



**Universidad Nacional Autónoma de México**

---

---

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**Facultad de Estudios Superiores  
*Campus Iztacala***

**PROCESAMIENTO DEL PLASMINÓGENO DURANTE LA IMPLANTACIÓN *IN*  
*VITRO* DE BLASTOCISTOS DE RATÓN.**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS  
PRESENTA:**

**ALEJANDRO CASTILLO TRÁPALA**

**DIRECTOR DE TESIS: LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN**

**Los Reyes Iztacala**

**2007**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología del Desarrollo, de la Unidad de Morfofisiología de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, bajo la dirección del Dr. Luis Arturo Baiza Gutman y la supervisión del comité tutorial conformado de la siguiente manera:**

**PRESIDENTE: Dr. Fernando Edgar Kröttsch Gómez**

**VOCAL: Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza**

**SECRETARIO: Dr. Luis Arturo Baiza Gutman**

**SUPLENTE: Dra. Clara Inés Espitia Pinzón**

**Suplente: Dr. Ricardo Mejía Zepeda**

**Para la realización de este estudio se contó con el apoyo del programa PAPCA 2007 de la FES-Iztacala y del PAPIIT, UNAM (proyecto IN212400), así como beca del CONACYT con número de registro 189689.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo expresar mi mayor agradecimiento al Dr. Luis Arturo Baiza Gutman, por su paciencia, consejos y apoyo profesional y material en la realización del presente trabajo.

A la Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza, por sus consejos y apoyo en la revisión y seguimiento del trabajo, así como por el tiempo dedicado a mi trabajo de investigación.

Al Dr. Ricardo Mejía Zepeda por compartir su experiencia, conocimientos y tiempo dedicado en el proceso de elaboración de mi trabajo de tesis.

Al Dr. Fernando Edgar Kröttsch Gómez y a la Dra. Clara Inés Espitia Pinzón por sus consejos y contribuciones para el mejoramiento del manuscrito del presente trabajo.

A la Dra. Leticia Moreno por el apoyo en la realización de los estudios enzimáticos.

A la M. C Guadalupe Martínez Hernández por su amistad, sus enseñanzas y apoyo en el trabajo del laboratorio.

Un agradecimiento para mis compañeros de laboratorio Gisela, Sócrates y Jaime, por compartir su amistad conmigo y por el tiempo que trabajamos juntos ya que fue una muy buena experiencia.

Al M. C. Manuel Mandujano por su amistad, consejos y apoyo así como a la M.C. Martha Salcedo y al Dr. Sergio Gonzalez por el apoyo prestado.

A todos los que de alguna manera contribuyeron a la realización del presente trabajo.

## DEDICATORIA

Mi principal motor en la vida son ustedes: Malis, Ale y David, así es que este trabajo va dedicado principalmente a ustedes que fueron los que tuvieron que aguantar el tiempo dedicado al trabajo de maestría. Un reconocimiento especial para ti Malis por el amor con que me has acompañado en todas mis aventuras.

A mis padres por enseñarme que la única forma de conseguir algo es luchar por ello.

A mis amigos

Recuerdos y

Gratitud por sus

Enseñanzas y comprensión.

A mis hermanos Cecilia, Rogelio, Emma y el Vaquero.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN .....	3
IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA.....	3
IMPLANTACIÓN IN VITRO. ....	7
MATRIZ EXTRACELULAR.....	8
PROTEASAS DE REMODELACIÓN TISULAR.....	11
SISTEMA PLASMINÓGENO/PLASMINA.....	12
METALOPROTEASAS DE MATRIZ EXTRACELULAR .....	17
CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LAS MMPs.....	19
ACTIVACION E INHIBICIÓN DE LAS MMP. ....	19
ANTECEDENTES .....	21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	24
HIPÓTESIS: .....	24
OBJETIVO GENERAL: .....	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	25
MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
OBTENCIÓN Y CULTIVO DE BLASTOCISTOS DE RATÓN.....	26
TRATAMIENTO CON PLASMINÓGENO E INHIBIDORES DE PROTEASAS Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS .....	27
ZIMOGRAFÍA EN GELATINA.....	28
ZIMOGRAFÍA EN CASEÍNA.....	29
ACTIVACIÓN DE MMP-9 CON APMA .....	29
CARACTERIZACION DEL PLASMINÓGENO UTILIZADO.....	30
AUTOPROCESAMIENTO DE PLASMINA .....	30
ANÁLISIS ENZIMÁTICO.....	30
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	32
RESULTADOS .....	33
CARACTERIZACION DEL PLASMINÓGENO HUMANO.....	33
AUTOPROCESAMIENTO DEL PLASMINÓGENO .....	34

PROCESAMIENTO DEL PLASMINÓGENO POR EMBRIONES EN CULTIVO .....	34
AUTOPROCESAMIENTO DE PLASMINA .....	37
EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE PLASMINA POR EL ENSAYO AMIDOLÍTICO .....	40
Cinética de la formación del plasmina.....	40
Capacidad de formar plasmina .....	45
ACCIÓN DE LOS INHIBIDORES EN EL ENSAYO AMIDOLÍTICO .....	48
ACTIVACIÓN DE MMP-9 DEPENDIENTE DE PLASMINÓGENO .....	50
EFEECTO DE INHIBIDORES DE PROTEASAS SOBRE LA ACTIVACIÓN DE MMP-9 DEPENDIENTE DE PLASMINÓGENO.....	51
EFEECTO DE LA PLASMINA SOBRE LA PRO-MMP-9 .....	53
DISCUSIÓN .....	54
PROCESAMIENTO DEL PLASMINÓGENO .....	54
ACCIÓN DE LOS INHIBIDORES SOBRE EL PROCESAMIENTO DEL PLASMINOGENO.....	57
ACTIVACION DE MMP-9 .....	59
EFEECTO DE LOS INHIBIDORES EN LA ACTIVACION DE LA MMP-9 DEPENDIENTE DE PLASMINÓGENO .....	60
CONCLUSIONES.....	64
BIBLIOGRAFIA .....	65



## RESUMEN

Durante la implantación embrionaria en roedores, participan enzimas proteolíticas para la penetración y remodelación del endometrio. Uno de los pasos iniciales en la cascada proteolítica que conduce a la degradación de la matriz extracelular es la transformación de plasminógeno a plasmina. La plasmina degrada algunas proteínas de la matriz extracelular e interviene en la activación de algunas metaloproteasas. La acción coordinada del sistema plasminógeno/plasmina con otras enzimas confieren al embrión una alta capacidad invasiva. Nuestro objetivo fue evaluar si el plasminógeno puede ser procesado por embriones peri-implantacionales de ratón, para formar plasmina y si ésta a su vez pueda activar a la pro-MMP-9.

Después de agregar plasminógeno a blastocistos que se desarrollan en cultivo se detectaron por zimografía en caseína, proteínas con actividad caseinolítica, incluyendo dos, de 84 y 88 kDa adsorbidas a la superficie de cultivo y otro grupo de formas solubles de 84, 65, 50, 44 y 40 kDa. Un patrón similar de bandas se encontró con el autoprocesamiento de la plasmina, indicativo de que las zonas de actividad caseinolítica encontradas en los cultivos, correspondían a formas de plasmina con diferentes pesos moleculares. La capacidad de los cultivos embrionarios para activar al plasminógeno también se demostró mediante un ensayo amidolítico. Por zimografía en gelatina se detectó que la adición de plasminógeno al sistema embrionario indujo la activación de la pro-MMP-9.

La acción de diversos inhibidores de proteasas indicó que en la formación de plasmina de alto peso molecular pueden estar involucradas enzimas adicionales a los activadores del plasminógeno, que la formación de plasminas de bajo peso molecular se debe a un proceso autoproteolítico y que la activación de la MMP-9 depende de la plasmina, sin la intermediación de otras metaloproteasas y que no se requiere de la unión del plasminógeno a la superficie de las células o del

substrato adhesivo.

## **ABSTRACT**

During the embryo implantation in rodents, proteolytic enzymes are involved in the penetration and remodeling of the endometrium. One of the initial steps in the proteolytic cascade leading to the degradation of the extracellular matrix is the transformation of plasminogen into plasmin. Plasmin degrades some extracellular matrix proteins, and takes part in the activation of some metalloproteinases. The coordinated action of the plasminogen/plasmin system with other enzymes provides the embryo with a high invasive capacity. Our aim was to evaluate if the plasminogen can be processed by peri-implantation mouse embryos, to form plasmin and if later, in turn could activate pro-MMP-9.

After the addition of plasminogen to blastocyst developing in culture, proteases with caseinolytic activity were detected by casein zymography, including two of 84 and 88 kDa adsorbed to the culture surface and another group of soluble forms of 84, 65, 50, 44 and 40 kDa. A similar pattern of bands was found as a result of plasmin autoprocessing, indicating that the zones of caseinolytic activity found in the embryo cultures after plasminogen addition correspond to different molecular weight forms of plasmin. The ability of the embryonic cultures to activate plasminogen also was demonstrated by an amidolytic assay. By gelatin zymography was detected that the activation of pro-MMP-9 was induced by the addition of plasminogen to the embryonic system.

The action of several inhibitors indicated that in the formation of high molecular weight plasmin, besides plasminogen activators, other enzymes can be involved, that the formation of low molecular weight plasmins is caused by an autoproteolytic process and that MMP-9 activation depends on plasmin activity without the participation of metalloproteinases or the binding of plasminogen to the cell surface or to an adhesive substrate.

# INTRODUCCIÓN

## IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA

Los vertebrados emplean diversos mecanismos para nutrir al embrión en desarrollo. La viviparidad ha conducido a diversas adaptaciones, incluyendo el establecimiento de una estrecha comunicación física entre los tejidos embrionarios y uterinos, que se inicia con la implantación embrionaria. El desarrollo pre-implantatorio en los mamíferos va de la fertilización a la implantación, este período se ha dividido en tres etapas: la primera corresponde a la fertilización y formación del cigoto, la segunda a la formación de la mórula, lo que implica la segmentación y el establecimiento de la polaridad celular mediante la compactación y por último la diferenciación de los linajes celulares para formar al blastocisto (Wang y Dey, 2006). La compactación lleva a la primera diferenciación celular; ya que las células que se localizan hacia el medio externo de la mórula formarán al trofotodermo, tejido que recubre al blastocisto, el cual da origen al ectodermo del corion, además de establecer una estrecha asociación con el endometrio y formar la parte fetal de la placenta (Gilbert, 2005; Sutherland, 2003).

El desarrollo embrionario del ratón previo a la implantación, culmina cuatro días después de la fertilización cuando se forma el blastocisto, constituido por dos poblaciones celulares, la del trofotodermo y la de la masa celular interna (MCI), ambas rodean una cavidad llena de líquido, llamada blastocele; todo el conjunto se halla rodeado por una cubierta resistente, la zona pelúcida. El trofotodermo que rodea la masa celular interna se le conoce como polar, mientras que el que rodea al blastocele se le designa como mural. De la MCI se originarán los tejidos del embrión propiamente dicho (Gilbert, 2005; Salas-Vidal y Lomelí, 2004).

En el útero, los blastocistos se distribuyen uniformemente en los cuernos uterinos, se liberan de la zona pelúcida, por la acción de algunas proteasas, como la

estripsina (Rosenfeld y Joshi, 1977), y se implantan en el endometrio (figura1). La implantación es el proceso por medio del cual el blastocisto entra en íntimo contacto físico y fisiológico con el endometrio uterino (Dey y Cols., 2004). Esta fase implantatoria es clave en los organismos que se desarrollan dentro de la madre y cuya nutrición depende de ella (Flamigni y Cols., 1991), además marca el inicio de una estrecha asociación entre tejidos de diferente constitución genética.

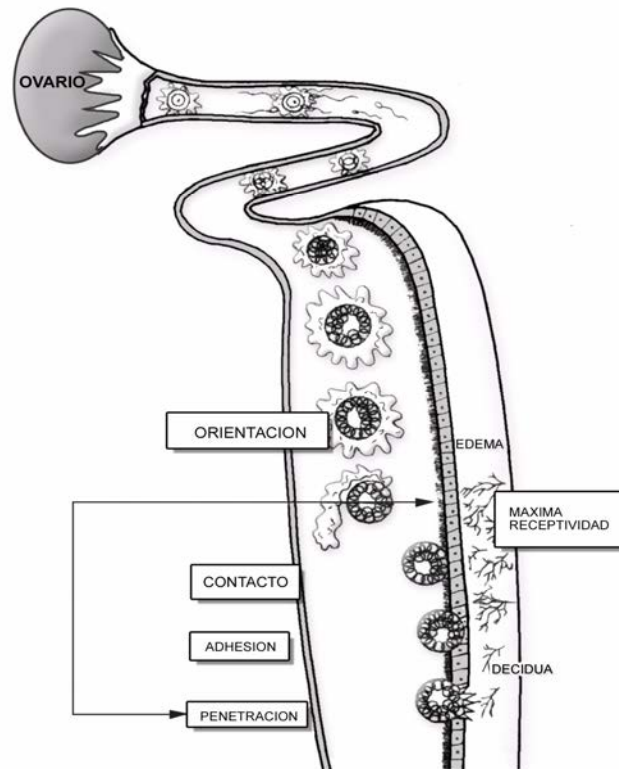


Figura 1.- El proceso de implantación, modificado de Baiza 1980.

Previo a la implantación y por acción de algunas hormonas, como la progesterona, ocurren cambios en el útero que llevan al desarrollo de un endometrio receptivo al blastocisto (Psychoyos, 1986; Guzman-Grenfell y Cols., 1993), formándose lo que se conoce como ventana de implantación (Liu y Cols., 2005).

Según Enders (1970), en el proceso de implantación de los mamíferos se pueden distinguir las siguientes etapas:

1. Distribución.- Por la actividad contráctil del músculo liso uterino, los blastocistos

son transportados por la luz uterina y se distribuyen al lugar donde ocurrirá la implantación.

2. Orientación.- El blastocisto se sitúa próximo a la porción específica del endometrio en que la implantación tiene lugar; en la rata y el ratón, el polo embrionario en el que se encuentra la MCI, se orienta hacia la superficie antimesometrial, es en este momento cuando se pierde la zona pelúcida.
3. Contacto o Aposición.- Se refiere al simple acercamiento que se da entre las superficies del trofodermo y el epitelio luminal uterino, en los mamíferos se presenta por diferentes mecanismos:
  - a. Envolvimiento.- El endometrio uterino se hincha, rodea y envuelve al blastocisto, estableciéndose el contacto del trofodermo con el epitelio del útero; se presenta en la rata y el ratón.
  - b. Expansión.- El blastocisto se expande, aumenta de volumen y llena la luz uterina; este proceso se observa en el conejo, cerdo, animales carnívoros y algunos primates.
  - c. Acercamiento activo.- Se establece por la aproximación del blastocisto a la mucosa uterina, se presenta en el cobayo, chimpancé y humano.

Durante esta etapa las microvellosidades del trofodermo y del epitelio luminal uterino se interdigitan. En el ratón esto ocurre con el trofodermo mural.

Es en este momento que el blastocisto manda señales que inducen la respuesta decidual en el útero receptivo, aún antes de que ambos se unan (Tabibzadeh y Babaknia, 1995). En algunas especies como la rata, ratón, conejo y cobayo, aumenta la permeabilidad vascular en las regiones donde

ocurre la implantación con la producción de edema y la extravasación de proteínas séricas.

4. Adhesión.- La unión entre el trofotodermo y el epitelio endometrial se vuelve resistente a la ruptura por medios físicos. Se establece una interacción estrecha entre las superficies de membrana, con la participación de moléculas de adhesión y formación de desmosomas entre las células.
5. Penetración o Invasión.- El trofoblasto se fusiona con el epitelio uterino o penetra a través de él a capas mas profundas del endometrio.

El grado de penetración varía en diferentes especies y va desde la simple adhesión de epitelios hasta la penetración a capas profundas del endometrio, dando por resultado que las vellosidades coriónicas, originadas por el trofoblasto, queden bañadas por la sangre materna (Wang y Dey, 2006).

Las células del trofoblasto que interactúan directamente con el tejido materno cambian de una forma aplanada, a células gigantes y poliploides en la rata y el ratón (Sutherland, 2003), o forman un sincicio, como en el humano.

La penetración del epitelio se produce por tres mecanismos diferentes (Wang y Dey, 2006):

- a) Desplazamiento.- Una vez que el trofoblasto se adhiere, se presenta la degeneración y el desprendimiento del epitelio luminal uterino, lo que facilita la interacción del tejido embrionario con la lámina basal y la penetración del estroma; este evento ha sido descrito para la rata y el ratón.
- b) Fusión.- La membrana apical del trofoblasto se funde con la del epitelio uterino, formando una mezcla sincicial de origen materno y embrionario, se presenta en conejos y rumiantes.

- c) Intrusión.- Pequeñas prolongaciones del citoplasma del sinciotrofoblasto penetran entre las células epiteliales uterinas; se pueden presentar también eventos de fusión. Este mecanismo se da en el humano, hurón y algunos carnívoros.

Al momento de la implantación el embrión adquiere una alta capacidad invasiva, similar a la de un tejido metastásico, en forma experimental puede invadir otros órganos o tejidos. Cuando se colocan blastocistos bajo la cápsula del testículo o del riñón, desarrollan células gigantes trofoblásticas e invaden el tejido (Billington, 1971). La invasión es regulada por factores de crecimiento e involucra a integrinas y proteasas producidas por el *conceptus* (Strickland y Cols., 1976), además de la actividad mecánica y fagocítica del trofoblasto. También son importantes las interacciones que se dan entre la superficie del trofoblasto con diversas moléculas de la matriz extracelular (MEC) y con otras células presentes en el estroma del endometrio (Guzman-Grenfell y Cols., 1993).

La invasión del endometrio debe ser finamente controlada; debido al carácter altamente invasivo del trofoblasto. El tejido endometrial juega un papel importante, por una parte la facilita por la regresión controlada del tejido decidual subyacente al embrión y por otra, evita que la invasión vaya más allá del estroma, por la producción de una gran masa de tejido decidual y la secreción de inhibidores de proteasas, que disminuyen la invasividad (Sherman y Salomon, 1975).

Una forma de estudiar los eventos que suceden en la implantación es utilizando cultivos, donde los blastocistos experimentan cambios parecidos a los que presentan en el útero durante el período pre-implantatorio, sin la influencia de los factores maternos.

## **IMPLANTACIÓN IN VITRO.**

Los blastocistos de ratón en cultivo, experimentan una serie de cambios que se

han homologado con los que ocurren en el útero cuando se fijan en el endometrio, por lo que se conoce como "implantación *in vitro*" (Jenkinson, 1977; Gonda y Hsu, 1980; Sellens y Sherman, 1980). Es decir, realizan la ruptura y liberación de la zona pelúcida; el trofotodermo adquiere un estado adhesivo y las células de su región mural se adhieren a la superficie de la caja de cultivo, crecen en extensión, migran sobre ella adoptando una morfología aplanada y forman una monocapa de células trofoblásticas gigantes, las cuales han aumentado de tamaño y se han convertido en poliploides por un proceso de replicación del DNA, sin división nuclear ni citoplasmática (Barlow y Sherman, 1972).

En cultivo, el destino de la masa celular interna es variable; prolifera creciendo como una masa desorganizada de células (la cual se podría distinguir utilizando algún marcador de totipotencialidad celular) y solo en algunos casos se forman cuerpos vesiculares con formación de epiblasto y endoblasto (Wilson y Jenkinson, 1974; Sherman y Salomon, 1975; Gonda y Hsu, 1980). Únicamente cuando se emplean condiciones especiales de cultivo se logra un mejor desarrollo morfológico de la masa celular interna (Gonda y Hsu, 1980).

Se han establecido las condiciones básicas de cultivo para las distintas fases de la implantación *in vitro*. La ruptura de la zona pelúcida y la adhesión al substrato en forma transitoria, requieren de una solución balanceada en sales, suplementada de fuentes de energía como la glucosa, el piruvato, el lactato y de una proteína, por lo general albúmina sérica de bovino (BSA) (Salomon y Sherman, 1975). Para que el trofotodermo forme a las células gigantes del trofoblasto se requiere adicionalmente de aminoácidos (Gwatkin, 1966), éstas últimas adquieren un fenotipo invasivo, interactúan con proteínas de la MEC, secretan enzimas proteolíticas y en presencia de un substrato adhesivo se extienden sobre el, formando una monocapa.

Antes de entrar a los antecedentes describiremos a la MEC y a las proteasas extracelulares implicadas en la remodelación tisular.



## **MATRIZ EXTRACELULAR**

La célula es la unidad básica de la vida. La mayoría de las células de los mamíferos forman parte de tejidos, los cuales están rodeados por una matriz extracelular de constitución compleja (Pardo y Selman 2003).

Las funciones más importantes de la MEC son:

1. Relleno de los intersticios o espacios entre las células.
2. Confiere resistencia mecánica (a la compresión, estiramiento, etc.) a los tejidos.
3. Constituye el medio homeostático, nutricional y metabólico para las células.
4. Provee fijación para el anclaje celular.
5. Constituye el medio adecuado para el tránsito celular.
6. Es el medio por el cual se transportan diferentes señales entre las células.

La MEC forma aproximadamente un poco más del 60% de la masa de los principales órganos del cuerpo de los vertebrados, o de los tumores sólidos. Esta conformada por una gran variedad de macromoléculas, las cuales interactúan entre sí, generando una estructura tridimensional a la cual las células se adhieren ya sea por receptores específicos o ligandos. Las macromoléculas que constituyen la MEC incluyen, entre otras: 1.- Colágenas, 2.- Fibronectinas, 3.- Tenacinas 4.- Fibras elásticas y 5.- Proteoglicanos.

1.- Las colágenas forman una familia de glicoproteínas que contienen un gran porcentaje de residuos de glicina y prolina. Son el mayor soporte estructural de casi todos los órganos en los animales y constituyen casi la mitad de las proteínas del cuerpo (Lodish y Cols, 2002), son el constituyente principal de los tejidos conjuntivos. Todos los tipos de colágena poseen una estructura helicoidal triple y otros dominios y de acuerdo a como se organizan estructuralmente se dividen en (Pardo y Selman 2003):

- a. Fibrilares, colágenas tipos I,II,III,V y XI.
- b. Colágenas asociadas a fibras, conocidas como FACIT (fibril-associated collagens with interrupted triple helices), colágenas tipos IX, XII, XIV.
- c. Colágenas que forman láminas, se incluyen a las colágenas tipo IV, VIII y X.
- d. Colágena tipo VI, formadora de filamentos en rosario.
- e. Colágena tipo VII, formadora de fibras de anclaje.
- f. Otros tipos de colágenas: tipo XIII, tipos XV y XVIII y tipo XVII.

2.- Las fibronectinas constituyen una familia de glicoproteínas multifuncionales, están constituidas por dos subunidades polipeptídicas unidas por puentes disulfuro. Se les puede encontrar en forma insoluble, formando parte de la MEC, así como en forma soluble circulando en el plasma. Realizan un papel fisiológico importante ya que no solo forman parte de la matriz extracelular sino que participan en procesos de adhesión y migración celular y en la opsonización y cicatrización de las heridas, entre otras funciones.

3.- Las tenacinas son una familia de proteínas multiméricas de matriz extracelular conformadas por módulos estructurales repetidos que incluyen repeticiones de setena, de fibronectina tipo III, de un fragmento similar al factor de crecimiento epidérmico y de un dominio globular compartido con los fibrinógenos. Se han descrito tres miembros de esta familia: la tenacina-C, la tenacina-R y la tenacina-X.

4.- Las fibras elásticas desempeñan un papel fundamental en la estructura de las matrices intersticiales y en la organización tisular. Dependiendo del tejido le otorgan la flexibilidad apropiada y, por otra parte, le permiten la resistencia en los procesos de estiramiento. Están conformadas por una compleja estructura que contiene elastina y proteínas microfibrilares.

5.- Los proteoglicanos representan un conjunto de proteínas cuyo rasgo estructural común es que todos ellos están conformados por una proteína central, a la cual se unen covalentemente una o múltiples cadenas lineales de carbohidratos conocidos como glicosaminoglicanos (GAG).

En función de los restos glucídicos, el tipo de enlace entre ellos y la localización de los grupos sulfato, los GAG se dividen en:

- a) ácido hialurónico
- b) condroitin sulfato
- c) dermatán sulfato
- d) heparán sulfato
- e) heparina
- f) keratán sulfato

A los proteoglicanos se les puede encontrar, como parte de la matriz extracelular, en las superficies celulares asociados a membrana, o en el interior de las células; tienen múltiples y variadas funciones entre las que destacan su participación en la organización estructural de los tejidos y en la regulación de algunos factores de crecimiento, asimismo poseen propiedades adhesivas y antiadhesivas, promueven la angiogénesis y la fibrillogénesis de las moléculas de colágena. Los proteoglicanos tienen tamaños extraordinariamente variables, entre los proteoglicanos grandes podemos encontrar al agregan y al versican, mientras que los proteoglicanos pequeños están representados por el biglican, la decorina y la fibromodulina (Pardo y Selman 2003).

Las cadenas de GAG pueden generar poros de diferente tamaño, por lo que pueden intervenir como filtro selectivo en la regulación del tráfico de moléculas y de células, seleccionándolas en función de su tamaño, su carga o ambas. Los GAG participan en el atrapamiento de agua lo que trae como consecuencia la turgencia de los tejidos.

A continuación vamos a describir algunas de las enzimas que participan en la degradación de la MEC.

## **PROTEASAS DE REMODELACIÓN TISULAR**

Diversas enzimas proteolíticas juegan un papel importante durante diversos procesos celulares, al degradar, por hidrólisis total o parcial, a las proteínas de la MEC. Para la clasificación de las proteasas se utilizan tres criterios que son:

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

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

- 1 Metaloproteasas.
- 2 Serina-proteasas.
- 3 Cisteína-proteasas.
- 4 Aspartato-proteasas.

Las primeras requieren de un ión metálico para su función, mientras que en las otras tres es necesaria la presencia de un aminoácido en su sitio catalítico, esencial para su actividad: la serina, la cisteína y el aspartato, respectivamente.

La degradación de la MEC durante el proceso de remodelación o invasión depende de la acción coordinada de diversas enzimas proteolíticas extracelulares. Proteasas como la plasmina y catepsinas, están implicadas y conducen a la activación de las metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs), enzimas que en conjunto degradan a casi todas las proteínas de la MEC (Vise y Nagase, 2003; Nagase y Cols., 2006). La activación de las proenzimas de las MMPs pueden ser dependientes del sistema del activador del plasminógeno (sistema plasminógeno/plasmina), metaloproteasas tipo membrana y catepsinas (Pardo y Selman, 1996).

Vamos a describir a profundidad al sistema plasminógeno/plasmina y a las metaloproteasas de matriz extracelular; ya que algunos de sus componentes son secretados por el trofoblasto y participan en la remodelación de la MEC, proceso necesario para la implantación embrionaria.

## **SISTEMA PLASMINÓGENO/PLASMINA**

La plasmina es una serina-proteasa que a nivel fisiológico participa en procesos tales como remodelación tisular, remoción de coágulos sanguíneos y procesos invasivos de implantación y metástasis. Esta enzima es la forma activa del zimógeno plasminógeno, el cual es secretado principalmente por el hígado y en muy pequeña cantidad por otros órganos: riñones, glándulas adrenales, cerebro, testículos, corazón, pulmones, útero, retina, bazo, timo e intestino (Castellino y Ploplis, 2005). El zimógeno es activado por los activadores del plasminógeno tipo tisular (tPA) y uroquinasa (uPA), y algunas otras enzimas; este proceso se da cuando los activadores cortan la cadena polipeptídica entre los aminoácidos Val-561 y Arg-562 formando plasmina, ésta última está constituida por dos cadenas, una pesada que va del Glu-1 a la Val-561 y una ligera formada a partir de la Arg-562 al Asp-791. El corte de la cadena lineal del plasminógeno provoca un cambio conformacional del sitio catalítico, que le confiere actividad enzimática sobre su sustrato.

El plasminógeno en humanos se sintetiza como un polipéptido de 810 aminoácidos, siendo su forma madura de 791, debido a que la secuencia líder de 19 aminoácidos se pierde cuando se secreta. En su estructura se presenta un propéptido de 77 aminoácidos. La cadena pesada de la plasmina se compone de 5 dominios "kringle", así llamados por su parecido con un pastel danés, de aproximadamente 80 aminoácidos cada uno y caracterizados por la presencia de tres puentes disulfuro, algunos de ellos contienen los sitios de unión a lisina que facilitan el enlace del plasminógeno con una amplia variedad de sustratos como el fibrinógeno, proteínas bacterianas y de superficies celulares en mamíferos

(Miles y Cols., 1988), también se unen a pequeñas moléculas que actúan como ligandos, por ejemplo iones cloro, aminoácidos  $\epsilon$ ,  $\alpha$  y  $\omega$  que interaccionan con la molécula del plasminógeno y regulan su activación, también se encuentran los sitios de glicosilación que le dan diferentes propiedades. El dominio catalítico se encuentra en la cadena ligera, en la que se localiza la tríada catalítica compuesta por los aminoácidos His-603, Asp-646 y Ser-741.

Se conocen 6 tipos diferentes de plasminógeno: Glu-plasminógeno, Lis-plasminógeno, dos más de acuerdo a su grado de glicosilación tipo 1 y tipo 2, miniplasminógeno y microplasminógeno. Cuando el plasminógeno se secreta se encuentra en forma de Glu-plasminógeno y adopta una conformación de espiral estrecha, dada por la unión de la Lis-50 y/o Lis-62 con el "kringle" 5 (Ohyama y Cols., 2004), lo cual previene su activación. La interacción del plasminógeno con componentes de la matriz extracelular como la fibrina y receptores celulares, relaja esta conformación y lo hace más rápidamente activable por el tPA y el uPA. La unión a la superficie celular puede ser importante; ya que se ha propuesto que la forma de Lis-plasminógeno unida a ella se activa con mayor eficiencia (Gong y Cols. y además disminuye la inhibición por su inhibidor fisiológico  $\alpha$ -2-antiplasmina.

La plasmina en solución es rápidamente inhibida por la  $\alpha$ 2-antiplasmina formando un complejo covalente (Rouy y Angeles-Cano, 1990). Otros inhibidores de la plasmina son: aprotinina y  $\alpha$ 2-macroglobulina.

Las formas más glicosiladas del plasminógeno son activadas más lentamente, debido probablemente a que los oligosacáridos afectan el enlace de los sitios de unión a lisina con la fibrina (Molgaard y Cols., 1997). Enzimas como la elastasa de los neutrófilos puede formar plasmina de bajo peso molecular como mini y microplasmina que conservan su actividad catalítica (Komorowicks y Cols., 1998). También se han encontrado formas de menor peso molecular de plasmina en algunos tipos de cáncer de ovario (Murthi, y Cols., 2004).

Bajo condiciones como crecimiento tumoral e inflamación, la plasmina sufre proteólisis parcial y origina varios fragmentos derivados de los “kringles” con actividad antiangiogénica, llamados colectivamente angiostatinas (O’Reilly y Cols., 1994 y Cao y Cols., 1996).

La formación fisiológica de las angiostatinas involucra una reducción parcial de los puentes disulfuro, por un donador de grupos sulfhidrilo y la actividad degradativa de algunas enzimas como la plasmina misma, MMPs, metaloelastasas y catepsina D (Ohyama y Cols., 2004 y De Groot-Besseling y Cols., 2006). La angiostatina típica comprende a los primeros 4 dominios “kringle” (K1-4) de la plasmina (O’Reilly y Cols., 1996 y Sim y Cols., 1997). Además, otros fragmentos conteniendo dominios “kringle”: K1, K2, K3, K5, K1-3 y K1-4½, inhiben la proliferación de células endoteliales, proceso fundamental de la angiogénesis. Algunos autores han detectado que en modelos animales las angiostatinas inhiben la angiogénesis y el crecimiento tumoral (Wang y Cols., 2004; Gonzalez-Gronow y Cols 2005).

Los activadores del plasminógeno, tanto el tPA como el uPA, pertenecen a la familia de las serina proteasas. El tPA participa principalmente en el sistema fibrinolítico. Está formado por una cadena polipeptídica de 530 aminoácidos. Estructuralmente se compone de los siguientes dominios: uno “finger” (residuos 4-50), el similar al factor de crecimiento epidérmico (residuos 50-87), dos “kringles” de aproximadamente 80 residuos cada uno y el dominio de serina proteasa (residuo 276-527), que contiene la tríada catalítica (Collen 2001). Cuando se forma un coágulo, el plasminógeno plasmático se une a la fibrina, y de esta manera es activado rápidamente por el tPA.

El uPA se secreta como proenzima de una cadena. La estructura de esta serina-proteasa está formada por 3 tipos de dominios, el similar al factor de crecimiento epidérmico en su porción amino terminal, 3 dominios kringle y el de serina-

proteasa en el extremo carboxilo terminal (Parfyonova y Cols., 2002). La función del primero es la de unirse con gran afinidad al receptor del uPA (uPAR) en las superficies celulares. El uPA de una cadena presenta baja actividad proteolítica, pero cuando la plasmina, o algunas otras enzimas como calicreínas, tripsina y catepsinas en células tumorales, cortan la cadena polipeptídica entre el enlace Lis-158 e Ile-159, se origina una proteína de dos cadenas unidas por un puente disulfuro entre la Cis-148 y la Cis-279, el uPA así formado incrementa su actividad catalítica hasta en un 300% (Lijnen y Cols., 2000).

Algunas células sintetizan sólo un tipo de activador del plasminógeno, mientras que otras pueden sintetizar ambos (Vassalli y Cols., 1984 y Pepper y Cols., 1993). Se piensa que el tPA se sintetiza principalmente cuando es necesaria la fibrinólisis, además de ser una proteína sérica (Ware y Cols., 2005), mientras que la síntesis del uPA está asociada con migración celular y remodelación tisular (metástasis, implantación, angiogénesis y organogénesis) (Vassalli y Cols., 1994). En embriones peri-implantacionales de ratón y humano se secreta una gran cantidad de uPA, por parte del trofotodermo, debido a su carácter altamente invasivo (Aflalo y Cols., 2004 y Coulam y Cols., 2006).

A nivel fisiológico el uPA y el tPA son inhibidos por los llamados inhibidores de los activadores del plasminógeno tipo 1 y 2 (PAI-1 y PAI-2), con los cuales forman complejos que bloquean el sitio catalítico de las enzimas activas, algunos autores sugieren que estos complejos pueden ser covalentes (Behrendt y Cols., 2003) aunque reversibles (Manchanda y Schwartz, 1995). Otros inhibidores pueden ser amiloride (inhibidor del uPA) y aprotinina (inhibidor de serina-proteasas).

A nivel de membrana celular hay un receptor para el uPA, el uPAR, consistente en una proteína unida a la superficie celular por una ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI) y que presenta 3 dominios homólogos repetidos, a los cuales se les puede unir el uPA. Este receptor presenta gran movilidad e interacciona con otras proteínas de superficie, se piensa que se encuentra en microdominios de



membrana celular llamados regiones balsa (Ossowski y Aguirre-Ghiso, 2000). La interacción del uPAR con algunas proteínas de señalización transmembranales que tienen dominios intracelulares, induce cambios en la célula para que esta adquiera un carácter invasivo. Además, la unión del plasminógeno al uPA unido a su receptor, y su consecuente activación, proporcionan una forma de remodelar a la MEC y permiten la migración.

Durante la implantación embrionaria el trofoblasto produce uPA y su expresión es regulada por las interacciones de éste con el substrato. La producción de esta enzima en el trofoblasto del ratón es inducida por fibronectina y laminina, la acción de la fibronectina es inhibida por hexapéptidos que contienen al péptido RGD, que es reconocido por las integrinas de la superficie celular.

La plasmina degrada algunos componentes de la matriz extracelular, como laminina, fibrina y fibronectina, pero también participa directa o indirectamente en la cascada proteolítica que activa a las MMPs y estas últimas son capaces de degradar prácticamente a todos los componentes de la MEC (figura 2).

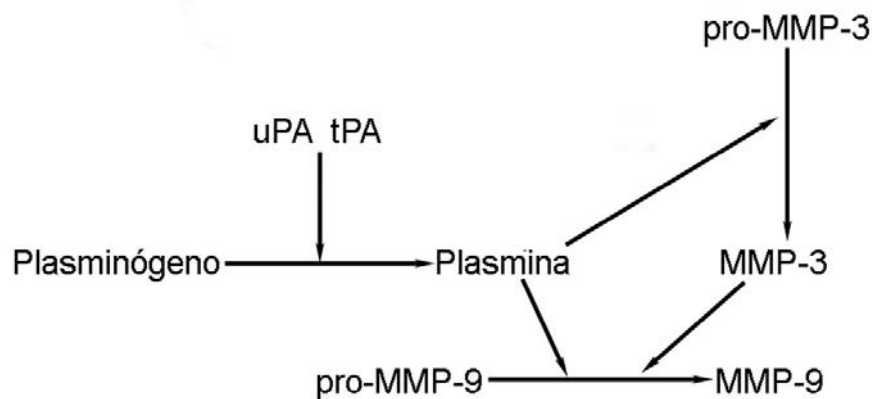


Figura 2.- Esquema de activación de metaloproteasas por el sistema plasminógeno/plasmina.

## **METALOPROTEASAS DE MATRIZ EXTRACELULAR**

Las metaloproteasas, son un grupo muy amplio de enzimas que contienen un ión metálico en su sitio catalítico indispensable para su función, las MMPs forman parte de este grupo y se caracterizan por presentar en su sitio catalítico un ión divalente de zinc, participan en procesos biológicos como crecimiento celular, apoptosis, angiogénesis, invasión (metástasis), implantación y respuesta inmune, en parte por la degradación de la MEC y también por medio de la activación de precursores de factores de crecimiento, moléculas de adhesión celular y algunas otras proteínas bioactivas.

Se han descrito varios miembros de las MMPs, tanto en humanos como en vertebrados y se clasifican de acuerdo a su substrato específico y homología estructural en seis grupos (Visse y Nagase 2003; Nagase y Cols., 2006):

1. COLAGENASAS INTERSTICIALES.- Incluye a la MMP-1, MMP-8 y MMP-13, degradan principalmente colágenas fibrilares I, II y III y algunos otros componentes de la MEC.
2. COLAGENASAS TIPO IV O GELATINASAS.- Se conocen dos miembros, gelatinasa A (MMP-2) y gelatinasa B (MMP-9), digieren principalmente colágenas desnaturalizadas y colágena tipo IV de las membranas basales .
3. ESTROMELISINAS.- Estromelisina 1 (MMP-3) y estromelisina 2 (MMP-10). Digieren a varios componentes de la MEC, además la MMP-3 activa a algunas otras metaloproteasas, por ejemplo a la MMP-9.
4. MATRILISINAS.- Se caracterizan por carecer del dominio hemopexina, se conocen dos miembros de esta familia, la matrilisina 1 (MMP-7) y la matrilisina 2 (MMP-26), degradan a diferentes componentes de la MEC.

5. METALOPROTEASAS TIPO MEMBRANA (MT-MMP).- Se conocen seis miembros de este grupo, cuatro son proteínas transmembranales tipo I (MMP-14, MMP-15, MMP-16 y MMP-24) y dos se anclan a la membrana celular por GPI (MMP-17 y MMP-25). Casi todas ellas son capaces de activar a la pro-MMP-2. Digieren algunos componentes de la MEC y algunas participan en la angiogénesis.

6. OTRAS.- Algunas MMPs no se clasifican en ninguna de las categorías anteriores, entre ellas están:

- a. MMP-12 o metaloelastasa, se expresa en macrófagos y es esencial para su migración.
- b. MMP-19, se presenta en hígado y linfocitos T, en pacientes con artritis reumatoide.
- c. Enamelisina o MMP-20, digiere amelogenina (componente del esmalte dentario).
- d. MMP-22, se clonó primero en los fibroblastos de pollo y se ha identificado un homólogo en humanos, su función es desconocida.
- e. MMP-23, conocida como MMP con arreglo de cisteína, participa en la degradación de algunos componentes de MEC.

### **CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LAS MMPs**

Todas presentan en su sitio amino terminal un péptido señal, necesario para su secreción, seguido de un prodominio, el cual forma un contacto esencial con el ión zinc de la zona catalítica lo que las mantiene inactivas. Después se presenta el dominio catalítico, caracterizado por la secuencia HEBXHXBGBXHS, que une al zinc por medio de sus histidinas. Algunas MMPs como la MMP-2 presentan un ión calcio en el sitio catalítico que les sirve para estabilizar a la molécula (Björklund y Koivunen, 2005).

Todas la MMPs, excepto la: 7, 23 y 26, contienen un dominio hemopexina, el cual

se encuentra unido al dominio catalítico por una región bisagra, algunos estudios han reportado que mutaciones en esta región afectan a la especificidad del sustrato y pueden provocar autoproteólisis. Las gelatinasas MMP-9 y MMP-2 tienen 3 dominios repetidos de secuencia similar a fibronectina, insertados entre el dominio catalítico y el carboxilo terminal, que actúan como sitio de unión a la colágena y a la gelatina.

Algunas MT-MMP se unen a la membrana celular por un dominio transmembranal formado por aminoácidos hidrofóbicos (MMP-14, MMP-15, MMP-16 y MMP-24), a estas MMPs se les conoce como transmembranal tipo I; o pueden unirse a la membrana a través de un anclaje por GPI (MMP-17 y MMP-25). Por otra parte, la MMP-23 se une a la superficie celular a través de un anclaje amino terminal único que posee un dominio rico en cisteína y prolina; debido a estas características particulares a esta MMP se le conoce como transmembranal tipo II. El dominio transmembranal tipo I, se extiende a partir del dominio hemopexina y consta de una región de alrededor de 30 aminoácidos, seguida de una región rica en residuos hidrofóbicos de aproximadamente 20 aminoácidos, los cuales están dentro de la membrana; a partir de esta región se localiza un tallo citoplasmático corto (Hernandez-Barrantes y Cols., 2002).

### **ACTIVACION E INHIBICIÓN DE LAS MMPs**

Las MMPs son activadas cuando su propéptido es cortado o la conformación de éste es alterada. El "switch" de cisteína es esencial para este proceso. Este propéptido contiene una secuencia **PRCGXD** conservada, en la que el residuo de cisteína está unido al zinc, bloqueando el sitio catalítico. Las MMPs son activadas por otras proteasas, cambios conformacionales causados por calor, agentes desnaturizantes, uniones a sustratos, metales pesados, organomercuriales como el ácido acetato fenil mercúrico (APMA), oxidantes y agentes alquilantes (Björklund y Koivunen, 2005). Algunas de las MT-MMPs son activadas intracelularmente, ya que poseen un dominio reconocido por furina. Esta serin-endopeptidasa, localizada en la red trans-Golgi, activa a estas MT-MMPs antes de

que se inserten a la membrana plasmática (Mazzone y Cols., 2004; Cao y Cols., 2005).

Los inhibidores fisiológicos de las MMPs son la  $\alpha$ 2-macroglobulina y los inhibidores tisulares de las MMPs (TIMPs). Otros inhibidores son la endostatina y la trombospondina 1. Algunos inhibidores sintéticos de las MMPs que actúan quelando al ión zinc son: carboxilatos, aminocarboxilatos, sulfhidrilos, tioles, derivados del ácido fosfórico, hidroxamatos, tetraciclinas y el EDTA.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Es posible que lo que limite la degradación de la MEC durante la implantación embrionaria sea la disponibilidad de plasminógeno y que éste provenga de la circulación materna. El sistema de embriones pre-implantacionales en cultivo debe ser capaz de generar el procesamiento del plasminógeno, el que es complejo; ya que se presentan diversas isoformas del mismo, dependiendo del grado de conjugación con carbohidratos (tipo 1 y 2) y de la pérdida de fragmentos amino terminales (Glu y Lis-plasminógeno) (Lijnen 2002), o de otras formas como mini y microplasminógeno.

## ANTECEDENTES

La remodelación y degradación de la MEC durante procesos invasivos depende de la acción concertada de enzimas proteolíticas extracelulares, principalmente MMPs y el sistema plasminógeno/plasmina. Las primeras constituyen una familia de Zn-endopeptidasas que en conjunto degradan a casi todos los componentes de la MEC. La mayoría se secretan como zimógenos aunque seis de ellas son de membrana. La subfamilia de las gelatinasas incluye 2 enzimas las gelatinasas A y B (MMP-9 o colagenasa tipo IV de 92 kDa), mismas que por su habilidad para degradar colágeno tipo IV y gelatina, se les ha implicado en el recambio de las membranas basales y en la remoción de fragmentos desnaturalizados de colágena durante los procesos invasivos. La subfamilia de la estromelisin presenta una especificidad de sustrato mas amplia (Björklund y Koivunen, 2005; Nagase y Cols., 2006).

Los mecanismos que conducen a la activación de las MMPs son claves para la remodelación tisular, entre los activadores fisiológicos potenciales de las MMPs, se incluyen a la plasmina, catepsina B y G, calicreínas, elastasa de los neutrófilos y algunos de sus miembros como la MT-MMP-1 y la MMP-3 (Werb y Sterlincht, 2001; Nagase y Cols., 2006). La MMP-3 ha sido considerada como el activador fisiológico de la MMP-9, sin embargo esta enzima no ha sido detectada en forma importante en embriones pre-implantacionales del ratón. Se ha visto que la activación eficiente de MMP-9 por el sistema plasminógeno/plasmina se da cuando los reactantes se asocian a la membrana celular o a matrices extracelulares. La adición de plasminógeno induce la activación de la proenzima MMP-9 en macrófagos obtenidos de ratones deficientes de MMP-3, por lo que se ha sugerido que la activación de la gelatinasa B independiente de MMP-3 puede ser importante fisiológicamente (Lijnen y Cols., 1998).

El sistema plasminógeno/plasmina ha sido considerado como uno de los pasos iniciales en la activación de la cascada proteolítica durante la remodelación de la

MEC, indispensable en el proceso implantatorio. Entre sus componentes podemos señalar al plasminógeno y la plasmina, los activadores del plasminógeno tPA y uPA y sus inhibidores (PAI-1 y PAI-2), y proteínas o receptores que ligan a alguno de los anteriores a la membrana. Los activadores del plasminógeno son serina-proteasas que convierten el plasminógeno a plasmina, otra serina-proteasa con amplia especificidad de sustrato y acción limitada sobre la MEC, que sin embargo puede controlar su recambio al activar a diversos miembros de las MMPs (Lijnen y Cols., 2000; Kucharewicz y Cols., 2003; Nagase y Cols., 2006). El plasminógeno se produce principalmente en el hígado y se presenta a altas concentraciones en el plasma y líquidos extracelulares. Su activación ocurre asociada a la superficie celular o al coágulo de fibrina; ya que la plasmina unida a la superficie celular es más estable que en solución y es menos sensible a su inhibidor fisiológico, la  $\alpha$ 2-antiplasmina (Michaud-Levesque y Cols., 2005). El uPA es el principal activador del plasminógeno en procesos de migración e invasión tisular.

La secreción de proteasas por el embrión de ratón en desarrollo aumenta dramáticamente durante su implantación en el útero, las principales enzimas de este tipo que son secretadas por él, son el uPA y la MMP-9 (gelatinasa B) (Behrendtsen y Cols., 1992; Baiza-Gutman y Cols., 2002; Martínez-Hernández y Cols., 2002). Ambas son expresadas por el tejido responsable de la invasión al endometrio, el trofoblasto, tanto en cultivo como *in situ* (Das y Cols., 1997). Se ha sugerido que la MMP-9 juega un papel limitante en la velocidad de degradación de la matriz extracelular materna por las células invasivas del trofoblasto; ya que es inhibida por TIMPs, por anticuerpos contra MMP-9 y por el tratamiento de los blastocistos con oligonucleótidos que evitan la expresión de esta enzima (Peters y Cols., 1999; Whiteside y Cols., 2001).

A pesar de que embriones peri-implantacionales del ratón producen y secretan a la MMP-9, la forma activa de la enzima solo se detecta en presencia de suero o de preparados de matriz extracelular (matrigel) (MacKay y Cols., 1993). Lo que indica que factores exógenos al sistema embrionario son requeridos para su activación.



Tanto el suero como el matrigel contienen plasminógeno, enzimas proteolíticas y factores del crecimiento, los que pudieran estar implicados en ello. En la activación de la MMP-9 han sido involucrados a la plasmina y a la estromelisin. Es posible que lo que limite la activación de la MMP-9 y por tanto la degradación de la MEC durante la implantación embrionaria sea la disponibilidad del plasminógeno y que este provenga de la circulación materna. Al tiempo de la implantación, día 4 y 5 de gestación, hay un aumento en la permeabilidad vascular uterina en las zonas donde se adhiere el blastocisto, lo que es seguido de la extravasación de proteínas séricas (albúmina) al estroma y luz uterinos (Armant 2005).

## **HIPÓTESIS:**

El sistema de cultivo de embriones pre-implantados de ratón, tiene la capacidad de convertir al plasminógeno a plasminas de diverso peso molecular y esto depende de la presencia de los activadores del plasminógeno; la plasmina así formada puede activar a la pro-MMP-9, lo que es indispensable para la degradación de la matriz extracelular durante la penetración del endometrio por el embrión.

## **OBJETIVO GENERAL:**

Analizar el procesamiento de plasminógeno por blastocistos de ratón en cultivo, la participación de los activadores del plasminógeno en el mismo y la capacidad de la plasmina producida para activar a la pro-MMP-9.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- a. Evaluar mediante zimografía en caseína y un ensayo amidolítico, empleando un sustrato para plasmina, la capacidad del sistema de blastocistos en cultivo para transformar plasminógeno a plasmina
- b. Analizar si en el sistema de cultivo mencionado, se activa la MMP-9 como consecuencia de la adición del plasminógeno.
- c. Estudiar el tipo de enzimas involucradas en el procesamiento de plasminógeno y la activación de MMP-9 dependiente del plasminógeno empleando diferentes inhibidores: amiloride, pepstatina,  $\alpha$ 2-antiplasmina, ácido  $\epsilon$ -aminocaproico, PAI-1, orto-fenantrolina y N-etilmaleimida.
- d. Evaluar si el plasminógeno empleado no presenta contaminación por plasmina, utilizando electroforesis en condiciones reductoras y no reductoras.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **OBTENCIÓN Y CULTIVO DE BLASTOCISTOS DE RATÓN**

Se utilizaron ratonas de la cepa CD1, hembras vírgenes de 6 semanas que fueron inducidas a superovular por la inyección intraperitoneal de 10 UI de gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG) (Intervet), seguida 45 horas después, por la administración de 10 UI de gonadotropina coriónica humana (hGC) (Sigma) por la misma vía. Se aparearon con machos de la misma cepa y al día siguiente se revisó la presencia del tapón vaginal, el cual es un indicador de preñez en ratones, a partir de ese momento se contó como el primer día de preñez, o día 1 equivalente de gestación (EG).

Los blastocistos fueron colectados entre las 16 y 17 horas del cuarto día de preñez; para ello los cuernos uterinos fueron removidos y posteriormente lavados suavemente con medio HAM F-10 (Sigma) pre-equilibrado a 37° C, sin la adición de BSA (Sigma).

Los blastocistos se lavaron al ser transferidos varias veces, con una micropipeta, a medio HAM F-10 en vidrios de reloj. Posteriormente fueron cultivados en grupos de 4 en gotas de 5  $\mu$ L del mismo medio, esta vez suplementado con BSA al 0.1%, lactato de calcio (Sigma) a una concentración de 0.2452 g/L y antibióticos (penicilina G 100 U/mL y estreptomina 100  $\mu$ g/mL) en cajas de plástico para cultivo de 35 mm (Greiner F67240 ó Falcon 3001), bajo aceite mineral (Armant., 2006), en una incubadora de CO<sub>2</sub> (Napco) a 37° C en una atmósfera húmeda y con 5% de CO<sub>2</sub>. Las cajas de cultivo fueron equilibradas previamente por al menos 2 h en las condiciones empleadas.

### **TRATAMIENTO CON PLASMINÓGENO E INHIBIDORES DE PROTEASAS Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS**

Para estudiar si los embriones cultivados tienen la habilidad de procesar al

plasminógeno y que la plasmina producida tenga la capacidad de activar a la pro-MMP-9, se agregó plasminógeno (Calbiochem, cat. 528175), a partir del día 5 EG, para tal efecto los embriones se cultivaron en medio HAM F-10 suplementado con antibióticos, BSA al 0.1% mas plasminógeno a 0, 5, 10 y 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , se obtuvieron los medios en que estaban cultivados los embriones (medio condicionado) cada 24 h hasta el día 9 EG, reemplazándolo con medio recién suplementado. En éste último día se tomaron muestras de lisados embrionarios y de proteínas de secreción adsorbidas a la superficie de la caja de cultivo, para ello los embriones se desprendieron con un bastón de vidrio, se pasaron a otra gota, y las proteínas adsorbidas a la superficie se extrajeron 3 veces con amortiguador de muestra 1 X (Tris HCl 0.125 M, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.006%, pH 6.8), después de haber sido lavadas con PBS en 5 ocasiones. Por su parte los embriones fueron lavados 5 ocasiones con PBS y disueltos en el amortiguador de muestra 1 X. Se escogió iniciar al día 5 de gestación; puesto que en el hay un aumento en la permeabilidad vascular uterina por lo que proteínas séricas como el plasminógeno pueden extravasarse (Psychoyos, 1973).

En las muestras se estudiaron la producción de derivados del plasminógeno por zimografía en caseína y en el medio condicionado se analizaron las formas de MMP-9 por zimografía en gelatina.

Con el fin de caracterizar a las enzimas implicadas en el procesamiento del plasminógeno y la activación de MMP-9 los embriones se cultivaron del día 7 al 9 EG con plasminógeno 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en presencia de alguno de los siguientes inhibidores de proteasas: pepstatina 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , amiloride 0.1 mM, ácido  $\epsilon$ -amino caproico 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , aprotinina 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , o-fenantrolina 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , PAI-1 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , N-etil-maleimida 1 mM y  $\alpha$ 2-antiplasmina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  (tabla 1) y se obtuvieron muestras del medio condicionado al día 9 EG, adicionalmente se extrajeron las proteínas adsorbidas a la superficie de la caja de cultivo.

Tabla1. Inhibidores de proteasas empleados y su acción.

<b>INHIBIDOR</b>	<b>ACCIÓN</b>
<b>Pepstatina</b>	<b>Inhibe aspartato-proteasas y algunas catepsinas.</b>
<b>Amiloride</b>	<b>Inhibe uPA.</b>
<b>Acido <math>\epsilon</math>-amino caproico</b>	<b>Es un análogo de la lisina, evita que el plasminógeno y plasmina se unan a la superficie de las células o a proteínas de la MEC.</b>
<b>Aprotinina</b>	<b>Inhibe serina-proteasas, dentro de ellas a la plasmina y activadores del plasminógeno.</b>
<b>o-Fenantrolina</b>	<b>Inhibe metaloproteasas.</b>
<b>N-Etil-maleimida</b>	<b>Inhibe cisteína-proteasas y bloquea grupos sulfhidrilos, es relativamente tóxica.</b>
<b>PAI-1</b>	<b>Inhibidor de los activadores del plasminógeno uPA y tPA</b>
<b><math>\alpha</math>2- Antiplasmina</b>	<b>Inhibidor fisiológico de la plasmina</b>

Para evitar que la o-fenantrolina inhibiera la detección de gelatinasas por zimografía, las muestras con este inhibidor fueron centrifugadas a 11,000 rpm en un tubo "ultra spin" (Sigma) con un filtro con exclusión de 5,000 daltones. Se lavó dos veces con 15  $\mu$ L de medio y se resuspendieron las proteínas retenidas en el filtro con amortiguador de muestra 1X.

## **ZIMOGRAFÍA EN GELATINA**

Los tipos de gelatinasas y la presencia de MMP-9 activa se determinaron en el medio de cultivo o en los extractos de la superficie por zimografía. Alícuotas correspondientes a 8 embriones en el día 7 EG y de 3 embriones en días 8 y 9

EG, se procesaron por electroforesis bajo condiciones no reductoras en un gel de poliacrilamida-SDS al 10% conteniendo 1 mg/mL de gelatina de piel de porcino (G2625; Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo). La electroforesis se hizo a 4° C, aplicando 15 mA/gel durante 2 horas. Posteriormente los geles se lavaron dos veces durante 30 minutos en Tritón X-100 al 2.5 % (v/v) para remover el SDS y se incubaron durante 48 horas a 37 °C en amortiguador revelador (50 mM Tris HCl pH 7.5 conteniendo 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl y 0.5% Tritón X-100). Después se tiñeron con azul de Coomassie R-250, las proteínas que degradaron gelatina se identificaron como zonas blancas de lisis en un fondo azul. Estándares preteñidos de pesos moleculares conocidos de 29 a 205 kDa (SDS-7B, Sigma) fueron usados como referencia.

## **ZIMOGRAFÍA EN CASEÍNA**

La zimografía en caseína se llevó a cabo para analizar productos derivados tanto del plasminógeno como la plasmina. Las muestras de medio condicionado y de los extractos de la superficie de la caja de cultivo, correspondientes a 2 embriones, al día 9 EG, se analizaron por electroforesis en condiciones no reductoras en geles de poliacrilamida-SDS al 10%, conteniendo 1 mg/mL de  $\alpha$ -caseína de bovino (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo.). Después de la electroforesis, los geles se lavaron dos veces durante 30 min en Tritón X-100 al 2% (v/v) y se incubaron por 24 h a 37 °C en amortiguador de glicina 100 mM, EDTA 10mM (para inhibir MMPs) a pH 8.3. Después de teñir con azul de Coomassie R-250, alrededor de 4 horas, se identificaron las bandas caseinolíticas como zonas claras de lisis contra un fondo azul. Los zimogramas fueron captados en un analizador de geles de Alpha Innotech Corporation con un gabinete Multi-Image<sup>TM</sup>. Se emplearon marcadores de pesos moleculares preteñidos 29-205 kDa (SDS-7B, Sigma) para la estimación de los mismos.

## **ACTIVACIÓN DE MMP-9 CON APMA**

La activación *in vitro* de la MMP-9 se logró mediante el empleo de APMA (Nagase,

1997). Para ello, se preparó en fresco una solución de APMA 10 mM en etanol al 20%, se agregó a las muestras de medio condicionado del día 9 EG en amortiguador de Tris-HCl 50 mM pH de 7.5, conteniendo  $\text{CaCl}_2$  1 mM, para dar una concentración final de APMA de 1 mM. La mezcla se incubó a 37° C durante 2 h. Este procedimiento se utilizó como referencia de la forma como se activa la MMP-9 en los zimogramas con substrato de gelatina.

### **CARACTERIZACION DEL PLASMINÓGENO UTILIZADO**

Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% - SDS del plasminógeno y Glu-plasminógeno (Calbiochem, Cat. 528180) comerciales empleados bajo condiciones reductoras y no reductoras, la electroforesis se hizo a 4° C por 2 horas y se reveló directamente con azul de Coomassie, junto con estándares de peso molecular. Las muestras fueron calentadas previamente en un baño de agua hirviendo durante 3 minutos. Se colocaron 1  $\mu\text{g}$  de plasminógeno por carril.

### **AUTOPROCESAMIENTO DE PLASMINA**

La plasmina puede autoprocesarse dando formas de diferente peso molecular (Komorowicks y Cols., 1998), las que podrían presentar actividad caseinolítica y gelatinolítica. Para analizar este evento, se colocó plasmina humana (Roche, Cat. 10 602 361 001) a una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en un volumen de 500  $\mu\text{L}$ , de medio HAM-F10 con BSA al 0.1% o con PBS. Las mezclas se colocaron en la cámara de cultivo a 37° C y 5% de  $\text{CO}_2$  a un pH de 7.5. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos (0, 3, 6 12 24 y 48 horas) y se les agregó amortiguador de muestra 1X. Las muestras fueron analizadas por zimografía en  $\alpha$ -caseína o gelatina.

### **ANÁLISIS ENZIMÁTICO**

Se realizó un ensayo amidolítico, para evaluar la formación de plasmina. Este es un método que mide pequeñas cantidades de proteasas. Cuando un péptido



cromogénico se rompe por la acción de alguna enzima (como la plasmina), se libera color a la solución; y se pueden medir por medios espectrofotométricos (Chibber y Cols., 1986).

Para los ensayos amidolíticos se obtuvieron muestras del medio condicionado, lisados embrionarios y proteínas de secreción adsorbidas a superficie de la caja de cultivo, de embriones cultivados del día 4 al 9 EG. En la lisis de los embriones y extracción de la superficie de cultivo se probaron los detergentes SDS a 0.1 y 0.25% + Tritón X-100 al 0.1%; NP-40 0.1% + Tritón X100 al 0.1% y Tritón X100 al 0.1%, encontrando que las combinaciones de SDS o NP-40 con Tritón X100 presentaron turbidez, teniendo al inicio de la extracción un alta densidad óptica y variabilidad en la formación de plasmina al inicio del experimento. El Tritón X-100 fue el detergente que permitió una mejor extracción de las proteínas que catalizan la formación de plasmina. Además, este detergente no afectó la activación del plasminógeno, mientras que con el SDS fue inhibida.

Este ensayo se realizó en placas de ELISA de 96 pozos (Sarstedt), donde se hicieron las mezclas a un volumen final de 200  $\mu$ L por poza. Se empleó un amortiguador de Tris-HCl 50 mM conteniendo 110 mM de NaCl a pH 7.4, plasminógeno o Glu-plasminógeno a una concentración final de 10  $\mu$ g/mL y el péptido cromogénico D-Val-Leu-Lis-p-Nitroanilina (Sigma) a una concentración final de 0.3 mM como sustrato de plasmina. La absorbencia se leyó a 405 nm en el lector de placas de Multiskan Ascent Lab System. Para caracterizar el procesamiento del plasminógeno por este método utilizamos algunos de los inhibidores mencionados en la tabla 1. Se tomaron alícuotas de los pozos de la placa de ELISA y se realizaron zimografías de caseína y de gelatina con la metodología mencionada anteriormente.

Con el fin de determinar el número óptimo de embriones para realizar los estudios enzimáticos, se analizó la formación de plasmina con alícuotas de medio condicionado proveniente de 7.5, 15 y 30 embriones, encontrando que con 7.5 y

15 embriones los valores obtenidos de densidad óptica correspondiente a la formación de plasmina, fueron proporcionales, mientras que con 30 embriones la proporcionalidad se pierde; por lo que decidimos utilizar 7.5 embriones en los ensayos posteriores. También probamos la activación del plasminógeno variando la concentración de BSA, cuando ésta se encuentra a baja concentración (0.014%), la presente en la alícuota de medio condicionado, la activación del plasminógeno fue menos eficiente que cuando está se encuentra mas concentrada (0.06%).

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos se representaron con la media y su desviación estándar. Con el fin de determinar los valores de formación de plasmina, se utilizó el programa FIT-2 para realizar las regresiones lineales de las curvas. Se realizó una ANOVA para comparar si las condiciones experimentales presentaron diferencias significativas, seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, empleando el programa Sigma Stat.

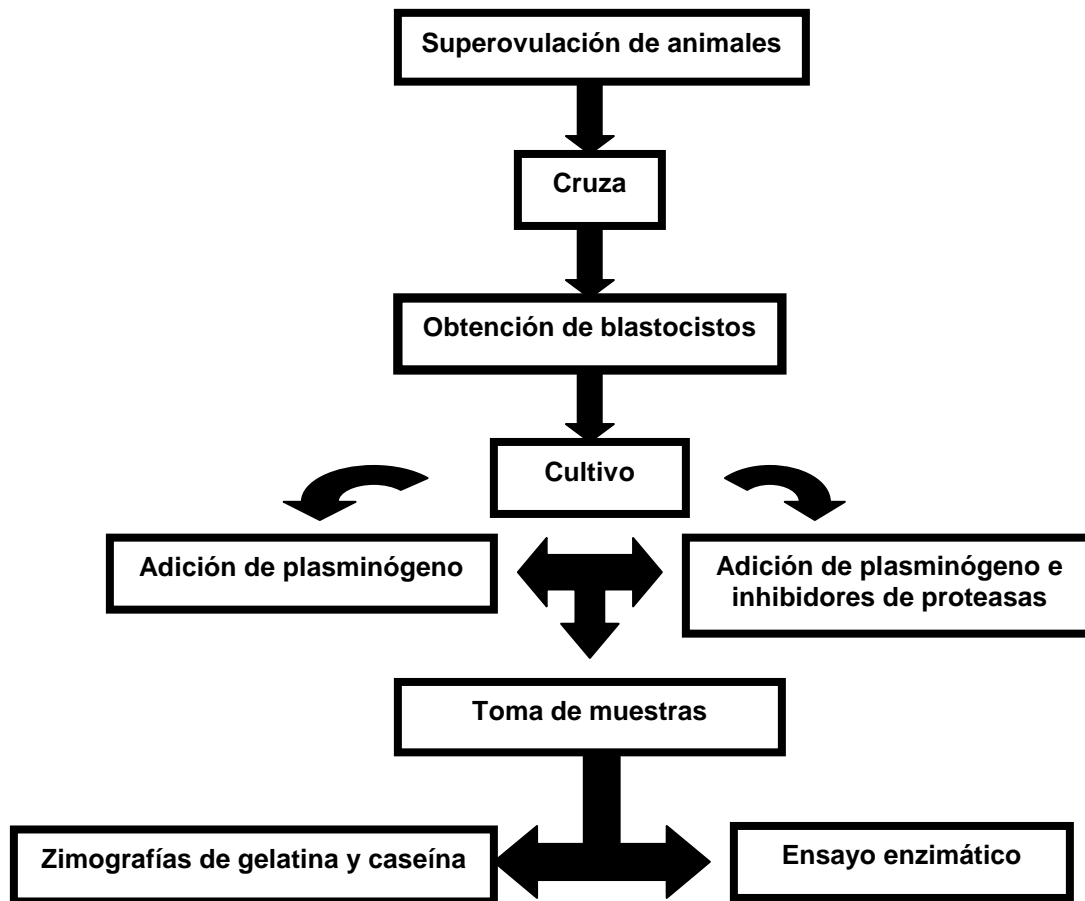


Figura 3.- Esquema metodológico.

## RESULTADOS

### CARACTERIZACION DEL PLASMINÓGENO HUMANO

Empleamos dos preparados comerciales de plasminógeno ambos de Calbiochem, uno de ellos descrito como plasminógeno (Cat. 528175) en el que posiblemente se encuentren mezclados Lis- y Glu-plasminógeno y otro de Glu-plasminógeno (Cat. 528180), aunque los dos se consideran relativamente puros, nuestros resultados nos llevaron a la necesidad de caracterizarlos y determinar si contenían o habían generado pequeñas cantidades de plasmina durante su almacenamiento y transporte o presentaban por si solos actividad en los zimogramas, por lo que se realizó electroforesis del plasminógeno y del Glu-plasminógeno (figura 4) y se valoró si al incubarlos eran estables o presentaban autoprocésamiento. Ambos plasminógenos fueron resueltos por electroforesis en condiciones no reductoras como una sola banda de 84 kDa, cuando se empleó  $\beta$ -mercaptoetanol, ambos presentaron una sola banda de 105 kDa. En condiciones reductoras, no se detectaron bandas de peso molecular correspondientes a las cadenas ligera y pesada de plasmina, las que se formarían al romperse los puentes disulfuro que las unen, si ésta se presenta.

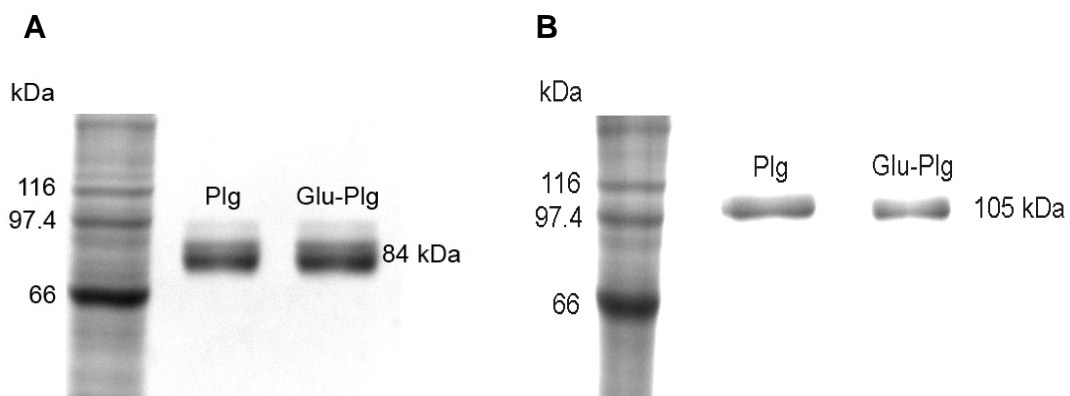


Figura 4.- Patrón electroforético del plasminógeno (Plg) y Glu-plasminógeno (Glu-Plg). En A, bajo condiciones no reductoras; en B, bajo condiciones reductoras. Se

utilizó 1 µg de proteína por carril. Este experimento se hizo por triplicado.

## **AUTOPROCESAMIENTO DEL PLASMINÓGENO**

El plasminógeno humano comercial utilizado en los experimentos, presenta una banda de actividad caseinolítica con un peso de 84 kDa, ésta permanece con la misma intensidad cuando se incubó hasta por 24 h en presencia o ausencia de BSA y no se detectan bandas de menor peso molecular (figura 5). No hay diferencias con y sin BSA.

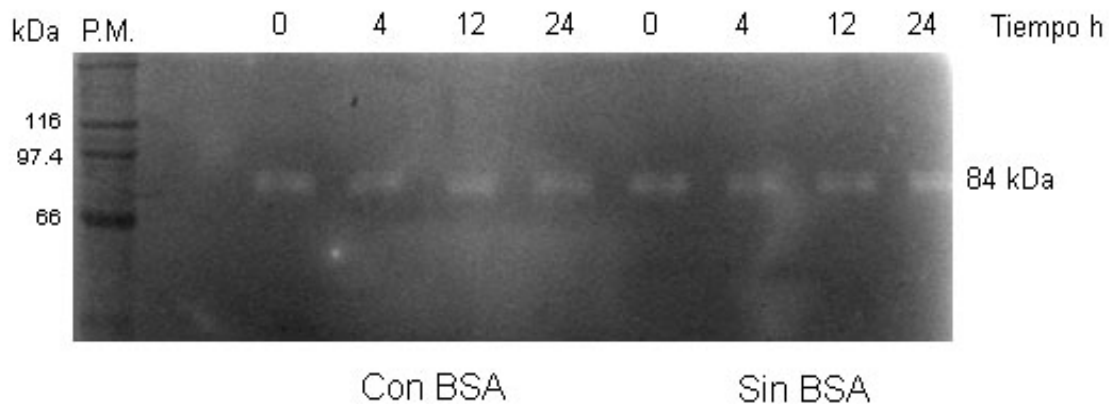


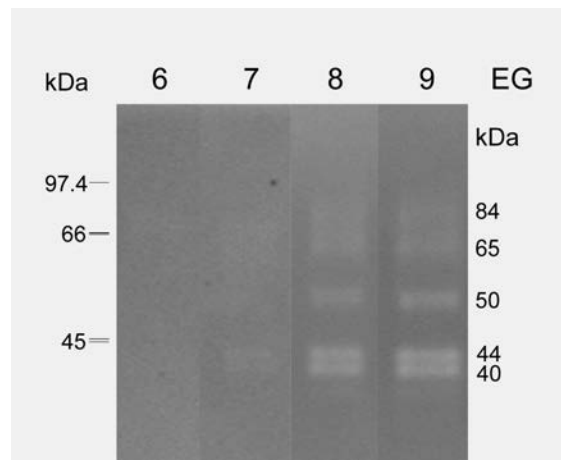
Figura 5.- Actividad caseinolítica del plasminógeno detectada por zimografía. Se incubó plasminógeno a 37°C hasta por 24 h, en presencia y ausencia de BSA. Se tomaron alícuotas a los tiempos indicados; la concentración del plasminógeno incubado fue de 10 µg/mL y la de BSA de 0.1%. Se aplicó 0.1 µg de plasminógeno por carril. Este estudio se hizo por triplicado.

## **PROCESAMIENTO DEL PLASMINÓGENO POR EMBRIONES EN CULTIVO**

Después de incubar los cultivos embrionarios en presencia de plasminógeno, se encontraron en el medio condicionado por zimografía con sustrato de caseína, bandas de actividad con pesos moleculares de 84, 65, 50, 44 y 40 kDa, las que en

primera instancia consideramos que correspondían a derivados del plasminógeno que conservaban su dominio catalítico y que perdían fragmentos de su porción amino terminal; por lo tanto plasminas de diferente peso molecular (figura 6). La banda de 65 kDa por lo general se presenta difusa, por otra parte, a la concentración de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de plasminógeno se observó una banda de 38 kDa al día 9 EG. El patrón e intensidad de las bandas caseinolíticas dependió de las dosis de plasminógeno utilizado y del tiempo de cultivo. Del día 5 al 6 EG casi no hay procesamiento del plasminógeno y solo a la dosis de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se forma la plasmina de 84 kDa, a los días subsiguientes aumenta progresivamente el procesamiento de plasminógeno y desde la dosis de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se observó la generación de plasminas de 65, 50, 44 y 40 kDa, éstas se acumularon en poca cantidad del día 6 al 7 EG, sin embargo su producción aumenta en los días subsiguientes (figura 6).

Plg 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$



Plg 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$

Plg 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$

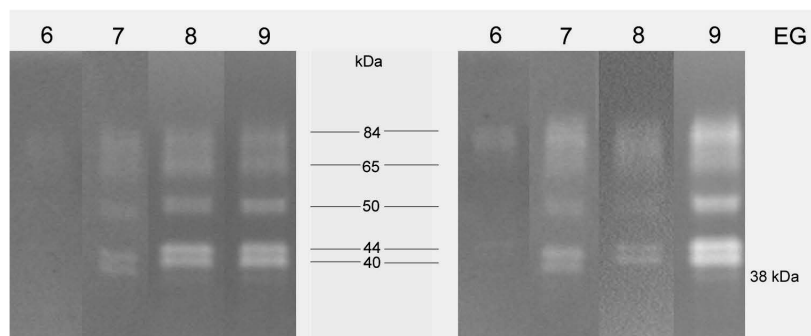


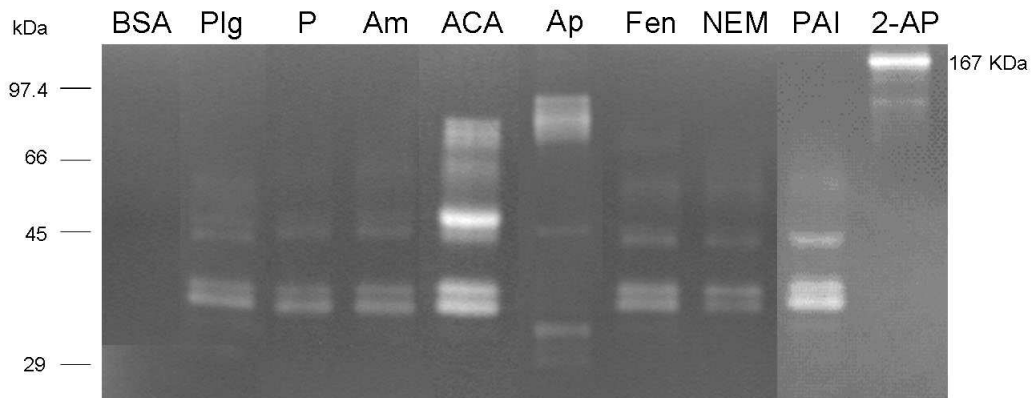
Figura 6.- Procesamiento del plasminógeno por embriones peri-implantacionales a diferentes días de cultivo. Se presentan zimogramas de caseína del medio condicionado por embriones en presencia de 5, 10 y 20  $\mu\text{g/mL}$  de plasminógeno desde el día 5 hasta el día 9 EG. El medio se recuperó cada 24 h sustituyéndolo por medio recién suplementado. En todos los casos se corrieron muestras equivalentes a 2 embriones.

Cuando los embriones se incubaron del día 7 al 9 EG, con plasminógeno en presencia de diferentes inhibidores, al analizar el medio condicionado obtenido al día 9 EG (figura 7 A), se observó que la pepstatina (P), amilorida (Am), ortofenantrolina (Fen), PAI-1 y n-etilmaleimida (NEM) no inhibieron el procesamiento del plasminógeno, detectándose bandas con actividad caseinolítica en forma similar a aquellas derivadas de la adición de plasminógeno sin el empleo de inhibidores. Con la aprotinina (Ap) el procesamiento fue diferente; ya que la banda de 84 kDa se presentó más intensa, adicionalmente se observó otra banda de mayor peso molecular (88 kDa), mientras que solo se presentaron en poca cantidad las plasminas de 50 y 38 kDa. Con  $\alpha 2$ -antiplasmina (2-AP) se observó una banda de 167 kDa. muy bien definida e intensa, originada por el complejo que forma la plasmina con este inhibidor, mientras que con el ácido  $\epsilon$ -aminocaproico (ACA), las bandas de 84, 50, 44 y 40 kDa fueron más intensas que las que se observaron con el plasminógeno.

Resultantes de la incubación de los embriones con plasminógeno también se presentaron proteínas con actividad caseinolítica adsorbidas a la superficie de la

caja de cultivo (figura 7B), presentándose una sola banda de actividad de 84 kDa, cuya presencia no fue afectada por pepstatina, PAI-1, amilorida y o-fenantrolina, mientras que con la n-etilmaleimida la intensidad de la banda es menor, con la aprotinina aumenta su intensidad y se observan bandas muy delgadas de mayor peso molecular, siendo la mayor de 88 kDa, con  $\alpha$ 2- antiplasmina se observó una banda de 167 kDa, muy intensa, y con el  $\epsilon$ -aminocaproico no se observa ninguna banda de actividad en esta zona de los zimogramas. Esto último, debido probablemente a que el ACA compitió por los sitios de unión a lisina de la plasmina y no permitió que esta se adsorbiera a la superficie de cultivo y se presentara en el medio condicionado.

#### A. Medio condicionado



#### B. Superficie de cultivo.

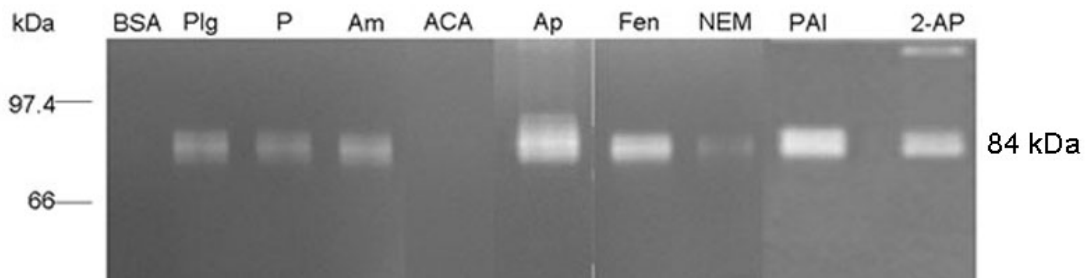


Figura 7.- Efecto de los inhibidores en el procesamiento del plasminógeno. Se



presentan zimografías en caseína del medio condicionado (A) o de proteínas adsorbidas a la superficie de la caja de cultivo (B) de embriones cultivados del día 7 al 9 EG, en presencia de BSA, o de ésta más plasminógeno 10 µg/mL (Plg) y alguno de los siguientes inhibidores; pepstatina (P), amilorida (Am), ácido-ε-aminocaproico (ACA), aprotinina (Ap), orto-fenantrolina (Fen), n-etil-maleimida (NEM), Inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI) y α2-antiplasmina (2-AP), se corrieron alícuotas correspondiente a 2 embriones por carril.

### **AUTOPROCESAMIENTO DE PLASMINA**

Con el fin de verificar si las bandas con actividad caseinolítica derivadas de la adición de plasminógeno a los cultivos embrionarios correspondían a plasminas, se estudió si estas podían generarse a partir de la misma plasmina por autoprocésamiento al incubarse esta enzima a 37° C (figura 8). Al tiempo 0, la plasmina comercial presentó 4 bandas con actividad caseinolítica: una de 82, otra de 51 y dos mas de 38 y 35 kDa respectivamente. Cuando la incubación se realiza en PBS todas ellas se pierden rápidamente, mientras que en presencia de BSA las bandas de 50, 38 y 35 kDa se conservan hasta las 48 h de incubación, aunque con menor intensidad, la zona de actividad de 82 kDa va disminuyendo de intensidad hasta perderse prácticamente a las 24 y 48 h de incubación, transitoriamente se observan zonas de actividad a 74, 65 y 47 kDa, mientras que 2 bandas de actividad, una de 44 y otra de 40 kDa se presentan después de 3 h de incubación y se vuelven mas intensas a las 24 y 48 h, como resultado de lo anterior a las 48 h se presentan con gran intensidad las bandas de 50, 44 y 40 kDa. Las bandas de actividad caseinolítica de 65, 50, 44, 40 y 38 kDa obtenidas a partir del procesamiento del plasminógeno por los cultivos embrionarios, corresponden con bandas de actividad derivadas del autoprocésamiento de plasmina.

**MEDIO + BSA**

**PBS**

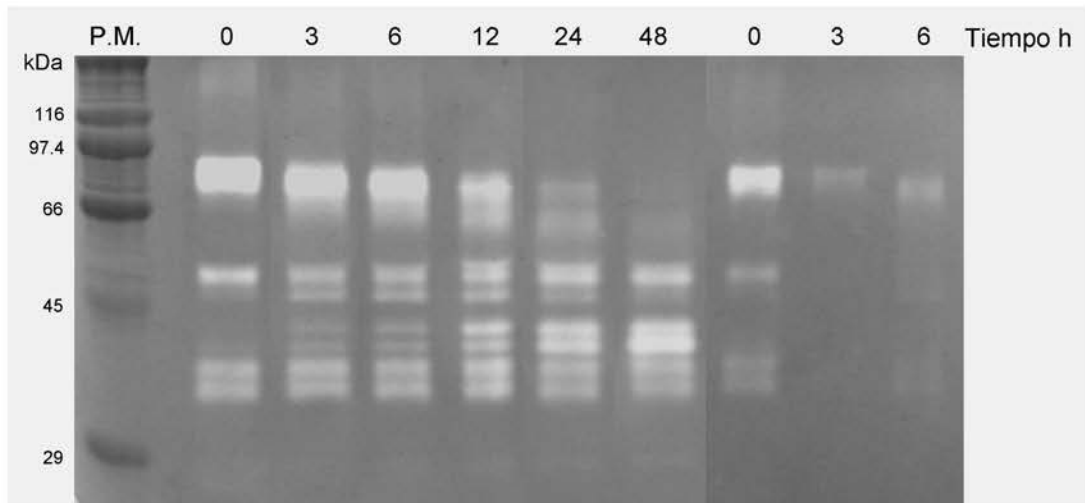


Figura 8.- Actividad caseinolítica de la plasmina y sus derivados. Plasmina humana comercial (Roche), a una concentración de 0.1  $\mu$ U, se incubó a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> en medio Ham F-10 con BSA al 0.1% o en PBS. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos, las cuales se procesaron por zimografía en caseína. Este experimento se hizo por triplicado y también se realizó en gotas con medio Ham F-10 de 5  $\mu$ L bajo aceite mineral en cajas de cultivo, obteniéndose el mismo resultado. El primer carril muestra los estándares de peso molecular (P.M.).

Al probar el efecto de diversos inhibidores sobre el autoprosesamiento de la plasmina, mediante zimografía en caseína (figura 9), se encontró que la Am no lo impidió, el ACA lo inhibe ligeramente, mientras que la Ap y la 2-AP lo evitaron casi por completo o totalmente. En presencia de Ap la banda de 84 kDa se mantiene intensa aún después de 48 h de incubación, mientras que con 2-AP desde el tiempo cero se observaron 3 bandas de pesos moleculares altos (167, 117 y 100 kDa) que no cambiaron con el tiempo de incubación y que corresponden a complejos de este inhibidor con las proteasas detectadas en la plasmina comercial, lo que adicionalmente proporciona evidencia de que se tratan de derivados de esta enzima ya que el inhibidor es relativamente específico para la misma. El complejo formado por la plasmina y la  $\alpha$ 2-antiplasmina ha sido detectado antes utilizando "Western blot" (Rouy y Angeles-Cano, 1990). Con el ACA algunas de las bandas caseinolíticas derivadas de la plasmina se

presentaron con mayor intensidad o por mas tiempo (75, 65, 54, 47 y 40 kDa) que las formadas en ausencia de inhibidores.

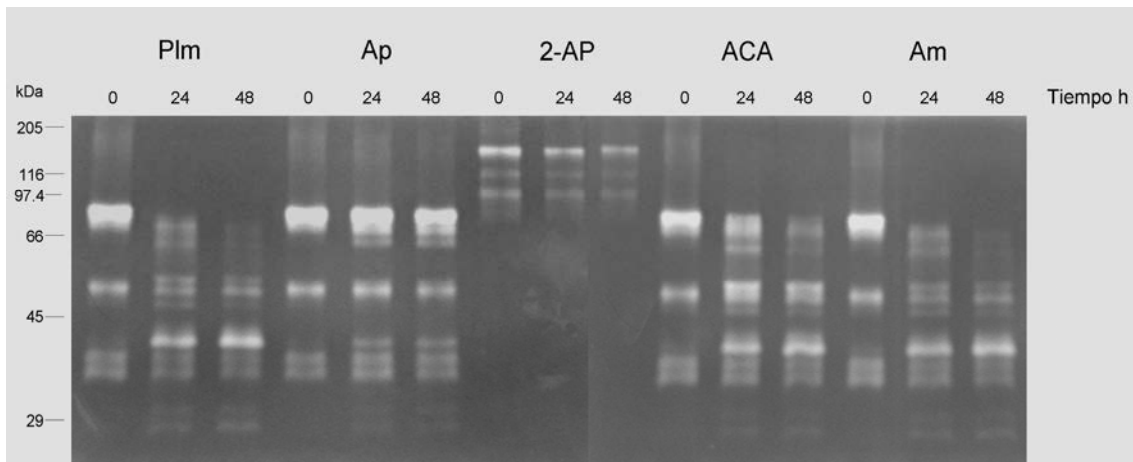


Figura 9.-. Efecto de inhibidores sobre el autoprosesamiento de plasmina. Se incubó plasmina humana comercial, 0.04  $\mu$ U a 37  $^{\circ}$ C y 5% de  $\text{CO}_2$ , en medio Ham F-10 con BSA al 0.1%, sola o en presencia de alguno de los inhibidores indicados. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos y se prepararon geles de poliacrilamida al 10%, con substrato de caseína. También se realizó con gota de 5  $\mu$ L en caja de cultivo, obteniéndose los mismos resultados.

## **EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE PLASMINA POR EL ENSAYO AMIDOLÍTICO**

Para evaluar la formación de plasmina a partir de plasminógeno, usamos como substrato de esta enzima D-Val-Leu-Lis-p-nitroanilina y muestras de los cultivos embrionarios como fuente de activador del plasminógeno. Empleamos dos procedimientos diferentes, en el primero el péptido se agregó al mismo tiempo que el plasminógeno y las muestras de los cultivos; en el segundo el substrato se colocó 24 h después de incubar al plasminógeno junto con las muestras de los cultivos. El primer método nos permitió seguir la formación de la plasmina desde el inicio de la reacción (cinética de su formación), mientras que el segundo evaluó la

cantidad de plasmina que se formó durante las 24 h previas; ya que en estas condiciones la velocidad inicial de la transformación del péptido es proporcional a la cantidad de plasmina producida, por lo que este método evaluó la capacidad de las muestras obtenidas de los cultivos para formar plasmina. En ambos procedimientos, el cambio en los valores de densidad óptica obtenidos, dependió de la cantidad de plasmina formada.

Por ambos métodos se encontró que tanto el medio condicionado, como los lisados embrionarios y las proteínas de secreción adsorbidas a la superficie de la caja de cultivo, obtenidos al día 9 EG, tienen la habilidad de formar plasmina.

### **Cinética de la formación del plasmina.**

Por el primer procedimiento observamos que la formación de plasmina por el medio condicionado de embriones del día 5 al 9 EG siguió una cinética sigmoideal, en la que la velocidad de la reacción fue mas lenta al principio, durante las primeras 3 o 4 h, posteriormente aumentó alcanzando una mayor velocidad que se mantuvo constante por un tiempo para posteriormente disminuir y finalmente alcanzar una cinética de orden cero (figura 10). Cuando en la mezcla de incubación la BSA estuvo mas concentrada (0.06%), la primera fase de velocidad de reacción lenta fue similar que cuando estuvo en menor concentración (0.014%), pero la actividad que se alcanzó en la segunda fase fue mayor y la enzima se saturó mas rápidamente (figura 10), probablemente esta proteína interactuó con la plasmina evitando su degradación o permitió que el plasminógeno fuera activado mas rápido al favorecer su conformación relajada (Ohyama y Cols. 2004). En la tabla 2 observamos la velocidad de la formación de plasmina en las fases lenta (primera) y mas rápida, lo que apoya que en la mayor concentración de albúmina la segunda es estimulada.

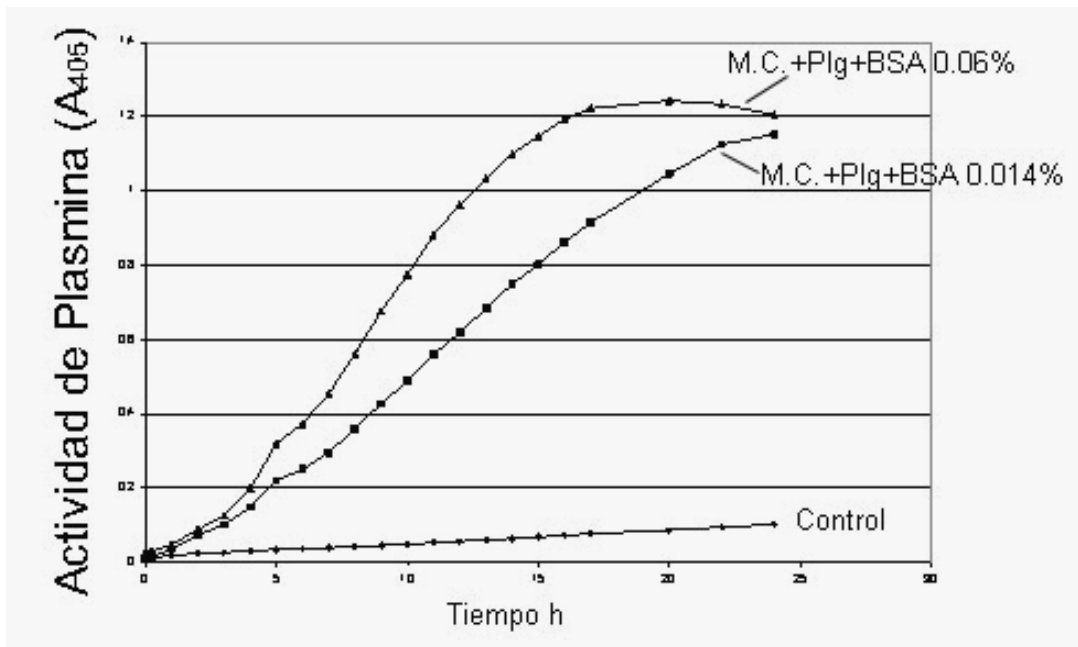
Cuando se empleó Glu-Plg se observó una cinética similar pero las velocidades de la reacción siempre fueron menores que a partir del plasminógeno al evaluar el medio condicionado (figura 10, tabla 2). En la tabla 3 se presentan en forma

comparativa los valores de la actividad de formación de plasmina alcanzada en la segunda fase, donde se detectó que esta es mayor para el medio condicionado, seguida por los lisados embrionarios y la menor actividad correspondió a los extractos de la superficie del cultivo.

Cuando se incubó plasminógeno o Glu-Plg en ausencia de muestras de embriones, también se formó plasmina pero solo entre un 10 a 20 % de la que se observó en presencia del medio condicionado, esto se detectó mediante el ensayo amidolítico y por zimografía en gel (figuras 10, 11 y 12).

En la figura 11 se compararon los productos con actividad caseinolítica derivados del Plg o Glu-Plg durante el ensayo amidolítico por 48 h en presencia del medio acondicionado (carriles 4 y 5) o sin el (carriles 2 y 3). Sin medio condicionado se detectaron 3 bandas: 84, 44 y 40 kDa respectivamente, la de 84 con Plg se presentó más intensa y las de menor peso molecular fueron de muy baja intensidad. Mientras que, en presencia de medio condicionado: se observaron 6 bandas con actividad caseinolítica: 84, 65, 54, 50, 44 y 40 kDa, cuando se empleó Glu-plasminógeno, mientras que con plasminógeno se observa otra banda de 38 kDa.

**A**



**B**

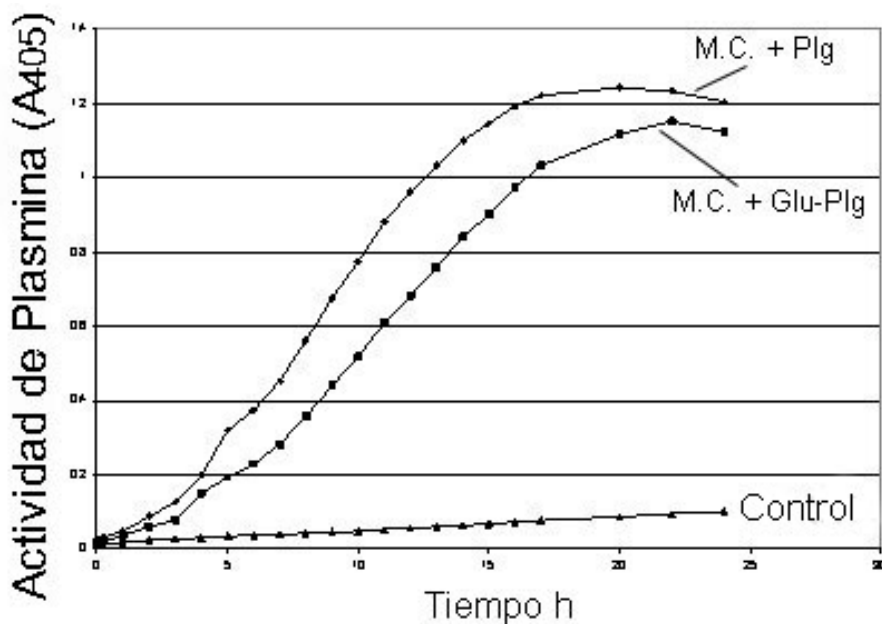


Figura 10.- Cinética de la transformación de plasminógeno a plasmina por el medio condicionado. Se incubó medio condicionado (M.C.) por embriones del día 5 al 9 EG con plasminógeno (Plg), variando la concentración de BSA (A) o con plasminógeno y Glu-Plg (B), ambos a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . El sustrato de la plasmina se agregó junto con el Plg y el medio condicionado, se midió la absorbencia a 405 nm

(A<sub>405</sub>) a distintos tiempos. En el control no se adicionó medio condicionado, únicamente plasminógeno. Se muestran gráficas representativas de 4 experimentos.

Tabla 2.- Efecto de BSA sobre la transformación de plasminógeno a plasmina.

Condición	Primera Fase (unidades)	Segunda Fase (unidades)
Plg (BSA 0.014%)	0.094±0.0018	0.14±0.002
Glu-Plg (BSA 0.014%)	0.055±0.0014	0.062±0.0003
Plg (BSA 0.06%)	0.08±0.001	0.2±0.0002
Glu-Plg (BSA 0.06%)	0.05±0.002	0.12±0.004

Estos datos se calcularon del experimento de la figura 10. La primera fase corresponde a la inicial en que la formación de plasmina fue mas lenta, mientras que la segunda es la fase más rápida. Cada unidad corresponde a la cantidad de plasmina que produce un cambio en absorbencia de 0.1 por 10 embriones, por hora, en las condiciones del ensayo. Se presenta la media y desviación estándar ( $\bar{X} \pm D.E.$ ) de 4 experimentos.

Tabla 3.- Comparación de la transformación de plasminógeno a plasmina en las diferentes fracciones del cultivo.

FRACCIÓN	PLASMINÓGENO (unidades)	GLU-PLASMINÓGENO (unidades)
M.C.	0.2±0.002 (38%)	0.145±0.02
Emb	0.095±0.056 (36%)	0.07±0.014
Sup	0.053±0.007 (-15%)	0.061±0.014

Se tomó la pendiente de la curva en la fase de actividad más rápida (segunda

fase), empleando las condiciones experimentales indicadas en la figura 10, pero usando como fuente de activación del plasminógeno y Glu-plasminógeno, medio condicionado (M.C.), lisados embrionarios (Emb) o extractos de las proteínas adsorbidas a la superficie de cultivo (Sup) obtenidos al día 9 EG. Se presenta la  $\bar{X} \pm D.E.$  de tres experimentos. Las unidades corresponden a las indicadas en la tabla 2. El porcentaje indica la diferencia entre los valores obtenidos para el Plg y el Glu-Plg, para las diferentes fracciones del cultivo.

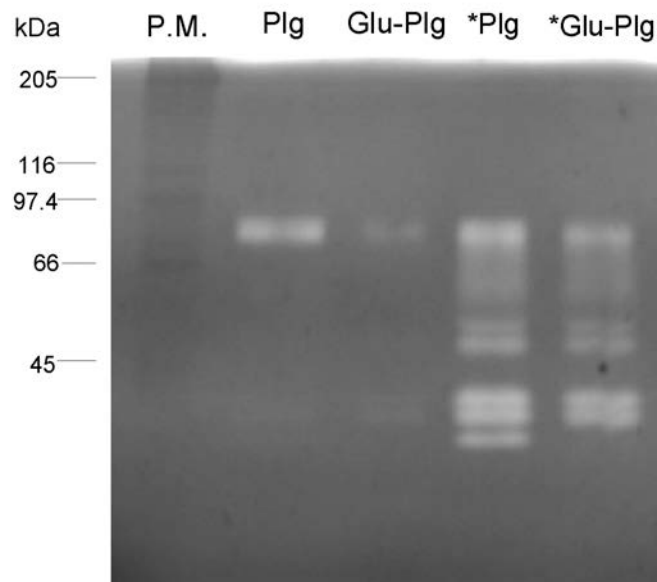


Figura 11.- Productos con actividad caseinolítica derivados del plasminógeno y Glu-plasminógeno durante el ensayo amidolítico. De las pozas de las cajas de ELISA del ensayo amidolítico por el primer procedimiento (figura 10, ver texto), se tomaron alícuotas después de 48 h de incubación y se realizó zimografía en caseína, la concentración de ambos plasminógenos fue de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se colocó 0.1  $\mu\text{g}$  de plasminógeno por carril.



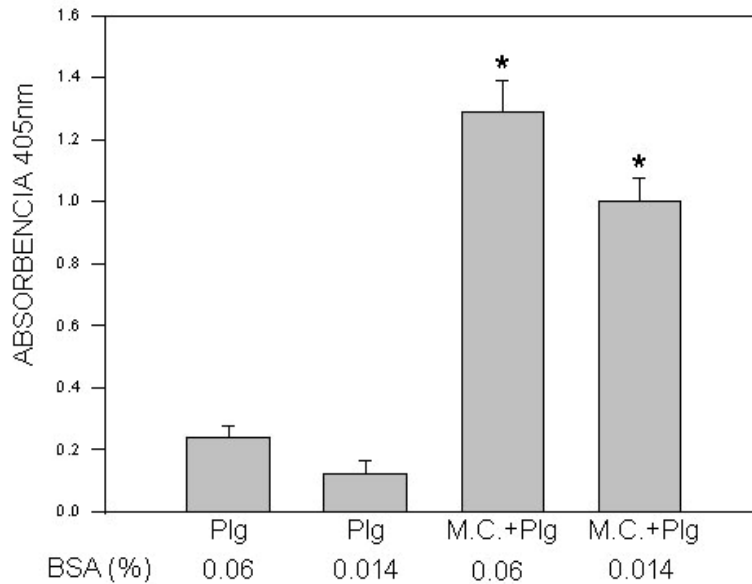


Figura 12.- Comparación de la transformación de plasminógeno a plasmina por el medio condicionado (M.C.) y auto-activación del plasminógeno. Se presentan los valores máximos de absorbencia después de 24 horas de iniciada la incubación con plasminógeno y el substrato de plasmina, con BSA a dos concentraciones. Se presenta la  $\bar{X} \pm D.E.$  de 6 experimentos. (\*) Diferente estadísticamente a los controles sin M.C.  $P < 0.001$

### Capacidad de formar plasmina

Por el segundo procedimiento, cuando se agregó el substrato de plasmina después de incubar previamente las muestras de embriones con plasminógeno por 24 h, la cinética de la reacción ya no fue sigmoideal y se pudo determinar la cantidad de plasmina que se formó en este tiempo, al evaluar la velocidad inicial de la reacción, bajo estas condiciones también el medio condicionado tuvo la mayor capacidad de formar plasmina y fue seguido por los lisados embrionarios, mientras que los extractos de la superficie de cultivo tuvieron la menor capacidad para ello (figuras 13 y 14), estos resultados se confirmaron al evaluar por zimografía en gel, a los productos con actividad caseinolítica, provenientes del ensayo amidolítico (figura 15), donde se observaron más intensas las bandas de

actividad resultantes de la acción del medio condicionado, menos intensas las derivadas en presencia de lisados embrionarios y muy tenues las provenientes de la acción de los extractos de superficie.

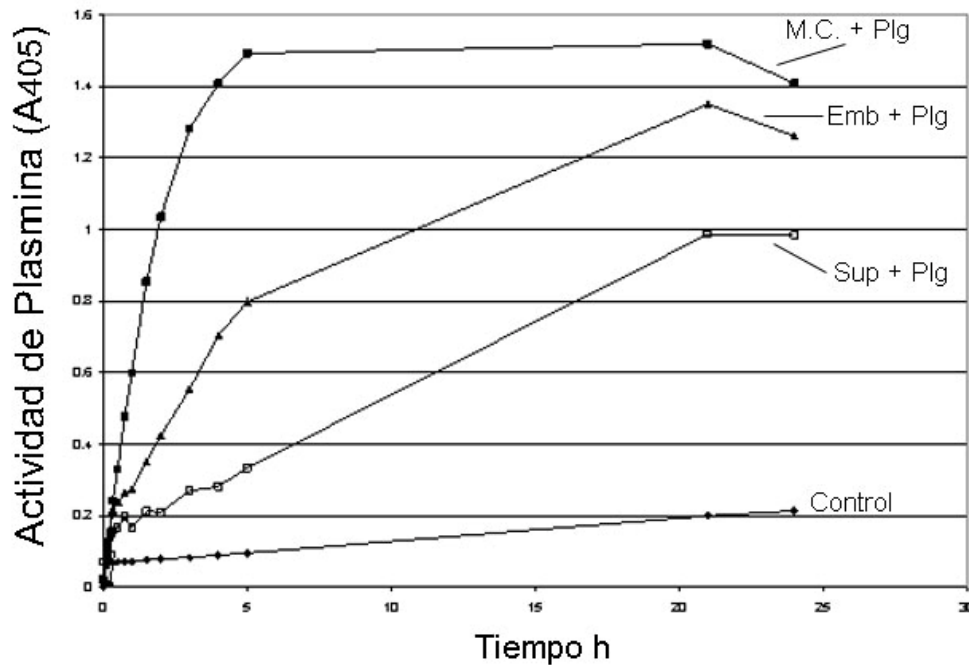


Figura 13.- Formación de plasmina por embriones peri-implantacionales. Se incubaron con plasminógeno 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , por 24 h, muestras de medio condicionado (M.C.), lisados embrionarios (Emb.) y extractos de la superficie de cultivo (Sup.), obtenidos de embriones cultivados del día 5 al 9 EG. Después se agregó el sustrato de plasmina y se midió la absorbencia a 405 nm ( $A_{405}$ ). Se usó muestra equivalente a 7.5 embriones. Se presenta el cambio de absorbencia con respecto al tiempo, en el control sólo se agregó plasminógeno sin medio condicionado.

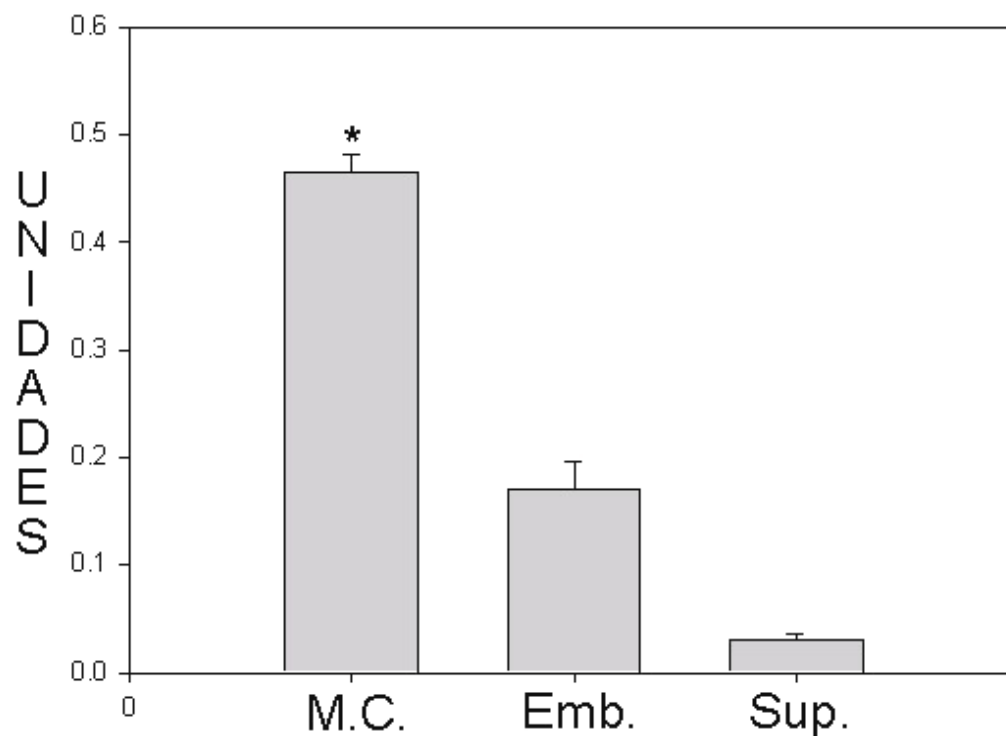


Figura 14.- Transformación de plasminógeno a plasmina en las diferentes fracciones del cultivo. Las condiciones del experimento son las indicadas en la figura 13, de la cual se midió la velocidad inicial de la reacción catalizada por plasmina. Las unidades corresponden a las indicadas en la tabla 2. Se presenta la  $\bar{X} \pm D.E$  de 4 experimentos. (\*) La actividad del M.C. es significativamente mayor que la de los lisados embrionarios y de los extractos de la superficie de cultivo ( $P < 0.005$ ).

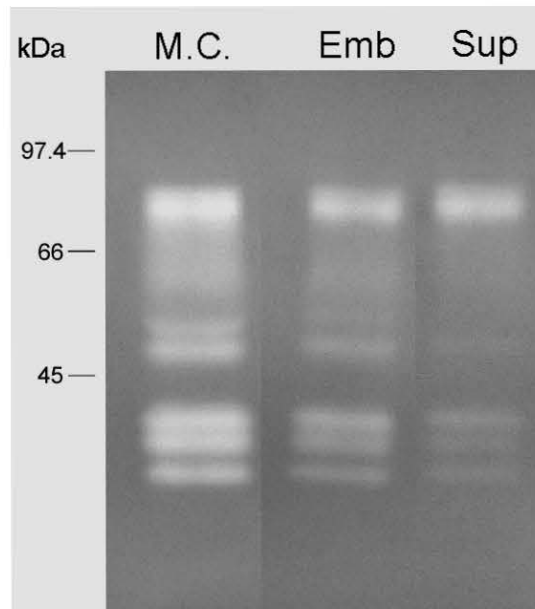
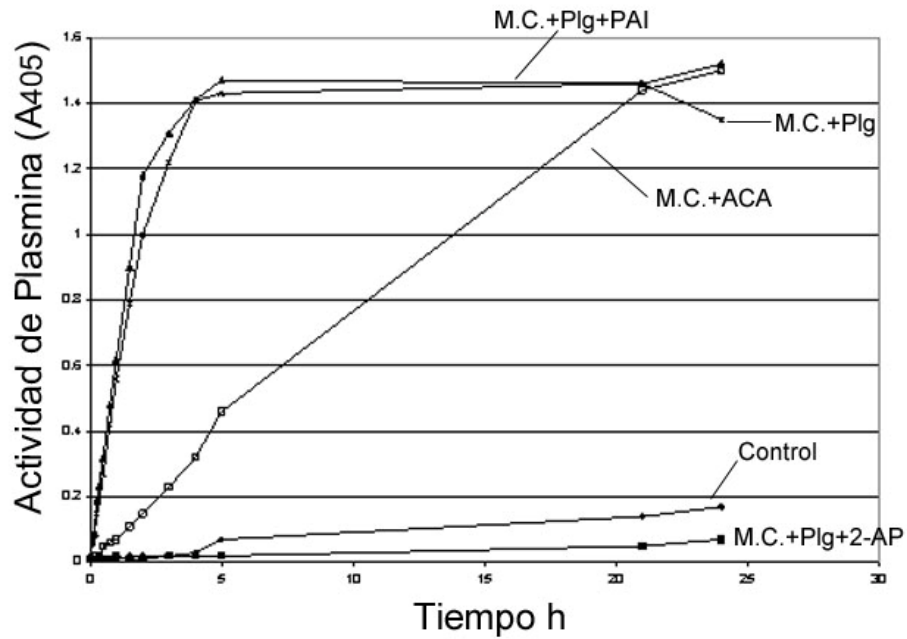


Figura 15.- Derivados del plasminógeno con actividad caseinolítica de las diferentes fracciones analizadas en el ensayo enzimático. De los experimentos descritos en la figura 13, se tomaron alícuotas al final del ensayo amidolítico, cuando se empleó medio condicionado (M.C.), lisados embrionarios (Emb) y extractos de la superficie de cultivo (Sup) y se analizaron por zimografía en caseína.

### **ACCIÓN DE LOS INHIBIDORES EN EL ENSAYO AMIDOLÍTICO**

En el ensayo enzimático la acción de los inhibidores no siempre fue la misma que se presentó en los cultivos embrionarios (figura 16) Cuando se agregaron los inhibidores y el plasminógeno 24 h antes del substrato de plasmina, y se incubó en presencia de BSA al 0.06%, no se encontró inhibición por PAI, con ACA sólo hay una inhibición parcial, mientras que con 2-AP se presenta inhibición en todos los casos. Conclusiones similares se encontraron cuando se analizaron los productos con actividad caseinolítica por zimografía en gel, una vez concluido el ensayo amidolítico (figura 17). Es de hacer notar que con ACA se observa más intensa la banda de 84 kDa y menos las otras bandas. Con 2-AP se forma un complejo de 167 kDa.

A



B

INHIBIDOR	% INHIBICION
2-AP	99
ACA	68
PAI	0

Figura 16.- Acción de algunos inhibidores sobre el procesamiento del plasminógeno durante el ensayo enzimático. El medio condicionado (M.C.) proveniente de los cultivos embrionarios al día 9 EG, se incubó con plasminógeno 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y con  $\alpha$ -2-antiplasmina, ácido  $\epsilon$ -aminocaproico o PAI-1 por 24 h, después se agregó el péptido D-Val-Leu-Lis-p-nitroanilina y se midió la

absorbencia a 405 nm ( $A_{405}$ ). En A, se presentan los valores de absorbencia en relación al tiempo de incubación, en el control solo se agregó plasminógeno sin medio condicionado. En B, se presenta el porcentaje de inhibición obtenido de los valores promedio de actividad de plasmina, tomados de la gráfica A. Este experimento se realizó por duplicado.

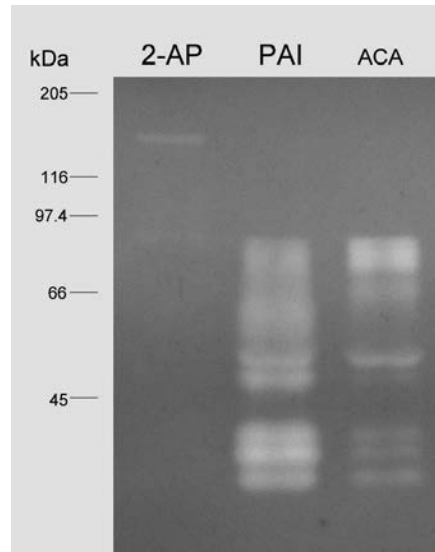


Figura 17.- Efecto de inhibidores en los productos con actividad casenolítica, derivados del procesamiento del plasminógeno durante el ensayo amidolítico. Muestras de medio condicionado obtenidos de embriones cultivados del día 5 al 9 EG, se incubaron con plasminógeno 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 24 h, con  $\alpha$ -2-antiplasmina, ácido  $\epsilon$ -aminocaproico o PAI-1; después se incubaron con el péptido amidolítico por 24 h. Al final del ensayo enzimático, se tomaron alícuotas y se analizaron por zimografía con substrato de caseína.

Como los embriones pre-implantacionales pueden formar plasmina y esta activa a algunas metaloproteasas, como la MMP-9 (Nagase y Cols., 2006), entonces se procedió a evaluar si la adición de plasminógeno o plasmina exógenos inducía la activación de la pro-MMP9 por los cultivos embrionarios.

## ACTIVACIÓN DE MMP-9 DEPENDIENTE DE PLASMINÓGENO

En la figura 18 se puede observar que la adición de plasminógeno induce la presencia de una banda gelatinolítica correspondiente a la MMP-9 activa, su intensidad es proporcional a la dosis empleada y es mas patente a los días 8 y 9 EG. Esta banda tiene un patrón electroforético similar a la enzima activada por APMA (figura 19).

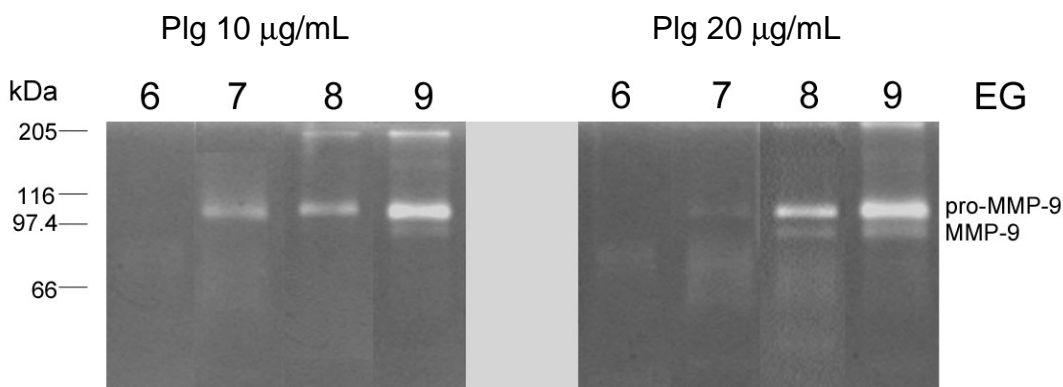


Figura 18.- Activación de MMP-9 dependiente de plasminógeno. Se presentan zimogramas con sustrato de gelatina del medio condicionado por embriones a los que se les adicionó plasminógeno a 10 o 20 µg/mL a partir del día 5 EG, cada 24 h se recuperó el medio de cultivo y se sustituyó por medio recién suplementado. De los días 6 y 7 EG se colocaron en los carriles lo equivalente a 8 embriones, mientras que de los días 8 y 9 se pusieron lo equivalente a 3 embriones.

Para corroborar que las bandas encontradas en este experimento correspondían a MMPs, se resolvió un gel con las mismas características que el de la figura 18, revelado con EDTA (quelante de iones divalentes), donde no se observó ninguna banda de actividad gelatinolítica (datos no mostrados).

## EFFECTO DE INHIBIDORES DE PROTEASAS SOBRE LA ACTIVACIÓN DE MMP-9 DEPENDIENTE DE PLASMINÓGENO

La activación de MMP-9 dependiente del plasminógeno fue inhibida por la Ap y la 2-AP, la Am y el PAI lo hacen sólo parcialmente, mientras que con NEM prácticamente la Pro-MMP-9 no se produjo, sin embargo los otros inhibidores no afectaron dicha activación (figuras 19 y 20). La NEM en esta concentración, fue tóxica para los cultivos. El ACA, se considera un modulador de la plasmina; ya que compite por los sitios de unión a Lis, en este sistema no inhibió la activación de la pro-MMP-9, incluso se observa una mayor cantidad de la MMP-9 activa. Para comprobar si las bandas de actividad detectadas en los geles anteriores correspondían a MMP-9, se reveló uno de ellos en presencia de EDTA encontrando que las bandas correspondientes al carril donde se corrió ACA, son de metaloproteasas; mientras que en presencia de Ap, el barrido de actividad observado cercano a la MMP-9 activa no fue inhibido, observándose en su lugar, dos bandas tenues de 88 y 84 kDa muy probablemente debidas a plasmina.

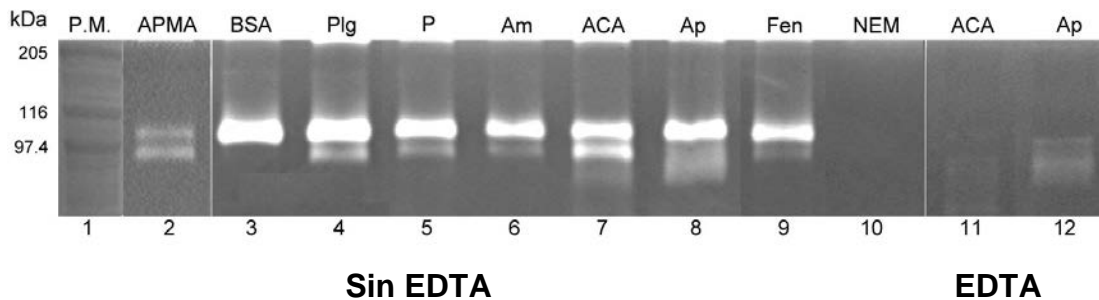


Figura 19.- Efecto de los inhibidores de proteasas, sobre la activación de MMP-9. Se procesaron por zimografía en gelatina alícuotas del medio condicionado obtenido al día 9 EG, después de incubar los embriones a partir del día 7 EG con y sin plasminógeno (10  $\mu$ g/mL) y con alguno de los inhibidores indicados. En el primer carril se observan marcadores de peso molecular y en el segundo medio acondicionado del día 8 EG, después de la activación con APMA. En los carriles 11 y 12 los zimogramas se revelaron en presencia de EDTA. En cada carril se detecta la enzima producida por 3 embriones



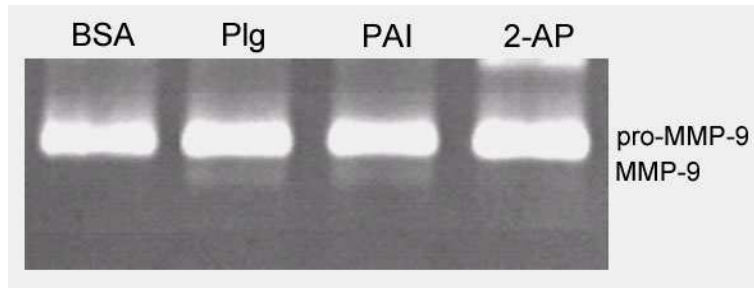


Figura 20.- Efecto del PAI-1 y de la 2-AP, sobre la activación de MMP-9. A los cultivos embrionarios se les agregó plasminógeno a una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$ , más los inhibidores indicados, a partir del día 7 EG. El día 9 EG se tomaron muestras del medio condicionado los cuales se analizaron por zimografía con substrato de gelatina.

### EFFECTO DE LA PLASMINA SOBRE LA PRO-MMP-9

En teoría el plasminógeno debe convertirse a plasmina para activar a la MMP-9, sin embargo la plasmina, adicionada directamente a los cultivos no indujo su activación, detectándose únicamente la forma proenzimática por zimografía en gelatina (figura 21).

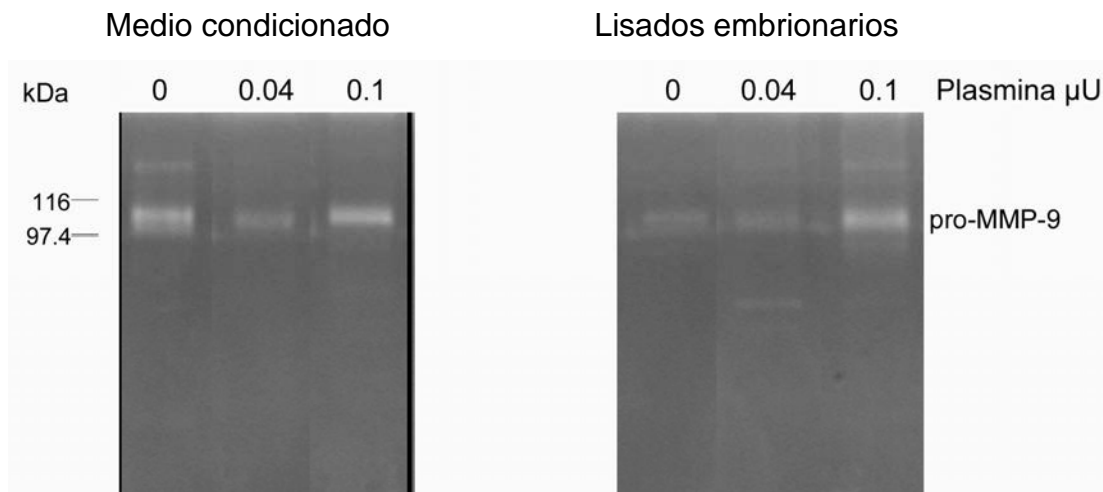


Figura 21.- Efecto de la plasmina sobre la Pro-MMP-9 producida por embriones peri-implantacionales de ratón. Los embriones se incubaron con plasmina humana

(Roche, Cat. 10 602 361 001), a concentraciones de 0.04 y 0, 0.1  $\mu$ U, del día 7 al 9 EG, el medio condicionado y lisados embrionarios se analizaron por zimografía en gelatina, del medio condicionado se empleó lo equivalente a 3 embriones por carril y de los lisados lo equivalente a 6 embriones. Este experimento se hizo por duplicado.

## **DISCUSIÓN**

En este trabajo se encontró que los embriones peri-implantacionales de ratón en cultivo procesan al plasminógeno formando plasmina y que dependiente de lo anterior la pro-MMP-9 puede ser activada.

El plasminógeno humano comercial utilizado en los experimentos, se analizó bioquímicamente para descartar contaminación con plasmina y que los resultados obtenidos por el procesamiento del plasminógeno en los cultivos, fuera atribuible a actividad de la misma. Por electroforesis de poliacrilamida, tanto en el plasminógeno como en el Glu-plasminógeno, encontramos una sola banda de 84 kDa (figura 4A), mientras que bajo condiciones reductoras se detectó una banda de 105 kDa para ambos, sin observarse bandas correspondientes a las cadenas pesada o ligera de la plasmina. Por otro lado, el plasminógeno fue estable al incubarse a 37° C por 24 h y presentó, una sola banda de 84 kDa, con actividad caseinolítica por zimografía en gel (figura 5). Cuando el plasminógeno se incubó por 48 horas se observaron bandas muy tenues de 44 y 40 kDa respectivamente (figura 11), en el ensayo enzimático se observó muy ligera actividad amidolítica después de incubar al plasminógeno por 24 h en ausencia de muestras de embriones, lo que indica que puede autoprocresarse pero de manera muy limitada, lo que no es suficiente para explicar la actividad mostrada por los embriones.

## **PROCESAMIENTO DEL PLASMINÓGENO**

La habilidad de procesar plasminógeno por los embriones se demostró por dos metodologías, zimografía en gel y por un ensayo amidolítico, por la primera, se detectaron diversos derivados del plasminógeno con actividad caseinolítica (plasminas de diferente peso molecular), incluyendo formas de alto peso molecular que se adsorben a la superficie de cultivo en forma dependiente del sitio de unión a lisina (es evitado por el ACA, figura 7B) y plasminas de bajo peso molecular que no lo hacen. Por el segundo, se detectó que los derivados del plasminógeno

presentan actividad sobre un sustrato específico para la plasmina.

La capacidad de formar plasmina se presentó tanto en el medio condicionado, como en los lisados embrionarios y las proteínas adsorbidas a la superficie de cultivo, lo que es acorde con la presencia de activadores del plasminógeno en las tres fracciones (Baiza-Gutman y Cols., manuscrito en preparación).

Por zimografía en caseína observamos que después de la adición del plasminógeno se formaron bandas con actividad caseinolítica de 84, 65, 50 44, y 40 kDa (figura 6), por lo que surgió la pregunta de si estas correspondían a derivados del plasminógeno que habían perdido diferentes fragmentos amino terminales conservando el dominio catalítico (plasminas), lo que fue apoyado al encontrar un patrón de bandas similar después de incubar plasmina a 37° C a diferentes tiempos (autoprocesamiento figura 8), su detección depende de la presencia de BSA, ya que sin ésta, la plasmina tiende a degradarse rápidamente.

Por lo general la formación de plasmina se estudia mediante el ensayo amidolítico; por lo que las diferentes plasminas con frecuencia pueden ser ignoradas, Esta es la primera vez que en un sistema celular se encuentran diversas formas de plasmina de diferente peso molecular derivadas del procesamiento complejo del plasminógeno.

Aunque son pocas las evidencias experimentales directas de la formación *in vivo* de diferentes formas de plasmina, hay diversos indicios de que su formación es posible, entre ellos:

1. El plasminógeno *in vitro* por acción de algunas enzimas puede ser escindido a formas de menor peso molecular, de esta manera, la elastasa de los macrófagos y la catepsina D, en tumores prostáticos, pueden formar al miniplasminógeno (Morikawa y Cols., 2000; Leksa y Cols., 2005); la plasmina a pH básico origina al microplasminógeno (Komorowicz y Cols., 1998), ambos pueden ser convertidos a las respectivas plasminas.

2. Bajo algunas condiciones patológicas como la progresión tumoral e inflamación, la reducción parcial de los puentes disulfuro y la proteólisis del plasminógeno o plasmina genera fragmentos amino terminales de diferente tamaño carentes del dominio catalítico, conocidos como angiostatinas, que presentan actividad antiangiogénica (O'Reilly y Cols., 1994; Stack y Cols., 1999; Soff, 2000; Ohyama y Cols., 2004; Murthi y Cols., 2004). Paralelo a las angiostatinas deben de formarse las porciones complementarias de derivados del plasminógeno que contengan el dominio catalítico (figuras 6 y 15).
3. Se han descrito derivados con actividad caseinolítica provenientes de la incubación de activadores del plasminógeno con fuentes crudas de plasminógeno, como fracciones de leche (Ismail y Cols., 2006) o fibrina (Makowski y Cols., 2001).

La cinética de la formación de plasmina es acorde con la descrita por otros autores como Behrendt (2003), ya que inicia con una fase de formación lenta, seguida de una segunda fase de formación rápida. Aunque ellos reportan que la primera fase tiene una duración de segundos a minutos empleando las enzimas purificadas, en nuestro sistema fue de alrededor de 3 h, probablemente debido al modelo empleado y que ellos agregan concentraciones altas de uPA ; la posible explicación a la fase de retardo es que, al predominar Glu-plasminógeno al principio este es convertido lentamente a Glu-plasmina y Lis-plasminógeno, posteriormente éste último es transformado mas rápidamente a la plasmina respectiva; debido a que presenta una conformación mas relajada y menos compacta que el Glu-plasminógeno (Walther y Cols., 1975; Castellino y Ploplis, 2005). Además de acuerdo con Ellis (1987) encontramos una activación más rápida del plasminógeno (probablemente mezcla de Glu- y Lis-plasminógeno) que del Glu-plasminógeno.

Se conoce muy poco acerca de la presencia *in vivo* de las formas de plasmina de

mediano y bajo peso molecular, y si tienen algún significado fisiológico. La miniplasmina que se ha obtenido *in vitro* tiene la misma afinidad por la fibrina que la plasmina, por lo que puede tener importancia fisiológica (Leksa y Cols., 2005 y Komorowicz y Cols., 1998), mientras que la velocidad de degradación de la fibrina por microplasmina es mas baja comparada con la plasmina y miniplasmina (Kolev y Cols., 1997).

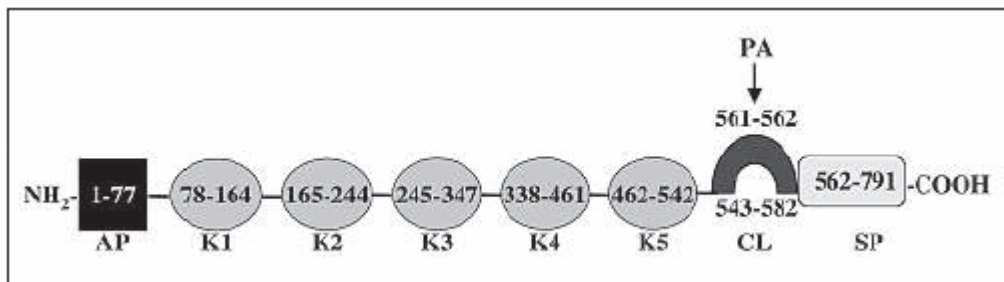


Figura 19.- Representación esquemática del plasminógeno (AP= propéptido, K= dominios tipo "kringle", CL= zona de activación, PA= sitio específico de acción de los activadores del plasminógeno y SP= dominio catalítico de serina-proteasa), tomado de Castellino (2005).

## ACCIÓN DE LOS INHIBIDORES SOBRE EL PROCESAMIENTO DEL PLASMINOGENO

Uno de los planteamientos centrales del trabajo es que el embrión de ratón secreta uPA y que esta enzima activa al plasminógeno exógeno; ya que la formación de plasmina a partir del plasmingeno es catalizada principalmente por los activadores del plasminógeno, sin embargo, contrario a lo que esperábamos, los inhibidores de uPA (amiloride) o de activadores del plasminógeno (PAI-1), no afectaron el procesamiento del plasminógeno en forma significativa, en el primer caso la activación del plasminógeno puede depender de tPA que también se produce en el sistema embrionario por células del endodermo primitivo. La falla del PAI-1 puede explicarse, por la existencia de otras enzimas que procesen

plasminógeno o que la inhibición ejercida por el no es estable o sea revertida, es posible que ambas opciones estén implicadas, la inhibición de la formación de plasmina por PAI-1 solo la observamos de manera dependiente de la dosis a tiempos cortos, tanto el uPA como el PAI-1 son sustratos de la plasmina, por su acción se forma un uPA de bajo peso molecular, y el PAI-1 puede ser degradado e inactivado (figura 22). Considerando que el PAI-1 es poco estable, se iniciaron algunos experimentos incubando el medio condicionado con plasminógeno en presencia del inhibidor por tiempos mas cortos antes de agregar el sustrato de plasmina, se observó que cuando esto se hace por 0, 1.5, 3 o 6 horas, la formación de plasmina es mas lenta al principio pero tiende a igualarse conforme la reacción avanza (es necesario realizar mas experimentos para confirmar estos resultados).

La aprotinina es un inhibidor mas general de serina-proteasas, que evita la acción no solo de los activadores del plasminógeno, sino también de la plasmina; en este estudio se encontró que este compuesto permite que se acumulen productos de alto peso molecular con actividad caseinolítica, tanto en forma soluble como adsorbida a la superficie de cultivo, resultado que no puede explicarse por la actividad limitada del plasminógeno observada en la zimografía en caseína. Estos datos refuerzan la idea de que en el sistema de embriones peri-implantacionales, hay enzimas que formarían plasmina además de los activadores del plasminógeno y que estas podrían no ser serina-proteasas, confirma además que la formación de bandas caseinolíticas de bajo peso molecular si dependen de serina-proteasas y la acción de la  $\alpha$ 2-antiplasmina indica que en gran medida es por autoprosesamiento de la plasmina.

Recientemente se ha señalado que algunas catepsinas (principalmente catepsina D), pueden promover *in vitro*, la conversión de plasminógeno a plasmina, o la activación del uPA y el tPA, incluso algunos autores las han colocado como las iniciadoras de la cascada proteolítica durante la remodelación tisular (Parfyonova y Cols., 2001 y Skrzydlewska y Cols., 2005). Además, se ha encontrado, en ratones

“knockout” para los activadores de plasminógeno, que aún en ausencia de ellos algún otro sistema podría estar activando al plasminógeno (Lund y Cols., 2006), por lo que es posible que en nuestro sistema exista alguna otra enzima que lo active.

El ácido  $\epsilon$ -aminocaproico, compite por los sitios de unión a lisina del plasminógeno y evita su unión a algunos substratos, esto explica porque en su presencia la plasmina no se une a la superficie de cultivo y aumentan formas solubles de alto peso molecular en el medio condicionado, sin embargo, si permite el autoprosesamiento de la plasmina y cuando el plasminógeno se agrega a los cultivos embrionarios, favorece la acumulación de bandas caseinolíticas de bajo peso molecular. Algunos autores sugieren que el  $\epsilon$ -aminocaproico, si bien evita la unión del plasminógeno a substratos como la fibrina y por lo tanto su acción sobre ella, no impide que la plasmina degrade al péptido empleado para su ensayo y puede actuar como un regulador de la formación de plasmina; ya que en algunos estudios enzimáticos se utiliza a bajas dosis para incrementar la velocidad de activación del plasminógeno, esto debido a que la unión de este compuesto con el Glu-plasminógeno relaja la conformación y acelera su activación (Bastian y Cols., 1991)

La diferencia en la acción de algunos inhibidores en los cultivos embrionarios y en el ensayo enzimático pudo estar influenciada por la concentración de los productos embrionarios ya que en el ensayo enzimático, las proteínas de secreción estuvieron 30 veces menos concentradas.

## **ACTIVACION DE MMP-9**

El sistema plasminógeno/plasmina, participa en procesos donde es necesaria la remodelación de la MEC; ya que la plasmina degrada algunos de sus componentes (laminina, fibrina y fibronectina), aunque su acción es insuficiente; también participa en la cascada proteolítica activando algunas MMPs, las que en conjunto degradan a casi todos los componentes de la MEC. Una de estas



enzimas es la MMP-9, la cual es secretada, como zimógeno, en forma importante por el embrión peri-implantacional de ratón y humano (Whiteside y Cols., 2001, Behretdtsen y Cols., 1992), esta enzima degrada a la colágena tipo IV, componente principal de las membranas basales, la barrera principal entre el epitelio y el estroma, por lo que se le considera importante en procesos invasivos.

La activación *in vivo* de la MMP-9, es un proceso que no ha sido bien caracterizado, se sabe que la MMP-3 tiene la capacidad de activarla, pero en los embriones de ratón prácticamente no se detecta su presencia. Los embriones peri-implantacionales de ratón secretan uPA y MMP-9 en forma importante, lo que le da al embrión un carácter altamente invasivo, y la capacidad de degradar a las membranas basales. En este trabajo encontramos que es suficiente la adición de plasminógeno exógeno para que la MMP-9 sea activada, esto sugiere que lo que limita la velocidad de degradación de la MEC, por el *conceptus*, es la disponibilidad de plasminógeno y que este provenga de los tejidos maternos. En el período preimplantatorio, se presenta un aumento en la permeabilidad vascular uterina por lo que proteínas séricas como el plasminógeno pueden extravasarse (Psychoyos, 1973) y al día 7 el trofoblasto entra en contacto con la sangre materna (Schlafke y Col, 1975), además de que la máxima producción de Pro-MMP-9 y uPA por los embriones en cultivo ocurre a los días 8 y 9 EG (Baiza y Cols. 2002: Martínez-Hernández y Cols. 2002).

Contrario a lo que esperabamos y acorde con los resultados de Behretdtsen (1992) la adición de plasmina a los cultivos no indujo la activación de la MMP-9, en base a este resultado estos autores descartaron a la plasmina como un activador de la MMP-9 durante la implantación embrionaria. Sin embargo la plasmina comercial es muy inestable puesto que se autoprocesa y tiende a degradarse rápidamente y además contiene pequeñas cantidades de formas de bajo peso molecular, lo anterior probablemente evite que pueda activar a la MMP-9 en el cultivo. En cambio si se agrega plasminógeno, este es procesado en forma secuencial originando primero a la plasmina de alto peso molecular y a partir de

ella las formas de bajo peso y en un proceso más lento. Es posible que una de las funciones de las plasminas de bajo peso molecular sea la degradación de las plasminas de alto peso molecular, de tal manera que sean removidas una vez que han realizado su función.

## **EFFECTO DE LOS INHIBIDORES EN LA ACTIVACION DE LA MMP-9 DEPENDIENTE DE PLASMINÓGENO**

El ácido  $\epsilon$ -aminocaproico, no solo no inhibe la activación de MMP-9, sino que la favorece. Lo anterior puede implicar que este compuesto favorezca la activación y/o acumulación de la MMP-9 activa, lo que puede deberse a que permite la acumulación de diversas formas moleculares de la plasmina. También indican que la unión de la plasmina con MMP-9 no es a través del sitio de unión a lisina y que la activación de MMP-9 por plasmina no depende de la unión a la superficie celular o a la matriz extracelular. En macrófagos se han encontrado resultados similares, la adición de plasminógeno induce la activación de MMP-9, lo que es inhibido por aprotinina (Mazzieri y Cols., 1997).

La o-fenantrolina no inhibe la activación de MMP-9, indicándonos que este proceso no depende de metaloproteasas. Se ha descrito que la plasmina activa a otras metaloproteasas como la MMP-1 y MMP-3 y esta última a su vez puede activar a la MMP-9 (Parfyonova y Cols., 2001, Vise y Nagase 2003, Nagase y Cols., 2006). El experimento es indicativo de que la plasmina puede actuar directamente sin la participación de alguna otra metaloproteasa (figura 22).

En los experimentos con NEM, se disminuye completamente tanto la proenzima como la forma activa de MMP-9, y ambas formas prácticamente desaparecen, este compuesto inhibe enzimas glicolíticas que contienen grupos sulfhidrilos, por lo que no se puede descartar un efecto tóxico sobre los embriones. Probablemente con un inhibidor que solo afecte a las cisteína-proteasas, como el E-64 (trans-epoxisuccinil-L-leucil-amido (4 guanidino) butano), se podría evaluar mejor su participación en este proceso.

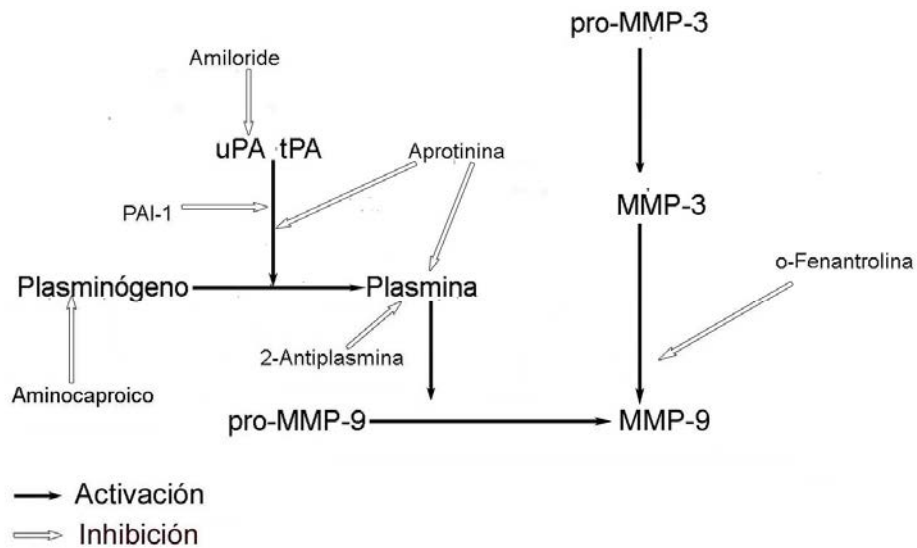


Figura 22.- Acción de algunos inhibidores en el procesamiento del plasminógeno y la activación de la pro-MMP-9.

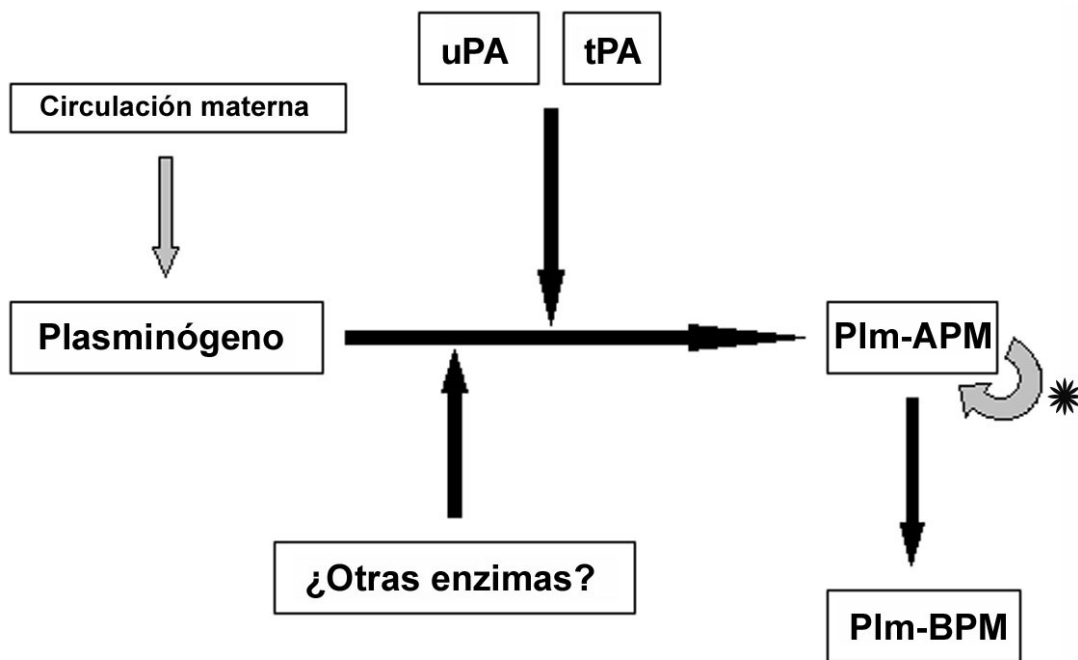
De lo anterior podemos decir que los cultivos de embriones peri-implantacionales procesan al plasminógeno formando plasminas de diferente peso molecular, y esto lo podemos comprobar tanto por medios zimográficos como por el ensayo amidolítico. Estas formas de plasmina de diferente peso molecular, pueden estar involucradas en la remodelación tisular durante la implantación embrionaria.

Si bien nuestros resultados indican una participación limitada del uPA, en el procesamiento del plasminógeno, en trabajos recientes (Aflalo y Cols., 2005; Coulam y Cols., 2006) se indica que esta enzima, aunque es dispensable, si contribuye a aumentar la capacidad del embrión a implantarse. Es muy factible que en nuestro sistema puede estar participando alguna otra enzima, además del uPA, en la activación del plasminógeno.

El embrión de ratón en su fase implantatoria adquiere un carácter altamente invasivo, que se ha equiparado al de un tumor metastásico, y este proceso *in vivo*

es estrechamente regulado por medio de enzimas e inhibidores proporcionados por los tejidos maternos y por el embrión. En nuestros resultados, encontramos una mayor formación de plasmina y una mayor capacidad de activar a la MMP-9 los días 8 y 9 EG, lo que corresponde con el tiempo en que el trofoblasto establece contacto directo con la sangre materna y llega a integrarse al endotelio vascular, por lo que es importante la participación del sistema de activación del plasminógeno y de la MMP-9 en la remodelación tisular en este periodo.

La producción de formas de bajo peso molecular de plasmina puede ser el reflejo de la producción de angiostatinas, las que podrían participar en la regulación de los procesos vasculares que ocurren durante el establecimiento de la placenta.



**Plm-APM= plasmina de alto peso molecular**

**Plm-BPM= plasminas de bajo peso molecular**

**\* Autoprocésamiento**

Figura 23.- Procesamiento del plasminógeno.

## CONCLUSIONES

Los embriones peri-implantacionales de ratón procesan al plasminógeno, formando plasminas de diferentes pesos moleculares y estas formas pueden estar involucradas en la remodelación tisular durante la implantación embrionaria.

Aparentemente la activación del plasminógeno por los cultivos embrionarios, no depende únicamente del uPA.

Los inhibidores actúan de forma diferente en los cultivos embrionarios y en el ensayo enzimático.

Cuando se agrega plasminógeno exógeno a los cultivos embrionarios, estos activan a la forma proenzimática de la MMP-9, y este proceso depende de la formación de plasmina.

La plasmina agregada directamente a los cultivos embrionarios, no activa a la pro-MMP-9.

Podemos decir que las bandas con actividad caseinolítica derivadas del procesamiento del plasminógeno, son plasminas de diferente peso molecular.

Se comprobó que las formas de plasmina encontradas, son producto del procesamiento y no por contaminación con plasmina o resultado del autoprocésamiento del plasminógeno.

La BSA afecta a la formación de plasmina, en el ensayo enzimático.

La velocidad de formación de plasmina es más alta en el plasminógeno que en el Glu-plasminógeno.

## BIBLIOGRAFIA

- Aflalo, E. D.; Sod-Moriah, U. A.; Potashnick, G.; Har-Vardi, I. (2004). Differences in the implantation rates of rat embryos developed *in vivo* and *in vitro*: possible role for plasminogen activators. *Fert. and Steril.* 81: 780-85.
- Aflalo, E. D.; Sod-Moriah, U. A.; Potashnick, G.; Har-Vardi, I. (2005). Expression of plasminogen activators in preimplantation rat embryos developed *in vivo* and *in vitro*. *Reprod. Biol. and Endocrinol.* 3: 7.
- Armant, D. R. (2005). Blastocysts don't go it alone. Extrinsic signals fine-tune the intrinsic developmental program of trophoblast cells. *Dev. Biol.* 280(2):260-80.
- Armant, D. R. (2006). Blastocyst culture. *Method. Mol. Med.* 121:35-56.
- Baiza-Gutman, L. A.; Martínez-Hernández, M. G.; Armant, D. R. (2002). Regulation of urokinase plasminogen activator expression during mouse blastocyst implantation *in vitro*. *Biol. Reprod.* 66(1):157 (Abstract).
- Barlow, P.; Sherman, M. (1972). The biochemistry of differentiation of mouse trophoblast: studies on polyploidy. *J. Embryol. Exp. Morph.* 27:447-65.
- Bastian, E. D.; Brown, R. J.; Ernstrom, C. A. (1991). Casein interference in bovine plasmin assays using a synthetic substrate. *J. Dairy Sci.* 74(12): 4119-24.
- Behrendt, N.; List, K.; Andreasen, A.; Dano, K. (2003). The pro-urokinase plasminogen-activation system in the presence of serpin-type inhibitors and the urokinase receptor: rescue of activity through reciprocal pro-enzyme activation. *Biochem. J.* 371: 277-87.
- Behrendtsen, O.; Alexander, C. M.; Werb, Z. (1992). Metalloproteinases mediated extracellular matrix degradation by cells from mouse blastocysts outgrowths. *Development* 114(2):447-456.

- Billington, W. D. (1971). Biology of trophoblast. En: Bishop M. (Edit.) Advances in Reproductive Physiology. Vol V. Academic. Press. New York. Pp 27-66.
- Björklund M and Koivunen E (2005) Gelatinase-mediated migration and invasión of cancer cells. Biochim. Biophys. Acta 1755, 37-69.
- Cao J, Rehemtulla A, Pavlaki M, Kozarekar P and Chiarelli Ch (2005) Furin directly cleaves proMMP-2 in the trans-golgi network resulting in a nonfunctioning proteinase. J. Biol. Chem. 280, 10974-80.
- Cao, Y.; Ji, R. W.; Davidson, D.; Schaller, J.; Marti, D.; Söhndel, S.; McCance, S. G.; O'Reilly, M. S.; Llinás, M.; Folkman J. (1996). Kringle domains of human angiostatin. Characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells. Biol. Chem. 271(46): 29461-67.
- Castellino, F.; Ploplis, V. (2005). Structure and function of the plasminogen/plasmin system. Thromb. Haemost. 93: 647-54.
- Chibber, B.A.; Radek, J.T.; Morris, J.P.; Castellino, F.J. (1986). Rapid formation of an anion-sensitive active site in stoichiometric complexes of streptokinase and human [Glu1] plasminogen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:1237-41
- Collen, D. (2001). Ham-Wasserman lecture: role of the plasminogen system in fibrin-homeostasis and tissue remodeling. Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program: 1-9.
- Coulam, C. B.; Jeyendran, R. S.; Fishel, L. A.; Roussev, R. (2006). Multiple thrombophilic gene mutations are risk factors for implantation failure. Reprod. Biomed. 12(3): 322-27.
- Das, S. K.; Yano, S.; Wang, J.; Edwards, D. R.; Nagase, H.; Dey, S. K. (1997). Expression of matrix metalloproteinases in the mouse uterus during the peri-implantational period. Dev. Genet. 2(1):44-54.
- De Groot-Besseling, R.; Ruers, T.; Lamers-Elmans, I.; Maas, C.; De Waal, R.; Westphal, J. (2006). Angiostatin generating capacity and anti-tumour effects of D-penicillamine and plasminogen activators. BMC Cancer. 6: 149-86.
- Dey S. K.; Lim H.; Das S.K., Reese J.; Paria B. C.; Daikoku T.; Wang H. (2004). Molecular Cues to Implantation. Endocr. Rev. 25(3):341–73.

- Ellis, V.; Scully, M. F.; Kakkar, V. V. (1987). Plasminogen activation by single-chain urokinase in functional isolation. A kinetic study. *J. Biol. Chem.* 262(31). 14998-15002.
- Enders, A. (1970). Fertilization, cleavage and implantation. En: Hafez, E. (Edit) *Reproduction and breeding techniques for laboratory animales*. Lea & Febiger, Philadelphia, 137-56.
- Flamigni, C.; Bulletti, C.; Polli, B.; Ciotti, P. M.; Prefetto, R.; Galassi, A.; Dicosmo, E. (1991). Factors regulating interaction between trophoblast and human endometrium, *Ann N. Y. Acad. Sci.* 22:176-190.
- Gilbert, S. F. (2005). La matriz extracelular como fuente de señales críticas en el desarrollo. En *Biología del Desarrollo*. Ed. Panamericana. 181-187.
- Gonda, M.; Hsu, Y. (1980). Correlative scanning electrón, transmisión electrón, and light microscopic studies of the *in vitro* development of mouse embryos on a plastic substrate at the implantation stage. *J. Embryol. Exp. Morph.* 56:23-39.
- Gong, Y.; Kim, S. O.; Grella, D.K.; Castellano, F. J.; Miles, L. A. (2001). Conversion of Glu-plasminogen to Lys-plasminogen is necessary for optimal stimulation of plasminogen activation on the endothelial cell surface. *J. Biol. Chem.* 276(22):19078-83.
- Gonzalez-Gronow, M.; Grenett, H.E.; Gawdi, G.; Pizzo, S. (2005). Angiostatin directly inhibits human prostate tumor cell invasion by blocking plasminogen binding to its cellular receptor, CD26. *Exp Cell Res.* 303(1): 22-31
- Guzman-Grenfell, M.; Baiza-Gutman, L. A.; Hicks, 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). Aminoacid requirements for attachment and outgrowth of the mouse blastocyst *in vitro*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 139: 79-90.
- Hernandez-Barrantes S, Bernardo M, Toth M and Fridman R (2002) Regulation of membrane type-matrix metalloproteinases. *Cancer Biol.* 12, 131-38.



- Ismail, B.; Choi, L. H.; Were, L. M.; Nielsen, S. S. (2006). Activity and nature of plasminogen activators associated with the casein micelle. *J. Dairy Sci.* 89(9):3285-95.
- Jenkinson, E. (1977). The in vitro blastocyst outgrowth system as a model for the analysis of peri-implantation development. En Johnson, M. (Edit) *Development in mammals*. Vol. II:151-172.
- Kolev, K.; Tenedekjiev, K.; Komorowicz, E.; Machovich, R. (1997). Functional evaluation of the structural features of proteases and their substrate in fibrin surface degradation. *J. Biol. Chem.* 272(21): 13666-75.
- Komorowicz, E.; Kolev, K.; Machovich, R. (1998). Fibrinolysis with des-Kringle derivatives of plasmin: its modulation by plasma protease inhibitors. *Biochemistry*. 37:9112-18.
- Kucharewicz, I.; Kowal, K.; Bucsko, W.; Bodzenta-Lukasyk, A. (2003). The plasmin system in airway remodeling. *Thromb. Res.* 112(1-2):1-7.
- Leksa, V.; Godar, S.; Schiller, H. B.; Fuerbauer, E.; Muhammad, A.; Slezakova, K.; Horejsi, V.; Steinlein, P.; Weidle, U. H.; Binder, B. R.; Stockinger, H. (2005). TGF- $\beta$ -induced apoptosis in endothelial cells mediated by M6P/IGFII-R and mini-plasminogen. *J. Cell Sci.* 118: 4577-86.
- Lijnen, H. R.; Arza, B.; Van Hoef, B.; Collen, D.; Declerck, P.J. (2000). Inactivation of plasminogen activator inhibitor-1 by specific proteolysis with stromelysin-1 (MMP-3). *J. Biol. Chem.* 275(48):37645-50.
- Lijnen, H. R.; Silence, J.; Van Hoef, B.; Collen, D. (1998). Stromelysin-1 (MMP-3) independent gelatinase expression and activation in mice. *Blood* 91(6):2045-2053.
- Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S. L.; Matsudaira, P.; Baltimore, D.; Darnell, J. (2002). Integración de células en tejidos. En: *Biología Celular y Molecular*. Lodish Ed. Panamericana. Madrid: 968-93.
- Lund, R. L.; Green, K. A.; Stoop, A. A.; Ploug, M.; Almholt, K.; Lilla, J.; Nielsen, B. S.; Christensen, I. J.; Craik, C. S.; Werb, Z.; Danø, K.; Rømer, J. (2006). Plasminogen activation independent of uPA and tPA maintains wound healing in gene-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 281: 2686-97.

- Mackay, A. R.; Gomez, D. E.; Cottam, D. W.; Rees, R. C.; Nason, A. M.; Thorgeirsson, U. P. (1993). Identification of the 72-kDa (MMP-2) and 92-kDa (MMP-9) gelatinase/type IV collagenase in preparations of laminin and Matrigel. *15(6):1048-51.*
- Makowski, G. S.; Melinda, L.; Ramsby. (2001). Interaction of amorphous calcium phosphate with fibrin in vitro causes decreased fibrinolysis and altered protease profiles: implications for atherosclerotic disease. *Inflammation. 25-5: 319-329.*
- Manchanda, N.; Schwartz, B. S. (1995). Interaction of single-chain urokinase and plasminogen activator inhibitor type 1. *J. Biol. Chem. 270(34): 20032-35.*
- Martínez-Hernández, M. G.; Baiza, L. A.; Armant, D. R. (2002). "Expression and secretion of matrix metalloproteinase-9 in developing mouse peri-implantation blastocysts". *Biol. Reprod. 66 (Supl. 1):158 (Abstract).*
- Mazzieri, R.; Masiero, L.; Zanetta, L.; Monea, S.; Onisto, M.; Garbisa, S.; Mignatti, P. (1997). Control of type IV collagenase activity by components of the urokinase-plasmin system: a regulatory mechanism with cell bound reactants. *EMBO J. 16(9):2319-2332.*
- Mazzone M, Baldassarre M, Beznoussenko G, Giacchetti G, Cao J, Zucker S, Luini A and Buccione R (2004) Intracellular processing and activation of membrane type 1 matrix metalloproteinase depends on its partitioning into lipid domains. *J. Cell Sci. 117, 6275-87.*
- Michaud-Levesque, J.; Rolland, Y.; Demeule, M.; Bertrand, Y.; Beliveau, Y. (2005). Inhibition of endothelial cell movement and tubulogenesis by human recombinant soluble melanotransferrin: involvement of the u-PAR/LRP plasminolytic system. *Biochim. Biophys. Acta. 1743(3):243-53.*
- Miles, L. A.; Dahlberg, C. M.; Plow, E. F. (1988). The cell binding domains of plasminogen and their function in plasma. *J. Biol. Chem. 263: 11928-34.*
- Molgaard, L.; Ponting, C. P.; Christensen, U. (1997). Glycosylation at Asn-289 facilitates the ligand-induced conformational changes of human Glu-plasminogen. *FEBS lett. 405(3): 363-68.*

- Morikawa, W.; Yamamoto, K.; Ishikawa, S.; Takemoto, S.; Ono, M.; Fukushi, J.; Naito, S.; Nozaki, C.; Iwanaga, S.; Kuwano, M. (2000). Angiostatin Generation by Cathepsin D Secreted by Human Prostate Carcinoma Cells. *275(49): 38912–20*.
- Murthi, P.; Barker, G.; Nowell, C. J.; Rice, G. E.; Baker, M. S.; Kalionis, B.; Quinn, M. A. (2004). Plasminogen fragmentation and increased production of extracellular matrix-degrading proteinases are associated with serous epithelial ovarian cancer progression. *Gynecol. Oncol. 92: 80-88*.
- Nagase, H. (1997). Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol. Chem. 378:151-160*.
- Nagase, H.; Visse, R.; Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPS. *Cardiovasc. Res. 69: 562-73*.
- O'Reilly, M. S.; Holmgren, L.; Shing, Y.; Chen, C.; Rosenthal, R.A.; Moses, M.; Lane, W. S.; Cao, Y.; Sage, E. H.; Folkman, J. (1994). Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a lewis lung carcinoma. *79(2): 315-28*.
- O' Reilly M. S.; Holmgren, L.; Chen, C.; Folkman, J. (1996). Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat. Med. 2(6): 689-92*.
- Ohyama, S.; Harada, T.; Chikanishi, T.; Miura, Y.; Hasumi, K. (2004). Nonlysine-analog plasminogen modulators promote autoproteolytic generation of plasmin(ogen) fragments with angiostatin-like activity. *Eur. J. Biochem. 271: 809-20*.
- Ossowski, L.; Aguirre-Ghiso, J. A. (2000). Urokinase receptor and integrin partnership: coordination of signaling for cell adhesion, migration and growth. *Curr. Opin. Cell Biol. 12(5): 613-20*.
- Pardo, A.; Selman M. (2003). Matriz extracelular. En: *Biología Celular y Molecular*. Ed. Jiménez L. F., Pearsons Educación México: 515-40.
- Pardo, A.; Selman, M. (1996). Metalloproteinases and lung injury. *Braz. J. Med. Biol. Res. 29:1109-1115*.

- Parfyonova, Y. V.; Plekhanova, O. S.; Tkachuk, V. A. (2001). Plasminogen activators in vascular remodeling and angiogenesis. *Biochemistry. (Moscow)* 67(1):119-34.
- Pepper, M. S. A.; Sappino, P.; Stöcklin, R.; Montesano, R.; Orci, L.; Vassalli, J. D. (1993). Upregulation of Urokinase Receptor Expression on Migrating Endothelial Cells. *J. Cell Biol.* 122(3): 673-84.
- Peters, T. S.; Albieri, A.; Bevilacqua, E.; Chapman, B. M.; Crane, L. H.; Hamlin, G. P.; Sechi, M.; Soares, M. J. (1999) Differentiation dependent expression of gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 in trophoblast cells. *Cell. Tissue Res.* 295:287-296.
- Psychoyos, A. (1973). Hormonal control of ovoimplantation. *Vitam. Horm.* 31:201-56.
- Psychoyos, A. (1986). Uterine receptivity for nidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 476:36-42.
- Rouy, D.; Angeles-Cano, E. (1990). The mechanism of activation of plasminogen at the fibrin surface by tissue-type plasminogen activator in a plasma milieu in Vitro. *Biochem. J.* 271: 51-57.
- Salas-Vidal, E.; Lomelí, H. (2004). Imaging filopodia dynamics in the mouse blastocyst. *Dev. Biol.* 265: 75– 89.
- Salomon, S.; Sherman, M. (1975). Implantation and invasiveness of mouse blastocyst on uterine monolayers. *Exptl. Cell Res.* 90:261-268.
- Schlafke, S.; Welsh, A. O.; y Enders, A. C. (1975). Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. *Biol. Reprod.* 12:41-65
- Schultz, G.A.; Edwards, D. R. (1997). Biology and genetics of implantation. *Develop. Genet.* 21: 1-5.
- Sellens, M.; Sherman, M. (1980). Effects of culture conditions on the developmental programme of mouse blastocysts. *J. Embryol. Exp. Morph.* 56:1-22.
- Sherman, M. I. (1978). Implantation of mouse blastocyst in vitro. En: Daniel, J. (Edit.) *Methods in mammalian reproduction.* Academic Press. San Francisco. 11:247-257.

- Sherman, M. I.; Salomon, D. S. (1975). The relationships between the early mouse embryo and its environment. En: The developmental biology of reproduction. Ed. J. Papaconstantinov, Academic Press. New York. 277-307.
- Skrzydlewska, E.; Sulkowska, M.; Koda, M.; Sulkowski, S. (2005). Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis. *World J. Gastroenterol.* 11(9):1251-66.
- Soff, G.A. (2000). Angiostatin and angiostatin-related proteins. *Cancer Metastasis Rev.* 19 (1-2): 97-107.
- Stack, M.S.; Gately, S.; Bafetti, L. M.; Enghild, J. J.; Soff, G.A. (1999). Angiostatin inhibits endothelial and melanoma cellular invasion by blocking matrix-enhanced plasminogen activation. *Biochem. J.* 348: 77-84.
- Sternlicht M.D.; Werb Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17:463-516.
- Strickland, S.; Reich, E.; Sherman, M. (1976). Plasminogen activator in early embryogenesis: enzyme production by trophoblast and parietal endoderm. *Cell.* 9:231-240.
- Sutherland, A. (2003). Mechanisms of implantation in the mouse: differentiation and functional importance of trophoblast giant cell behavior. *Dev. Biol.* 258: 241-51.
- Tabibzadeh, S.; Babaknia, A. (1995). The signals and molecular pathways involved in implantation a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. *Hum. Reprod.* 10(6):1574-1602.
- Vassalli, J. D.; Dayer, J. M.; Wholwend, A.; Belin, D. (1984). Concomitant secretion of prourokinase and of plasminogen activator-specific inhibitor by cultured human monocytes-macrophages. *J. Exp. Med.* 159: 1653-58.
- Visse, R.; Nagase, H, (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry. *Circ. Res.* 92:827-839.

- Walther, P.J.; Hill, R. L.; McKee, P.A. (1975). The importance of the preactivation peptide in the two-stage mechanism of human plasminogen activation. *J. Biol. Chem.* 250(15): 5926-33.
- Wang, H.; Dey, SK. (2006). Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat. Rev. Genet.* 7(3): 185-99.
- Wang, H.; Schultz, R.; Hong, J.; Cundiff, D. L.; Jiang, K.; Soff, G. A. (2004). Cell surface-dependent generation of angiostatin 4.5. *Cancer Res.* 64(1): 162-68.
- Ware, L. B.; Bastarache, J. A.; Wang L. (2005). Coagulation and fibrinolysis in human acute lung injury –New therapeutic targets? *Keio J. Med.* 54 (3): 142–49,
- Whiteside, E. J.; Jackson, M. M.; Herington, A. C.; Edwards, D. R.; Harvey, M. B. (2001). Matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 are key regulators of extracellular matrix degradation by mouse embryos. *Biol Reprod.* 64:1331-1337.
- Wilson, I. B.; Jenkinson, J. (1974). Blastocyst differentiation *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 39:243-49.