



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“EFECTO DE DIVERSAS CONCENTRACIONES  
DE GLUCOSA SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA  
METALOPROTEINASA DE LA MATRIZ  
EXTRACELULAR 9 (MMP-9) EN BLASTOCISTOS  
DE RATÓN EN CULTIVO.”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

**P R E S E N T A:**

**ALEJANDRA SÁNCHEZ SANTOS**

Director de Tesis: Dr. Luis Arturo Baiza Gutman



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

A los apoyos recibidos por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca No. 210446 y por la UNAM a través de la beca Fomento a la Graduación 2009

## **AGRADECIMIENTOS**

A los miembros del Comité Tutoral y miembros del Jurado quienes enriquecieron este trabajo con sus conocimientos, observaciones y consejos. Gracias por su apoyo y su tiempo.

Dr. Luis Arturo Baiza Gutman

Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza

Dra. Maricela Villagran Santa-Cruz

Dra. Juana Alba Luis Díaz

Dr. Diego Arenas Aranda

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Dios, por darme la oportunidad de existir y de conocer día a día las maravillas que se presentan en la vida.

A mis padres, gracias por el apoyo y cariño incondicional que siempre me han brindado. Todos los logros que he tenido hasta ahora han sido gracias a su respaldo y este no podía ser la excepción. Los quiero mucho.

A mis hermanas Elizabeth y Azucena, quienes día a día descubro cuanto me quieren, por apoyar siempre mis ideas y actos. Gracias por creer en mí...!!!

A mis sobrinos Valeria y Sebastian, porque siempre aprendo algo de cada uno. Gracias por existir... los quiero... !!!

Quiero agradecer a toda mi familia, que siempre está en mi corazón, son la fuerza de mi vida: a mi tía Araceli y mi tío Arturo, mis primos Aldo, Cinthia y Jessica, a Doña Luisa que es parte de esta gran familia y que siempre me ha dado el apoyo y el cariño para seguir adelante.

A Juan Carlos, porque desde que llegaste a mi vida, la has llenado de luz y amor, porque tú compañía me ha dado fuerzas para empezar a hacer realidad mis sueños, eres mi apoyo y mi seguridad. Te quiero...!!!

A mis amigas incondicionales Blanca y Lorena que siempre me apoyan haga lo que haga, escuchan y comparten mis alegrías y tristezas...por su confianza, se que siempre puedo contar con ustedes y porque a pesar del tiempo y la distancia seguimos unidas. Gracias por todo, saben que son importantes en mi vida...!!!

A mis amigos y compañeros de carrera: Néstor, Miguel, José Luis, Noé, Stephanie, Diana, Belem, Enrique, Lulú, Anita, y a todos los que me faltaron por los grandes momentos que pasamos juntos...!!! Gracias por ayudarme a ser una mejor persona.

A mis compañeros y amigos de la Maestría: Laura, Goyo, David, Beta y Héctor, quienes con su dedicación y conocimiento me ayudaron a salir adelante. Gracias por su apoyo, comprensión y cariño.

A Alejandro, por el apoyo que me has brindado desde que llegue al laboratorio y por enseñarme a hacer mi mejor esfuerzo. Gracias por tu amistad, cariño y ánimo...!!!

Al Dr. Luis Arturo Baiza Gutman, gracias por la oportunidad de realizar este trabajo bajo su dirección y por todas sus enseñanzas.

A la maestra Lupita por el apoyo, cariño y confianza que me ha brindado desde que llegue al laboratorio y empecé este proyecto.

*“La vida esta llena de sueños, pero con trabajo y esfuerzo, podemos hacerlos realidad...”*

## ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	3
RESUMEN .....	4
ABSTRACT .....	5
INTRODUCCIÓN .....	6
<b>IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA</b> .....	6
<b>IMPLANTACIÓN IN VITRO</b> .....	10
<b>MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)</b> .....	11
<b>DEGRADACIÓN DE LA MEC</b> .....	12
<b>SISTEMA PLASMINÓGENO/PLASMINA</b> .....	14
<b>ESTRUCTURA DE LAS MMPs</b> .....	18
<b>REGULACIÓN DE LAS MMPs</b> .....	20
<b>GELATINASAS (MMP-2 Y MMP-9)</b> .....	22
<b>MMP-9</b> .....	23
<b>HIPERGLUCEMIA</b> .....	24
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	28
HIPÓTESIS .....	28
OBJETIVO GENERAL .....	28
METODOLOGÍA .....	29
RESULTADOS .....	31
DISCUSIÓN .....	45
CONCLUSIONES .....	49
BIBLIOGRAFÍA .....	50

## ABREVIATURAS

AGEs	Productos de glicación avanzada
BSA	Albúmina de suero bovino
CTGF	Factor de crecimiento de tejido conectivo
DEG	Día equivalente de gestación
ERO	Especies reactivas de oxígeno
MCI	Masa celular interna
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteinasas de la matriz extracelular
MMP-9	Metaloproteinasa de la matriz extracelular
NF- $\kappa$ β	Factor nuclear $\kappa$ β
PAI-1	Inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1
p-NA	para-nitro anilina
SZP	Sin zona pelúcida
TIMPs	Inhibidores de las metaloproteinasas de la matriz extracelular
TIMP-1	Inhibidor tisular de las metaloproteinasas tipo 1
tPA	Activador del plasminógeno tipo tisular
uPA	Activador de plasminógeno tipo uroquinasa
TGF-β1	Factor de crecimiento transformante β1
TNF-α	Factor de necrosis tumoral-α
ZP	Zona pelúcida

## RESUMEN

Se define a la implantación embrionaria como la fijación del embrión al endometrio materno, en ella el blastocisto penetra a distintas profundidades de la pared uterina, por un proceso conocido como invasión. Durante la penetración del endometrio por el trofoblasto del embrión, participan algunas enzimas proteolíticas que degradan a la matriz extracelular (MEC) y que se producen tanto por el blastocisto como por los tejidos uterinos, entre ellas se encuentran la metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs), como la gelatinasa B (MMP-9) y el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA). La hiperglucemia altera la expresión de las MMPs debido a que aumenta el estrés oxidativo e induce la formación de productos de glicación avanzada o AGEs en las proteínas de la MEC promoviendo cambios en su función biológica. Estudios recientes han demostrado que concentraciones altas de glucosa en diferentes tipos celulares producen cambios en la síntesis y degradación de la MEC. La hiperglucemia provoca en algunas células, una reducción en las actividades de las MMPs, sin embargo en otras células, como las endoteliales, altas concentraciones de glucosa inducen la expresión y actividad de MMP-9, mientras que no afectan la secreción de MMP-9 en células de trofoblasto humano; por lo que existen controversias en cuanto a la activación y/o inhibición de la expresión o actividad de MMP-9 por altas concentraciones de glucosa en diferentes tipos celulares. La invasión del epitelio uterino por el blastocisto durante su implantación es promovida por la MMP-9 y cualquier cambio en la concentración de glucosa puede alterar la capacidad invasiva del embrión. Por lo que en el presente trabajo se evaluó el efecto de la glucosa sobre la secreción y contenido de MMP-9, así como la secreción de activadores del plasminógeno durante el desarrollo de blastocistos de ratón *in vitro*, en presencia de diferentes concentraciones de glucosa (6, 10, 20, 40, 60 y 80 mM). Los blastocistos se cultivaron al día 4 de gestación, y después de 5 días en cultivo (día 9 equivalente de gestación), se realizaron zimogramas en gelatina del medio condicionado y lisados embrionarios y la zona de actividad fue valorada por densitometría. La capacidad activadora del plasminógeno se evaluó en el medio condicionado, agregando plasminógeno y evaluando su conversión a plasmina, midiendo esta última por un ensayo amidolítico empleando un sustrato cromogénico específico (D-Val-Leu-Lis-4-nitranilina), determinando la liberación de p-nitroanilina a 405 nm, en función del tiempo, utilizando un lector de placas. El aumento en las concentraciones de glucosa disminuyó el contenido de MMP-9, especialmente en 40 mM. La producción de plasmina fue mayor en concentraciones altas de glucosa (10, 20 y 40 mM). La disminución en la secreción y contenido de MMP-9 y el aumento en la producción de plasmina por los blastocistos de ratón a altas concentraciones de glucosa puede deberse al aumento en el estrés oxidativo que incrementa la expresión de algunas citocinas como TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  y CTGF.

## ABSTRACT

Embryo implantation is defined as the acquisition of a fixed position of the embryo into maternal endometrium, the blastocyst penetrates at different depths of the uterine wall by a process known as invasion. During the penetration of the endometrium by the trophoblast of the embryo are involved some proteolytic enzymes that degrade the extracellular matrix (ECM), which are produced by both, the blastocyst and uterine tissues, among them are the extracellular matrix metalloproteinases (MMPs), as gelatinase B (MMP-9) and urokinase-type plasminogen activator (uPA). Hyperglycemia alters the expression of MMPs, because it increases oxidative stress and induces the formation of advanced glycation end products or AGEs in the ECM proteins promoting changes in their biological function. Recent studies have shown that high glucose levels in different cell types induce changes in the synthesis and degradation of ECM. Hyperglycemia causes a reduction in the activities of MMPs, however in endothelial cells high glucose concentrations induce the expression and activity of MMP-9, while not affects the secretion of MMP-9 in human trophoblast cells; since there are controversies regarding the activation and/or inhibition of MMP-9 expression or activity by high glucose concentrations in different cell types. The invasion of the uterine lining for implanting blastocyst is promoted by MMP-9 and any changes in glucose concentration can alter the invasive capacity of the embryo. In the present study the effect of glucose on the secretion and content of of MMP-9, as well as plasminogen activators during the development of mouse blastocysts in vitro were evaluated, in the presence of different concentrations of glucose (6, 10, 20, 40, 60 and 80 mM). 4 day blastocysts were cultured for 5 days (day 9 equivalent of gestation), gelatin zymograms were performed in conditioned medium or cell lysates and the area of activity was assessed by densitometry. The hability of conditioned medium to activate plasminogen was evaluated by measure plasmin activity after the addition of plasminogen, by an amidolytic assay, using a specific chromogenic substrate D-Val-Leu-Lys-4-nitranilide and determining the release of p-nitroaniline at 405 nm, versus time using an plate reader. The increase in glucose concentrations decreased the content of MMP-9, especially when glucose 40 mM was used. The plasmin production was higher in high glucose concentrations (10, 20 and 40 mM). The decreased secretion and content of MMP-9 and increased plasmin activation in mouse blastocysts by high concentrations of glucose can be associated to increased expression of some cytokines, like TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  or CTGF associated with enhanced oxidative stress.

## INTRODUCCIÓN

### 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, 2006). La compactación lleva a la primera diferenciación celular; ya que las células que se localizan hacia en la parte externa de la mórula formarán al trofotodermo, tejido que recubre al blastocisto, y que 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 (ZP). 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, 2003; Salas-Vidal y Lomelí, 2004).

En el útero, los blastocistos se distribuyen uniformemente en los cuernos uterinos, se liberan de la ZP, por la acción de algunas proteasas, como la estripsina (Rosenfeld y Joshi, 1977), y se implantan en el endometrio (figura 1).

Se define a la implantación embrionaria como la fijación del embrión al endometrio materno, en ella el blastocisto se adhiere al epitelio uterino y dependiendo de la especie, penetra a distintas profundidades de la pared uterina, por un proceso conocido como invasión (Carson *et al.*, 2000). El grado de invasión varía en diferentes especies y va desde la simple adhesión de los epitelios a la penetración de capas profundas del endometrio. La implantación es el proceso por medio del cual el blastocisto entra en íntimo contacto físico y fisiológico con el endometrio uterino (Dey *et al.*, 2004). Esta fase implantatoria es clave en los organismos que se desarrollan

dentro de la madre y cuya nutrición depende de ella (Flamigni *et al.*, 1991), además marca el inicio de una estrecha asociación entre tejidos de diferente constitución genética.

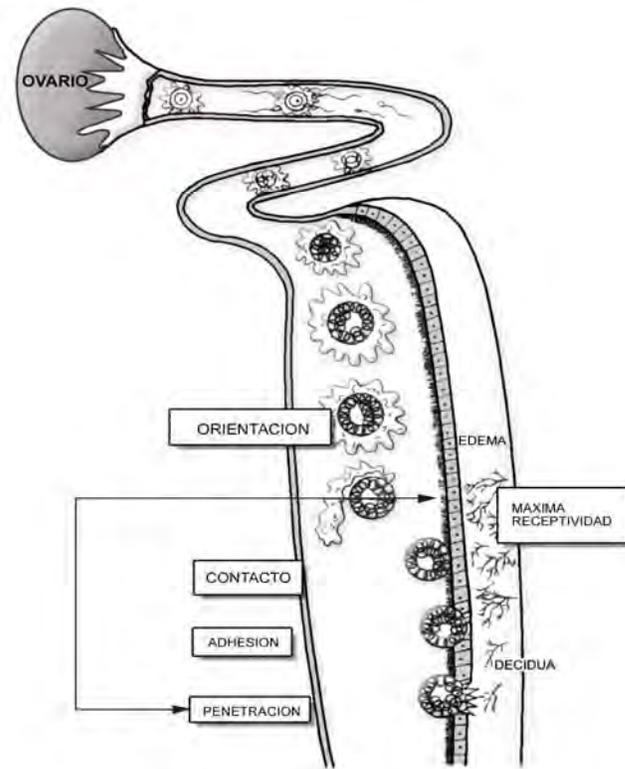


Figura 1.- El proceso de implantación, modificado de Baiza 1980.

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 *et al.*, 1993), formándose lo que se conoce como ventana de implantación (Liu *et al.*, 2005).

Según Enders (1970), en la 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 ZP.

3. Contacto o aposición.- Se refiere al simple acercamiento que se da entre las superficies del trofotodermo 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 trofotodermo 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 trofotodermo y del epitelio luminal uterino se interdigitan, en el ratón esto ocurre con el trofotodermo 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 *et al.*, 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 *et al.*, 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 *et al.*, 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.

La invasión del endometrio debe ser finamente controlada, debido al carácter altamente invasivo del trofoblasto. El tejido endometrial juega un papel importante; ya que, 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 *et*

*al.*, 1975; Gilbert *et al.*, 1997). La invasión es regulada por factores de crecimiento e involucra integrinas, proteasas y la actividad mecánica y fagocítica del blastocisto (Isaka *et al.*, 2003; Staun-Ram *et al.*, 2005). Durante la penetración participan algunas enzimas proteolíticas que degradan la matriz extracelular (MEC) y que se producen tanto por el blastocisto como por los tejidos uterinos, entre ellas se encuentran las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs) (Martínez-Hernández *et al.*, 2002; Nagase *et al.*, 2006) y el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) (Harvey *et al.*, 1995).

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). En la implantación *in Vitro*, el embrión realiza la ruptura y se libera de la ZP; 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 MCI 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 MCI (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 ZP 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 de suero bovino (BSA) (Salomon y Sherman, 1975). Para que el trofoblasto forme a las células gigantes del trofoblasto se requiere adicionalmente de aminoácidos (Gwatkin, 1966), éstas últimas al adquirir un fenotipo invasivo, interactúan con proteínas de la MEC, secretan enzimas proteolíticas y en presencia de un substrato adhesivo se extienden sobre él, formando una monocapa.

## **MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)**

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).

La MEC es todo aquel material que se encuentra en los tejidos o fuera de la célula y está compuesta por 3 clases de biomoléculas: las proteínas estructurales (colágena y elastina), las proteínas especializadas (fibronectina y laminina) y proteoglicanos (proteínas de gran tamaño a las que se les unen cadenas de azúcares como glicosaminoglicanos). Algunas de sus funciones son separar tejidos y órganos, a pesar de que en los años 60's sólo se creía que la MEC era una simple estructura para atrapar desechos y material residual, actualmente se sabe que es un sistema dinámico que está involucrado en diversas funciones: moduladora de crecimiento, migración celular, proliferación y diferenciación celular, apoptosis, reparación de tejidos, almacenamiento para factores de crecimiento, etc; por lo tanto la MEC desempeña una función fundamental en la arquitectura y en la regulación de la homeostasis tisular (Castillo *et al.*, 2004).

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 es una estructura dinámica lo cual implica un constante recambio de las proteínas y elementos que la conforman. Durante los procesos de diferenciación en el desarrollo embrionario o en procesos de migración celular, la remodelación se da de acuerdo a los requerimientos celulares. En tejidos adultos dicha remodelación ocurre en la neovascularización así como en los cambios que sufren las glándulas mamarias y el tejido uterino durante el ciclo menstrual (Streuli, 1999).

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 o ligandos específicos.

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 *et al.*, 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 helix”), 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: tipos XIII, XV, XVIII y XVII.

## **DEGRADACIÓN DE LA MEC**

La degradación de la MEC es un proceso fisiológico normal, que puede intensificarse o ser mas moderada en procesos patológicos. En condiciones normales está asociada con el crecimiento, cicatrización, morfogénesis, angiogénesis, migración celular, implantación del trofoblasto resorción uterina posparto, remodelación ósea, erupción dental, entre otras. (Mignatti, 1995).

La degradación de la MEC se relaciona también con algunos procesos patológicos, tales como la formación del granuloma, artritis reumatoide, enfermedad periodontal, aterosclerosis, entre otras. En estas condiciones se debe a la pérdida de homeostasia por una mayor producción anormal de proteínas o un aumento en la velocidad de recambio de estas (Goetzl *et al.*, 1996). Una degradación anormal pero regulada de la MEC, se observa en otras condiciones, como la invasión y metástasis de células neoplásicas (Stettler-Stevenson *et al.*, 1993)

Diversas enzimas proteolíticas juegan un papel importante durante diversos procesos celulares, al degradar, por hidrólisis total o parcial, a las proteínas de la MEC. Las proteasas, se clasifican por la naturaleza química del sitio catalítico, en cuatro grupos que son:

- Metaloproteasas.
- Serina-proteasas.
- Cisteína-proteasas.
- 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, esenciales para su actividad: la serina, la cisteína y el aspartato, respectivamente.

La remodelación de la MEC requiere de dos procesos antagónicos: síntesis y depósito de nuevos componentes de la MEC y la destrucción proteolítica de otros (Castillo *et al.*, 2004). 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 MMPs, enzimas que en conjunto degradan a casi todas las proteínas de la MEC (Visse y Nagase, 2003; Nagase *et al.*, 2006). La activación de las proenzimas de las MMPs pueden ser dependientes del sistema del activador del plasminógeno (sistema plasminógeno/plasmina), metaloproteinasas tipo membrana y catepsinas (Pardo y Selman, 1996).

Una serina proteasa que forma parte del sistema de activación plasminógeno/plasmina es la plasmina, esta proteína también actúa sobre varios componentes de la matriz extracelular como son: la fibrina, la colágena tipo IV y V, fibronectina, laminina y proteoglicanos. Además la

plasmina media indirectamente la degradación de la MEC por la activación de ciertas MMPs, entre ellas MMP-3, MMP-9, MMP-12 y MMP-13, que degradan colágenas tipo III y IV, procolágena tipo I, fibronectina, proteoglicanos y laminina entre otros ( figura 2; Sternlicht y Werb, 2001).

## **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 como la implantación embrionaria 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 *et al.*, 2005). El zimógeno es activado por los activadores del plasminógeno (PAs) tipo tisular (tPA) y uroquinasa (uPA). El corte de la cadena lineal del plasminógeno provoca un cambio en la conformación del sitio catalítico, que le confiere actividad enzimática sobre su substrato.

El plasminógeno en humanos se sintetiza como un polipéptido de 810 aminoácidos (aa), siendo su forma madura de 791, debido a que la secuencia líder de 19 aa se pierde cuando se secreta. En su estructura se presenta un propéptido de 77 aa. La cadena pesada de la plasmina se compone de 5 dominios “kringle”, de aproximadamente 80 aa 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 substratos como el fibrinógeno, proteínas bacterianas y de superficies celulares en mamíferos (Miles *et al.*, 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. La plasmina en solución es rápidamente inhibida por la  $\alpha$ 2-antiplasmina formando un complejo covalente (Rouy *et al.*, 1990). Otros inhibidores de la plasmina son: aprotinina y  $\alpha$ 2-macroglobulina.

Los activadores del plasminógeno, tanto el tPA como el uPA, pertenecen a la familia de las serina proteasas. El tPA está formado por una cadena polipeptídica de 530 aa. Cuando se forma un coágulo, el plasminógeno plasmático se une a la fibrina, y de esta manera es activado rápidamente por el tPA (Castillo-Trápala, 2007). 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 crecimiento epidérmico en su porción amino terminal, 3 dominios kringle y el de serina-proteasa en el extremo carboxilo terminal (Parfyonova *et al.*, 2001). 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 corta la cadena polipeptídica, se origina una proteína de dos cadenas unidas por un puente disulfuro, el uPA así formado incrementa su actividad catalítica hasta en un 300% (Lijnen *et al.*, 1998).

Algunas células sintetizan sólo un tipo de activador del plasminógeno, mientras que otras pueden sintetizar ambos (Vassalli *et al.*, 1984; Pepper *et al.*, 1993). Se piensa que el tPA se sintetiza principalmente cuando es necesaria la fibrinólisis, además de ser una proteína sérica (Ware *et al.*, 2005), mientras que la síntesis del uPA está asociada con migración celular y remodelación tisular (metástasis, implantación, angiogénesis y organogénesis) (Vassalli *et al.*, 1984). En el proceso de fibrinólisis por lo general está implicado tPA, mientras que uPA participa en la remodelación de la MEC en los tejidos (Filippov *et al.*, 2005). Por lo tanto, la activación del plasminógeno se lleva a cabo bajo dos esquemas, uno en donde principalmente actúa tPA y en el otro uPA. En el segundo esquema, el uPA se encuentra unido a la MEC o forma un complejo con su receptor en la superficie de las células (complejo uPA-uPAR) (Herrmann *et al.*, 2006). El complejo uPA-uPAR permite que el plasminógeno sea convertido a plasmina por uPA en forma mas eficiente y que la plasmina a su vez degrade componentes de la MEC como las fibras de colágena y algunos inhibidores de las metaloproteasas (TIMPs) (Tsai, 2006).

A nivel fisiológico el uPA y el tPA son inhibidos por los llamados inhibidores de los activadores del plasminógeno tipo 1, 2 y 3 (PAI-1, PAI-2 y PAI-3), con los cuales forman complejos que bloquean el sitio catalítico de las enzimas activas, algunos autores sugieren que estos complejos pueden ser covalentes (Behrendt *et al.*, 2003) aunque reversibles (Manchanda *et al.*, 1995). Adicionalmente la degradación de la MEC mediada por plasmina es controlada por, la inactivación de plasmina mediante la unión de las proteínas  $\alpha$ -2-antiplasmina ( $\alpha$ -2-AP) o el

inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina (TAIF) (Brown *et al.*, 2003).

PAI-1 juega un papel muy importante en varios procesos celulares como angiogénesis, homeostasis e invasión de células tumorales. Esta proteína es el principal inhibidor de uPA y tPA. La interacción PAI-1-uPA provoca la inhibición de la actividad proteolítica del uPA, por lo tanto no transforma el plasminógeno en plasmina (figura 2). Así PAI-1 e al inhibir la degradación de la MEC mediada por plasmina, está involucrada en un gran número de patologías como son diabetes tipo 2 y cáncer (Libby, 2000; Hayden *et al.*, 2005).

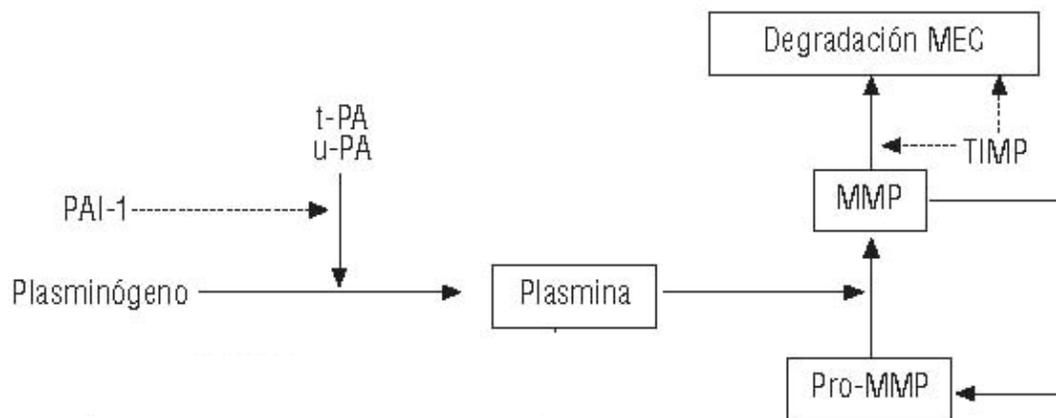


Figura 2. Representación esquemática del papel de las metaloproteasas en la degradación de la MEC regulada por el sistema plasminógeno/plasmina. MEC: matriz extracelular; MMP: metaloproteasa; PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1; TIMP: inhibidores tisulares de metaloproteasas; t-PA: activador tisular del plasminógeno; u-PA: urocinasa. (Modificado de Lijnen, 2002).

El sistema del 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. En embriones peri-implantacionales de ratón y humano se produce y secreta una gran cantidad de uPA, por parte del trofotodermo, debido a su carácter altamente invasivo (Aflalo *et al.*, 2004; Coulam *et al.*, 2006) 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 (Zhang *et al.*, 1996).

## METALOPROTEINASAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR (MMPs)

Las MMPs intervienen en la mayoría de los procesos fisiológicos que requieren la remodelación de la MEC, como el crecimiento celular, angiogénesis, respuesta inmune e implantación embrionaria, además tienen un papel bien definido en procesos celulares diversos como la proliferación y la apoptosis. Además de esta función reparadora y de remodelación (reabsorción ósea, recambio endometrial, etc.), la presencia de niveles elevados de algunas MMPs se ha asociado a la destrucción tisular en una amplia variedad de procesos patológicos como diseminación de tumores, artritis, formación de aneurismas, aterosclerosis, etc. (Shapiro, 1998).

Las MMPs también llamadas matrixinas, son proteinasas que participan en la degradación específica de los distintos elementos de la MEC, bajo condiciones fisiológicas normales, la actividad de las MMPs es regulada a distintos niveles, que incluyen la síntesis, secreción de zimógeno, así como su interacción con sus inhibidores (TIMPs). Una pérdida en el control de su actividad puede resultar en enfermedades tales como la artritis, cáncer, arterioesclerosis, aneurisma, nefritis, úlceras tisulares y fibrosis, entre otras (Visse y Nagase, 2003)

Las MMPs son enzimas que muestran dominios funcionales (figura 3) y mecanismos de activación comunes; son endopeptidasas dependientes de  $Zn^{+}$  y  $Ca^{+}$  que son activas a pH neutro. Cuando se secretan están como proenzimas y son procesadas a su forma activa por la eliminación del propéptido amino terminal. El propéptido confiere latencia a la enzima, la disrupción de esta interacción dispara el mecanismo denominado “switch de cisteína” y la enzima es activada.

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

1. Colagenasas intersticiales: incluye 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 ó 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. Estromelisinias: estromelisinias 1(MMP-3) y 2 (MMP-10), degradan varios componentes de la MEC, además la MMP-3 activa a otras metaloproteasas, por ejemplo a la MMP-9.
4. Matrilisinias: 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 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 glicosilfosfatidilinositol (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 ó MMP-20: degrada 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 la MEC.

## **ESTRUCTURA DE LAS MMPs**

La estructura de todos los miembros en general es muy similar, es una secuencia de aminoácidos, que se encuentra conformada de la siguiente manera: (figura 3) (Castillo *et al.*, 2004; Pardo, 2008).

- **Prodominio:** conformado por un péptido señal y un propéptido, típicamente de 80 aminoácidos y con una secuencia consenso PRCXXPD (donde X denota cualquier aminoácido), conteniendo un residuo de cisteína que interactúa con el zinc catalítico mediante el grupo tiol. La estructura del prodominio para MMP-2, MMP-3 y MMP-9 consiste en 3  $\alpha$ -hélices con lazos de unión (Visse y Nagase, 2003).
- **Dominio o sitio catalítico:** constituido por alrededor de 170 aminoácidos y un sitio activo que se une al  $Zn^{2+}$  por tres residuos de histidina conservados en la secuencia HEXXHXXGXXH/TXXXXXM, también contiene una metionina conservada en el lado carboxilo del sitio de unión al zinc, que forma una estructura “Met-vuelta” (Nagase y Woessner, 1999). Una base que soporta la estructura alrededor del zinc catalítico. El ligando del zinc catalítico es una molécula de agua. El ácido glutámico adyacente a la primera histidina es esencial para la catálisis. El dominio catalítico contiene dos iones de zinc y al final un ión calcio coordinado a varios residuos. Uno de los dos iones de Zn está presente en el proceso catalítico de las MMPs, el otro es conocido como zinc estructural. El ión de calcio está presente en el dominio catalítico aproximadamente a  $12^{\circ}A$  del Zn catalítico; éste es esencial para que se realice la actividad proteolítica de las MMPs.
- **Dominios adicionales:** en su gran mayoría las MMPs tienen dominios adicionales, su importancia radica en el reconocimiento del sustrato y su unión con los TIMPs. Algunos de ellos son las llamadas regiones de hemopexina y fibronectina. El dominio hemopexina, conocido así por que muestra una gran similitud con la proteína hemopexina, se encuentra hacia el carboxilo terminal (aproximadamente 210 aminoácidos) y tiene forma de disco elipsoidal. Este dominio tiene 4 hojas  $\beta$  plegadas, unidas por un puente disulfuro entre la hoja I y IV. El dominio hemopexina de MMP-9 forma un homodímero asimétrico alrededor de la hoja IV. Dependiendo de la MMP el dominio hemopexina es importante para la especificidad al sustrato y es requerido por pro-MMP-2 para la dimerización con MT1-MMP y la activación de la MMP-9 (Visse y Nagase, 2003).

- **Región bisagra o hendidura para furina:** sitio específico para la ruptura o modificación estructural de la proteasa.



Figura 3. Estructura de las MMPs. Están formadas por diversos dominios: S, péptido señal; Pro, propéptido; Cat, dominio catalítico; Zn, sitio activo de zinc; Hpx, dominio hemopexina; Fn, dominio de fibronectina; V, inserto de vitronectina; I, dominio transmembrana tipo I; II, dominio transmembrana tipo II; G, anclaje de GPI; Cp, dominio citoplasmático; Ca, región del arreglo de cisteína; Ig, dominio de inmunoglobulina. Un sitio de corte de furina es mostrado como una banda negra entre el dominio propéptido y catalítico (Visse y Nagase, 2003).

### REGULACIÓN DE LAS MMPs

En un tejido normal, la expresión de las MMPs es muy baja, sus niveles son casi indetectables; por lo que su regulación es altamente controlada y se dan en tres niveles: (Yong *et al.*, 2001; Ethell *et al.*, 2007; Pardo, 2008)

- **Nivel transcripcional**
- **Activación de proenzimas**
- **Inhibidores**

### **Nivel transcripcional**

Pueden ser activadas por respuesta a factores de crecimiento, citocinas y hormonas. Los promotores de las MMPs contienen elementos cis que permiten la regulación de la expresión génica por trans-activadores incluyendo a la proteína activadora 1 (AP-1), al factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) y a la proteína de unión del amplificador A del poliovirus (PEA) entre otros (Yan y Boyd, 2007).

La composición de los promotores de las MMP-2 y MMP-9 son diferentes; ya que MMP-9 contiene una caja TATA aproximadamente a -30 pb (relativos al sitio de inicio de la transcripción), un sitio de unión a AP-1 a -70 pb y corriente arriba adyacente a este último, un sitio de unión PEA<sub>3</sub> con el que actúa en forma cooperativa, todo lo anterior contribuye a que su expresión pueda ser fuertemente inducida por una gran variedad de citocinas y factores de crecimiento incluyendo interleucinas, interferones, EGF, VEGF, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ . Por su parte en el promotor de la MMP-2 la transcripción puede iniciar en diferentes sitios y su expresión está determinada por la familia de los factores de transcripción Sp-1, que se unen a una caja GC proximal, es prácticamente constitutiva, siendo solo ligeramente inducible por factores de crecimiento o citocinas (Yan y Boyd, 2007).

### **Activación de proenzimas**

La mayoría de MMPs son secretadas como zimógenos y para su activación es necesaria la liberación del propéptido con la subsiguiente exposición del sitio catalítico, por ende la activación se logra por la acción de enzimas, que pueden ser otras MMPs o serían proteasas como la plasmina (Castillo *et al.*, 2004). El propéptido contiene una secuencia conservada (PRCGXPD), en donde la cisteína está coordinada con el ión zinc. Se ha demostrado que el paso primordial en la activación de la forma latente de las MMP se basa en el mecanismo 'llave' de la cisteína, de manera que la proteólisis y la escisión del propéptido iniciada por proteinasas tisulares o plasmáticas desestabiliza la unión Cis-Zn<sup>2+</sup> y convierten la MMP en su forma activa (Sternlicht y Werb, 2001).

Para algunas MMPs el activador fisiológico principal es la plasmina generada a partir del plasminógeno por el tPA unido a la fibrina o por el uPA unido a su receptor de la superficie

celular (Mazzei *et al.*, 1997). Varios tipos de células, entre ellas las musculares lisas, las endoteliales y las implicadas en la remodelación de los tejidos, especialmente los macrófagos, expresan uPA y sus receptores (Estreicher *et al.*, 1990).

Así, las MMPs son activadas por otras proteasas, cambios conformacionales causados por calor, agentes desnaturizantes, unión al sustrato, metales pesados, organomercuriales como el ácido acetato fenil mercúrico (APMA), oxidantes y agentes alquilantes (Björklund y Koivunen, 2005).

### **Inhibidores de las MMPs**

Los inhibidores fisiológicos de las MMPs son la  $\alpha$ 2-macroglobulina y los TIMPs, de los últimos hay 4 miembros reconocidos TIMP-1 al TIMP-4, éstos se unen al sitio catalítico evitando su activación (y de forma menos específica a la  $\alpha$ 2-macroglobulina). Actualmente se reconoce que estos inhibidores participan en procesos como proliferación y muerte celular. Los TIMPs se unen a las MMPs de forma irreversible en una razón molar de 1:1, por lo que el nivel neto de actividad proteolítica dependerá de las concentraciones relativas de MMP activas y sus inhibidores, además, los TIMPs poseen propiedades reguladoras del crecimiento celular. A pesar de que los TIMPs tienen cierta similitud estructural, entre ellos, existen diferencias en su especificidad, así TIMP-1 resulta particularmente importante en la regulación de la actividad de MMP-9 y TIMP-2 para el control de la actividad de MMP-2 (Loftus y Thompson, 2002). TIMP-3 a diferencia de TIMP-1 y TIMP-2, puede inducir apoptosis celular cuando es sobreexpresado en las células musculares lisas vasculares y de esta forma, estar implicado en la patogenia de la aterosclerosis (Baker *et al.*, 1998).

### **GELATINASAS (MMP-2 Y MMP-9)**

Las gelatinasas tienen una gran importancia; debido a que degradan colágena tipo IV, uno de los principales componentes de las membranas basales y elastina, a diferencia de las otras MMPs, presentan tres repeticiones de dominios de fibronectina tipo II, insertados entre la quinta hebra  $\beta$  y el sitio catalítico, adicionalmente la MMP-9 contiene una inserción similar a colágena V. Las dos estructuras del dominio de fibronectina consisten en dos hojas  $\beta$  antiparalelas, conectadas por una pequeña  $\alpha$ -hélice y estabilizadas por dos uniones disulfuro,

que tiene alta afinidad para unirse a la gelatina y elastina (Yong *et al.*, 2001; Visse y Nagase, 2003).

La regulación de la activación de la MMP-9 es más complejo que el de las otras MMPs debido a que la mayoría de las células no expresan una forma constitutivamente activa de MMP-9, pero su actividad es inducida por diferentes estímulos en función del tipo de célula (Dubois *et al.*, 2000).

### MMP-9

La MMP-9 o gelatinasa B (figura 4), como se ha mencionado anteriormente degrada gelatina y también escinde la cadena  $\alpha 2$  de la colágena tipo I, además de degradar a colágenas tipos III, IV y V, elastina, fibronectina, entactina y la proteína de unión al cartílago. También activa al TGF- $\beta$ , además escinde el receptor  $\alpha$  de la interleucina-2 (IL-2) (Visse y Nagase, 2003). Su peso molecular es de 92 kDa (Castillo *et al.*, 2004; Dzwonek *et al.*, 2004).

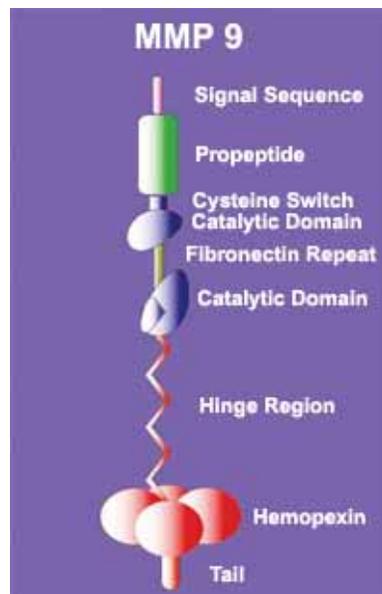


Figura 4. Estructura de MMP-9

El estado de activación en el que se encuentra MMP-9 es trascendente, como proenzima se une con mayor afinidad a colágena tipo I y a gelatina y con menor afinidad a colágena tipo IV en comparación a la MMP-9 en estado activo (Allan *et al.*, 1995).

La MMP-9 está asociada con la invasión y la metástasis, pero también ha sido implicada en la angiogénesis, la artritis reumatoide, la retinopatía y estenosis vascular; por lo tanto la MMP-9 se considera como una de las principales proteínas implicadas en diversas patologías (Folkman, 1999). La sobreexpresión de MMP-9 aumenta la invasión, crecimiento y angiogénesis en cáncer de mama (Mira *et al.*, 2004).

La presencia en el promotor del gen de la MMP-9 de sitios de unión a NF- $\kappa$ B y AP-1, conduce a que su expresión sea sensible a los cambios redox, mecanismo por el cual la glucosa induce estrés oxidativo y puede regular la transcripción y actividad de MMP-9 (Uemura *et al.*, 2001).

La MMP-9 es secretada abundantemente por el blastocisto de ratón durante la implantación embrionaria (Fata *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001, Zhang *et al.*, 2004), siendo producida por las células del trofoblasto primario *in vivo* e *in vitro* (Harvey *et al.*, 1995; Alexander *et al.*, 1996). Diversos estudios indican que esta enzima actúa como el principal regulador de la degradación de la MEC durante la implantación (Whiteside *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2001, Zhang *et al.*, 2004).

Factores de crecimiento, citocinas y proteasas son sintetizadas por el embrión preimplantacional y pueden mejorar o aumentar la receptividad uterina. Por esta razón el establecimiento del embarazo en mamíferos depende entre muchas causas de la secreción de proteínas específicas como las MMP-9 (Xu *et al.*, 2001). Se sabe que el genoma embrionario en humanos comienza a activarse entre el estadio de 4 a 8 células por lo que la detección de mRNA de MMP-9 sugiere que esta metaloproteasa está entre los primeros genes transcritos en el embrión preimplantacional (Wang *et al.*, 2003).

## **HIPERGLUCEMIA**

La hiperglucemia se define como concentración elevada de glucosa en sangre (mayor a 120 mg/dl), mientras que la concentración fisiológica de glucosa en sangre es de aproximadamente 75-110 mg/dl (4-6 mM). Las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus se correlacionan bien, en la mayoría de los casos, con la severidad y duración de la hiperglucemia, por ejemplo niveles de glucosa superiores a 11 mM se asocian más frecuentemente con las complicaciones renales, retinianas y neurológicas.

La diabetes tipo I durante el embarazo o diabetes gestacional, se ha asociado con un cambio en el metabolismo de la glucosa que afecta a la implantación del embrión y alteraciones en los niveles de glucosa están asociados con un desarrollo anormal del feto (Belkacemi *et al.*, 2005). El efecto de la concentración de glucosa local en la invasión del trofoblasto ha sido poco estudiado, además de que la concentración de glucosa en la interface fetal-maternal no se conoce (Belkacemi *et al.*, 2005), como referencia, en el ratón la concentración de glucosa en el oviducto es de  $5.10 \pm 0.20$  mM (Gardner y Leese, 1990).

Los cambios metabólicos derivados de las concentraciones altas de glucosa promueven estrés oxidante, debido al aumento en la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y a la disminución de los sistemas de defensa antioxidantes. Se han descrito varias rutas metabólicas vinculadas con el estrés oxidante causado por altas concentraciones de glucosa, entre ellas las más estudiadas son la ruta del sorbitol, la de la glicosilación no enzimática de proteínas o glicación, que genera productos de glicación avanzada (AGEs), la autooxidación de glucosa, la modificación de la actividad de la protein-cinasa C (PKC) y la alteración en la producción y secreción de citocinas (Robertson *et al.*, 2004).

Las ERO actúan sobre las proteínas oxidando preferentemente aminoácidos con estructura cíclica y como consecuencia se da el entrecruzamiento de cadenas peptídicas, fragmentación de proteínas y formación de grupos carbonilo, con lo cual se impide el desarrollo normal de las funciones de las diversas proteínas (Urso y Clarkson, 2003).

La glicación es un proceso espontáneo, no enzimático en el que la glucosa y otros carbohidratos reaccionan con las proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, involucra la condensación de aldehídos, cetonas y azúcares reductores con grupos aminos, que a través de una serie de reacciones secuenciales y paralelas conduce a la formación de AGEs y a la agregación de proteínas. La hiperglucemia crónica acelera la formación y acumulación de estos compuestos con el subsiguiente deterioro de las funciones tisulares asociados con el envejecimiento y la diabetes (Monnier *et al.*, 2005). Todo ello conduce a que la hiperglucemia afecte los procesos de remodelación tisular y los sistemas enzimáticos implicados.

## 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 (Björklund y Koivunen, 2005; Nagase *et al.*, 2006), participando el último, en parte, a través de la activación de diversas MMPs.

Los mecanismos que conducen a la activación de las MMPs son claves en la remodelación tisular, entre sus activadores fisiológicos potenciales, se incluyen a la plasmina, MT-MMP-1, y MMP-3 (Werb y Sterlincht, 2001; Nagase *et al.*, 2006). En un tiempo se pensó que la MMP-3 o estromelina 1 era su principal activador, sin embargo la eficiencia de la activación de MMP-9 por el sistema plasminógeno/plasmina aumenta 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 *et al.*, 1998).

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 (Behrendtsen *et al.*, 1992; Baiza-Gutman *et al.*, 2002; Martínez-Hernández *et al.*, 2002). Ambas son expresadas por el tejido responsable de la invasión al endometrio, el trofoblasto, tanto en cultivo como *in situ* (Das *et al.*, 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 esta última 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 *et al.*, 1999; Whiteside *et al.*, 2001).

Los embriones peri-implantacionales de ratón en cultivo, en ausencia de factores séricos o de matrigel, solo secretan el zimógeno de la MMP-9, por lo que factores exógenos al sistema embrionario son requeridos para su activación, entre ellos, podemos considerar al plasminógeno, enzimas proteolíticas, factores del crecimiento y estrés oxidante, entre otros, así la adición de plasminógeno exógeno conduce a la activación de la MMP-9 por blastocistos

de ratón en cultivo (Martínez-Hernández *et al.*, 2005; Castillo Trápala, 2007). Es posible que el aumento en la concentración de glucosa característico de la diabetes influya sobre la expresión y activación de la MMP-9 y por tanto en la degradación de la MEC durante la implantación.

Altos niveles de glucosa pueden aumentar las ERO como resultado de su auto-oxidación o de la glicación, produciéndose además AGEs que alteran la estructura y función de proteínas (Díaz-Flores *et al.*, 2006). A su vez la expresión de MMP-9 es regulada por estrés oxidante causado por altos niveles de glucosa (Rajagolapan *et al.*, 1996, Kamada *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007).

En embriones pre-implantacionales de ratón *in vivo* e *in vitro*, concentraciones altas de glucosa (30 y 50 mM) disminuyen la expresión de sus transportadores GLUT 1, 2 y 3 en el blastocisto, a nivel de mRNA y proteína, lo cual conduce a una baja disponibilidad de la glucosa para los requerimientos energéticos del embrión (Moley y Mueckler, 2000; Moley, 2001) y subsecuentemente apoptosis al aumentar la expresión de la proteína Bax, un miembro de la familia proapoptótica Bcl-2 (Keim *et al.*, 2001; Vander-Heiden *et al.*, 2001; Chi *et al.*, 2002, Fraser *et al.*, 2007).

La acción de la glucosa a altas concentraciones sobre la expresión de MMP-9 en células o tejidos en cultivo es dependiente del tipo celular o de las condiciones experimentales, así en trofoblasto humano no afecta la secreción de MMP-9, pero sí disminuye la actividad de uPA y por lo tanto reduce la invasividad de este tejido (Belkacemi *et al.*, 2005); en cambio se le ha encontrado una acción inhibitoria en la expresión y actividad de MMP-9 en células endoteliales (McLenan *et al.*, 2004; Gharagozlian *et al.*, 2006; Lan *et al.*, 2008) y en la actividad de esta enzima en embriones de rata (Doung Van Huyen, *et al.*, 2007), por otra parte en podocitos (Bai *et al.*, 2006) y células del músculo liso vascular induce la expresión y activación de MMP-9 (Death *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2007).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Estudios recientes han demostrado que altas concentraciones de glucosa en diferentes tipos celulares producen cambios en la síntesis y degradación de la MEC (McGinn *et al.*, 2004; Volg-Willins y Edwards, 2004; Bai *et al.*, 2006; Ko *et al.*, 2006). La hiperglucemia altera la expresión de las MMPs y uPA debido a que aumenta el estrés oxidante e induce la formación de AGEs, los que contribuyen a la oxidación y modificación química de las proteínas de la MEC promoviendo cambios en su función biológica (Ha y Lee, 2005; Wolf *et al.*, 2005; Bai *et al.*, 2006). La invasión del endometrio uterino por el blastocisto durante su implantación es promovida por la MMP-9 y uPA, por lo que cualquier cambio en la concentración de glucosa puede alterar la expresión y estado de activación de estas enzimas y por lo tanto la capacidad invasiva del embrión.

## **HIPÓTESIS.**

Altas concentraciones de glucosa afectan la expresión de MMP-9 y activadores del plasminógeno en embriones peri-implantacionales de ratón en cultivo.

## **OBJETIVO GENERAL.**

Evaluar el efecto de la glucosa sobre la expresión de MMP-9 y PAs en blastocistos de ratón *in vitro*.

## **METODOLOGÍA**

### **Obtención y cultivo de blastocistos de ratón.**

Se utilizaron ratonas hembras vírgenes CD-1, de 6 semanas, que se indujeron a superovular por la aplicación 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) (Intervet) por la misma vía, posteriormente se aparearon con machos de la misma cepa y al día siguiente se revisó la presencia del tapón vaginal, indicando el día 1 de gestación.

Los blastocistos fueron colectados en el día 4 de gestación y cultivados en placas de cultivo de 96 pozos, en cada pozo se colocaron 100 µl de medio RPMI suplementado con BSA al 0.1% y antibióticos (penicilina G 100U/ml y estreptomycin 100 µg/ml) o medio HAM-F10 con los mismos suplementos mas lactato de calcio (BMP-biomedicals) 0.2452 g/L (Armant, 2006), empleando diferentes concentraciones de glucosa (6, 11, 20, 40, 60 y 80 mM). Las cajas fueron pre-equilibradas al menos por 2 h en la incubadora de CO<sub>2</sub> (37 °C en una atmósfera húmeda y con 5% de CO<sub>2</sub>, Napco). Se cultivaron 20 blastocistos por poza. El medio condicionado fue obtenido por aspiración al día 9 EDG (después de 5 días a partir de la obtención y cultivo de blastocistos al día 4 de gestación), posteriormente los embriones se desprendieron con un bastón de vidrio hecho a partir de un capilar y pulido a la llama, los embriones fueron agrupados, lavados 5 veces con PBS y lisados en amortiguador de muestra para electroforesis.

### **Análisis del contenido de gelatinasas por zimografía en geles copolimerizados con gelatina.**

Se corrieron alícuotas correspondientes a 6 o 12 embriones para el análisis del medio condicionado o los lisados embrionarios, respectivamente. Todas estas muestras se procesaron por electroforesis bajo condiciones no reductoras en geles de poliacrilamida-SDS al 10% conteniendo 1 mg/ml de gelatina de piel de porcino (G2625; Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo). Se corrieron a 4 °C, aplicando 15 mA/gel durante 2 h. 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 degradan gelatina se identificaron como zonas blancas de lisis en un fondo azul. Los zimogramas fueron captados en un analizador de geles de Alpha Innotech Corporation con un gabinete Multi-Image<sup>TM</sup> y la zona de actividad enzimática valorada por densitometría,

usando el software del aparato (alpha-Imager 2000). La cantidad de enzima se expresó en unidades arbitrarias (UA) de densidad integrada, proporcionadas automáticamente por el mismo. Estándares preteñidos de pesos moleculares conocidos 27-180 kDa (SDS-7B, Sigma) fueron usados como referencia.

### **Evaluación de activadores del plasminógeno.**

La conversión de plasminógeno a plasmina se evaluó midiendo la actividad de la plasmina formada posterior a la adición de plasminógeno, mediante un ensayo amidolítico, empleando como sustrato a D-Val-Leu-Lis-4-nitranilina, el cual es roto por la plasmina en un péptido residual y 4-nitroanilina (p-NA) (Ellis et al, 1987). El ensayo se realizó a 37 °C en una mezcla de reacción de 0.2 mL, conteniendo 50 mM Tris pH 7.4, NaCl 110 mM, plasminógeno 10 µg/mL y 0.3 mM del sustrato cromogénico. La absorbencia de pNA fue seguida espectrofotométricamente a 405 nm con el empleo de un lector de microplacas, cada ensayo fue relizado por duplicado. La actividad de plasmina se calculó empleando el coeficiente de extinción para pNA ( $\epsilon_{405 \text{ nm}} = 1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Para asegurar la especificidad, los resultados fueron confirmados por la inclusión de un inhibidor de plasmina, aprotinina (2 µg/ml), el que inhibió toda la actividad de plasmina.

El sustrato natural de la plasmina es la fibrina. La plasmina corta uniones péptidicas particulares de la fibrina, pero también puede ejercer su acción sobre fragmentos peptídicos que contengan los sitios específicos de corte. Existen reactivos capaces de evidenciar la acción de la enzima denominados sustratos cromogénicos y la actividad enzimática sobre ellos se denomina actividad amidolítica. El sustrato cromogénico contiene p-NA, que al ser liberado tiene color amarillo (absorbe a 405 nm); por lo tanto la actividad de la plasmina es proporcional a la intensidad del color desarrollado y puede cuantificarse.

**Análisis estadístico.** Los datos se representan con la media y su desviación estándar. Se utilizó el análisis ANOVA, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, empleando el programa Sigma Stat.

## RESULTADOS

En términos generales, los blastocistos durante los primeros 3 días de cultivo rompen la zona pelúcida (ZP) haciéndole una pequeña muesca y se liberan de ella. Durante este evento en la mayoría de ellos la cavidad del blastocele tiende a colapsarse. Posteriormente, entre el segundo y tercer día en nuestras condiciones de cultivo (sin sustrato de adhesión y medio RPMI o HAM-F10), pocos blastocistos se adhieren débilmente al sustrato y se desprenden cuando se agita la caja de cultivo o se les aplica una corriente de medio de cultivo.

En las Figuras 5A y 6A, se observa la cinética de la liberación de la zona pelúcida (SZP) durante los días de tratamiento con las diferentes concentraciones de glucosa, en el primer caso cultivando con medio RPMI y en el segundo con HAM-F10, empleamos ambos debido a que la concentración basal de glucosa del primero es 11 mM, mientras que la del segundo es de 6 mM, correspondiente ésta última a la fisiológica; sin embargo, debe de considerarse que en los cultivos la glucosa es consumida constantemente, por lo que su concentración no permanece estable. En condiciones basales la velocidad de ruptura de la ZP fue mayor en el medio RPMI; sin embargo a 10 y 11 mM de glucosa fue similar en ambos medios. Cuando se compara el porcentaje total de ruptura de la ZP de los cultivos en RPMI, no se encontraron diferencias significativas entre el control y los embriones cultivados con glucosa 20 y 60 mM; sin embargo, el porcentaje total de blastocistos que rompen la ZP en los cultivos con 40 mM ( $77.06 \pm 15.6\%$ ), fue mayor con respecto al control ( $P \leq 0.05$ ), por otra parte cuando el cultivo se realizó en presencia de 80 mM de glucosa el porcentaje de blastocistos que rompen la ZP es menor al control, siendo solo del 46.15%.

Cuando se empleo medio de HAM F10, los embriones cultivados con 10, 20 y 40 mM de glucosa presentaron un porcentaje significativamente mayor de ruptura de la ZP que los cultivos con glucosa 6 mM ( $P \leq 0.05$ ). Al calcular el tiempo medio de la ruptura de la ZP, definido como el tiempo en que el 50% de los blastocistos han perdido la ZP (Tabla 1 y 2), se encontraron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) tanto en RPMI y HAM con glucosa 10, 20, 40 y 80 mM comparados con sus respectivos controles.

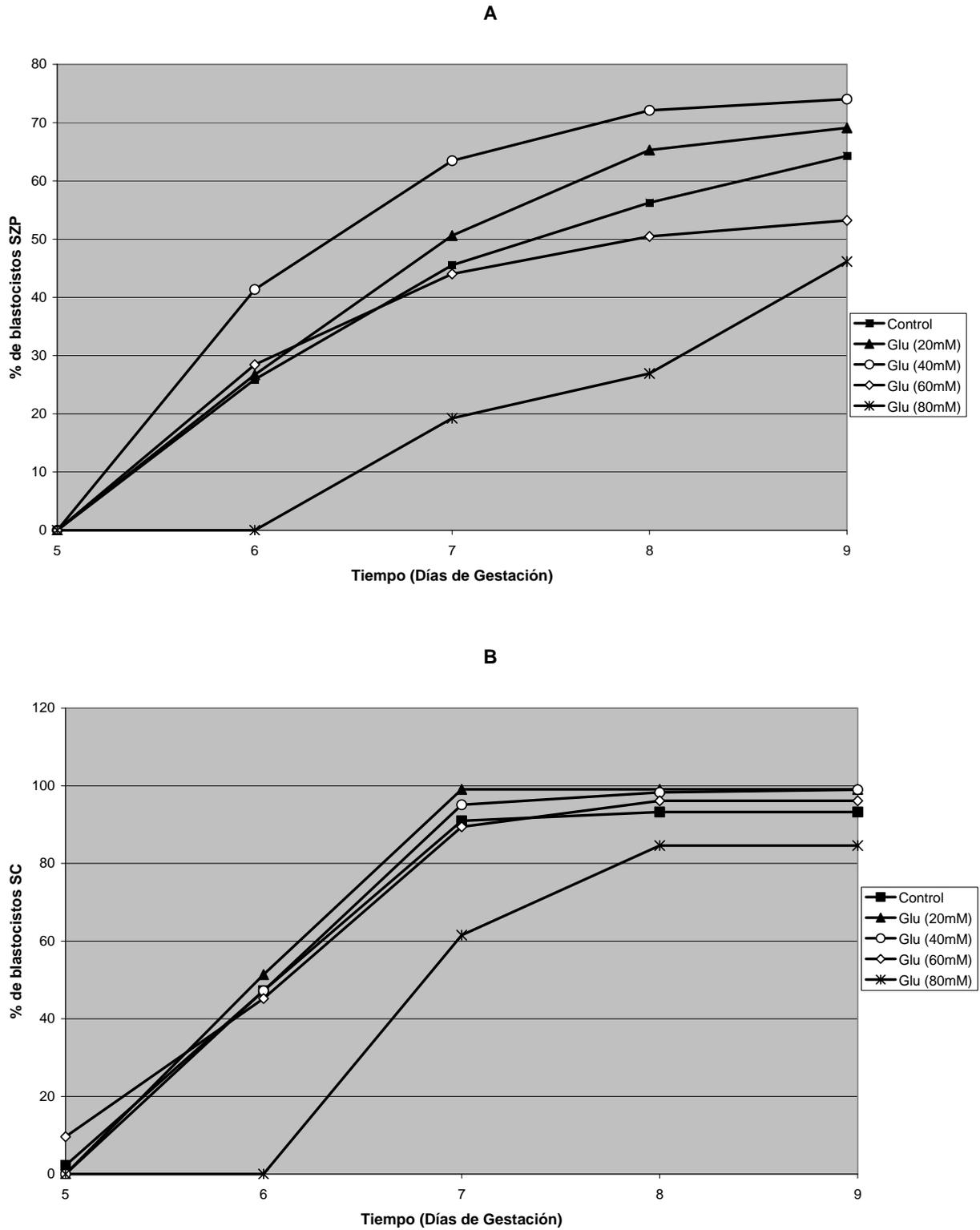


Figura 5. Efecto de diversas concentraciones de glucosa sobre blastocistos de ratón. Los blastocistos fueron obtenidos al día 4 de gestación y se sembraron en grupos de 20 en 100 mL de medio RPMI con diferentes concentraciones de glucosa., se evaluó el porcentaje de blastocistos que perdían la ZP (A) y la cavidad del blastocele (B), Glu: glucosa. DG: día de gestación. SZP: sin zona pelúcida. SC: sin cavidad.

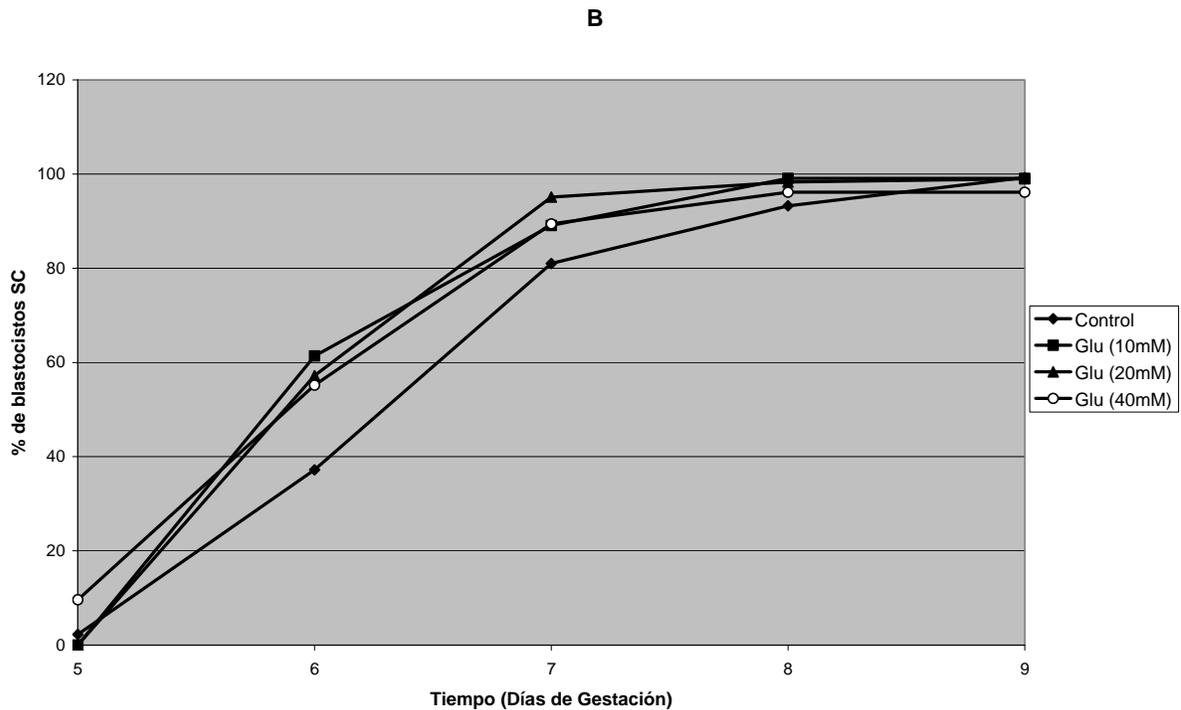
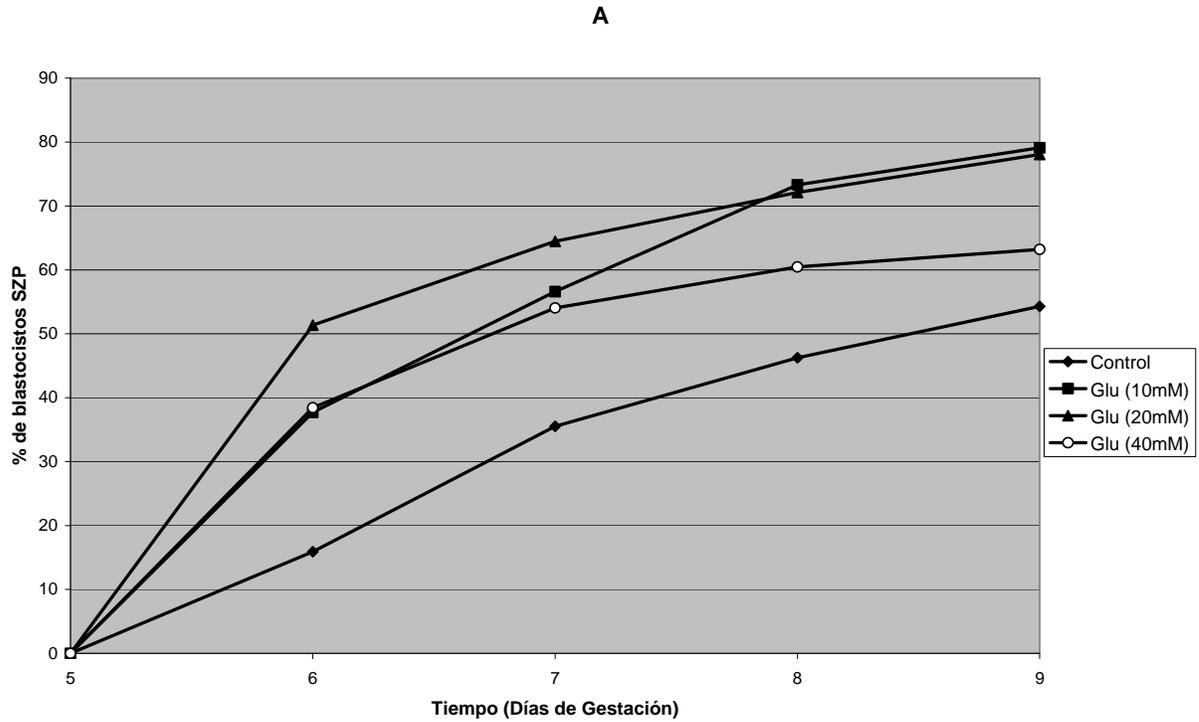


Figura 6. Efecto de distintas concentraciones de glucosa sobre blastocistos de ratón con medio HAM-F10. Los blastocistos fueron obtenidos al día 4 de gestación y se sembraron en grupos de 20 en 100 mL de medio HAM-F10 con diferentes concentraciones de glucosa, se evaluó el porcentaje de blastocistos que perdían la ZP (A) y la cavidad del blastocele (B), Glu: glucosa. DG: día de gestación. SZP: sin zona pelúcida. SC: sin cavidad.

En las Figuras 5B y 6B, se muestra el porcentaje de embriones que perdieron la cavidad del blastocele cultivando en RPMI o HAM-F10, respectivamente. Al comparar el porcentaje total de blastocistos con colapso del blastocele no fueron encontradas diferencias significativas entre los tratamientos con respecto al control ( $P > 0.05$ ), independientemente del medio de cultivo empleado; sin embargo, sólo los blastocistos cultivados con 80 mM de glucosa perdieron la cavidad mas tardíamente, de manera significativa.

Glucosa (mM)	Tiempo medio (horas de incubación)
Control (11)	62.4 ± 5.9
20	48 ± 1.6*
40	35.6 ± 5.3*
60	72 ± 4.7
80	96.9 ± 16.9*

Tabla 1. Efecto de la glucosa sobre el tiempo medio de ruptura de la ZP en blastocistos cultivados con RPMI-1640. Se presenta la media y la desviación estándar ( $X \pm DE$ ) de 9 experimentos, con 20 embriones cada uno. \*diferente significativamente al control ( $P > 0.05$ ).

Glucosa (mM)	Tiempo medio (horas de incubación)
Control (6)	78.2 ± 4.4
10	40.8 ± 9.4*
20	22.7 ± 2.5*
40	41.9 ± 6.7*

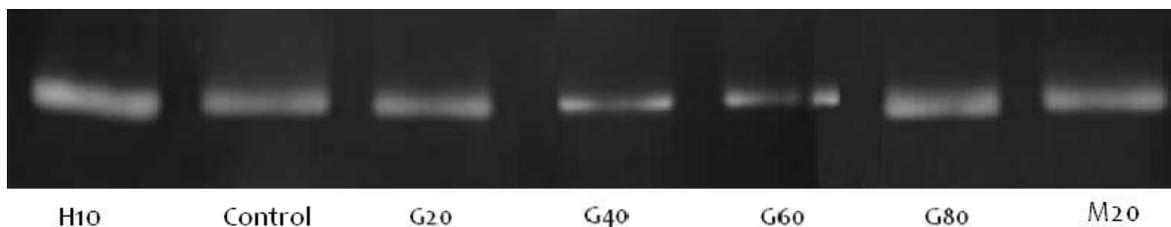
**Tabla 2.** Efecto de la glucosa sobre el tiempo medio de ruptura de la ZP en blastocistos cultivados con HAM-F10. Se presenta la  $X \pm DE$  de 6 experimentos con 20 embriones cada uno. \*diferente significativamente al control ( $P > 0.05$ ).

#### **Efecto de la glucosa en la secreción y contenido celular de MMP-9.**

Se observó en el medio condicionado y lisados embrionarios, una banda gelatinolítica principal de 105 kDa correspondiente a la Pro-MMP-9 de ratón (Figuras 7 y 9), ésta es mas pesada que la enzima humana de 92 kDa (Reponen *et al.*, 1995), en menor proporción se encuentra otra

banda de alrededor de 230 kDa, que corresponde con el homodímero de la MMP-9 (Olson *et al.*, 2000), ambas son inhibidas por EDTA (datos no mostrados), lo que corrobora que se trata de metaloproteasas. En la figura 7A se observa un zimograma representativo del medio condicionado de cultivos con las diferentes concentraciones de glucosa en medio RPMI-1640, se corrió como referencia medio condicionado de cultivos con HAM-F10 conteniendo 10 mM de glucosa, además se utilizó manitol (20 mM) como control de osmolaridad (Bai *et al.*, 2006). En esta figura se observa que la banda de Pro-MMP-9 en el cultivo con Ham F-10, 10 mM de glucosa es solo ligeramente mas intensa que la correspondiente para RPMI glucosa 11 mM (control), sin encontrarse diferencias significativas entre ellas cuando se evalúan por densitometría (datos no mostrados), por su parte la intensidad de la misma banda es menor en los cultivos con RPMI y glucosa 40 y 60 mM en relación al control de RPMI glucosa 11 mM.

**A**



**B**

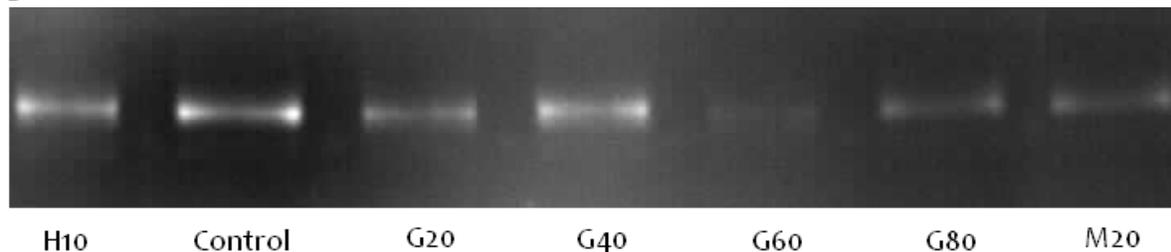


Figura 7. Secreción y contenido tisular de MMP-9 en blastocistos de ratón cultivados con diferentes concentraciones de glucosa en medio RPMI. Los embriones se obtuvieron al día 4 de gestación y se cultivaron en medio RPMI con glucosa 11 mM (control), 20 (G20), 40 (G40), 60 (G60) u 80 (G80) mM, tomándose el medio condicionado (A) y lisados embrionarios (B) después de 5 días de cultivo y analizándose por zimografía en geles copolimerizados con gelatina, se muestra un zimograma representativo de 6 experimentos, se empleó un control de osmolaridad, cultivando en presencia de manosa 20 mM (M20). H10: empleando medio HAM-F10 ajustado a 10mM de glucosa.

En la Figura 7B se muestra el contenido de MMP-9 en los lisados embrionarios con las diferentes concentraciones de glucosa. Se puede observar que la intensidad de la banda de MMP-9 es menor en cultivos con glucosa 40, 60 y 80 mM.

En la Figura 8 se muestran las densidades ópticas de las bandas de MMP-9 secretada (medio condicionado) y asociada a los embriones (lisados embrionarios) (n=6) cultivados en medio RPMI-1640 con diferentes concentraciones de glucosa, se encontró una disminución significativa en la cantidad de la enzima secretada y total sólo con glucosa 40 mM con respecto al control ( $P \leq 0.05$ ). Es decir, todos los demás tratamientos con glucosa no aumentaron ni disminuyeron la expresión de MMP-9. EL control de osmolaridad (manitol 20mM) tampoco aumentó o disminuyó la cantidad de MMP-9.

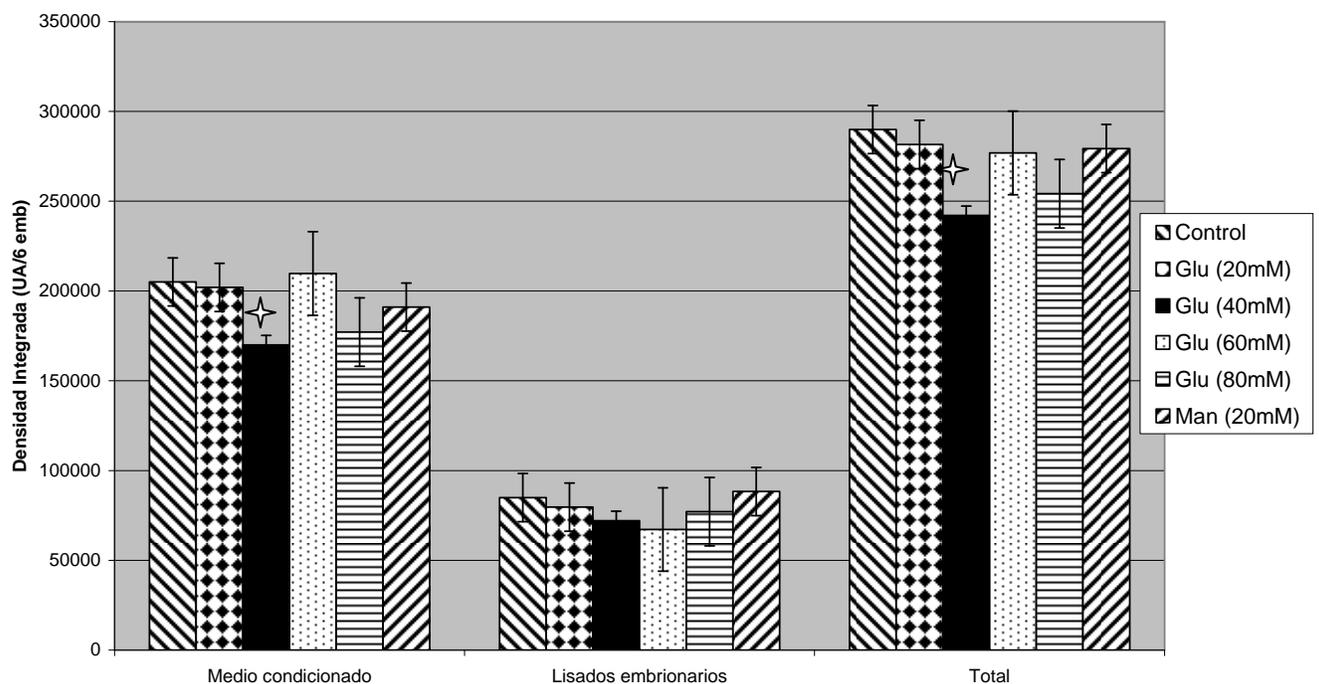


Figura 8. MMP-9 en blastocistos de ratón cultivados con diferentes concentraciones de glucosa en medio RPMI-1640. Glu: Glucosa. Man: manitol. Se muestra la  $X \pm DE$  de 6 experimentos, \* diferente al respectivo control ( $P \leq 0.05$ ).

En la Tabla 3 se presenta el porcentaje de la MMP-9 que es secretada en relación a la que se presenta asociada a los embriones cultivados con el medio RPMI-1640, notándose que siempre es más abundante la enzima que es secretada (68.4 a 75.9 %) y que esta proporción no es modificada significativamente al aumentar la concentración de glucosa.

Tratamientos	% de MMP-9 En MEDIO	% de MMP-9 en EMBRIONES
Control (Glu 11mM)	70.7	29.3
Glu 20mM	71.7	28.3
Glu 40mM	70.2	29.8
Glu 60mM	75.8	24.3
Glu 80mM	69.7	30.3
Man 20mM	68.4	31.6

TABLA 3: Efecto de la glucosa sobre la proporción de MMP-9 secretada y asociada al embrión en medio RPMI-1640. Glu: Glucosa. Man: Manitol

En la Tabla 4 y Figura 11, se muestra la cantidad de MMP-9 usando datos normalizados, estos valores se representan como números de veces que cambio la cantidad de la enzima a las distintas concentraciones de glucosa con respecto al control (11 mM), cuyo valor es considerado como la unidad. Se encontró una disminución significativa en la cantidad de la enzima en el medio condicionado, los lisados embrionarios y la total en los cultivos con glucosa 40 mM ( $P \leq 0.05$ ), con respecto al control (RPMI-1640 que contiene 11 mM de glucosa).

Tratamientos	Medio condicionado	Lisados embrionarios	Total
Control Glu 11mM	1 $\pm$ 0.19	1 $\pm$ 0.14	1 $\pm$ 0.22
Glu 20mM	0.98 $\pm$ 0.13	0.94 $\pm$ 0.1	0.92 $\pm$ 0.15
Glu 40mM	0.83 $\pm$ 0.04*	0.85 $\pm$ 0.05*	0.76 $\pm$ 0.05*
Glu 60mM	1.02 $\pm$ 0.25	0.79 $\pm$ 0.27	0.96 $\pm$ 0.21
Glu 80mM	0.86 $\pm$ 0.19	0.91 $\pm$ 0.16	0.91 $\pm$ 0.18
Man 20mM	0.93 $\pm$ 0.18	1.04 $\pm$ 0.11	0.99 $\pm$ 0.13

TABLA 4: Efecto de la glucosa sobre la producción de MMP-9 por blastocistos de ratón cultivados en RPMI y usando datos normalizados. Glu: Glucosa, Man: Manitol, se muestra la X  $\pm$  DE de 6 experimentos

Con el propósito de evaluar la acción de la glucosa en un rango de concentraciones mas cercano a lo fisiológico, se realizaron experimentos similares a los anteriores empleando medio HAM-F10 con glucosa 6 (control), 10, 20 y 40 mM (Figuras 9 y 10; Tablas 5 y 6).

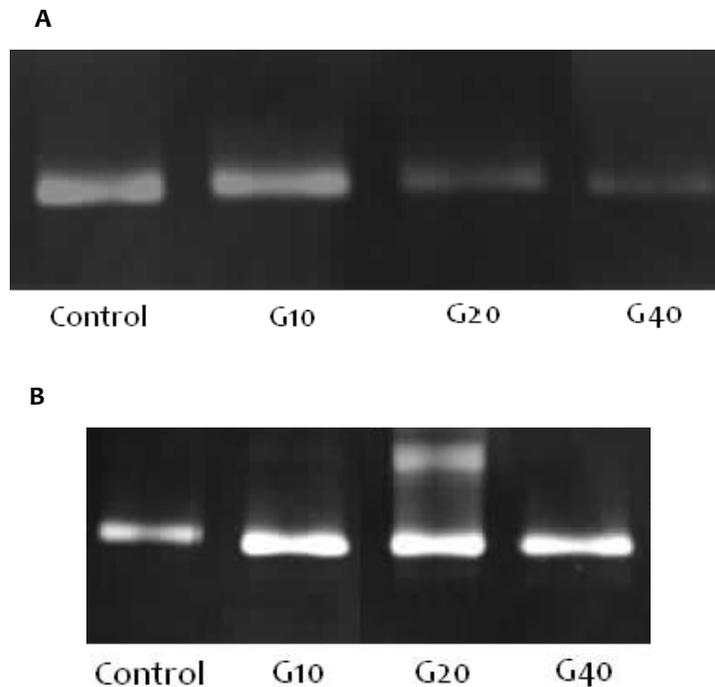


Figura 9. MMP-9 en blastocistos de ratón cultivados en Ham-F10 con distintas concentraciones de glucosa. Los embriones se obtuvieron al día 4 de gestación y se cultivaron en medio Ham-F10 con glucosa 6 mM (control), 10 (G10), 20 (G20) y 40 (G40), tomándose el medio condicionado (A) y lisados embrionarios (B) después de 4 días de cultivo y analizándose por zimografía en geles copolimerizados con gelatina, se muestra un zimograma representativo de 6 experimentos.

En la Figura 10 se muestran las densidades ópticas de las bandas de MMP-9 secretada y asociada a los blastocistos cultivados en medio HAM-F10 con diferentes concentraciones de glucosa, al aplicar la prueba de ANOVA  $P \leq 0.001$  seguida de la de Tukey  $P \leq 0.05$ , no se encontraron diferencias significativas entre el control (6 mM) y 10 mM de glucosa en el medio condicionado, pero si con glucosa 40 mM, al disminuir significativamente la cantidad de MMP-9, lo que corresponde con la intensidad de las bandas del zimograma (Figura 9). Aunque en los lisados embrionarios se encontraron bandas proteolíticas mas intensas que el control a 10, 20 y 40 mM de glucosa, al realizar el análisis densitométrico no se encontraron diferencias estadísticas entre ellas, sin embargo éstas se hicieron patentes al expresar el cambio en el contenido de la enzima en relación al control ( $P \leq 0.05$ , Tabla 6).

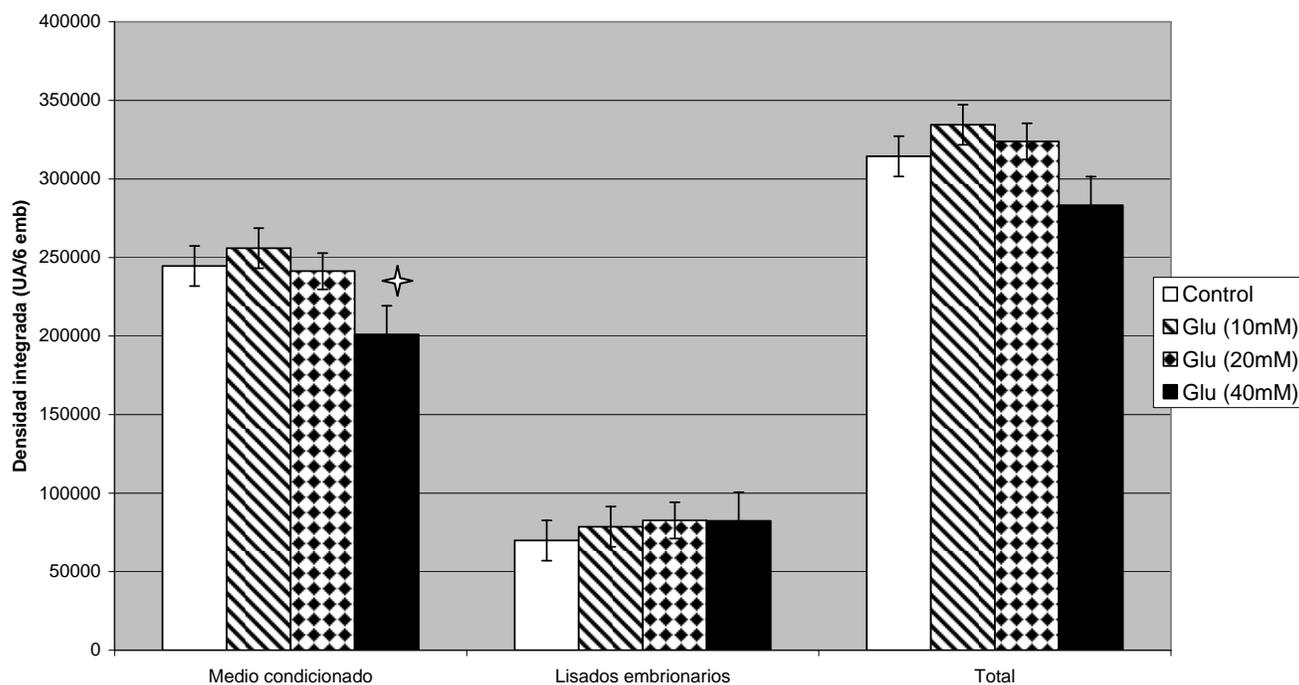


Figura 10. MMP-9 en blastocistos de ratón cultivados con diferentes concentraciones de glucosa en medio HAM-F10. Glu: Glucosa, Man: Manitol. Se muestra  $X \pm DE$  de 3 experimentos, \* diferente al respectivo control ( $P \leq 0.05$ ).

En la Tabla 5 se presenta el porcentaje de la MMP-9 que es secretada en relación a la que se presenta asociada a los embriones cultivados con el medio HAM-F10, notándose que siempre es mas abundante la enzima que es secretada (55 a 63.7 %). Tanto en estos valores, como en los zimogramas se observa que conforme aumenta la concentración de glucosa tiende a disminuir la proporción de la enzima secretada, mientras que la unida al embrión tiende a elevarse.

Tratamientos	% de MMP-9 en MEDIO	% de MMP-9 en EMBRIONES
Control Glu 6mM	63.7	36.3
Glu 10mM	61.9	38.1
Glu 20mM	59.4	40.6
Glu 40mM	55	45

TABLA 5: Efecto de la glucosa sobre la proporción I de MMP-9 secretada y asociada al embrión en medio HAM-F10. Glu: Glucosa.

Tratamientos	Medio condicionado	Lisados embrionarios	Total
Control Glu 6mM	1 ± 0.04	1 ± 0.05	1 ± 0.04
Glu 10mM	1.05 ± 0.04	1.12 ± 0.03*	1.08 ± 0.05
Glu 20mM	0.98 ± 0.06	1.18 ± 0.04*	1.06 ± 0.05
Glu 40mM	0.86 ± 0.08*	1.18 ± 0.09*	0.95 ± 0.07

TABLA 6: Efecto de la glucosa sobre la producción de MMP-9 por blastocistos de ratón cultivados con medio HAM-F10, usando datos normalizados. Glu: Glucosa, datos normalizados: estos valores se representan como números de veces más o menos la cantidad de la enzima con respecto al control (6 mM) cuyo valor es considerado como la unidad, se presenta  $X \pm DE$  de 6 experimentos. \* diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ )

### **Efecto de la glucosa sobre la activación del plasminógeno por blastocistos en cultivo.**

El cambio en la densidad óptica debido a la liberación de pNA del sustrato cromogénico con respecto al tiempo y resultante de la acción de la plasmina, formada a partir de plasminógeno, por acción del medio condicionado de los blastocistos cultivados en RPMI-1640 o HAM-F10, conteniendo diferentes concentraciones de glucosa se muestra en las figuras 11 y 12, respectivamente y es una medida de la actividad formadora de plasmina. En ambos medios de cultivo se observa que la capacidad de formar plasmina es mayor en los cultivos con glucosa 20 y 40 mM para RPMI y 10, 20 y 40 mM para HAM-F10. De estos datos se calculó la actividad de la plasmina formada, correspondiente a la zona en que la absorbencia varía proporcionalmente con el tiempo en una relación lineal, considerando la producción de pNA por tiempo por 10 embriones, valores que se muestran en las Figuras 13 y 14.

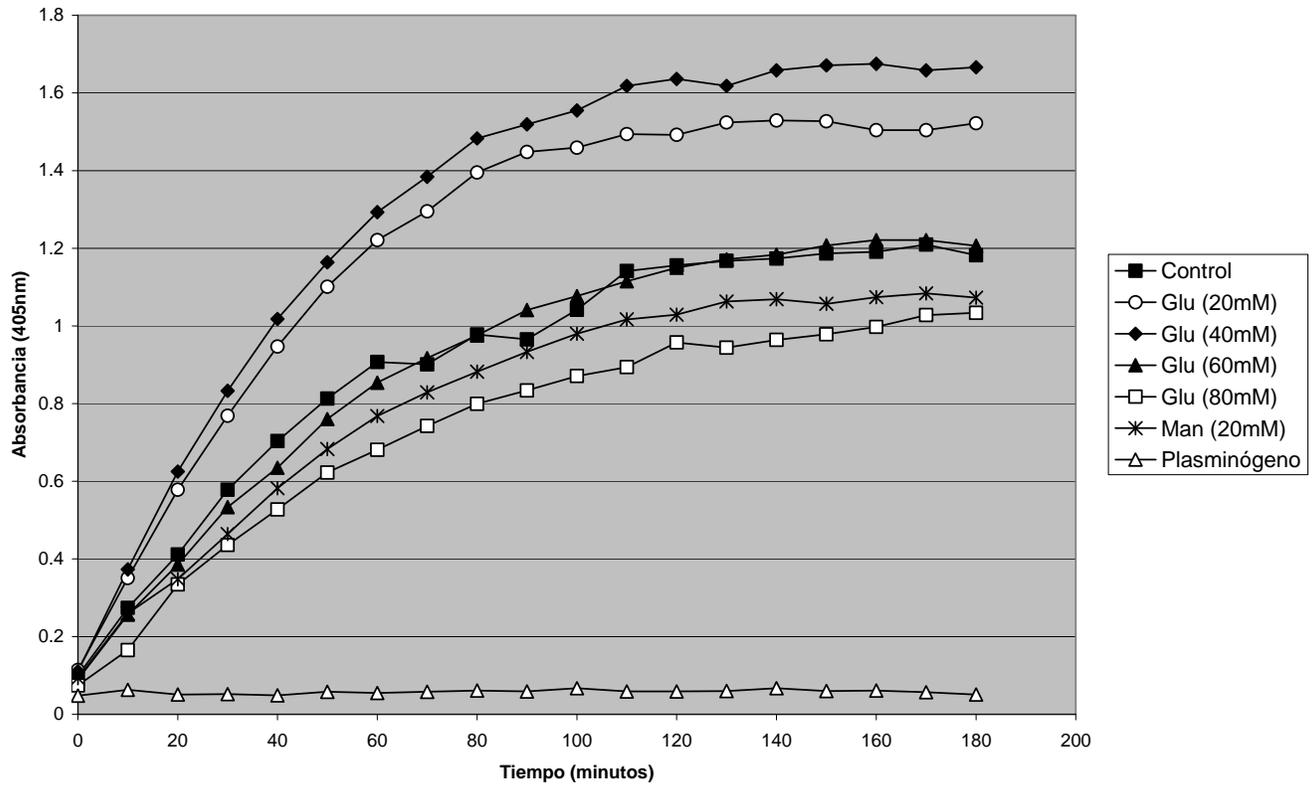


Figura 11. Actividad de la plasmina formada a partir de plasminógeno por el medio condicionado de blastocistos cultivados en RPMI-1640. El medio condicionado obtenido al día 9 EDG, se incubó con plasminógeno y el sustrato de plasmina D-Val-Leu-Lis-pNA y se midió a 405 nm la liberación de pNA por tiempo por 10 embriones. Glu: Glucosa. Man: manitol. Se muestra una gráfica representativa de 5 experimentos.

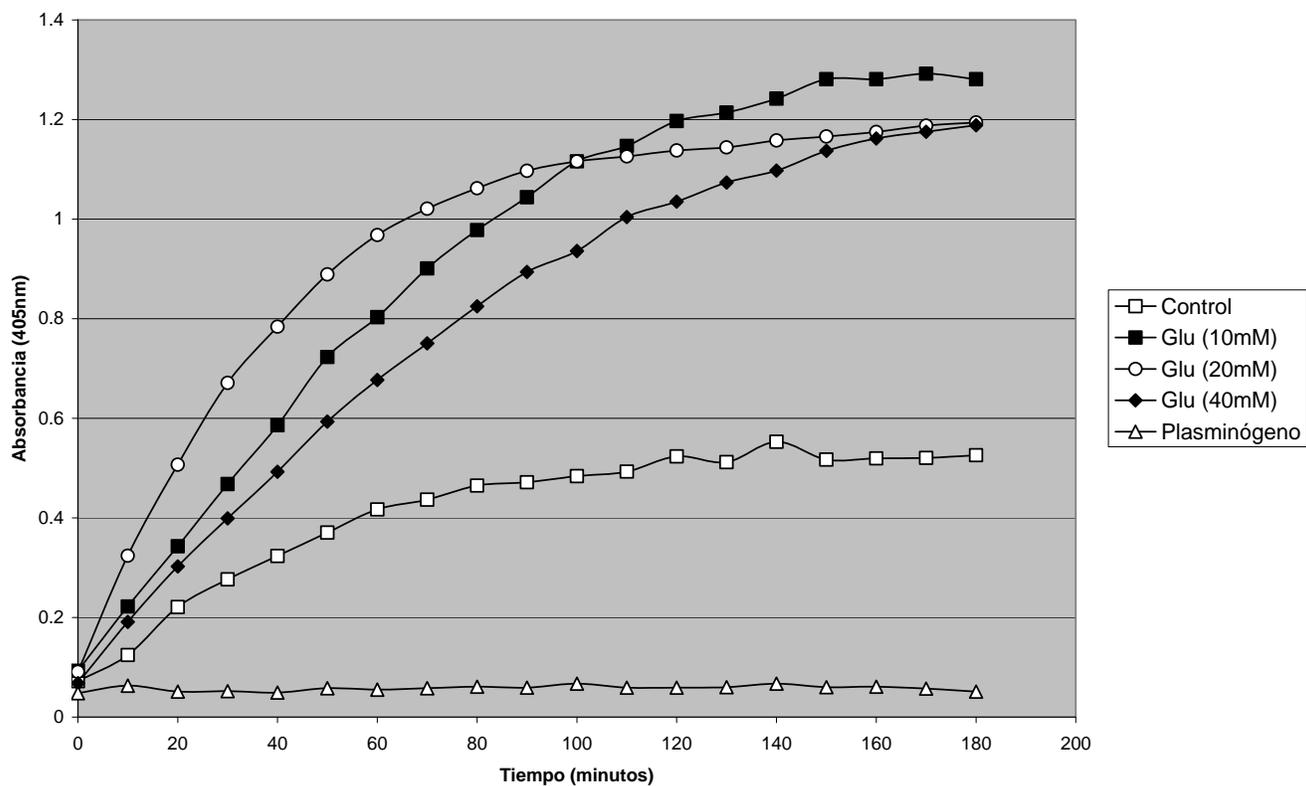


Figura 12. Cinética de la transformación del plasminógeno a plasmina por el medio condicionado de blastocistos cultivados en HAM-F10. El medio condicionado obtenido al día 9 EDG, se incubó con plasminógeno y el sustrato de plasmina D-Val-Leu-Lis-pNA y se midió a 405 nm la liberación de pNA a través del tiempo, por 10 embriones. Glu: Glucosa. Man: manitol. Se muestra una gráfica representativa de 3 experimentos.

En la Figura 13 se observa que la capacidad de activar al plasminógeno aumenta significativamente en los cultivos en RPMI con 20 y 40 mM de glucosa ( $P \leq 0.05$ ), a concentraciones mas altas 60 mM regresa al nivel del control, para alcanzar valores menores al control con glucosa 80 mM ( $P \leq 0.05$ ).

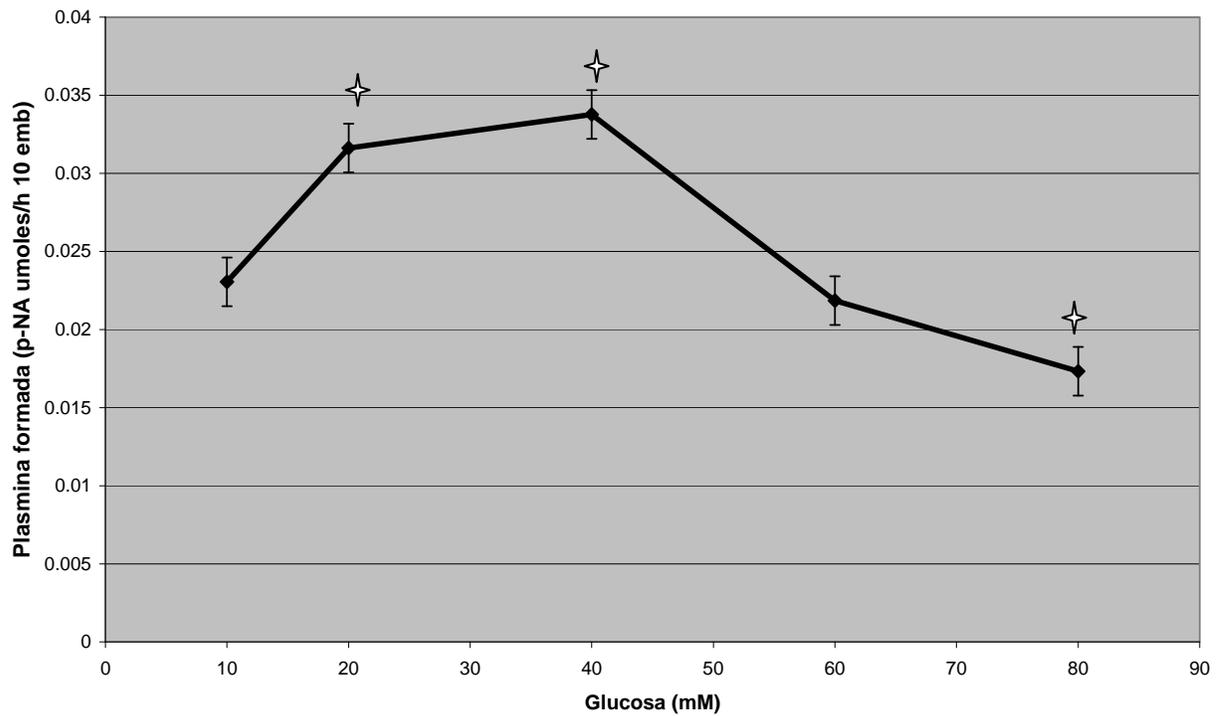


Figura 13. Efecto de la glucosa sobre la activación del plasminógeno en blastocistos de ratón en cultivo con medio RPMI-1640. La actividad de la plasmina formada por el medio condicionado se calculó considerando la cantidad de pNA producida por hora y por 10 embriones, en base a los datos de la figura 11. Se muestra la  $X \pm DE$  de 5 experimentos, \* diferente significativamente al control ( $P \leq 0.05$ ).

Cuando los cultivos se realizaron en HAM-F10, la capacidad de activar plasminógeno también aumenta significativamente ( $P \leq 0.05$ ) en el medio condicionado, con glucosa 10, 20 y 40 mM con respecto al control (6 mM; Figura 14).

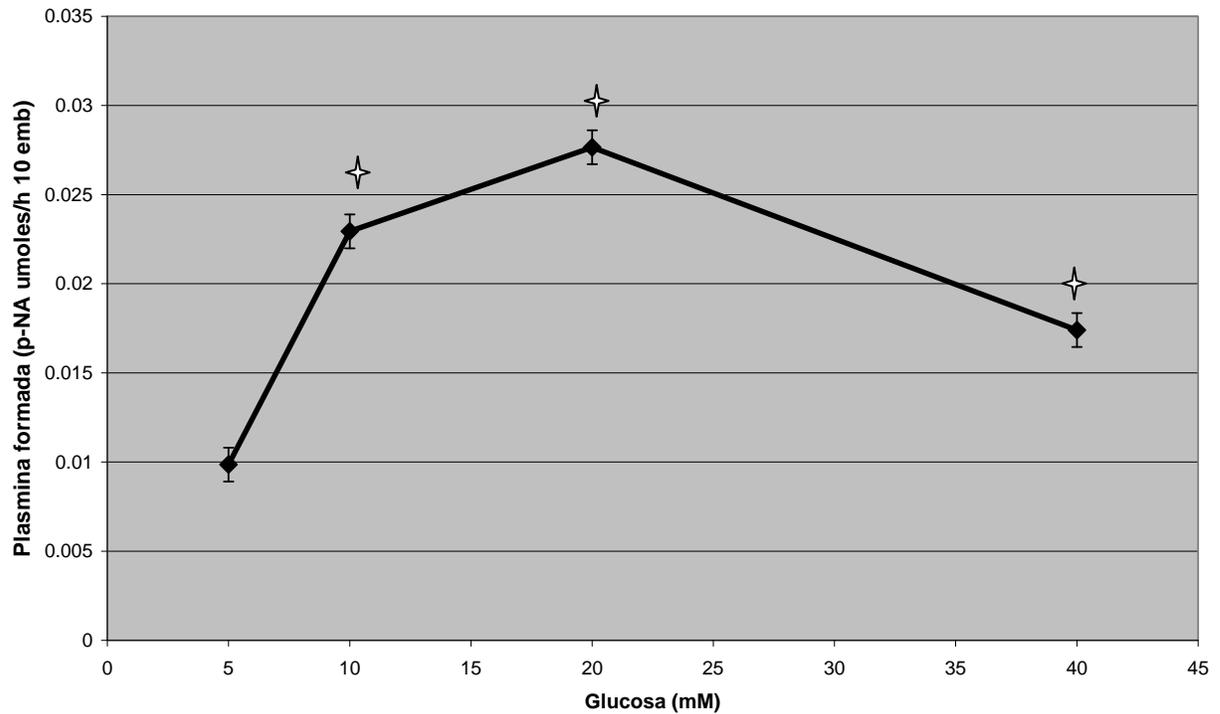


Figura 14. Efecto de la glucosa sobre la activación del plasminógeno por blastocistos de ratón en cultivo con medio HAM-F10. La actividad de la plasmina formada por el medio condicionado se calculó considerando la cantidad de pNA producida por hora y por 10 embriones, en base a los datos de la figura 12. Se muestra la  $X \pm DE$  de 3 experimentos, \* diferente significativamente al control ( $P \leq 0.05$ ).

Con la intención de determinar si la activación de plasminógeno observada se debía al uPA y tPA se evaluó la formación de plasmina a partir del plasminógeno en presencia del PAI-1, empleando una forma recombinante humana que permanece estable por alrededor de 24 h y que inhibe la misma reacción al agregar uPA humano en lugar del medio condicionado, en estas condiciones encontramos sólo una ligera inhibición de la actividad, por lo que los blastocistos pueden producir una enzima distinta que cataliza esta reacción o el PAI humano no actúa sobre los activadores del plasminógeno del ratón.

## DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó la cantidad de MMP-9 y la capacidad activadora del plasminógeno en blastocistos de ratón cultivados con diferentes concentraciones de glucosa. Se encontró que la cantidad de MMP-9 secretada y total es similar en cultivos con glucosa 6, 10, 11 y 20 mM y experimenta una caída respecto al control en presencia de 40 mM de glucosa cultivando en RPMI-1640 o HAM-F10, por su parte la MMP-9 unida al embrión aumentó a las concentraciones de glucosa de 10, 20 y 40 mM en relación al control en medio de HAM-F10 con glucosa 5 mM. Por su parte la capacidad de transformar plasminógeno a plasmina aumentó progresivamente en el medio condicionado cuando la glucosa se elevó de 5 a 20 mM en medio de HAM-F10 o de 11 a 40 mM en RPMI. La ruptura de la ZP fue óptima a 11, 20 y 40 mM de glucosa en medio RPMI, mientras que en HAM-F10 lo fue a 10 y 20 mM.

Los embriones de ratón en cultivo experimentan cambios similares a los que le ocurren durante su implantación en el útero; rompen y se liberan de la ZP y las células del trofoblasto se vuelven gigantes y poliploides, además en presencia de un substrato adhesivo el trofoblasto se adhiere y extiende sobre él (Jenkinson, 1977; Gonda y Su, 1980). Considerando el porcentaje de blastocistos que rompieron la ZP y la velocidad en que esta ocurrió (tiempo en que el 50% de los blastocistos lo hicieron) las condiciones en que la primera fue mayor y la segunda mas rápida fue en medio de HAM-F10 a 20 mM y RPMI a 40 mM, la ruptura de la ZP solo fue inhibida a concentraciones muy altas de glucosa (60 y 80 mM). La eficiencia en la ruptura de la ZP, puede estar asociada a un mejor desarrollo de los blastocistos, lo que indicaría que éste mejora cuando aumenta la concentración de glucosa en el medio hasta un nivel máximo que puede depender del medio de cultivo empleado (20 mM para HAM-F10 o 40 mM para RPMI), lo anterior se refuerza por el hecho de que, en general la secreción de activadores del plasminógeno aumentó conforme la ruptura de la ZP fue mayor y mas rápida. Otra posibilidad es que la ruptura de la ZP, en algún momento, sea favorecida por que la glucosa tuvo una acción tóxica sobre el embrión; ya sea causando la acidificación del medio de cultivo, condición en que la ZP se disuelve o al modificar por oxidación a la enzima involucrada en la ruptura de la ZP, la estripsina.

Para discriminar entre una acción promotora del crecimiento o tóxica de la glucosa, se requiere evaluar con mas detalle el crecimiento y o condiciones del embrión en las distintas condiciones

de cultivo (midiendo por ejemplo, contenido de proteínas o DNA, porcentaje de células apoptóticas, pH del medio, etc).

Tanto la MMP-9 como el uPA han sido considerados como marcadores del desarrollo del trofoblasto de los blastocistos de ratón en cultivo (Salomon y Sherman, 1975; Aflalo *et al.*, 2004; Witheside *et al.*, 2001), sin embargo aunque la capacidad activadora del plasminógeno aumentó con la ruptura de la ZP, no pudimos establecer que fuese dependiente de uPA y la secreción y contenido de MMP-9 varió independientemente de la eficiencia en la ruptura de la ZP y no fue proporcional a la variación en la concentración de glucosa. En todo caso nuestros datos parecen indicar que los blastocistos de ratón son relativamente resistentes a los cambios en la concentración de glucosa en un rango en que otras células son susceptibles y que las diferencias encontradas en la literatura sobre la acción de la glucosa sobre la expresión y actividad de la MMP-9 sean debidas a diferentes susceptibilidades dependiente del tipo celular y al medio empleado.

Estudios *in vitro* han demostrado que altas concentraciones de glucosa (25 y 30 mM) en diferentes tipos celulares, disminuye la actividad de MMP-9 al incrementar la expresión de TIMP-1 (Ding *et al.*, 2007; McLenan *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2001). Por ejemplo, en presencia de glucosa 12 y 25 mM disminuye la actividad de MMP-9 en queratinocitos, al aumentar la expresión de TIMP-1, reduciéndose la capacidad de proliferación de estas células (Lan, 2008). En nuestro caso no detectamos la banda de actividad gelatinolítica correspondiente a la MMP-9 activa, lo que en blastocistos de ratón en cultivo solo se logra en presencia de factores séricos o matrigel (Witheside *et al.*, 2001), ni se midió el TIMP 1.

Aunque Belkacemi *et al.*, en el 2005 reporta que la glucosa (10 mM) inhibe la capacidad invasiva del trofoblasto humano al disminuir (no significativamente) la expresión de MMP-9, en este trabajo solo en la concentración 40 mM de glucosa hubo una disminución significativa de esta enzima, lo que a su vez puede afectar la invasividad de los blastocistos del ratón. El efecto de la glucosa sobre los blastocistos de ratón en cultivo afecta su capacidad invasiva durante la implantación, Fraser *et al.*, en el 2007, describen que la glucosa a concentraciones de 15.56 y 25.56 mM disminuyen la capacidad del blastocisto a extenderse sobre fibronectina, mientras se incrementaba la concentración de glucosa. Ellos reportaron que en los blastocistos cultivados con 25.56 mM de glucosa disminuye la proliferación celular y aumenta la apoptosis, por otra parte en estudios preliminares, hemos observado que la adhesión de los embriones en cultivo

es más lábil a concentraciones altas de glucosa; ya que después del cambio de medio de cultivo éstos tienden a desprenderse.

Las concentraciones altas de glucosa originan cambios químicos y funcionales de macromoléculas (oxidación, formación de AGEs) y aumento en el estrés oxidativo y alteraciones metabólicas que llevan a cambios en la expresión genética. Los AGEs aumentan la expresión de citocinas, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 y CTGF (Doung Van Huyen, *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007).

La invasión del trofoblasto al útero durante la implantación, es regulada por factores endometriales como TGF- $\beta$ 1 y TNF- $\alpha$ , al inhibir éstos la invasión del trofoblasto (Baver *et al.*, 2004). Diversos estudios reportan que la capacidad invasiva de varios carcinomas de diferentes líneas celulares incrementa después de un periodo de inanición con glucosa (Jang y Hill, 1997; Couvier *et al.*, 1997). Por otra parte el TGF- $\beta$ 1 y el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), regulan la degradación de la MEC en altas concentraciones de glucosa (14 mM) al disminuir la actividad de MMP-9 en embriones de rata, al aumentar la expresión de TIMP-1 (Doung Van Huyen, *et al.*, 2007). Mientras otros estudios en monocitos indican que 25 mM de glucosa induce la expresión y actividad de MMP-9 y no afecta la expresión de TIMP-1 (Death *et al.*, 2003); por lo anterior, es necesario evaluar el efecto de dichas concentraciones de glucosa sobre TIMPs en blastocistos de ratón en cultivo.

En los lisados embrionarios cultivados con 10, 20 y 40 mM de glucosa en medio HAM-F10, la cantidad de MMP-9 aumentó de manera significativa. El embrión en la fase de implantación adquiere un carácter altamente invasivo comparado como el de un tumor metastático, y este proceso *in vivo* está estrechamente regulado por medio de enzimas e inhibidores proporcionados por los tejidos maternos y por el embrión. En los lisados embrionarios el aumento en la cantidad de MMP-9 puede deberse al aumento en la asociación de dicha proteína a la superficie, los lisados embrionarios se realizaron el día 9 EG, lo que corresponde con el tiempo en el que el trofoblasto establece contacto con la sangre materna y llega a integrarse al endotelio vascular, por lo que puede ser importante un aumento en la cantidad de MMP-9 en la superficie para una mayor eficiencia en la degradación local de la zona cercana al trofoblasto.

Uno de los mecanismos para la regulación de las MMPs, es el sistema plasminógeno/plasmina. El plasminógeno es activado por los PAs, entre ellos uPA y tPA los cuales efectúan una proteólisis parcial de la proteína para convertirla en plasmina activa, quién degrada a la fibrina o activa a otras MMPs (Filippov *et al*, 2005; Tsai, 2006). La degradación de la MEC o activación de MMPs mediadas por plasmina es inhibida por PAI-1, el cual es el principal inhibidor de uPA y tPA. La interacción PAI-1-uPA provoca la inhibición de la actividad degradativa del uPA, por lo tanto no transforma el plasminógeno en plasmina y se inhibe la degradación de MEC, lo que se transforma en un gran número de patologías como son cáncer, diabetes, entre otras (Hayden *et al*, 2005). En este trabajo concentraciones altas de glucosa (10, 20 y 40 mM) aumentaron la actividad de transformación de plasminógeno a plasmina lo que sugiere que la glucosa aumenta la actividad de uPA o de otra enzima con actividad similar, lo que favorecería la invasividad del trofoblasto. Contrario a lo encontrado, concentraciones altas de glucosa (10mM) no afectaron la secreción de MMP-9, uPA y PAI-1 en células de trofoblasto humano (Belkacemi *et al.*, 2005). En el presente trabajo la acción de la glucosa sobre la activación del plasminógeno depende de la dosis y del medio empleado, a 20 mM alcanza su máximo en medio HAM-F10, mientras que en RPMI su máximo lo alcanza a 40 mM y luego disminuye en 60 y 80mM, lo que sugiere a estas últimas concentraciones, la acentuación del efecto del estrés oxidativo, Gharagozlian *et al.*, en el 2006, encuentran que una concentración de glucosa 25 mM provoca la reducción en las actividades de las MMPs, uPA y PAI-1, mediante la producción de AGEs.

Debido a que la actividad transformadora del plasminógeno detectada no fue inhibida por el PAI recombinante humano, ni ha sido inhibido por amilorida cuando el plasminógeno se adiciona directamente a los embriones en cultivo puede haber otra enzima involucrada en la activación del plasminógeno (Castillo-Trápala, 2007), por lo que se requieren mas estudios para establecer la identidad de la o las enzimas involucradas en la conversión de plasminógeno a plasmina, en nuestro sistema de estudio.

Los cambios metabólicos derivados de las concentraciones altas de glucosa promueven estrés oxidativo, debido al aumento en la formación de ERO y AGEs (Robertson, *et al.*, 2004), lo que afecta la actividad y expresión de diversas proteínas en este caso MMP-9 y uPA. También pueden afectar la expresión de diversos factores del crecimiento y citocinas reguladoras a su vez, de la actividad y expresión de MMP-9 y activadores del plasminógeno.

## CONCLUSIONES

- El porcentaje de blastocistos que rompen la ZP y la velocidad en que lo hacen es dependiente del medio de cultivo y de la concentración de glucosa, en medio HAM-F10 las concentraciones de glucosa aumentan de 6 a 20 mM, mientras que en RPMI son mayores a 40 mM de glucosa, debido quizá a que altas concentraciones de glucosa generan ERO los cuales modifican a las proteínas de secreción que degradan la ZP.
- La acción de la glucosa sobre la secreción y la cantidad total de MMP-9 en blastocistos de ratón fue dependiente de su concentración en el medio de cultivo, solo se encontró que a 40 mM disminuyó significativamente ambos parámetros, lo que puede deberse al aumento en el estrés oxidativo (AGEs y ERO) que incrementa la expresión y actividad de TIMPs, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , NF- $\kappa$ B o CTGF.
- Concentraciones altas de glucosa (10, 20 y 40 mM) aumentan la activación del plasminógeno a plasmina, se sugiere que al aumento en la formación de ERO y AGEs afecta la actividad y expresión de uPA, tPA o alguna otra enzima involucrada.
- Es necesario realizar más experimentos para establecer la identidad de la o las enzimas involucradas en la activación del plasminógeno en nuestro sistema de estudio.

## BIBLIOGRAFÍA

**Aflalo** ED, Sod-Moriah UA, 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 Steril.* 81:780-785

**Armant** DR. 2006. Blastocyst culture. *Method Mol Med.* 121: 35-56.

**Arno** G, Kaski JC, Smith DA, Akiyu JP, Hughes SE, Baboonian C. 2005. Matrix metalloproteinase-9 expression is associated with the presence of *Chlamydia pneumoniae* in human coronary atherosclerotic plaques. *Heart.* 91:521-5.

**Bai** Y, Wang L, Li Y, Liu S, Li J, Wang H, Huang H. 2006. High ambient glucose levels modulates the production of MMP-9 and  $\alpha 5(IV)$  collagen by cultured podocytes. *Cell Physiol Biochem.* 17:57-68.

**Barlow** P, Sherman M. 1972. The biochemistry of differentiation of mouse trophoblast: studies of polyploidy. *J Embryol Exp Morph.* 27:447-465

**Behrendt** N, List K, Andreasen A, Dano K. 2003. The pro-urokinase plasminógen-activation system in the presence of serpin-type inhibitors and the urokinase receptor rescue of activity trough reciprocal pro-enzyme activation. *Biochem J.* 371:277-287

**Belkacemi** L, Lash GE, Mcdonajd-Goodfellow S, Caldwell JD, Graham CH. 2005. Inhibition of human trophoblast invasiveness by high glucose concentrations. *J Clin Endocrinol Metab.* 90(8):4846-4851.

**Björklund** M, Koivunen E. 2005. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 1755:37-69.

- Bond M**, Chase AJ, Baker AH, Newby AC. 2001. Inhibition of transcription factor NF-kappaB reduces matrix metalloproteinase-1, -3 and -9 production by vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 50:556-65
- Bourcier T**, Sukhova G, Libby P. 1997. The nuclear factor kappa-B signaling pathway participates in dysregulation of vascular smooth muscle cells in vitro and in human atherosclerosis. *J Biol Chem.* 272:15817-24
- Carson DD**, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA, Yoshinaga K. 2000. Embryo implantation. *Dev Biol.* 223:217-237.
- Castellino F**, Plopis V. 2005. Structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Thromb Haemost.* 93:647-654
- Castillo JR**, Leira M. 2004. Metaloproteasas y lesión neurovascular. *Neurología.* 19(6)312-320.
- Castillo-Trápala A**. Procesamiento del plasminógeno durante la implantación *in vitro* de blastocistos de ratón. Maestría en Ciencias Biológicas, UNAM, 17 de agosto de 2007.
- Chi MMY**, Hoen A, Moley KH. 2002. Metabolic changes in the glucose-induced apoptotic blastocyst suggest alterations in mitochondrial physiology. *Am J Physiol-Endocrinol Metab.* 283:226-232.
- Coulam CB**, Jeyendran RS, Fishel LA, Roussev R. 2006. Multiple thrombophilic gene mutations are risk factors for implantation failure. *Reprod Biomed.* 12(3):322-327
- Death AK**, Fisher EJ, McGrath KCY, Yue DK. 2003. High glucose alters matrix metalloproteinase expression in two key vascular cells: potential impact on atherosclerosis in diabetes. *Atherosclerosis.* 168(2):263-269.

- Dhawan S**, Singh S, Aggarwal BB. 1997. Induction of endothelial cell surface adhesion molecules by tumor necrosis factor is blocked by protein tyrosine phosphatase inhibitors: role of the nuclear transcription factor NF-kappa B. *Eur J Immunol.* 27:2172-9
- Díaz-Flores M**, Gutiérrez-Rodríguez ME, Ortega-Camarillo C, Cruz M, Martínez Hernández MG, Baiza-Gutman LA. 2007. Alteraciones moleculares de las lesiones titulares inducidas por la hiperglucemia crónica. SIICSalud, (<http://www.siicsalud.com>), Mayo, 18 páginas.
- Ding He-lin**, GUO Ying, XU Ming-tong, LI Hai-yan and FU Zu-zhi. 2007. Effect of angiotensin II receptor blocker on glucose-induced mRNA expressions of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in rat mesangial cells. *Chin Med J.* 120(21):1886-1889.
- Dubois B**, Masure S, Hurtenbach U, Paemen L, Heremans H, Van den Oord J, Sciot R, Meinhardt T, Hammerling G, Opdenakker G, Arnold B. 2000. *J Clin Invest.* 104:1507-1515.
- Duong Van Huyen JP**, Viltard M, Nehiri T, Freund N, Be´lair MF, Martinerie C, Lelongt B, Bruneval P y Lelie`vre-Pe´gorier M. 2007. Expression of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 is altered during nephrogenesis in fetuses from diabetic rats. *Lab Invest.* 87: 680–689
- Dzwonek J**, Rylski M, Kaczmareck L. 2004. Matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in neural physiology of the adult brain. *FEBS Letters.* 567:129-135.
- Ellis V**, Scully MF, Kakkar VV. 1987. Plasminogen activation by single-chain urokinase in functional isolation. A kinetic study. *J Biol Chem* 262(31) 14998-15002.
- Ethell I**, Ethell DW. 2007. Matriz metalloproteinases in brain development and remodeling: synaptic functions and targets. *J Neuro Res.* 85: 2813-2823.
- Flamigni C**, Bulletti C, Polli B, Ciotti PM, Prefetto R, Galassi A, Dicosmo E. 1991. Factors regulating interaction between trophoblast and human endometrium. *Ann NY Acad Sci.* 22:176-190

- Fata** JE, Ho AT, Lecho KJ, Moorehead RA, Khokha R. 2000. Cellular turnover and extracellular matrix remodelling in female reproductive tissues: functions of metalloproteinases and their inhibitors. *Cell Mol Life Sci.* 57:77-95.
- Ferroni** P, Basili S, Martini F, Cardarello CM, Ceci F, Di Franco M. 2003. Serum metalloproteinase 9 levels in patients with coronary artery disease: a novel marker of inflammation. *J Invest Med.* 51:295-300.
- Filippov** S, Koenig GC, Chun TH, Hotary KB, Ota I, Bugge TH. 2005. MT1-matrix metalloproteinase directs arterial wall invasion and neointima formation by vascular smooth muscle cells. *J Exp Med.* 202:663-71.
- Fornoni** A, Striker LJ, Zheng F. 2002. Reversibility of glucose-induced changes in mesangial cell extracellular matrix depends on the genetic background. *Diabetes.* 51:499–505.
- Fraser** RB, Waite SL, Wood KA, Martin KL. 2007. Impact of hyperglycemia on early embryo development and embryopathy: in vitro experiments using a mouse model. *Hum Reprod.* 32(12):3059-3068.
- Gardner** DK, 1998. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology* 49:83–102.
- Gardner** DK, Pool TB, Lane M. 2000. Embryo nutrition and energy metabolism and its relationship to embryo growth, differentiation and viability. *Sem Reprod Med.* 18:205–218.
- Gharagozlian** S, Henriksen T, Kolset SO. 2006. High glucose and N-(carboxymethyl)lysine bovine serum albumin modulate release of matrix metalloproteinases in cultured human endothelial cells. *Eur J Nutr.* Aug 45(5):283-90.

- Jenkinson** E. 1977. The in vitro blastocyst outgrowth system as a model for the análisis of peri-implantation development. En: Johnson M. (Edit.) Development in mammals. Vol 2, 151-172.
- Gilbert** SF. 2005. La matriz extracelular como fuente de señales críticas en el desarrollo. En: Biología del Desarrollo. Ed. Panamericana. 181-187p.
- Gonda** M, Hsu Y. 1980. Correlative scanning electron, transmisión electron, 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.
- Guzman-Grenfell** M, Baiza-Gutman LA, Hicks JJ. 1993. Sistemas moleculares de las interacciones celulares II : Implantación embrionaria en mamíferos. Ginec Obstet Méx. 61:22-25
- Gwatkin** RB. 1966. Aminoacid requirements for attachment and outgrowth of the mouse blastocyst in vitro. Ann NY Acad Sci. 139:79-90
- Ha** H, Lee HB. 2005. Reactive oxygen species amplify glucose signalling in renal cells cultured under high glucose and in diabetic kidney. Nephrology 10(Suppl):S7-S10.
- Hardy** K, Handyside AH, Winston RM, 1989. The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development in vitro. Development 107:597-604.
- Harvey** MB, Leco KJ, Arcellana-Panlilio MY, Zhang X, Edwards DR, Schultz GA. 1995. Proteinase expression in early mouse embryos is regulated by leukaemia inhibitory factor and epidermal growth factor. Development. 121(4):1005-1014.
- Hayden** MR, Sowers JR, Tyagi SC. 2005. The central role of vascular extracellular matrix and basement membrane remodeling in metabolic syndrome and type 2 diabetes: the matrix preloaded. Cardiovasc Diabetol. 4:9.

- Herrmann** J, Lerman LO, Mukhopadhyay D, Napoli C, Lerman A. 2006. Angiogenesis in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26:1948-57.
- Herrera** B, Álvarez AM, Sánchez A, Fernández M, Roncero C, Benito M y Fabregat I. 2001. Mitochondrial permeability transition induced by TGF- $\beta$  in fetal hepatocytes in primary culture. Role of reactive oxygen species (ROS) upstream the mitochondria. *FASEB J.* 15: 741-751.
- Houde** M, de Bruyne G, Bracke M, Ingelman-Sundberg M, Skoglund G, Masure S, van Damme J, Opdenakker G. 1993. *Int J Cancer.* 53, 395-400.
- Isaka** K, Usuda S, Ito H, Sagawa H, Nakamura H, Nishi Y, Suzuki Y, Li F, Takayama M. 2003. Expression and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in human trophoblasts. *Placenta.* 24: 53-64.
- 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
- Kamada** H, Yu F, Nito C, Pak H, Chan. 2007. Influence of hyperglycemia on oxidative stress and MMP-9 activation after focal cerebral ischemia/reperfusion in rats: relationship to blood-brain barrier dysfunction. *PMC.* 38(3): 1044-1049.
- Kim** HS, Kim HJ, Park KG, Kim YN, Kwon TK, Park JY, Lee KU, Kim JG, Lee IK. 2007.  $\alpha$ -Lipoic acid inhibits matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting NF- $\kappa$ B transcriptional activity. *Exp Mol Med.* 39(1):116-113.
- Keim** AL, Chi MM, Moley KH. 2001. Hyperglycemia-induced apoptotic cell death in the mouse blastocyst is dependent on expression of p53. *Mol Reprod Dev.* 60:214-224.
- Ko** SH, Hong OK, Kim JW, Ahn YB, Song K, Cha BY, Son HY, Kim MJ, Jeong IK, Yoon KH. 2006. High glucose increase extracellular matrix production in pancreatic stellate cells by activating the rennin-angiotensin system. *J Cell Biochem.* 98(2):343-355

- Lan** C-CE, Liu I-H, Fang A-H, Wen C-H y Wu C-S. 2008. Hyperglycaemic conditions decrease cultured keratinocyte mobility: implications for impaired wound healing in patients with diabetes. *Brit J Dermat.* 159:1103–1115
- Libby** P, Lee RT. 2000. Matrix matters. *Circulation.* 102:1874-6.
- Lijnen** HR, 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, Zipurski SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. 2002. Integración de células en tejidos. En: *Biología Celular y Molecular.* Lodish Ed Panamericana. Madrid: 968-993.
- Manchanda** N, Schwartz BS. 1995. interaction of single-chain urokinase and plasminogen activator inhibitor type 1. *J Biol Chem.* 270(34):20032-35
- Martínez-Hernández** MG, Baiza LA, Armant DR. 2002. Expresión and secretion of matrix metalloproteinase-9 in developing mouse peri-implantation blastocyst. *Biol Reprod.* 66(Supl.1): 158 (Abstract).
- Martínez-Hernández** MG, Baiza-Gutman LA, Aguilar-Garcia C, Armant DR. 2005. Activation of matrix metalloproteinase 9 is induced by plasminogen in cultured mouse blastocysts. *Biol. Reprod. Special Issue:82 (Abstract 6).*
- McGinn** S, Poronnik P, Gallery ED, Pollock CA. 2004. The effects of high glucose and atorvastatin on endothelial cell matrix production. *Diabet Med.* 21(10):1102-1107.
- McLennan** SV, Wang XY, Moreno V, Yue DK, Twigg SM. 2004. Connective tissue growth factor mediates high glucose effects on matrix degradation through tissue inhibitor of matrix metalloproteinase type 1: implications for diabetic nephropathy. *Endocrinology.* 145: 5646-5655.

- Mignatti P.** 1995. Extracellular matrix by metalloproteinases and plasminogen activators. *Kidney Int.* 47 (suppl. 49): S14-S16.
- Miles LA, Dahlberg CM, Plow EF.** 1988. The cell binding domains of plasminogen and their function in plasma. *J Biol Chem.* 263:11928-34.
- Mira E, Lacalle RA, Buesa JM, González de Buitrago G, Jiménez-Baranda S, Gómez-Moutón C, Martínez-A C, Mañes S.** 2004. Secreted MMP-9 promotes angiogenesis more efficiently than constitutive active MMP9 bounded to the tumor cell surface. *J Cell Sci* 117:1847-1856.
- Moley KH, Mueckler MM.** 2000. Glucose transport and apoptosis. *Apoptosis.* 5:99-105
- Moley KH.** 2001. Hiperglycemia and apoptosis: mechanisms for congenital malformations and pregnancy loss in diabetic women. *Endocrinol & Metabol.* 12(2):78-82.
- Monier VM, Mustata GT, Biemel KL, Reihl O, Lederer MO, Zhenyu D, Sell DR.** 2005. Cross-linking of extracellular matrix by the Maillard reaction in aging and diabetes. An update on “ a puzzle nearing resolution”. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1043:533-544.
- Nagasse H, Visse R, Murphy G.** 2006. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 69:562-573.
- Pardo A.** 2008. Metaloproteasas de matriz en la remodelación aberrante de la fibrosis pulmonary. En XXXII Mensaje Bioquímico. Facultad de Medicina, UNAM. Departamento de Bioquímica. México. 39-47.
- Pardo A, Selman M.** 2003. Matriz Extracelular. En : *Biología Celular y Molecular.* Ed. Jiménez LF Pearson's Educación México. 515-540.
- Pardo A, Selman M.** 1996. Metalloproteinases and lung injury. *Braz J Med Biol Res.* 29:1109-1115

- Parfyonova** YV, Plekhanova OS, Tkachuk VA. 2001. Plasminogen activators in vascular remodeling and angiogenesis. *Biochemistry (Moscow)*. 67(1):119-134
- Pepper** MSA, Sappino P, Stöcklin R, Montesano R, Orci L, Vassalli JD. 1993. Upregulation of urokinase receptor expression on migrating endothelial cells. *J Cell Biol*. 122(3):673-684
- Psychoyos** A. 1986. Uterine receptivity for nidation. *Ann NY Acad Sci*. 476:36-42
- Rajagolapan** S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. 1996. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulated the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest*. 98:2572-2579.
- Rouy** D, Angeles-Cano E. 1990. The mechanism of activation of plasminógen 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. *Exp Cell Res*. 90:261-268.
- Sánchez** A, Álvarez AM, López Pedrosa JM, Roncero C, Benito M y Fabregat I. 1999. Apoptotic response to TGF- $\beta$  in fetal hepatocytes depends upon their state of differentiation. *Exp Cell Res*. 252: 281-291.
- Sato** H y Seiki M. 1993. Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene*. 8:395-405
- Schultz** RM. 1999. Blastocyst: *Enciclopedia of reproduction*. 4:370-375

- Sellens** M, Sherman M. 1980. Effects of culture conditions on the developmental programme of mouse blastocyst. *J Embryol Exp Morph.* 56:1-22
- Sherman** MI, Salomon DS. 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.
- Singh** R, Song RH, Alavi N et al. 2001. High glucose decreases matrix metalloproteinase-2 activity in rat mesangial cells via transforming growth factor-beta1. *Exp Nephrol.* 9:249-57.
- Staun-Ram** E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E. 2004. Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reprod Biol Endocrinol.* 2(59):1-13.
- Staun-Ram** E, Shalev E. 2005. Human trophoblast function during the implantation process. *Reprod Biol Endocrinol.* 3(56):1-12.
- Sternlicht** MD, Werb Z. 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17:463-516
- Stettler-Stevenson** WG, Liotta LA, Kleiner DE, Jr. 1993. Extracellular matrix 6: Role of metalloproteinase in tumor invasion and metastasis. *FASEB J.* 7:1434-1441.
- Sutherland** A. 2003. Mechanisms of implantation in the mouse: differentiation and functional importance of trophoblast giant cell behavior. *Dev Biol.* 258:241-251
- 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.
- Tsai** HM. 2006. ADAMTS13 and microvascular thrombosis. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 4:813-825

**Urso** ML, Clarkson PM. 2003. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicol.* 189:41-54

**Vander-Heiden** MG, Plas DR, Rathmell JC, Rathmell JC, Fox CJ, Harris MH, Thompson CB. 2001. Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism. *Mol Cell Biol.* 21:5899-5912.

**Vassalli** JD, Dayer JM, 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 metalloproteinase and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry. *Circ Res.* 92:827-839.

**Vogl-Willis** CA, Edwards IJ. 2004. High-glucose-induced structural changes in the heparin sulphate proteoglycan, perlecan, of cultured human aortic endothelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 1672(Apr7, 1):36-45.

**Wang** H, Schultz R, Hong J, Cundiff DL, Jiang K, Soff GA. 2004. Cell surface-dependent generation of angiostatin 4.5. *Cancer Res.* 64(1):162-168

**Wang** HM, Wen Y, Mooney S, Li H, Behr B, Lake PM. 2003. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase expression in human preimplantation embryos. *Fertil Steril.* 80(2):736-742.

**Ware** LB, Bastarache JA, Wang L. 2005. Coagulation and fibrinolysis in human acute lung injury New therapeutic targets? *Keio J Med.* 54(3):142-149

**Wilson** IB, Jenkinson J. 1974. Blastocyst differentiation in vitro. *J Reprod Fert.* 39:243-249

**Wolf G**, Chen S, Ziyadeh FN. 2005. From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy. *Diabetes*. 54(6): 1626-1634.

**Whiteside EJ**, Jackson MM, Herington AC, Edwards DR, Harvey MB. 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.

**Xu P**, Wang Y, Piao Y, Bai S, Xiao Z, Jia Y. 2001. Effects of matrix proteins on the expression of matrix metalloproteinase -2, -9 and -14 and tissue inhibitors of metalloproteinases in human cytotrophoblast cells during the first trimester. *Biol Reprod*. 65:240-246.

**Yan C**, Boyd D. 2007. Regulation of Matrix Metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol*. 211:19-26.

**Zhang X**, Shu MA, Harvey MB, Schultz GA 1996 Regulation of urokinase plasminogen activator production in implanting mouse embryo: effect of embryo interaction with extracellular matrix. *Biol Reprod*. 54 1052-1058.

**Zhang X**, Wang HM, Lin HY, Liu GY, Li QL, Zhu C. 2004. Regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) during mouse peri-implantation: role of nitric oxide. *Placenta*. 25: 243-252.