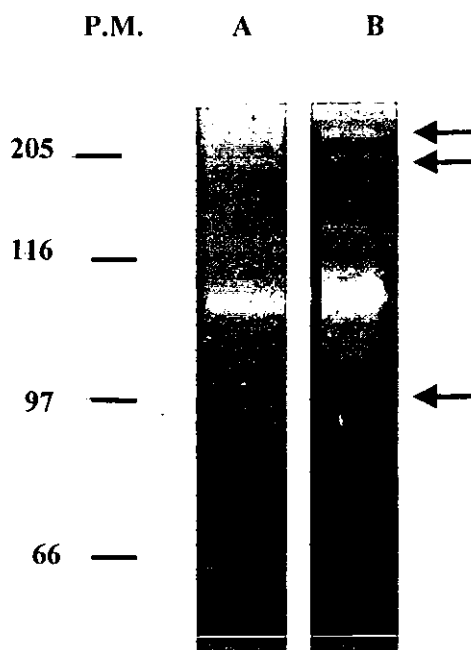
En la figura 3 se observa en el carril (A), el patrón electroforético del matrigel y en el carril (B) al de la matriz extracelular del endometrio, las bandas más oscuras se tiñeron con rojo sirio por lo que contienen colágena.

En cuanto a la zimografía, se encontraron gelatinasas tanto en la matriz extracelular del endometrio como en el matrigel. Estas fueron detectadas como bandas claras, debido a la acción proteolítica sobre la gelatina atrapada en la trama de la poliacrilamida.

Tanto en la matriz obtenida del útero de ratón como en el preparado comercial, el matrigel,

se observó la presencia de tres bandas claras con pesos moleculares de alrededor de los 255, 221 y 97 kDa en ambos casos la banda con el peso molecular de 97 kDa es la de mayor intensidad, y es aun más intensa en el matrigel (figura 4). Por medio del tratamiento con EDTA se mostró la desaparición de estas bandas, lo que corrobora que son metaloproteasas.

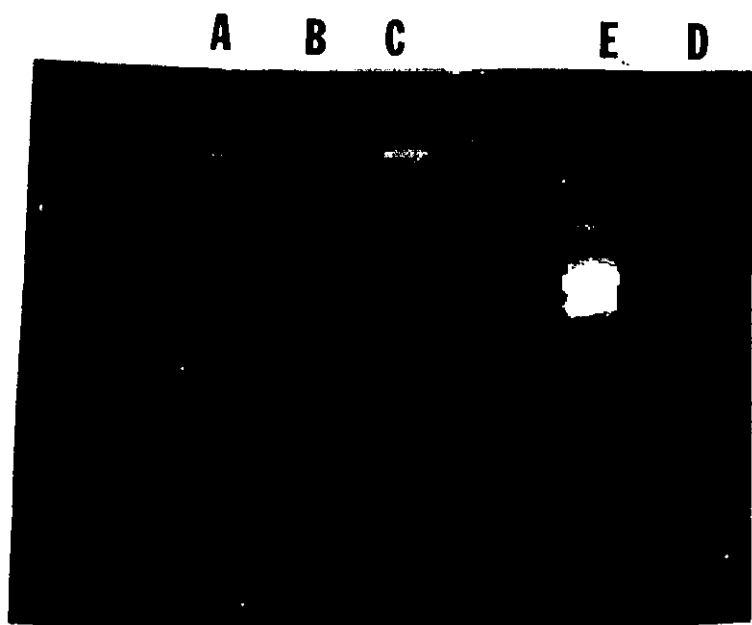
Figura 4.-Detección de gelatinasas en la matriz extracelular del endometrio.



En la zimografía se muestra a las gelatinasas presentes en la matriz extracelular del endometrio (carril A) y el matrigel (carril B). Se realizó en geles de poliacrilamida al 7.5 % con SDS y copolimerizados con gelatina como se indica en material y métodos. Se observan en ambos carriles 3 bandas de peso molecular de 255, 221 y 97 kDa, la ultima es la más abundante y posiblemente corresponda a la precursora de la MMP9 (flechas).

Las proteasas presentes en la matriz extracelular del endometrio no se pudieron extraer con ninguno de los siguientes tratamientos, a) cloruro de calcio 5 mM más urea 6M, b) cloruro de calcio 5M, c) cloruro de calcio 5mM. Con ninguna de ellas se pudo extraer las gelatinasas presentes en la muestra de matriz extracelular. Solamente se observó una disminución de la intensidad en el color de la banda cuando la muestra fue tratada con cloruro de calcio 5 molar (figura 5).

Figura 5: Extracción de metaloproteasas de la matriz extracelular del endometrio.



La zimografía se realizó después de la extracción de las metaloproteasas con diferentes tratamientos de la matriz extracelular del endometrio, sin tratamiento (carril A), matriz extraída con con cloruro de calcio 5 mM más urea 6M (carril B), Cloruro de calcio 5M (carril C), y cloruro de calcio 5 mM (carril D).

Las proteínas de la matriz extracelular del endometrio se disolvieron parcialmente en ácido acético al 2.5 % a 4°C cuando esta se extrajo toda la noche. Con SDS al 1 % a 37°C no se disolvieron en la figura 6 se observan bandas de proteínas cuando se corrió la electroforésis del extracto con ácido acético, no así con el extracto con SDS.

Figura 6: Aislamiento de las proteínas de matiz extracelular con ácido acético y SDS.

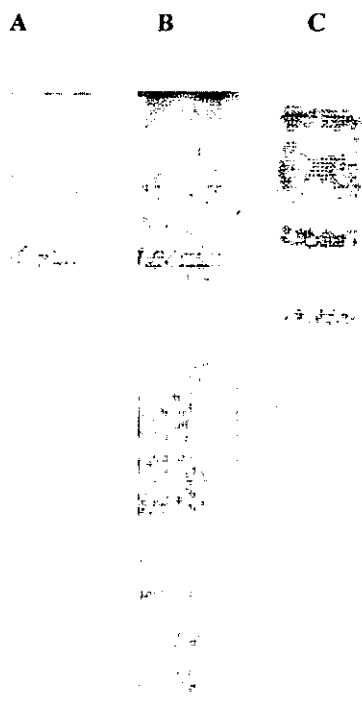


Figura 6 Se muestra la aislación de las proteínas se la matriz extracelular del endometrio, en el carril (A) se muestra el tratamiento con ácido acético, en el carril (B) se observa la muestra tratada con SDS, y el carril (C) se observa una muestra de matrigel.

2.- Cultivo de blastocistos de ratón.

En las diferentes condiciones de cultivos que permitieron, los cambios que se observaron a nivel morfológico en los blastocistos fueron similares.

En este trabajo se emplearon condiciones de cultivo, incluyendo: un medio rico en nutrientes, cNCTC-135 adicionado con SBF al 10%, en los otros casos se sustituyó el suero por BSA al 0.4%, utilizando la matriz extracelular en fibras, sonicada, el matrigel.

En términos generales, en el cultivo en presencia de suero que sirve como control positivo, los blastocistos en los dos primeros días de cultivo rompen la zona pelúcida haciéndole una pequeña muesca y se liberan de ella (figura 7).

Entre el segundo y tercer día de cultivo los blastocistos se adhieren al sustrato (figura 8 a) durante este proceso generalmente se colapsa la cavidad del blastocele; del segundo al cuarto día de cultivo las células del trofoblasto forman una monocapa de células con núcleos prominentes (células gigantes). Mientras que la masa celular interna permanece sobremontada en la superficie del crecimiento trofoblástico un día después, a las 96 h de cultivo las características del conceptus son similares a las descritas para el día 4 (figura 8 b).

Cuando los blastocistos se cultivaron en la matriz extracelular sonicada en sus distintas formas que fueron la matriz sonicada total, el sobrenadante y la suspensión del sedimento; cuando se sonicó y se lavó en PBS o medio de cultivo los blastocistos murieron durante el cultivo, sin llegar a romper la zona pelúcida. Pero por lo contrario, cuando la matriz extracelular utilizada en fibras sin sonicar fue lavada con medio de cultivo NCTC-135 suplementado con BSA, y dejado incubar durante 24 h, la adhesión y extensión ocurrió de dos maneras. La primera la observamos en la figura 9a, en la que los blastocistos se adhirieron a la superficie de cultivo, y a la matriz extracelular.

El otro caso se representa en la figura 9 b, en ella observamos al blastocisto adherido y extendido solo a la superficie de cultivo. En ambos casos se observa a la masa celular interna, y el crecimiento trofoblástico con la formación de células gigantes, con un desarrollo similar al observado en los cultivos con suero (figuras 8 b, 9a y 9 b).

Cuando los blastocistos se cultivaron en matrigel se pudo observar la adhesión de estos a la capa de matrigel, pero la extensión del trofoblasto fue más limitada, observándose pocas células del trofoblasto que se alejan de la masa celular interna, y se extienden

pero ocupan un área mucho menor que la que ocupó el crecimiento trofoblastico en presencia de suero (figura 10 a).

Otra condición observada en los cultivos sobre matrigel fue que los blastocistos rompían la zona pelúcida pero no se liberaban completamente de ella, y la adhesión se llevaba a cabo por medio de prolongaciones del trofoblasto que salían por la abertura en la zona pelúcida y penetraban en la capa de matrigel (figura 10 b).

En vista de que algunas de las condiciones de cultivo los blastocistos no rompía la zona pelúcida y el citoplasma tendía a tener, en ocasiones una apariencia dispersa, para detectar si estos se encontraban en buen estado se procedió a realizar la técnica de MTT, para determinar la viabilidad de los mismos. En la figura 11 se muestra un blastocisto muerto, no viable en un cultivo sobre la fracción completa de la matriz extracelular sonicada, esto se determino por la ausencia del color del derivado de formazan del MTT dentro de la célula, todos los cultivos sobre la matriz extracelular sonicada se observaban de la misma forma. Cuando la matriz extracelular en fibras se lavo en medio NCTC-135 y se dejo incubar por 4 h, los blastocistos solamente llegaron a romper la zona pelúcida, y no fueron viables (figura 12 a).

Los blastocistos que se encuentran viables se observan en las figuras 12 b,13, y 14 estos se encuentran en etapas diferentes de desarrollo, pero la presencia de cristales de color oscuro dentro de la célula indica su la viabilidad.

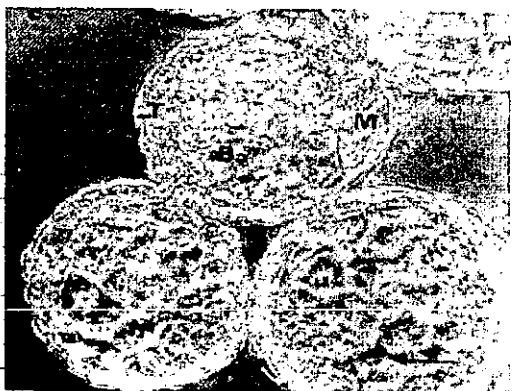
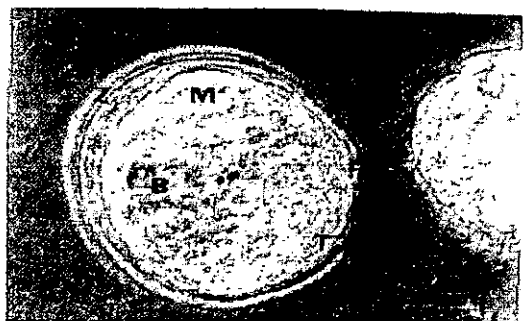


Figura 7.- Desarrollo *in vitro* de blastocistos de ratón. Ruptura y liberación de la zona pelúcida. Los blastocistos obtenidos de la cepa CDI al 4^o día de preñez, conservan aún la zona pelúcida (a) después del primer día de cultivo muchos la han roto (b) y se liberan de ella (c). B, blastocoele; M, masa celular interna; T, trofotodermo. Imagen observada a 250 aumentos.

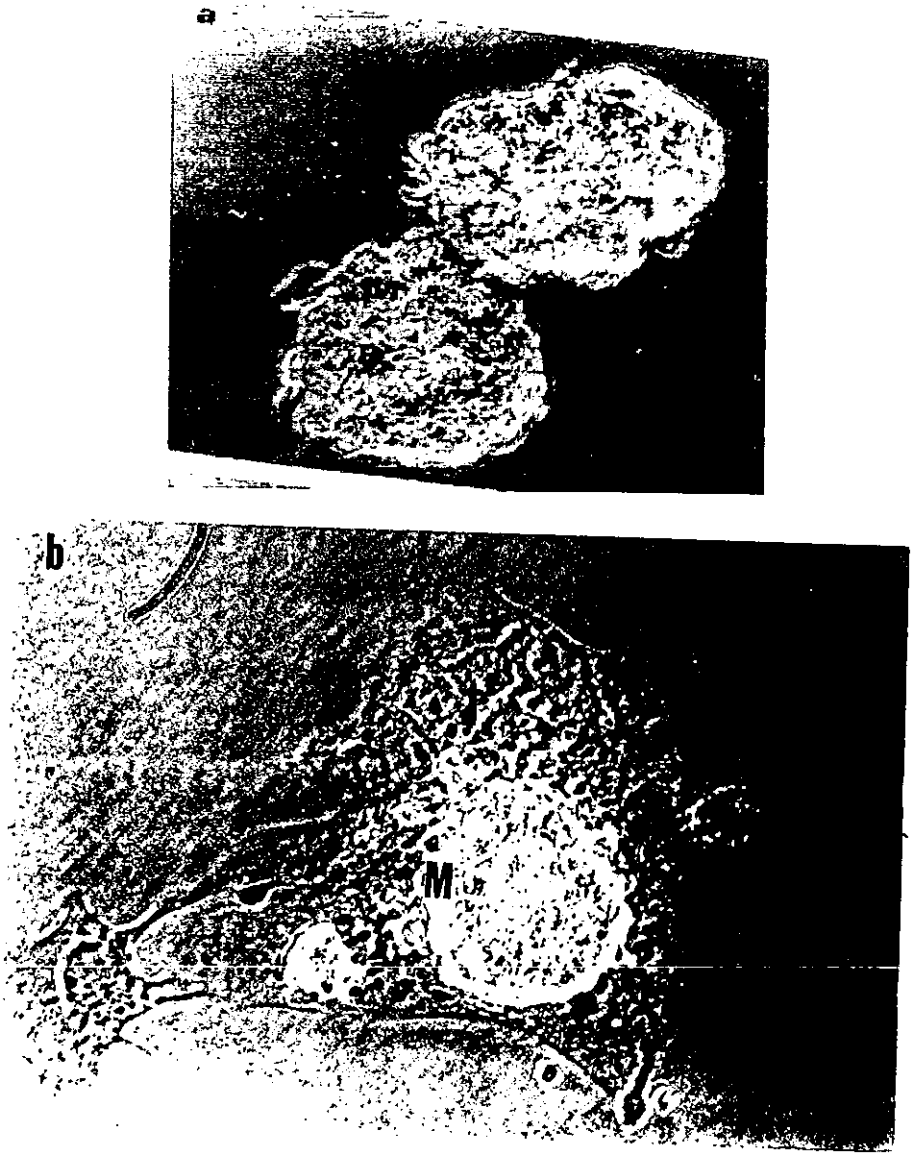


Figura 8.- Desarrollo *in vitro* de blastocistos de ratón: adhesión y extensión sobre el sustrato. Al segundo día de cultivo se han adherido al sustrato (a) y al cuarto día las células del trofoblasto se han extendido formando células gigantes con núcleo prominente (b). C, células del trofoblasto polar que han formado una estructura similar al cono ectoplacentario; M, masa celular interna; G, capa de células trofoblásticas gigantes

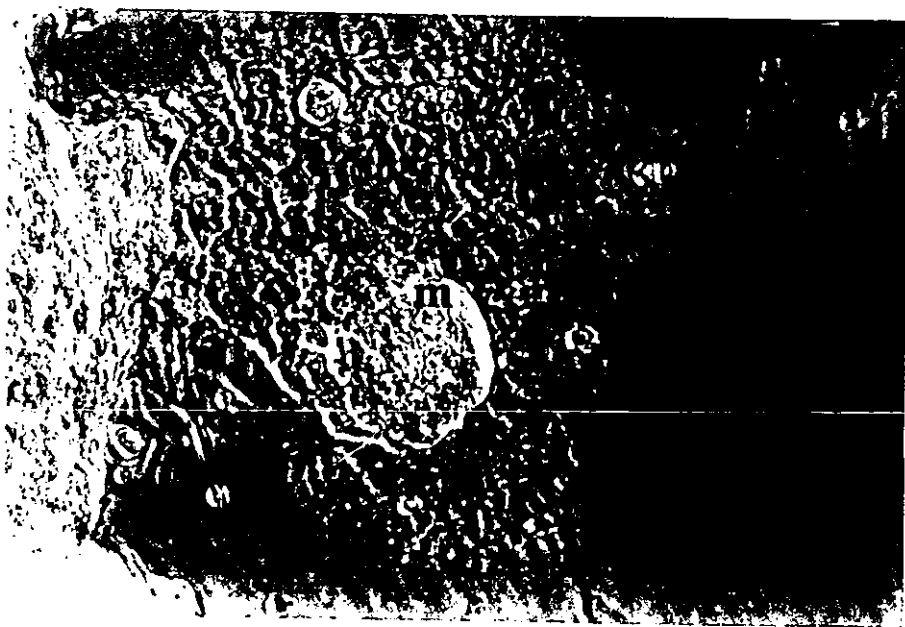
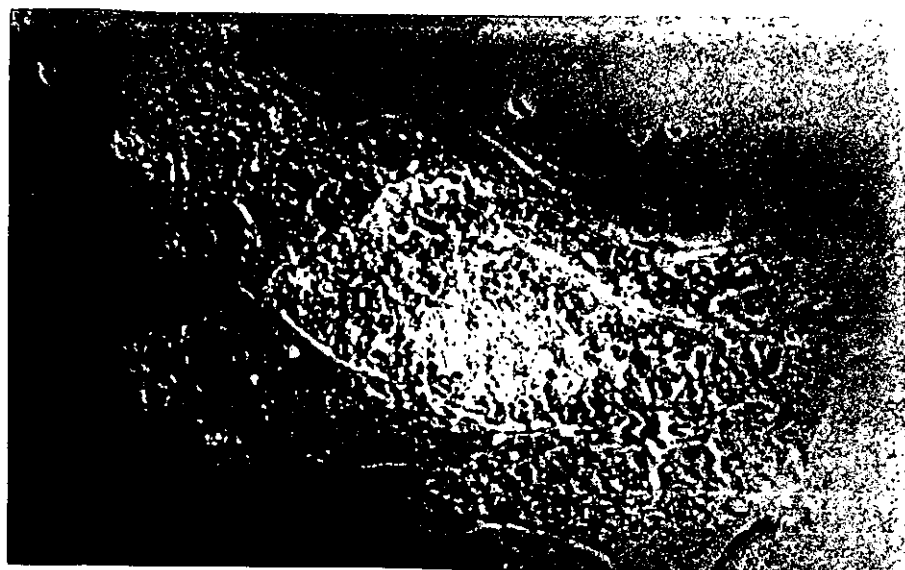


Figura 9 - Desarrollo de blastocistos cultivados sobre la matriz extracelular del endometrio. Después de 96 h de cultivo los blastocistos presentaron adhesión y extensión sobre la superficie de cultivo (a), sobre la superficie de cultivo, con una parte adherida a las fibras de la matriz (b) mostrando la masa celular interna (M), y las células gigantes del trofoblasto (C). Con un aumento de 250

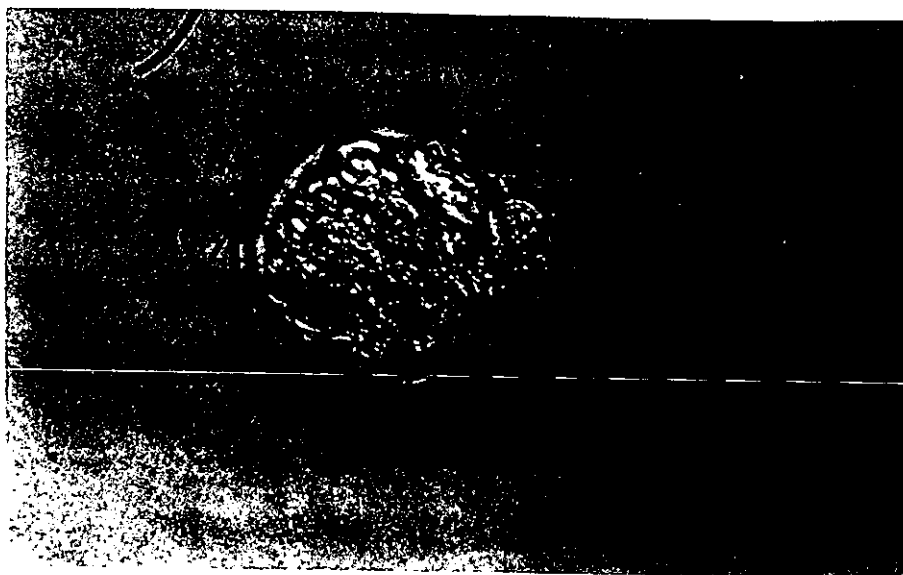


Figura 10 - Desarrollo de blastocistos sobre matrigel. Se observa el desarrollo del blastocisto adherido a la superficie del matrigel cuando se libera de la zona pelúcida (a) (z.p) o permanecen en ella (b). se observa con poca extensión a comparación de los otros cultivos con suero o sobre las fibras de la matriz extracelular del endometrio. Imagen a 250 aumentos

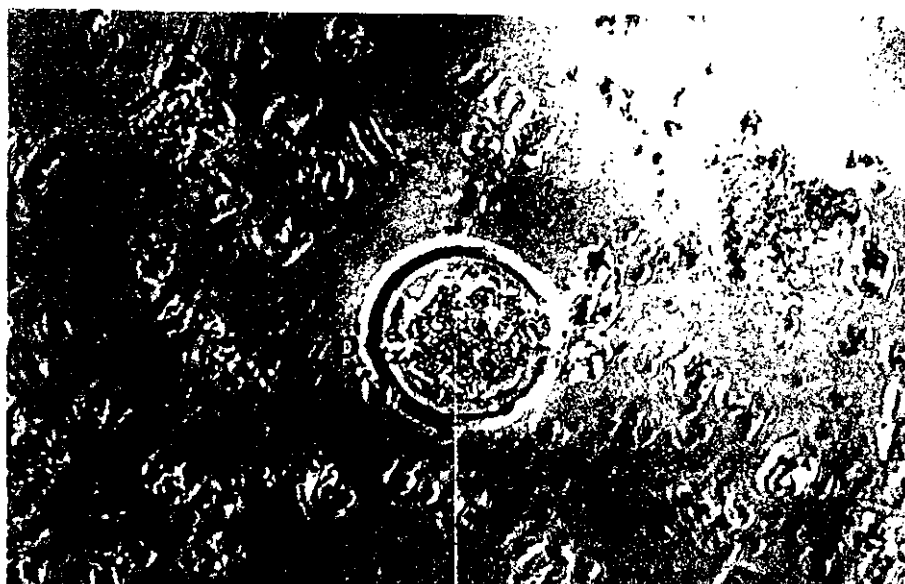


Figura 11.- Evaluación de la viabilidad en cultivos sobre la matriz extracelular sonicada: Se realizó la prueba de viabilidad del MTT. Se muestra un blastocisto no viable, por no presentar colonización debido a la acumulación de formazan derivado del MTT en sus células, no llegó a romper la zona pelúcida (Z.P), a las 96 h de cultivo. Se observa en un aumento de 250 X

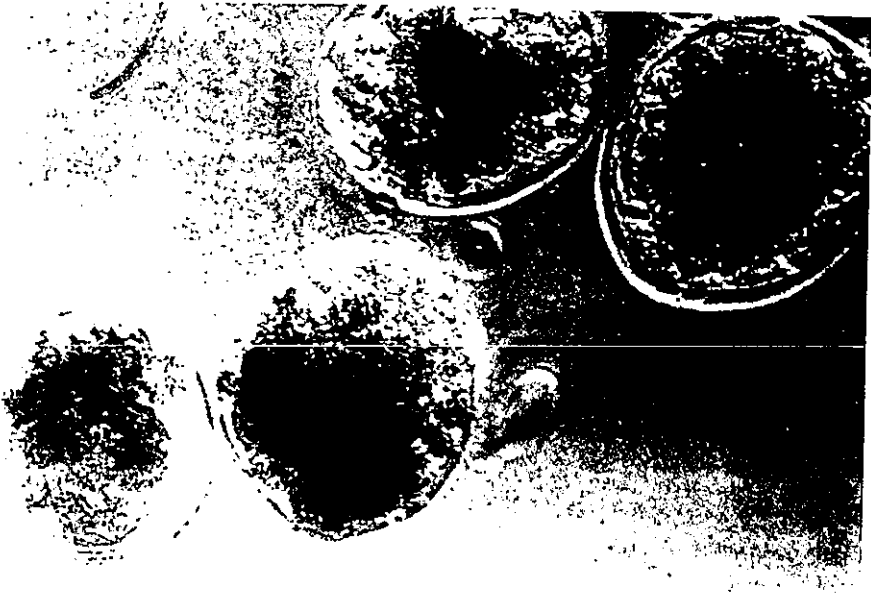
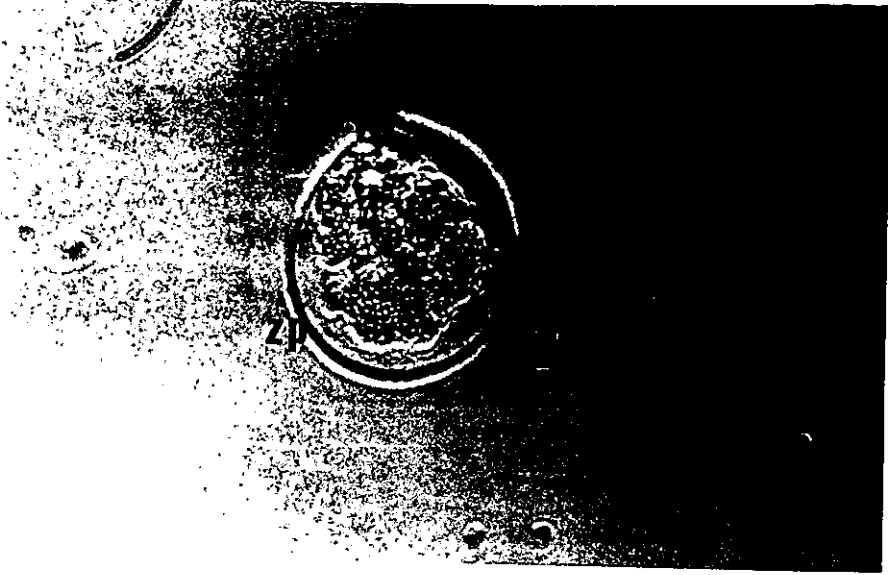


Figura 12 - Blastocisto cultivado en fibras de matriz extracelular evaluados con MTT. El blastocisto presenta ruptura de la zona pelúcida a las 96 h, pero no se liberó de ella, y no se encontraba viable (a), se observan cuatro blastocistos que no rompieron la zona pelúcida pero viables (b). Imagen a 250 aumentos



Figura 13 - Blastocisto evaluados con MTT, sobre matriz. Blastocisto adherido por medio de prolongaciones de tejido, sin liberarse de la zona pelúcida (Z.P), se encuentra viable al presentar una coloración oscura con 96 h de cultivo. Aumentos de 250



Figura 14 - Cultivo de blastocistos en medio NCTC-135 más suero, evaluado con MTT. Se muestra un blastocisto adherido y extendido a la superficie de cultivo a las 96 h, al cabo del cual fue viable a la prueba del MTT. Imagen presentada a 250 aumentos.

2.1.- Cinética de los cultivos

En la figura 15 se observa la evolución que tuvieron los blastocistos en el medio NCTC suplementado con SBF al 10%. Hasta las 72 h se observó la adhesión de los blastocisto en un porcentaje del 45% aproximadamente, este aumenta a las 96 horas observandose un 60% de blastocistos adheridos. A las 72 h se observó que el 40% de los blastocistos estaban extendidos, lo que aumento a las 96 h hasta un 50%. En cuanto a la perdida de la zona pelúcida se observa que la las 96 h un 80% de los embriones la habían perdido.

En cuanto a la cinética de los cultivos sobre la matriz extracelular del endometrio, fue variable dependiendo de la forma en que se preparó la matriz, cuando esta se lavó en agua destilada y en PBS, y cuando se equilibrio con medio de cultivo NCTC-135 durante 4 h, los blastocistos no llegaron a sobrevivir mas de un día de cultivo, incluso no rompieron la zona pelúcida. Cuando la matriz fue sonicada utilizando la suspensión completa, el sobrenadante, el sedimento los blastocistos no sobrevivieron. En cambio cuando las fibras de la matriz extracelular se lavaron con el medio NCTC-135 más BSA y se dejaron toda la noche en refrigeración se obtuvieron resultados favorables, mismos que podemos observar en la figura 16, en ella se observa la cinética del cultivo sobre la matriz extracelular del endometrio en estas condiciones:, A las 72 h los embriones se adhirieron pero en un porcentaje menor al 20%, para las 96 h solo el 20% de los embriones se habían adherido, estos datos son iguales para el caso de la extensión. A partir de las 72 h ya habían perdido la zona pelúcida un 40% de los blastocistos, manteniéndose así hasta el fin del cultivo.

Con referencia a la cinética de los cultivos sobre el de matrigel se observó que cuando se realizaron empleando diluciones del matrigel, los embriones no llegaron a desarrollarse y murieron al poco tiempo, sólo sobrevivieron y se desarrollaron aquellos que se cultivaron en el matrigel concentrado. Los datos se presentan en la figura 17, a partir de las 48 h se notó la perdida de la zona pelúcida en un 20 % de los embriones, llegando a un 30% a las 72 h y manteniéndose de esa manera hasta el final del cultivo. Se observó que el porcentaje de los embriones adheridos para las 72 h era de menos del 20%, aumentando hasta un 30% a las 96 h. Pero para la extensión tenemos que solamente se obtuvo un 20 % de embriones extendidos a las 96 h.

Figura 15: Cinética del cultivo de blastocistos en medio cNCTC y suero.

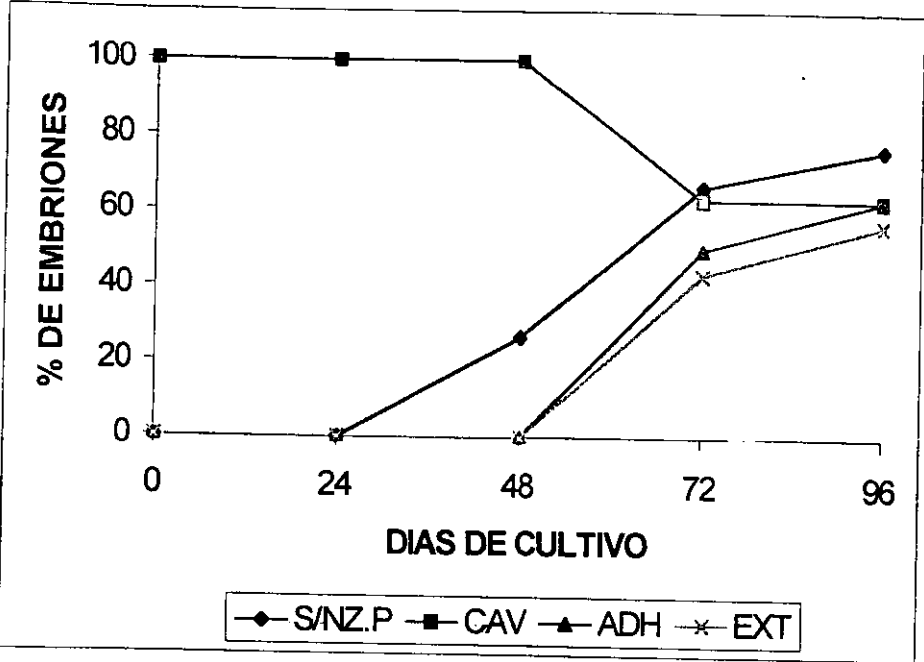


Figura 15 .- Se muestran el porcentaje de embriones que rompieron la zona pelúcida (S/NZ.P), con cavidad (CAV), adheridos (ADH) o extendidos (EXT) a distintos tiempos de cultivo, siendo datos agrupados de 3 experimentos realizados por duplicado cada uno con 10 blastocistos.

Figura 16 : Cinética del cultivo sobre la matriz extracelular del endometrio.

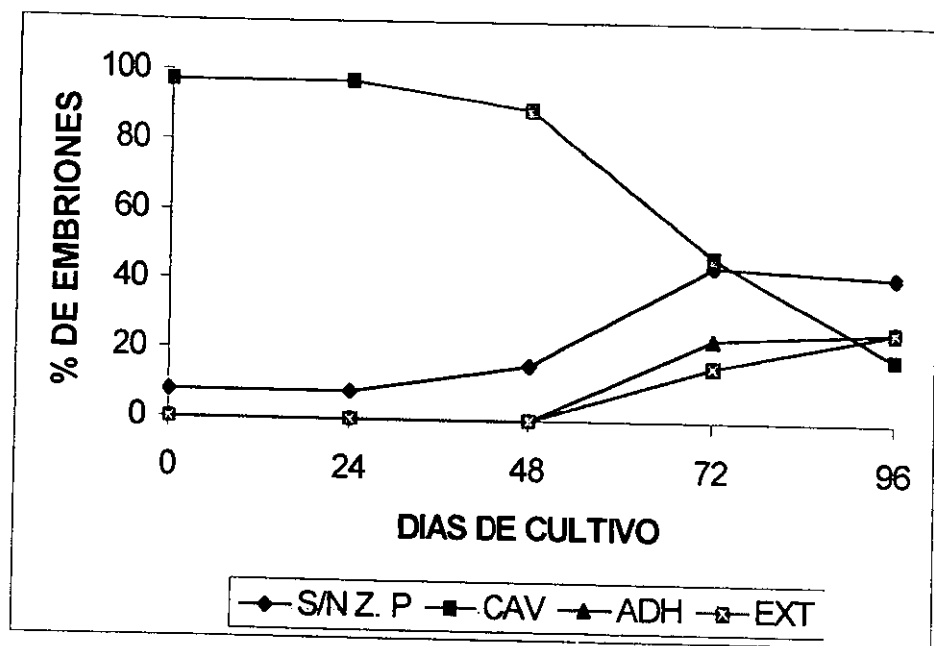


Figura 16.- Se muestra la cinética de los cultivos sobre las fibras de matriz extracelular equilibradas 24 h en medio de cultivo, de un grupo de 4 experimentos realizados por duplicado cada uno con 10 blastocistos blastocistos en cada uno. En los cuales se evaluó la ruptura de la zona pelúcida (S/NZ:P), la cavidad del blastocisto (CAV), la adhesión (ADH), y la extensión(EXT).

Figura 17: Cinética de los cultivos sobre matrigel.

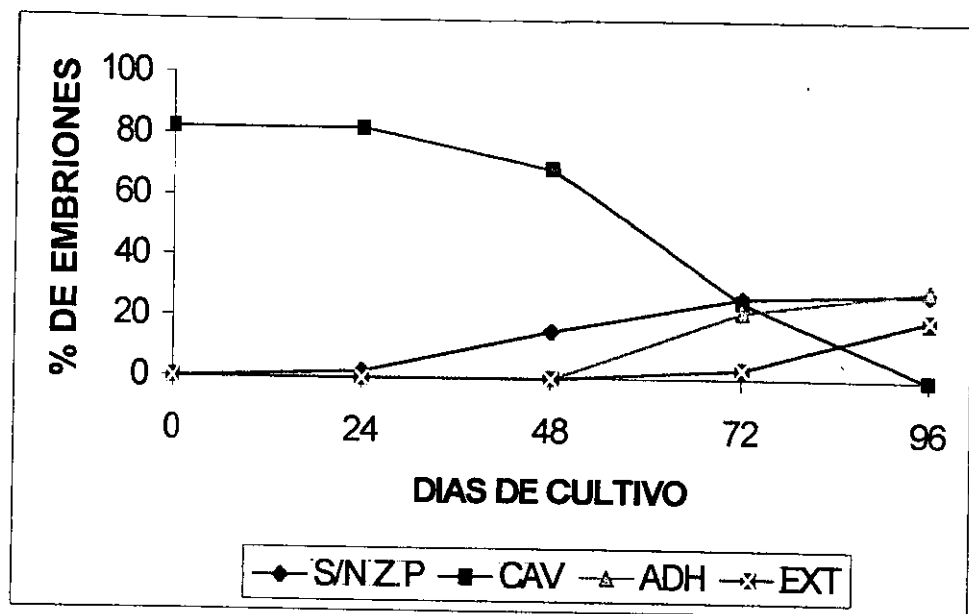


Figura 17.- Se muestra la cinética de los blastocistos cultivados en matrigel concentrado, presentando los datos agrupados de 7 experimentos, cada uno con 10 blastocistos blastocistos en los cuales se evaluó la ruptura de la zona pelúcida (S/NZ:P), la cavidad del blastocisto (CAV), la adhesión (ADH), y la extensión(EXT).

2.2.- Efecto de la sonicación sobre el contenido de grupos carbonilo en la matrix extracelular del endometrio.

Para tratar de explicar por que se morian los blastocistos al cultivarlos sobre la matriz sonicada, se procedió a la determinar la concentración de los grupos carbonilo en la matriz, como un indicador del grado de oxidación de las proteínas que la forman obteniendo los siguientes resultados.

Tabla 2: Oxidación de proteínas de la matriz extracelular por efecto de la sonicación.

TRATAMIENTOS DE LA MEC	GRUPOS CARBONILO (nanomoles/mg de MEC)
NINGUNO	0.58 ± 0.07
SONICACIÓN	$1.73 \pm 0.26^*$
SONICACIÓN EN PRESENCIA DE MANITOL	0.76 ± 0.30

Se evaluó el contenido de grupos carbonilo, por el metodo de la dinitrofenilhidrazina (Pinamon) en la matriz extracelular (MEC) con y sin sonicación y cuando se sonica en presencia de manitol 50mM. Se presenta la media y la desviación estandar ($X \pm D.E$) de 5 experimentos.

*Fue significativamente diferente con respecto a los demás datos ($P < 0.05$).

La mayor concentración de grupos carbonilo se presentó en la matriz sonicada, la que fue 3 veces mayor a la que se observó para la matriz sin sonicar ($P < 0.05$) y en la matriz sonicada en presencia de manitol se tuvo una concentración de grupos carbonilo estadísticamente igual a aquella de la matriz sin sonicar ($P > 0.05$).

VIII.- DISCUSIÓN

En la matriz extracelular obtenida del endometrio de ratón se encontraron predominantemente proteínas que pertenecen a la matriz extracelular tipo membrana basal, las cuales pueden ser laminina, fibronectina, y colágena, tipo IV entre otras, esto en base a que sus pesos moleculares corresponden a los de estas proteínas, además de que el patrón electroforético corresponde con el encontrado por Armant y Kameda (1994), ellos indican que la laminina y la fibronectina se encuentran cerca de la región de 205 kDa aproximadamente, y la colágena tipo IV entre 116 y 205 kDa. Nosotros confirmamos que una de estas bandas correspondía a la fibronectina por la prueba de "Western blot", y la presencia de colágena se reafirmó por la tinción con rojo sirio. La presencia de diversas bandas proteicas del matrigel positivas al rojo sirio puede deberse a que hay una unión muy estrecha entre todos sus componentes y no se disocian completamente. Por ello la colágena puede permanecer unida a otras proteínas de matrigel, ya que se encontró la colágena asociada con diversas bandas.

Se detectaron gelatinasas de peso molecular similar tanto en el matrigel como en la matriz extracelular obtenida por nosotros, la más abundante en ambos casos fue la de 97 kDa, muy probablemente corresponda al precursor de la MMP 9 o gelatinasa B; ya que tiene un peso molecular similar a su precursor, la PRO-MMP9 y es producida por el útero en el día de la preñez en que se obtuvo la matriz extracelular.

Aunque en el matrigel se han detectado gelatinasas y factores de crecimiento fuertemente unidos a las proteínas de la matriz extracelular (Mackay y col, 1993), cuando esta se obtiene de distintos órganos este aspecto prácticamente no se estudia. Armant y Kameda (1994) consideran que la matriz extracelular que ellos obtienen esta prácticamente pura, sin embargo en la matriz extracelular obtenida por el procedimiento descrito por ellos, observamos que no es así, debido a que encontramos gelatinasas fuertemente unidas a esta.

La matriz extracelular empleada como pura en distintos estudios contiene enzimas que pueden degradarla incluyendo los preparados comerciales de membrana basal. En el preparado de matrigel se han encontrado las proteasas MMP-2 y MMP-9 (Mackay y col, 1993).

Esto apoya la probabilidad de que la banda de 97 kDa que nosotros encontramos en muestra matriz sea la MMP-9.

Estas proteasas se encuentran íntimamente asociadas con la matriz extracelular y no se pudieron eliminar con los procedimientos empleados. Solo encontramos resultados parcialmente favorables con el tratamiento con cloruro de calcio 5 M, en el que se encontró una disminución en cuanto a la intensidad de las bandas de geletinasas, esto lo atribuimos a que estas proteasas son dependientes de iones divalentes y el calcio es uno de estos, y que al encontrarse en altas concentraciones en el medio pudo permitir la disociación de las proteasa de la muestra de matriz de manera parcial y no de forma total. Podemos concluir que estas proteasas son prácticamente componentes de la matriz extracelular. Por lo cual resulta difícil su eliminación.

Es importante señalar que la presencia del precursor de la gelatinasa B en la membrana basal del epitelio uterino permite que las células puedan rápidamente activarla cuando se requiera la degradación de la matriz extracelular, como ocurre un día después de que obtuvimos a la matriz y el blastocisto se adhiere primero al epitelio uterino y posteriormente degrada a la membrana basal y penetra al endometrio.

Con lo referente a la cinética de los cultivos podemos determinar que el bajo porcentaje de adhesión y extensión que se obtuvo en los casos de matrigel y matriz se debieron a que en el último caso, no se llegó a dar la unión de los embriones con las fibras de la matriz, debido a que el medio no contaba con la proporción de componentes que requerían los blastocistos. y se adhirieron cuando se dejó equilibrar por 24 h con medio NCTC-135 BSA posiblemente por que la matriz logró desprender parte de sus componente. dichos componentes, los cuales se agregaron al medio permitiendo su adhesión a la superficie de cultivo; ya que en los casos que no fue así los blastocistos permanecieron viables hasta el final del cultivo.

En lo que respecta al cultivo sobre matrigel el porcentaje de adhesión fue mayor con respecto a los cultivos sobre la matriz extracelular, pero en el caso de el área de extensión no fue así debido a que el embrión formó prolongaciones hacia adentro del gel de matrigel que se formó en la base de la caja, también en estos cultivos se observó que muchos de los embriones no se liberaron por completo de la zona pelúcida; esto pudo ser debido a que la al adherirse el embrión con unas cuantas células al matrigel fue más que suficiente para que este comenzara su proceso de invasión.

En cuanto a la cinética de los cultivos con suero fue la que ya esperábamos debido a que esta condición ha sido ampliamente usada experimentalmente y sabemos que cuenta con los nutrientes necesarios para el desarrollo de los embriones, dando una buena extensión y adhesión con porcentajes mayor o cercano al 80%.

Debido a los resultados que encontramos en la cinética de los cultivos se procedió a hacer la prueba del MTT que sirve para evaluar la viabilidad de los embriones y con ello determinamos si estos se encontraban vivos al terminar el cultivo o no. Esta técnica nos permitió tener una imagen mas completa de cómo se estaba comportando nuestro cultivo; ya que contaba con los nutrientes necesarios para sostener vivo a un embrión.

En el caso de la matriz sonicada en la cual los embriones no sobrevivían ni por 24 h después de la transferencia, nos dimos cuenta que era debido a la sonicación; ya que este procedimiento provocaba la acidificación del medio tornándolo amarillo, siendo que su color normal debería ser naranja. Se determinó que la sonicación inducía la formación de grupos carbonilos en las proteínas de la matriz extracelular. Indicando que este procedimiento inducía un marcado daño oxidativo de la matriz extracelular.

Lo que concuerda con lo encontrado por otros autores de que la sonicación de medios de cultivo induce la generación de especies reactivas de oxígeno (Pinamon, 1994).

En apoyo a lo anterior se encontró que el manitol, un compuesto que apaga algunos radicales libres de oxígeno protegía la matriz extracelular de la acción oxidante de la sonicación. Es posible que algunas proteínas o mezclas de proteína sean más sensibles a la acción de la sonicación.

Por lo anterior podemos concluir que el empleo de una la matriz sonicada puede ser perjudicial para el desarrollo de los blastocistos, debido a la formación de grupos carbonilo que provoca un medio inestable para su crecimiento, aún cuando se utilizó la matriz sonicada en presencia de manitol los embriones no fueron viables, lo que indica que no fue suficiente el manitol para proteger del daño oxidativo a la matriz extracelular. Este compuesto apaga principalmente radicales oxhidrilo, aunque es probable que pueda formarse otros radicales como el superóxido, los que inducen daños a la matriz extracelular y que afectan la viabilidad de los embriones.

IX.- CONCLUSIONES

Se aisló y caracterizó la matriz extracelular tipo membrana basal del endometrio de ratones al cuarto día de preñez.

Se detectó la presencia de diversas proteínas constituyentes de la matriz extracelular y de gelatinasas en la muestra de matriz y matrigel. Se requiere del diseño de otros procedimientos para tratar de quitar las gelatinasas presentes en la matriz y matrigel.

La gelatinasa que se encuentra en forma más abundante y con un peso molecular de 97 kDa pueden corresponder al precursor de la metaloproteínasa MMP-9, por ser inhibida por el EDTA y tener un corrimiento electroforético similar

El aislamiento de la matriz extracelular resultó exitoso, faltan más estudios y su patrón electroforético de proteínas corresponde con los ya establecidos por otros autores.

El empleo de la matriz extracelular para el cultivo de blastocistos no fue exitoso para establecer condiciones para el uso mas adecuado de la matriz extracelular del endometrio para el cultivo de blastocistos.

La sonicación ocasionó un aumento en la concentración de grupos carbonilo en la MEC.

El manitol ejerce un efecto de protección parcial de la MEC a la acción oxidativa de la sonicación.

Se considera que se requieren otros experimentos con otros antirradicales como protectores.

X.- BIBLIOGRAFIA

Abrahamsohn, P., Zorn .T. (1993). Implantation and decidualization in rodents. J. Exp. Zool. 266:603-628.

Armant, D.R.,(1991), Cell interaction with laminin and its proteolytic fragments during outgrowth of mouse primary trophoblast cells. Biol. Reprod., 45: 664-672.

Armant. D.R., Ha. Kaplan, H. Mover, y W.j. Lennarz (1986a) Fibronection and laminin promote in vitro attachment and ooutgrowth of mouse blastoysts. Devv. Biol., 116: 519-523.

Armant, D.R; Kaplan,H; y Lenarz,W.J. (1986a). Fibronection and Laminin promote in vitro attachment and outgrowth of mouse blastocists. Devel. Biol. 116:519-523.

Armant, R.C., y Kameda, S. (1994) Mouse trophoblast cell invasion of extracellular matrix purified from endometrial tissue: A model for peri-implantation development. J. Exp. Zool. 269:146-156.

Azzo, W y Woessner, J.F. (1986). Purification an caracterization of an acid metalloprotenase from human articular cartilage. The Jou of Biol Chem 261:5434-544.

Boving, B.G. (1971) Biomechanics of implantation en: The biology of the blastocysts. R.J. Blandau ed. The University of Chicago Press, Chicago pp. 23-442.

Brenner, C., Adler R., Rappolee, D., Pederson, R., y Werb, Z. (1989): Genes for extracellular matrix-degrading metalloproteases and their inhibitor, TIMP are expressed during early mammalian develoment. Genes. Dev. 3:848-859.

Carnegie. J. A. y Cabaca O.(1993) extracellular matrix composotion and resilience: two parameters the influence the in vitro migration and morphology of rat inner cell messderived cells. Biol of Rep. 48:287-299.

Carson, D.D., Dutt, A., Tang, J. P. (1987): Glycoconjugate synthesis during early pregnancy: hyaluronate synthesis and function. *Devel. Biol.* 120: 228-235.

Carson, P.D., Tang, J.P., y Gay S., (1988) Collagens support embryo attachment and outgrowth in vitro: effects of the Arg-Gly-Asp. sequence. *Dev. Biol.*, 127:368-375.

Denker, W. (1990): Trophoblast-endometrial interactions at embryo implantation a cell biological paradox. En: Denker, H., Aplin, J. (Edit): *Trophoblast invasion and endometrial receptivity. Trophoblast Research*, Vol. 4, Plenum Press, New York, pp. 3-29.

Enders, A. (1970): Fertilisation, cleavage and implantation. En: Hafez, E. (Edit.) *Reproduction and breeding techniques for laboratory animals*. Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 137-156.

Enders, A. (1976): Anatomical aspects of implantation; *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 25:1-5.

Gilbert, S. (1991): *Developmental Biology*, Sinauer, Sunderland, Massachusetts. pp 91-92 y 146-147.

Gilbert, S. (1994). *Developmental biology*. Sinauer, Massachusetts. Pp.105-113.

Guzmán-Grenfell, M. Baiza-Gutman, L.A., Hicks- Gomez, J.J. (1993). Sistemas moleculares en las interacciones celulares II: Implantación embrionaria en mamíferos. *Ginec. Obstet. Et. Méx.* 61:22-25.

Gwatkin R.B., (1966). Defined media and development of mammalian eggs in vitro. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 139:79-90.

Harvey, M., Leco, K., Arcellana, Panilio M., Zhan, X., Edwards D., Schultz, G. (1995). Proteinase expression in early mouse embryos is regulated by leukemia inhibitory factor and epidermal growth factor. *Development*. 121:1005-1014.

Izquierdo, L. (1986): Desde la especificación regional a la diferenciación celular en el desarrollo preimplantacional de mamíferos. Arch. Biol. Med. Exp. 19: 279-300.

Kisalus, L.L., Herr, J.C., y Littl, C.D., (1987). Immunolocalization of extracellular matrix proteins, and catilagen synthesis in first-trimester human decidua. Anat. Rec. 218:402-415.

Lala P.K. hamilton G. (1996). Growth factors, proteases and protease inhibitors in the maternal-fetal dialogue. Placenta 17: 545-555.

Lessey. B.A., Castelbaum A.j., Buck. C.A., Leiy, Yowell C. W., Sun, J., (1994) Further characterization of endometrial integrin during the menstrual cycle and in pregnancy. Fertil Steril ; 62: 497-506.

Martin, L., y C.A. Finn (1968) Hormonal regulation of cell division in epithelial and connective tissues of the mouse uterus. J. Endocrinol., 41:363-371.

Martin, L., y C.A. Finn (1969) Duration of progesterone treatment required for a stromal response to oestradiol-17 β the uterus of the mouse. J Endocrinol.44:279-280.

Pardo A. Selman M (1996). Metalloproteinases and lung injury. Braz jour of med and Biol Res 29: 1109-1115.

Pascal A., Huarte J., Belin D., y Vassalli D., (1987). Plasminogen activators in tissule remodeling and invasion: mRNA localization in mouse ovaries and implanting embryos. J. Cell Biol. 109: 2471- 2479.

Pinamonti, S, Chieca M.C, Muzzoli M,M. Papi A, Fabbri, y Ciaccia A. (1994): Oxigen radical scavengers clastogenic activity induced by sonication of human suero. Free. Rad. Bi& Med16(3):363-71

Psychoyos, A. (1973): Hormonal control of ovoimplantation. Vitam Horm 31: 201-256.

Psychoyos, A. (1986): Uterin Receptivity for nidation. Ann. N.Y. Acad. Sci. 476: 36-42.

Randall, A. Shogo, K. (1994). Mouse trophoblast cell invasion of extracellular matrix purified from endometrial tissue: a model for peri-implantation development. J. Exp. Zool. 269:146-156.

Rau M.B., Tanksalea. M Chatge y Despnrand. V.V (1998). Molecular and biotechnological aspect of microbiol Proteases. the microbiology and Mmlecular biology reviews. 62: 597-635 pg.

Rosenfeld, M.G., and Joshi, M.S. (1977). A possible role of aspecific uterine fluid peptidase in implantation in the uterus in the rat. J Reprod. Fertil., 51:137-139.

Salomon, S., Sherman. M. (1975): Implantation and invasiveness of mouse blastocysts on uterine monolayers, Exp. Cell. Res. 90: 261-268.

Schlaflk, S. & Enders, A.C. (1975). Cellular basic of interaction of the basal lamina of the uterine luminal epithelium during implantation in the rat. Anat. Rec. 212:47-56.

Schlaflke, S., Welsh A.O., any Enders, A.C., (1975). Celluar basis of interaction bretwren trophoblast and uterus at implantation. Biol.Reprod., 12:41-65.

Schlaflke, S., Welsh A.O., y Enders, A.C., (1985). Penetration of the lamina of uterine luminal epithelium during implantation in the rat. Anat. Rec., 212:47-56.

Sherman. M.I.y Salomon. D.S. (1975). The relationships between the early mouse embryo and its enviroment. In the developmental Biology of reproduction. pp. 277-307. Ed. J. Papacons tantinove Academic Press. New York.

Sherman. M.I. (1975a). Long term culture of cells derived from mouse blstocysts differentiation. 3:51-67.

Sherman, M.I. (1975b). The role of cell-cell. Interactions during early mouse embryogenesis in the early development of mammals. M. Balls and A.E. Jolld. Editors. Cambridge university press, London 148-165.

Shutherland, A. E; Calarco, P. G; Damsky, C.H. (1988). Expression and function of cell surface extracellular matrix recepto and mouse blastocysts attachment and outgrowth. J.Cell. Biol. 106;1331-1348.

Strichul, S., Reich, E., y Sherman, M. (1976): Plasminogen activator in early embryogenesis: enzyme production by trophoblast and parietal endoderm. Cell. 9: 231-240.

Tabibzadesh, S., y Babaknia A. (1995). The signals and molecular pathwas invoued in implantation a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. Hum. Reprod. 10 (6): 1574-1602.

Were, U.M., Damjanouv, A., Weiss, J., Liatta, L.A., y Damjanav, I. (1986).Mouse endometrial stromal cells produce basement-membrane components. diferrention. 32:49-58.

Willey, L.M., Kidder, G.M., Watson, A.J. (1990): Cell polarity and development of the first epithelium. BioEssays 12:67-73.

Yagel, Ş., Parhay, R. S., Jeffery, J., Lacla, P. (1988): Normal nonmetastaic human trophoblast cells share in vitro invasive properties of malignant cells. J. Cell. Physiol. 136: 455-462.