



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Participación del estrés oxidante en la acción de concentraciones altas de glucosa sobre la expresión de MMP-9 y uPA en blastocistos de ratón en cultivo.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ALEJANDRA SÁNCHEZ SANTOS

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Luis Arturo Baiza Gutman
UNAM, FES-Iztacala

COMITÉ TUTOR: Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza
UNAM, Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dr. Felipe Vadillo Ortega
UNAM, Facultad de Medicina

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. MARZO, 2018



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.



LIC. IVONNE RAMÍREZ WENCE
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 23 de octubre de 2017, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **SANCHEZ SANTOS ALEJANDRA**, con número de cuenta **99318086**, con la tesis titulada **"Participación del estrés oxidante en la acción de concentraciones altas de glucosa sobre la expresión de MMP-9 y uPA en blastocitos de ratón en cultivo"**, realizada bajo la dirección del **DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN**:

Presidente: DRA. MARISELA VILLAGRÁN SANTA CRUZ
Vocal: DR. RODOLFO CÁRDENAS REYGADAS
Secretario: DRA. NORMA ANGÉLICA MORENO MENDOZA
Suplente: DRA. JUANA ALBA LUIS DÍAZ
Suplente: DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 21 de febrero de 2018.

DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

Primeramente al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Para la realización del presente trabajo de investigación se contó con el apoyo del Programa de Becas para Estudios de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número (CVU/Becario: 226303/210446.

Además este proyecto fue financiado por:

1. UNAM-PAPIIT IN 220818

2. FESI-DIP-PAPCA-2016-19

Finalmente, gracias a mi Tutor Principal el Dr. Luis Arturo Baiza Gutman y a los miembros de mi Comité Tutor, a la Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza y al Dr. Felipe Vadillo Ortega por todo su apoyo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi familia, comenzando por mis padres, que siempre estuvieron ahí conmigo y aunque no les parecían algunas decisiones mías, al final siempre terminaron apoyándome. A mis hermanas, gracias por escucharme y apoyarme en todo lo que hago, gracias por brindarme tanta inspiración y un muy buen ejemplo en todo. A mis sobrinos, porque con sus locuras llenaron de risas y alegría mi vida.

A mis amigos, David, Gina, Marilú, Eda y Lorena, que en cada momento estuvieron escuchándome, apoyándome, dándome buenos consejos y llenando mi vida de aprendizaje y aventuras, mil gracias por ser tan buenas personas conmigo.

A Doña Luisa, que es a la vez familia y amiga, gracias por estar apoyándonos, guiándonos y llenando siempre de luz nuestro camino, infinitas gracias por todo.

A el amor de mi vida, sin ti esto nunca hubiera sido posible, gracias por encontrarme, llenar mi vida con tanto amor y hacerme tan feliz. A mi nueva familia, gracias por aceptarme y por apoyarnos en esta nueva etapa.

A todos los que fueron parte de este proceso, Blanca, Sandra, Elsa, Gisela, Alejandro, Eli, Goyo, Edna, Judith, Toño, Luis Octavio, Maestro Carmelo, Dra. Rosario, Dr. Armando, Dra. Maricela, Dra. Norma, Dra. Ma. Eugenia, Maestra Irma, Maestra Laura, Maestra Martha, Dra. Juanita, Dr. Rodolfo, y a tantos más, que sería imposible mencionar a todos, algunos que estuvieron desde el principio y otros al final, muchas gracias por todo.

Y principalmente GRACIAS A DIOS, por cuidarme y guiarme siempre, gracias por darme la oportunidad de aprender y crecer día con día.

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT.....	1
INTRODUCCIÓN	2
Diabetes mellitus gestacional	2
Estrés oxidante	5
Desarrollo pre-implantacional.....	10
Desarrollo de los linajes extraembrionarios.....	12
Actividad proteolítica durante la invasión del trofoblasto	23
ANTECEDENTES	32
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	33
HIPÓTESIS.....	34
OBJETIVOS	
Objetivo general.....	34
Objetivos particulares.....	34
METODOLOGÍA.....	35
RESULTADOS.....	41
DISCUSIÓN.....	55
CONCLUSIONES.....	61
BIBLIOGRAFÍA.....	62
ANEXO: Artículo Publicado.....	73

RESUMEN

Durante la implantación embrionaria, la capa más externa del blastocisto da origen al linaje celular del trofoblasto, el cual establece la interacción con el endometrio y debido a sus propiedades invasivas permite la penetración del conceptus a este tejido uterino. El mecanismo que regula la capacidad invasiva de estas células es esencial para el establecimiento y el mantenimiento del intercambio eficiente entre los tejidos maternos y fetales durante el embarazo, donde la hiperglicemia induce estrés oxidante causando alteraciones en la placenta. Este estudio evaluó el rol del estrés oxidante en la acción de concentraciones altas de glucosa sobre la expresión de la metaloproteinasa de matriz extracelular 9 (MMP-9) y del activador del plasminógeno tipo urokinasa (uPA) en trofoblasto derivado de blastocistos de ratón en cultivo. Los blastocistos se obtuvieron el día 4 equivalente de gestación (4 EG) y fueron cultivados hasta el día 7 EG en medio HAM-F10 y posteriormente tratados durante 48 h con alta glucosa (25 mM) del día 7 al 9 EG. Este tratamiento promovió el crecimiento trofoblastico asociado con el aumento de la actividad y expresión de uPA y MMP-9. Los efectos de altas concentraciones de glucosa fueron regulados por especies reactivas de oxígeno (EROs); ya que estos efectos fueron prevenidos por el antioxidante N-acetilcisteína (NAC) y por la apocinina, un inhibidor de una de las fuentes principales de EROs, la NADPH oxidasa. Altas concentraciones de glucosa incrementaron los niveles de EROs y promovieron el crecimiento trofoblástico, induciendo la expresión de MMP-9 y uPA, en un mecanismo regulado por la producción de ERO por la NADPH oxidasa, lo que puede estar asociado con las alteraciones en la placenta en la diabetes mellitus gestacional.

ABSTRACT

During embryo implantation, the outer layer of the blastocyst establishes the interaction with the endometrium given rise to the development of the trophoblast cell lineage, which participates in the penetration of endometrium, because of their motility and invasive properties. The mechanisms that regulate the invasive ability of these cells are essential for the establishment and maintenance of an efficient exchange between maternal and fetal tissues during pregnancy, where hyperglycemia induces oxidative stress causing alterations in the placenta. This study evaluated the role of oxidative stress in the actions of high concentration glucose (HG) on the expression of extracellular proteases in trophoblast derived from cultured mouse blastocyst. Blastocysts from gestation day 4 (GD4) were cultured until GD7 in HAM-F10 and further treated for 48 h with HG (glucose 25 mM from GD7 to GD9). This treatment induced higher trophoblast outgrowth associated with enhanced expression of urokinase type-plasminogen activator (uPA) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9). These effects of HG were mediated by reactive oxygen species (ROS) because they were prevented by the antioxidant N-acetylcysteine (NAC) and apocynina an inhibitor of NADPH oxidase, one of the major sources of the production of ROS. HG also induced an increase in ROS levels. HG promotes trophoblast spreading inducing the expression of uPA and MMP-9, in a mechanism mediated by the production of ROS by NADPH oxidase, which can be associated with placental alterations in gestational diabetes mellitus.

INTRODUCCIÓN

DIABETES MELLITUS GESTACIONAL

La diabetes mellitus gestacional (DMG) es comúnmente caracterizada por adquisición de hiperglicemia crónica debida a la intolerancia a la glucosa y a fallas en la acción y secreción de insulina, con un primer reconocimiento durante el embarazo. DMG es el tipo más común de diabetes encontrado en el embarazo; sus rangos de prevalencia están entre el 1-14% de todas los embarazos dependiendo de la población y la prueba de diagnóstico empleada. La prevalencia de DMG está incrementando alrededor del mundo, aumentando con la edad maternal avanzada y obesidad. DMG está asociada con un marcado aumento del riesgo de resultados adversos para la madre y el embrión en desarrollo, tanto a corto como a largo plazo. El impacto que tiene DMG y sus consecuencias sobre la salud comunitaria, económica y el capital humano es substancial (Lappas, *et al.*, 2011; Monteiro, *et al.*, 2016).

El aumento de la prevalencia de DMG es paralelo al aumento temporal de la tasa de diabetes tipo 2 en la población adulta no embarazada en países de bajo y mediano ingreso. Depende también de raza y etnia, siendo los asiáticos los que presenta el más alto rango, seguido de hispánicos, americanos africanos y caucásicos (Caughey, *et al.*, 2010). La DM se ha convertido en una epidemia global, la Federación Internacional de Diabetes estima que en 2015, India, China, Estados Unidos, Rusia y Brasil fueron los cinco países con el más grande número de personas afectadas por la diabetes, México se encuentra en el lugar número seis con 11.5 millones de personas con diabetes con una prevalencia del 15.8% ajustada por edad al 14.7% neto (www.diabetesatlas.org). La incidencia estimada de DMG depende de las estrategias que cada país aplica, debido a que un consenso internacional aún no ha sido aceptado. La relevancia y consecuencias de la hiperglicemia y los resultados adversos del embarazo, además de los criterios de detección son actualmente debatidos porque existe una incidencia del 3-5 % al 17% (Coustan, *et al.*, 2010) La incidencia de DMG también incrementa en obesidad con

radios de 1.9, 3.0 y 5.5, respectivamente para sobrepeso, obesidad, y obesidad severa comparada con mujeres con un índice de masa corporal normal (Torloni, *et al.*, 2009).

Etiología y factores de riesgo

DMG es un desorden heterogéneo que involucra una combinación de factores responsables de la disminución de la sensibilidad a la insulina y una inadecuada secreción de insulina. La fisiopatología de la DMG es similar a la de la diabetes tipo 2. Esta condición metabólica es manifestada cuando las células β -pancreáticas pierden su capacidad para compensar el incremento de la resistencia a la insulina para normalizar la glucosa sistémica, lo cual se traduce en hiperglucemia materna, sin embargo, la patogénesis de la enfermedad permanece desconocida (Monteiro, *et al.*, 2016). Como la diabetes tipo 2, la DMG es una enfermedad multifactorial asociada con factores de riesgo genéticos y no genéticos/ambientales (tabla 1). Una vez que la predisposición genética de un individuo está siendo desafiada por el aumento de la resistencia a la insulina durante el embarazo, hay una carga adicional sobre la célula pancreática, lo que resulta en una disfunción, es decir, una respuesta insulínica inadecuada a los desafíos de glucosa (Buchanan y Xiang, 2005). Los defectos moleculares comunes en la diabetes tipo 2 y DMG tiene muchas interpretaciones, una por ejemplo es de que ambas son manifestaciones de la misma enfermedad. Sin embargo, los diferentes desafíos ambientales pueden sombrear la cifra global; ya que ocurren con una temporización específica en el ciclo de vida (Lauenborg, *et al.*, 2009; Langer, 2010). Aunque la expresión de alguna variante genética aumenta significativamente el riesgo de desarrollar DMG, sólo una pequeña proporción de DMG (<10%) puede ser determinada por la predisposición genética, lo que apunta claramente a otros factores etiológicos. La obesidad, definida como el índice de masa corporal pre-gravida >30, una dieta alta en grasa y una edad avanzada representan los factores de riesgo no genéticos más importantes que regulan la incidencia de DMG (Chu, *et al.*, 2007)

Factores no modificables	Factores modificables
Genética	Sobrepeso/obesidad
Edad	Dieta alta en grasas
Etnia	Hipertensión
Paridad	Exceso de peso ganado durante el embarazo
	Disfunciones endocrinas (como ovario poliquístico)
	Actividad física (estilo de vida sedentario)

Tabla 1. Resumen del riesgo de factores asociados con DMG

ESTRÉS OXIDANTE

Los cambios metabólicos derivados de las concentraciones altas de glucosa promueven estrés oxidativo, debido al aumento en la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) y a la disminución de los sistemas de defensa antioxidantes. Se han descrito varias rutas metabólicas vinculadas con el estrés oxidativo asociado a altas concentraciones de glucosa, entre ellas las más estudiadas son la ruta del sorbitol, la de la glucosilación no enzimática de proteínas que genera productos de glicación avanzada (AGEs), la autooxidación de glucosa, la modificación de la actividad de la protein-quinasa C (PKC) y la alteración vía citocinas (Robertson, *et al.*, 2004). Las cuales generan EROs que actúan sobre las proteínas oxidando preferentemente aminoácidos con estructura cíclica y como consecuencia se da 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 (Fröhlich, *et al.*, 2012; Kowluru, *et al.*, 2015).

El estrés oxidante se debe al desequilibrio entre la producción de compuestos oxidantes como las EROs y de nitrógeno y la capacidad antioxidante en los tejidos. El predominio de los primeros conduce a la oxidación de macromoléculas y alteración de sus funciones (carbonilación de proteínas, lipoperoxidación, oxidación de ácidos nucleicos), además influye sobre diversas vías de señalización, por lo que se han considerado como uno de los mecanismos patogénicos en muchas enfermedades crónico degenerativas, como las neurodegenerativas, la diabetes mellitus y el cáncer. Las EROs además de estar involucradas en la carcinogénesis, inflamación, fibrosis y necrosis, también participan en una gran variedad de procesos celulares normales que van desde la proliferación celular a la apoptosis.

De hecho, eventos moleculares, como la inducción de la proliferación celular, disminución de la apoptosis, y daño oxidativo al DNA han sido propuestos como procesos críticos involucrados en la carcinogénesis. La carcinogénesis y la invasión celular son procesos complejos en los que los mecanismos exactos por los cuales

las EROs y el estado redox inducen a las células a proliferar o morir, ser más o menos invasivas y a la formación de tumores, están aún bajo investigación. Las ERO pueden modificar componentes de las vías de señalización incluyendo proteínas fosfatasa, proteínas cinasas y factores de transcripción y se ha sugerido que la mayoría de los efectos de las EROs que conducen al cáncer, son a través de sus acciones sobre las vías de señalización en lugar de daños no específicos de macromoléculas.

Especies reactivas de oxígeno (EROs).

Las EROs se generan constantemente en organismos aeróbicos durante el metabolismo intracelular y en respuesta a estímulos del ambiente. Diversos estudios indican que las EROs tienen un papel central en la cascada de señalización involucrada en una variedad de procesos celulares (Aslan y Ozben, 2003; Poli, *et al.*, 2004; Chiarugi, 2005). Se consideran EROs al oxígeno atómico (O) y al ozono (O₃), al singulete de oxígeno (1O₂) que se produce con la excitación de uno de los electrones desapareados del O₂ y al superóxido (O₂[•]), al peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y al radical hidroxilo (•OH) en casi todas el oxígeno está parcialmente reducido. Las EROs son responsables de regular modificaciones redox de diferentes biomoléculas y su sobreproducción y/o mal manejo conduce al fenómeno de estrés oxidante que está implicado en el envejecimiento, muerte celular (Barnham, *et al.*, 2004; Finkel, *et al.*, 2007) y en diversas patologías.

Las EROs desempeñan un papel central como segundos mensajeros en muchas vías de transducción de señales, donde pueden modificar proteínas postraduccionalmente a través de la oxidación de los residuos de cisteína sensibles a cambios redox. El rango de procesos celulares bajo la regulación redox es muy amplio e incluye las vías proliferativas y apoptóticas. El control del ambiente redox celular es esencial para la función fisiológica normal y las perturbaciones del equilibrio redox son características de muchas patologías. El estrés oxidante es particularmente frecuente en el cáncer (donde muchos tipos celulares malignos

poseen un metabolismo redox anormal) y en la diabetes mellitus, involucrando la regulación a la baja de las enzimas antioxidantes y la función mitocondrial alterada.

Hay tres principales lugares en la célula que producen EROs bajo condiciones fisiológicas (mitocondria, retículo endoplásmico y membrana celular), otros organelos como el núcleo, el aparato de Golgi y los peroxisomas, también participan y están bajo estudio (Dickinson y Chang, 2011). En la mitocondria, la cadena transportadora de electrones (CTE), transfiere electrones desde NADH y succinato a través de una vía redox y termina en la reducción del O_2 a H_2O , durante la síntesis de ATP en la respiración aeróbica. Sin embargo, el flujo de electrones a través de esta cadena es un proceso imperfecto y en diferente proporción, acorde a las condiciones metabólicas, las moléculas de oxígeno son solo reducidos parcialmente y forman EROs, particularmente O_2^\bullet del que deriva H_2O_2 (Figura 1, Murphy, 2009)

La producción de superóxido en la membrana plasmática es por acción de NADPH oxidasas (Nox; Lamberth, 2004; Suh, *et al.*, 1999; Geiszt, *et al.*, 2000). Éstas son conocidas clásicamente por ser productoras de EROs para causar la muerte de patógenos fagocitados durante la respuesta inmune (Bedard y Krause, 2007). Las Nox tienen la función de producir O_2^\bullet . En el humano existen siete tipos de Nox, Nox 1-5 y Duox 1-2. Todas ellas presentan un dominio adicional con probable función de peroxidasa extracelular. De estas enzimas, la Nox2 (gp91 phox) de los neutrófilos ha sido la más estudiada. Las Nox se encuentran en la mayoría de eucariotas, quienes por lo general tienen más de una. La función de estas enzimas, además de la inmunológica, está relacionada con las vías de señalización, como la de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK), y también con la activación del factor de transcripción nuclear κB (NF- κB). Finalmente, estas enzimas se han asociado con los procesos de diferenciación y muerte celular (Binker, *et al.*, 2011). Está bien establecido que las Nox son responsables de la generación intracelular de EROs, desencadenada por los diferentes factores de crecimiento al unirse a sus receptores, al inducir proliferación celular, diferenciación o apoptosis (Choi, *et al.*, 2005).

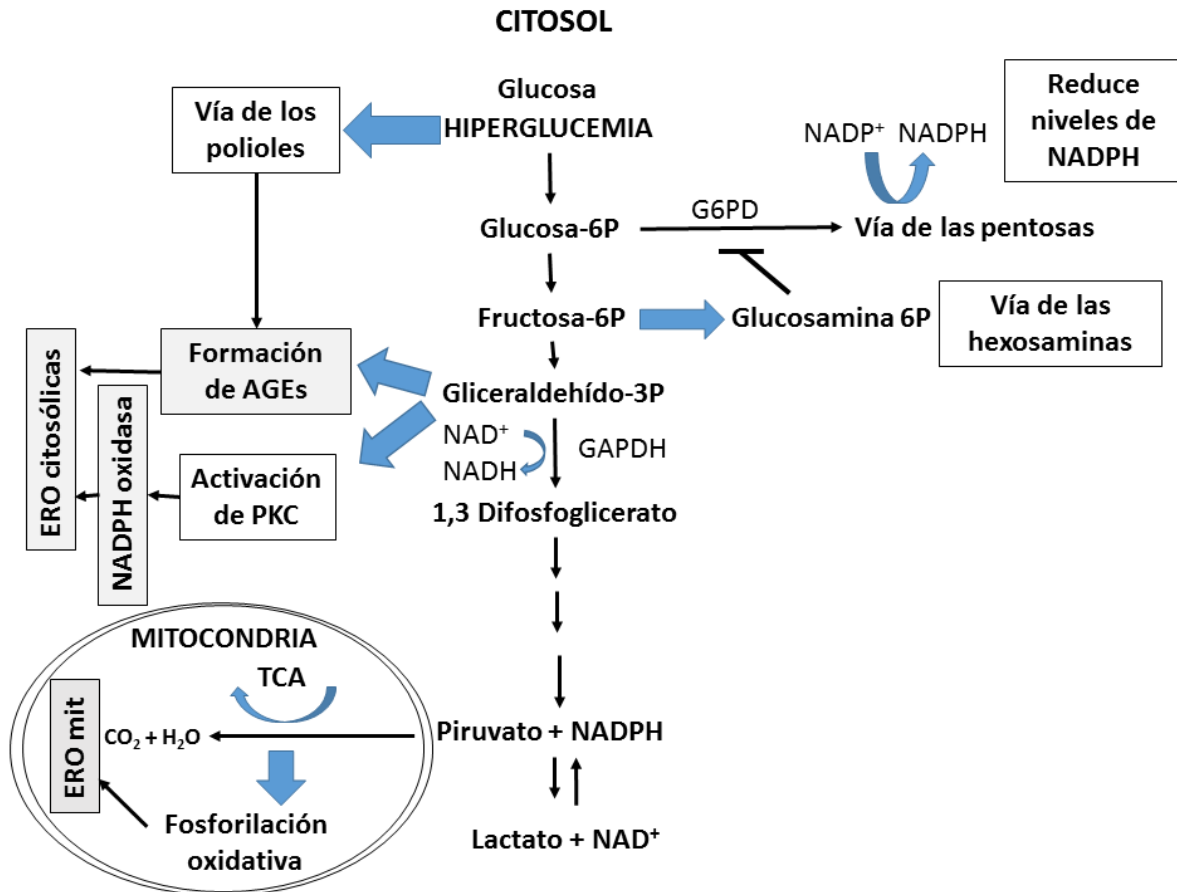


Figura 1. Vías que contribuyen a la generación de EROs en la DMG (modificado de Lappas, *et al.*, 2011)

Diabetes mellitus gestacional y estrés oxidante

Los embarazos humanos normales son considerados un estado de aumento de estrés oxidante. En el embarazo, las EROs juegan papeles importantes en el desarrollo embrionario, implantación, desarrollo y función de la placenta, desarrollo fetal y parto. Sin embargo, en embarazos patológicos, incluyendo DMG, están asociados con un nivel aumentado de estrés oxidante, debido a la sobreproducción de radicales libres y/o un defecto en las defensas antioxidantes. Estas últimas, tienen implicaciones importantes en la madre, en la función de la placenta y en el buen desarrollo fetal. Modelos animales de diabetes han confirmado el papel importante del estrés oxidante en la etiología de las malformaciones congénitas; la relativa inmadurez del sistema antioxidante facilita la exposición de embriones y fetos al daño del estrés oxidante. Existen pocos estudios clínicos evaluando el

potencial benéfico de los efectos antioxidantes en la DMG. Así que si el aumento del consumo de antioxidantes puede reducir las complicaciones de la DMG en la madre y en el feto, necesita ser explorado (Lappas, *et al.*, 2011).

Además, el estrés oxidante tiene un gran número de papeles importantes en el desarrollo embrionario, incluyendo el desarrollo de la placenta, que requiere propiamente la invasión del trofoblasto y la remodelación de tejidos. Una exitosa implantación depende de la capacidad del embrión en degradar la membrana basal del epitelio uterino e invadir el estroma uterino (Staun-Ram, *et al.*, 2004). Este trabajo provee datos de la participación del estrés oxidante en la implantación embrionaria de ratón. Para comprender este proceso comenzaremos describiendo el desarrollo preimplantacional y posteriormente el desarrollo temprano de los linajes extraembrionarios y la placenta.

DESARROLLO PRE-IMPLANTACIONAL: UNA VISIÓN GENERAL

El periodo del desarrollo pre-implantacional en mamíferos, va desde la fertilización hasta la implantación del blastocisto en el útero. Es una etapa en que se forman el trofotodermo, el endodermo primitivo y el epiblasto. Estos tres linajes contribuyen a tejidos distintos en el desarrollo posterior: el epiblasto dará origen al feto, el trofotodermo continuará formando la mayoría de la contribución fetal para la placenta, y el endodermo primitivo se convertirá en endodermo parietal y visceral, el cual después contribuirán al saco vitelino.

El conocimiento acerca del desarrollo de estos tres linajes durante el periodo de pre-implantación tiene implicaciones clínicas para el incremento en estrategias de reproducción asistida como fertilización *in vitro* y diagnósticos genéticos preimplantacionales, previniendo el alto índice de pérdidas en embarazos tempranos en humanos y mejorando la derivación de líneas de células madres o estaminales de embriones humanos. Mucho de lo que se sabe acerca del desarrollo preimplantacional ha sido de estudios en el ratón, el cual ha sido usado, desde hace

40 años, como modelo para el estudio, indicativo de lo que puede ocurrir en el desarrollo de los embriones humanos (Cockburn y Rossant, 2010).

Primero, el huevo es fertilizado y comienzan una serie de divisiones celulares, produciendo un incremento de células pequeñas, conocidas como blastómeras, sin ningún cambio en el tamaño del embrión. Como en otros tipos de organismos, la síntesis de proteínas en el cigoto de mamífero inicialmente se basa en un depósito de mRNA maternos (Bacharova, 1985). La transcripción de los mRNA del genoma del cigoto comienza durante las primeras divisiones, a esta transición de la transcripción materna a embrionaria se le conoce como activación del genoma embrionario. Esta activación se lleva a cabo de forma temprana en el ratón, al final del estadio (E) de 1-2 células, y en humanos ocurre más tarde en el estadio de 4-8 células. Las divisiones celulares producen un embrión de 8 células que subsecuentemente experimenta un incremento de adhesión intercelular, conocida como compactación, causando que todas las células adopten una morfología menos redondeada. Este proceso de compactación es esencial para los eventos morfogénéticos posteriores y para la segregación de los tres linajes embrionarios. En el ratón la compactación es asociada con la formación de uniones adherentes mediadas por la cadherina E u ovomorulina (Vestweber, *et al.*, 1987), y posteriormente por uniones estrechas entre células. Las blastómeras no muestran ninguna señal de polaridad intracelular hasta la compactación pero con el incremento de la adhesión celular en esta etapa, todas las células rápidamente se polarizan en un eje perpendicular a la célula, y se forman regiones, en contacto con el exterior (apical) y con el interior (basolateral). Aunque el cómo se inicia el proceso de compactación y polaridad celular permanecen inciertos. Una vez que el embrión de 8 células se ha compactado y polarizado, vienen otras dos divisiones, y crece de 16 a 32 células. Del estadio de 32 células en adelante, hay dos poblaciones celulares que tienen distintos destinos: las células en el exterior del embrión contribuyen al linaje del trofotodermo (TE), mientras que las células internas contribuyen a la masa celular interna (MCI), en ésta última se forman los linajes de epiblasto y endodermo primitivo. La formación del blastocele comienza en el estadio

de 32 células, las células de afuera del embrión se convierten en el linaje del TE (Dyce, *et al.*, 1987; Pedersen, *et al.*, 1986), un fluido llena la cavidad conocida como blastocele, cuya presencia es esencial para el desarrollo de la MCI (Pedersen, *et al.*, 1986). Durante la formación del blastocele el agua puede entrar al embrión por un gradiente osmótico, como un resultado de Na^+/K^+ ATPasa que produce la acumulación de Na^+ en el lado basolateral del TE, una hora después de la compactación, y continua durante otro día entero. Con la formación del blastocele en el E3.5, el embrión es ahora considerado blastocisto, este continúa madurando durante 24 horas y está listo para implantarse en la pared uterina por el E4.5. Aunque no ha sido estudiado extensivamente la formación del blastocele en embriones humanos parece formarse aproximadamente en el E4.5 (Edwards, *et al.*, 1981).

DESARROLLO TEMPRANO DE LOS LINAJES EXTRAEMBRIONARIOS

Los primeros linajes en diferenciarse en el embrión de mamífero son el trofotodermo (TE) y el endodermo primitivo, los cuales se diferencian en el blastocisto. Estudios experimentales en el ratón han mostrado que estos linajes celulares tempranos dan origen a componentes de las membranas extraembrionarias que son usados para asegurar la supervivencia del embrión de mamífero en el ambiente uterino, pero no contribuyen a la formación del feto. Existe un gran interés en comprender la regulación del desarrollo de estos tejidos; ya que sus funciones han sido esenciales para el establecimiento de la viviparidad en mamíferos (Rossant y Cross, 2001). La disrupción en el desarrollo y diferenciación de estos linajes puede subrayar una variedad de problemas en el embarazo humano, incluyendo crecimiento retardado intrauterino y preeclampsia. La evidencia es acumulativa ya que en el desarrollo temprano, estos linajes extraembrionarios no solo tiene un papel secundario en el embrión, sino que juegan un rol activo en proveer señales de información para los linajes embrionarios y promover el patrón correcto y la diferenciación del embrión (Rossant, 2016). Comprender la regulación

de la formación, mantenimiento y función de estos linajes es por lo tanto una parte importante del entendimiento del desarrollo del embrión de mamífero

El desarrollo del blastocisto de ratón implica la generación del epitelio polarizado del TE, el cual inyecta fluido para formar el blastocele interno. En un extremo de la cavidad del blastocele está un grupo no polarizado de células llamada masa celular interna (MCI). Como se mencionó anteriormente, la formación del blastocele comienza alrededor del día 3 del desarrollo en la mórula tardía de 32 células, inicialmente por la acumulación de vesículas llenas de fluido intracelular que después se fusionan para formar el blastocele intercelular. El fluido del blastocele se mantiene por un transporte activo de iones de Na^+ vía un transportador Na^+/K^+ localizado en el lado basal de la capa del TE (MacPhee, *et al.*, 2000). Inicialmente todas las células del TE son aparentemente similares, pero antes de que el embrión se implante en el útero, las células del TE lejos de la MCI (TE mural), cesan la división celular pero continúan la replicación del ADN para comenzar el proceso de la formación de células gigantes del trofoblasto (CGT) primarias (Gardner y Davies, 1993). Las células del TE en contacto con la MCI continúan proliferando para formar el TE polar. Inicialmente, en el E3.5 de blastocisto, la superficie del blastocele de la MCI está cubierta por protrusiones, desde las células del TE hasta el margen de la MCI (Fleming, *et al.*, 1984). Estas protrusiones se desvanecen cuando las células superficiales de la MCI son reconociblemente distintas del resto de la MCI para formar el endodermo primitivo.

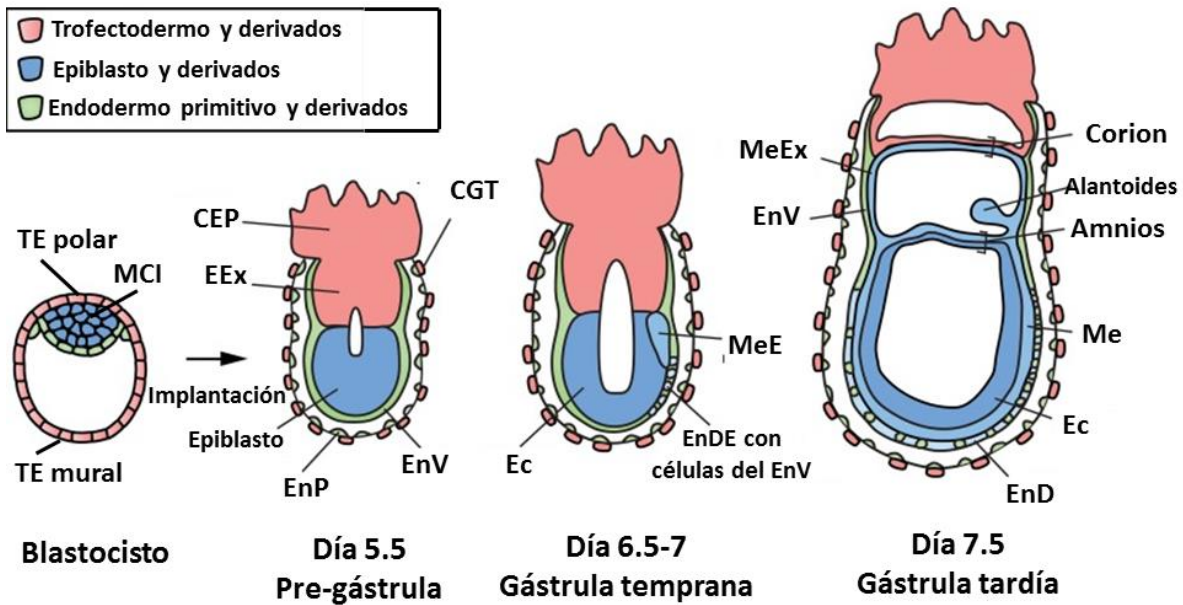


Figura 2. Relaciones del linaje en el embrión temprano de ratón. Representación de los principales derivados del trofotodermo y del endodermo primitivo en etapa de post-implantación temprana. TE: trofotodermo; MCI: masa celular interna; CEP: Cono ectoplacentar; EEx: Endodermo extraembrionario; EnP: Endodermo parietal; EnV: Endodermo visceral; CGT: Células gigantes de trofoblasto; Ec: Ectodermo; EnDE: Endodermo definitivo emergente; MeE: Mesodermo emergente; MeEx: Mesodermo extraembrionario; Me: Mesodermo; EnD: Endodermo definitivo. Modificado de Rossant, 2016.

El endodermo primitivo es una capa sencilla de células sobre la superficie de la MCI distinguible por una variedad de marcadores ultraestructurales y moleculares. Entre el día 3.5 y 4.5 la zona pelúcida alrededor del blastocisto se pierde y el embrión comienza a experimentar crecimiento neto. El endodermo primitivo se expande lateralmente y comienza a migrar sobre la superficie del TE mural para formar el endodermo parietal (EnP). Éste, en el momento en el que el embrión se implanta en el útero, cerca del día 4.5 de gestación, ha formado tres distintos tipos celulares y

además la diferenciación ha comenzado en ambos linajes, en el trofoblasto y en el endodermo primitivo (Rossant y Tam, 2002; Cockburn y Rossant, 2010).

Entre el E4.5 y E6, además del crecimiento y diferenciación de los linajes extraembrionarios, ocurre la gastrulación en el embrión. El TE polar del blastocisto prolifera y empuja a la MCI dentro del blastocele para formar el también llamado estadio del desarrollo del cilindro huevo (Copp, 1979). La proliferación diploide del trofoblasto en aposición al epiblasto del embrión es llamado el ectodermo extraembrionario (EEx) y el trofoblasto más lejano forma el cono ectoplacental (CEP) que sobresale dentro de la cavidad uterina. Las células del trofoblasto del borde del CEP detienen la división pero endoreduplican su ADN para formar las CGT secundarias que migran alrededor del conceptus entero y es la capa que está en contacto directo con el tejido uterino. El EnP se alinea a la capa de CGT para formar el saco vitelino parietal, mientras que el endodermo primitivo que está sobre el cilindro del huevo forma el endodermo visceral (EnV). Estos dos tipos celulares son distintos en morfología, las células del EnP son pequeñas, en forma de eje y migran activamente sobre la superficie del saco vitelino parietal (Cockroft, 1986), secretando matriz extracelular (MEC), mientras que las células del EnV forman una capa epitelial columnar en la superficie del cilindro huevo.

Los derivados exactos de la MCI y del TE en el E3.5 de blastocisto fueron revelados por experimentos de reconstitución del blastocisto, en los cuales la MCI es escindida de un blastocisto, creando una vesícula de TE dentro de la cual un donador genéticamente distinto de MCI fue inyectado (Gardner, *et al.*, 1973). Se encontró que el TE da origen al EEx, CEP y CGT primarias y secundarias, después de la implantación, mientras que la MCI contribuye para todos los otros linajes extraembrionarios y al embrión en sí (Figura 2). La división de la MCI en ectodermo primitivo o epiblasto y endodermo primitivo en el E4.5 marca el origen de solamente otro linaje extraembrionario.

La implantación ocurre por la adhesión de las células del TE mural al epitelio uterino y subsecuentemente, en los roedores, por el desplazamiento de las células epiteliales que es absolutamente dependiente del correcto funcionamiento del trofoblasto. La MCI aislada no puede implantarse en el útero y diversas mutaciones en ratón que afectan el desarrollo del trofoblasto causan muerte embrionaria por interferir con el proceso de implantación (Rossant y Cross, 2001).

La sincronización e invasividad de la implantación del blastocisto de mamífero varía en las diferentes especies, desde la relativamente temprana y profunda vista en ratones y humanos hasta la muy tardía y superficial característica de cerdos, vacas y caballos. Pero incluso entre ratón y humano, existen diferencias. En el ratón el sitio de implantación es rodeado por una rápida expansión del estroma uterino, la decidua, pero las células del TE por sí solas no invaden el estroma. Más bien el TE que está sobre la MCI prolifera en respuesta al factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) para formar la estructura sólida del ectodermo extraembrionario (EEx), las células madre para la placenta tardía (figura 3a). En humanos, el TE temprano del blastocisto es altamente invasivo, y de él se forma el citotrofoblasto y el sinciotrofoblasto, en este último solo se dividen los núcleos sin división citoplásmica, más tarde algunas células de trofoblasto en la vellosidad coriónica pueden actuar como células madre para continuar el desarrollo de la placenta (figura 3b). La importancia relativa del saco vitelino en ratón y humanos puede también jugar un papel en apariencia diferente en la regulación del endodermo primitivo versus formación del epiblasto. En el ratón, el saco vitelino visceral juega un papel crucial como el principal intercambio entre el feto y la madre antes de que la placenta sea establecida. En humanos, los pocos datos sugieren que el saco vitelino es más bien vestigial y que el trofoblasto temprano invasivo juega un papel fuertemente nutritivo (Rossant, 2015).

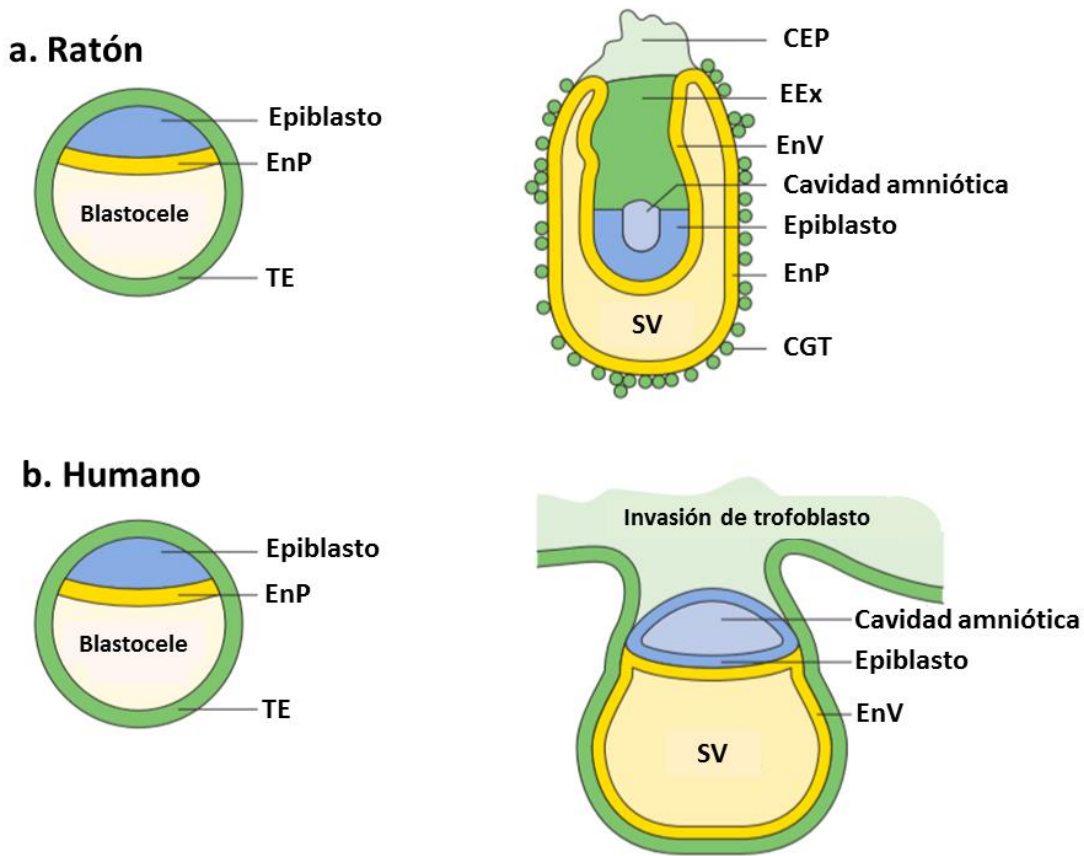


Figura 3. Relaciones del linaje en el embrión temprano. Representación de los principales derivados del trofotodermo y del endodermo primitivo en etapa de post-implantación temprana. TE: trofotodermo; CEP: Cono ectoplacental; EEx: Endodermo extraembrionario; EnP: Endodermo parietal; EnV: Endodermo visceral; CGT: Células gigantes de trofoblasto; SV: saco vitelino. Modificado de Rossant, 2015.

Desarrollo de membranas extraembrionarias

Diferente a la organización del plan general del cuerpo, el cual es altamente conservado en mamíferos, los aspectos estructurales y papeles relativos de las diferentes membranas extraembrionarias varían considerablemente entre los mamíferos. En roedores el saco vitelino rodea el feto entero como la principal membrana extraembrionaria del conceptus. Es la única estructura de intercambio hasta la maduración de la placenta coriónica y persiste como la capa principal de intercambio y protección tardía en el embarazo. En otros mamíferos, el papel del saco vitelino en la placenta varía. Los marsupiales solo utilizan la placenta del saco vitelino, mientras que en humanos y rumiantes, el saco vitelino no rodea el feto,

perdura por solo unas pocas semanas y es vestigial en términos de función de intercambio. Sin embargo, permanece como el sitio inicial de la hematopoyesis embrionaria. El amnios es la membrana de protección principal del feto en primates, encerrando al feto desde estadíos tempranos. En roedores, el proceso de recubrimiento embrionario resulta en el encierre de ambos, el feto y el amnios dentro del saco vitelino visceral, donde el amnios es de importancia auxiliar. Consistente con estos resultados, existen estudios donde en ratones no mutantes hubo muerte embrionaria como resultado de defectos en la función del amnios (más que formación; Rossant y Tam, 2002).

Clasificación de placentas

La placenta es al menos superficialmente distinta en las diferentes especies. La placenta puede ser clasificada por su estructura y por el número de capas celulares entre los sistemas sanguíneos fetales y maternos. Estructuralmente, las placentas de los roedores y humanos se clasifican como discoidales, en las cuales la placenta forma una discreta unidad de adhesión y asociación con el útero. La placenta humana consiste en diversas unidades discoidales llamadas cotiledones, aunque están agrupados juntos. La placenta cotiledónea se encuentra en rumiantes y consiste en múltiples y dispersos sitios de adhesión de cotiledones placentales al endometrio uterino. Algunas otras especies como perros y gatos, tienen una placenta zonaria, en la cual la unión placental se da sobre una banda circular ecuatorial abarcando el conceptus entero. Finalmente en especies como el cerdo, caballo y ballena, la placenta es difusa y la unión es distribuida sobre la mayoría de la superficie del útero (Rossant y Tam, 2002).

La segunda clasificación se relaciona con las estructuras celulares y la degradación en donde las células del trofoblasto invaden y erosionan los tejidos maternos (Rossant y Cross, 2001). Pueden haber hasta seis capas celulares entre la sangre fetal y materna, según los siguientes tipos:

- 1) Placenta epiteliochorial: se encuentra en rumiantes, cerdos, caballos. Ninguna capa celular se pierde y el epitelio uterino es la capa maternal en contacto con el trofoblasto fetal.
- 2) Placenta endoteliochorial: se encuentra en carnívoros. El epitelio uterino se degrada, así que las células endoteliales maternas y fetales están separadas solo por las capas de trofoblasto.
- 3) Placenta hemocorial: se encuentra en humanos y roedores. Existe una completa pérdida del epitelio uterino y degradación de células endoteliales de los capilares maternos, los cuales directamente bañan la superficie del trofoblasto fetal.

Desarrollo de la placenta en ratón

Como producto del desarrollo, el ectodermo extraembrionario se expande para formar el epitelio coriónico, el cual está alineado por una delgada capa de células mesoteliales producidas como el resultado de la formación de los pliegues amnióticos. El alantoides crece fuera desde la parte final posterior del embrión y hace contacto con el corion en el E8.5. En ratones, un evento llamado fusión corioalantoidea, sin embargo, no se produce una fusión celular real. En cuestión de horas de adhesión alantoidea, aparecen pliegues en la placa coriónica próxima a los vasos sanguíneos feto-placentales que crecen a partir del alantoides para generar los componentes fetales de la red vascular placentaria. El trofoblasto, con su asociación a vasos sanguíneos fetales, se somete a una extensiva ramificación de vellosidades para crear una estructura densamente compactada llamada el laberinto. Coincide con el comienzo de las ramificaciones morfogenéticas, las células del trofoblasto coriónicas comienzan a diferenciarse en tres capas de células del trofoblasto del laberinto. En ratones, hay dos capas de células del sinciotrofoblasto que están directamente en aposición a las células endoteliales de los vasos sanguíneos derivados del feto. Estas células son multinucleadas y están formadas por fusión de células precursoras post-mitóticas. Además, un tipo celular mononuclear permanece afuera de la capa del sincicio, sin embargo, su origen y funciones se desconocen (Rossant y Tam 2002; Rossant, 2015).

Mientras el laberinto es desarrollado, este está apoyado estructuralmente por la formación del espongiotrofoblasto, el cual forma una capa compacta de células no-sinciales entre el laberinto y las células gigantes externas. A pesar de que el análisis directo del linaje no ha sido estudiado, se ha asumido, basándose principalmente en estudios histológicos y con marcadores de expresión genética, que el espongiotrofoblasto deriva de células del cono ectoplacentario de estadíos tempranos. La sangre materna se suministra a través del espongiotrofoblasto por medio de unos senos arteriales centrales y largos, en los cuales las células endoteliales maternas fueron erosionadas y remplazadas por células del trofoblasto. La sangre materna eventualmente entra dentro del tortuoso y pequeño espacio del laberinto en el cual directamente baña las vellosidades trofoblasticas fetales, asegurando así el fácil intercambio de materiales entre los dos sistemas sanguíneos. El intercambio en el área del laberinto está establecido en el principio actual, donde los pequeños canales de sangre materna cursan en la dirección opuesta al flujo capilar sanguíneo en la circulación feto-placental.

La placenta se encarga de muchas funciones más allá del simple intercambio entre el ambiente materno y fetal. Por ejemplo las células gigantes del trofoblasto y del espongiotrofoblasto producen muchas moléculas, incluyendo hormonas como el lactógeno placentario y factores de remodelación como metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) (Teesalu, *et al.*, 1999) y el activador del plasminógeno de tipo urokinasa (uPA) (Teesalu, *et al.*, 1998). La placenta de ratón es así una cama altamente fina con un soporte celular que involucra aspectos estructurales y funcionales del intercambio materno-fetal.

Aspectos comparativos entre la placenta de humano y ratón

Comparaciones cercanas de los tipos celulares de placentas, sus funciones y los tipos de genes y proteínas que ellas expresan, revela que existen considerables similitudes en las vías de regulación que se conservan evolutivamente. Una comparación de placentas humanas y de ratón es particularmente importante, ya que se espera que la información generada del control molecular del desarrollo de

la placenta de ratón sea aplicable para los humanos (figura 4). La capa externa de la placenta de roedores está compuesta de células gigantes del trofoblasto (CGT) que regulan la implantación e invasión dentro del útero. Este último comportamiento es similar por lo tanto a las células invasivas del citotrofoblasto extraveloso (CTE) en humanos. Las CGT de ratón son menos invasivas *in vivo* que las células del CTE, las cuales pueden migrar distancias considerables dentro de la pared uterina. Sin embargo, las moléculas que están implicadas en la invasión celular en humanos están también expresadas en las CGT (Cross, *et al.*, 1994). Uno de los rasgos más llamativos de las CGT es que son poliploides (Zybina y Zybina, 1996), debido a la repetida replicación del ADN en la ausencia de mitosis (endoreduplicación) (MacAuley, *et al.*, 1998). Las células del CTE humano también son poliploides, aunque en menor medida (Berezowsky, *et al.*, 1995). La función de la capa media de la placenta de ratón, las células del espongiotrofoblasto se desconoce. Sin embargo al menos parte de las células del espongiotrofoblasto (y particularmente su precursor, el cono ectoplacentario pueden diferenciarse en células gigantes, análogas a las células de las columnas celulares de citotrofoblasto en las vellosidades de anclaje de la placenta humana. La capa del laberinto de la placenta es completamente análoga en función a las vellosidades coriónicas flotantes en la placenta humana, ellas proveen grandes áreas de superficie para nutrientes e intercambio gaseoso. En ambas placentas de humanos y roedores, las vellosidades están cubiertas por sincitiotrofoblasto que está en contacto directo con la sangre materna. Como se describió anteriormente existen similitudes y diferencias entre el modelo de ratón y humano (Rossant y Cross, 2001; Rossant, 2015).

Desarrollo de la placenta y complicaciones en el embarazo

Una de las esperanzas para los estudios en ratones es que se podrá obtener información de las bases moleculares de enfermedades que aumentan los defectos en la placenta durante el desarrollo intrauterino. Estas enfermedades incluyen “aborto” (perdida en los primeros dos meses de gestación), algunos tipos de restricción de crecimiento intrauterino (RCIU) y preeclamsia. Con la comparación entre las placentas humanas y de ratón, es posible encontrar las moléculas

reguladoras que participan en las placentas de ratón y que están expresados y son funcionales en los tipos celulares análogos en humanos. Diversos genes que son necesarios para el desarrollo de la placenta en ratón, han sido encontrados y se expresan en los humanos (Rossant, 2016).

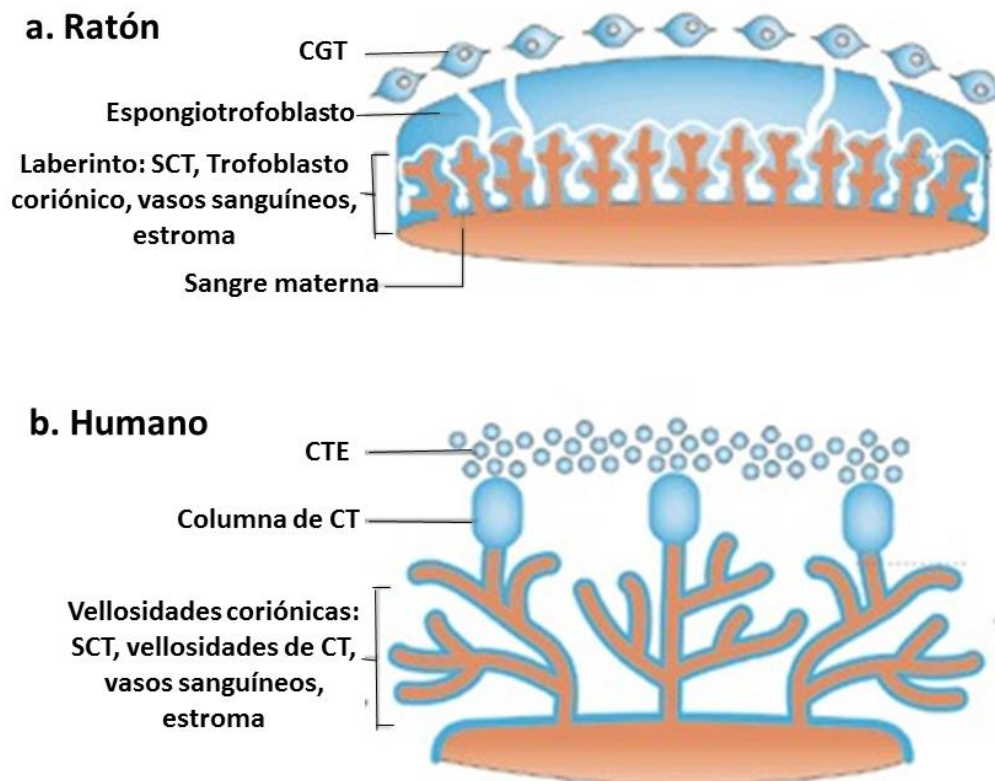


Figura 4. Anatomía comparativa de las placentas de ratón y humano. a) Estructura de la placenta de ratón. b) Estructura de la placenta humana. Estructuras derivadas de trofoblasto (azul) y tejidos derivados de mesodermo (naranja). CGT: Células gigantes de trofoblasto. SCT: Sincitiotrofoblasto. CT: citotrofoblasto. CTE: citotrofoblasto extravelloso. Modificado de Rossant y Cross, 2001.

Uno de los principios importantes que surge de los estudios es que distintas vías controlan diferentes aspectos del desarrollo de la placenta. Aunque en los abortos, algunos tipos de restricción de crecimiento intrauterino (RCIU) y preeclamsia son considerados como parte de un espectro, la evidencia sugiere que hay distintas patologías afectando diferentes componentes de la placenta. En el aborto y casos

severos de RCIU, en donde la placenta se caracteriza por una reducción en la ramificación de las vellosidades coriónicas y en la vasculatura fundamental. Mientras que la preeclampsia está asociada con defectos de la diferenciación/invasión de las células del citotrofoblasto extraveloso, aunque la complejidad de esta enfermedad hace difícil la asignación del defecto primario (Cross, 1996).

La diferenciación y la capacidad invasiva de las células del trofoblasto están altamente controladas espacial y temporalmente para establecer la placentación propiamente. Defectos en la invasión del trofoblasto están asociados con diversas complicaciones durante el embarazo, afectando a ambos a la madre y al feto. La reducción en la invasión del trofoblasto y el fallo de la remodelación de arterias espirales maternas se observa en las complicaciones de embarazos con preeclampsia y/o crecimiento con restricción intrauterina. Una excesiva invasión de trofoblasto deja a la placenta acreta y percreta, la cual es la principal causa de una hemorragia masiva postparto y muerte maternal.

Así, el comprender el mecanismo que controla la invasión del trofoblasto es esencial para definir las modalidades de estos desordenes. La biología de la diferenciación e invasión, los factores que gobiernan este proceso y las vías de señalización que operan para regular la invasión han sido extensamente revisadas. Como se mencionó anteriormente, la DMG está asociada con un cambio en el metabolismo de la glucosa, el cual afecta a la implantación del embrión. El efecto de la concentración de glucosa local en la invasión del trofoblasto no ha sido comprendida (Belkacemi, *et al.*, 2005). El establecimiento del embarazo en mamíferos depende en parte de la secreción de proteínas específicas del embrión temprano (Wang, *et al.*, 2003). En este trabajo nos enfocaremos en la participación del estrés oxidante en acción de altas concentraciones de glucosa sobre la expresión de proteasas que participan durante la invasión del trofoblasto, en blastocistos de ratón en cultivo.

ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DURANTE LA INVASIÓN DEL TROFOBLASTO

Metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs)

Las MMPs son un grupo de proteinasas extracelulares y de membrana, que juntas son capaces de degradar todas las proteínas de la MEC, y a otras proteínas como: otras proteinasas, inhibidores de proteinasas, factores de crecimiento, receptores de superficie celular y moléculas de adhesión (Nagase, *et al.*, 2006). La familia de las MMPs se compone de 24 enzimas que se agrupan en seis subgrupos de acuerdo en la especificidad por el sustrato y por los dominios que las constituyen (Wieczorek, *et al.*, 2012). Los dominios generales son el prodominio N-terminal con una cisteína conservada, el dominio catalítico que contiene el sitio activo que une Zn^{2+} , la región bisagra, y el dominio C-terminal tipo hemopexina. Algunas de las MMPs tienen dominios adicionales, mientras que otras carecen de uno o más dominios. La expresión y actividad de las MMPs están controlada específicamente en varios niveles, en su síntesis y secreción, durante la activación de proenzimas, por inhibidores, por su ubicación en el tejido o por degradación (Ra y Parks, 2007).

La regulación transcripcional de las MMPs ocurre a través de varios elementos *cis* en las regiones promotoras de los genes que las codifican (Yan y Boyd, 2007). Esto permite que las diferentes MMPs sean reguladas por diversos *trans*-activadores y por lo tanto pueden ser reguladas específicamente dependiendo del tipo celular. Entre los elementos *cis* que se encuentran en los distintos promotores de las MMPs son la caja TATA y sitios de unión para AP-1, para miembros de la familia Ets, Sp-1 y NF- κ B. La mayoría de las MMPs se sintetizan y se transportan a la MEC como proenzimas inactivas. Estas proenzimas pueden ser activadas por otras proteinasas, a veces unidas a la membrana celular, mientras que otras pueden ser activadas intracelularmente. La actividad enzimática de las diferentes MMPs es también regulada por proteínas circulantes y proteínas de la MEC. Entre estas proteínas están los inhibidores tisulares específicos de las MMPs (TIMPs).

La expresión de MMPs puede ser fuertemente inducida por una gran variedad de citocinas y factores de crecimiento incluyendo interleucinas, interferones, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento hepático (HGF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Yan y Boyd, 2007). La presencia en el promotor del gen de la MMP-9 de sitios de unión a NF- κ B y AP-1, conduce a que su expresión sea sensible a los cambios redox, mecanismo por lo que el estrés oxidante puede regular su transcripción y actividad (Uemura, *et al.*, 2001).

La implantación del embrión en el endometrio uterino es altamente regulada por eventos que son críticos para el establecimiento del embarazo. Una exitosa implantación embrionaria depende del desarrollo sincronizado de ambas, la capacidad invasiva del embrión y la receptividad del endometrio. Este proceso es acompañado por la degradación extensiva y remodelación de la MEC. Diversos sistemas enzimáticos, incluyendo el sistema de activación del plasminógeno y el de las MMPs, son responsables de la degradación de la MEC. Recientes estudios han implicado a las MMPs particularmente a la MMP-9 como la principal enzima en la remodelación de la MEC durante la implantación en el ratón. La actividad de las MMPs está altamente controlada por sus inhibidores endógenos (TIMPs). El elaborado balance entre la actividad de las MMPs y su inhibición por TIMPs es importante para la regulación de la implantación embrionaria (Zhang, *et al.*, 2004).

Similar a otros procesos los cuales requieren de migración e invasión tisular, incluyendo la progresión del cáncer, angiogénesis o desarrollo embrionario, la invasión del trofoblasto en el estroma decidual está acompañada por la regulación de enzimas proteolíticas. Estas incluyen a las MMPs, catepsinas y el activador de plasminógeno tipo urokinasa (uPA). Entre estas, MMP-2 y -9 representan las proteasas mejor caracterizadas en el contexto de la invasión del trofoblasto. Ambas son expresadas y secretadas por cultivos de trofoblasto (Librach, *et al.*, 1991) y la adición de los TIMPs o anticuerpos específicos bloqueadores de su función disminuyen la invasión del trofoblasto *in vitro* (Isaka, *et al.*, 2003).

Además, factores que incluso promueven o inhiben la invasión del trofoblasto han sido asociados con efectos reguladores de la actividad de MMP-2 y/o -9. Por ejemplo, el EGF que regula la inducción de la invasión del trofoblasto al incrementar la expresión y actividad de ambas MMP-2 y -9 (Biadasiewicz, *et al.*, 2011) mientras el efecto anti-invasivo del TGF- β en el trofoblasto es acompañada por la inducción de la secreción de TIMP2. A pesar de esto, recientes estudios sugieren que la deficiencia de MMP-9 en ratones mimetiza un fenotipo de preeclamsia asociado a la perjudicación de la diferenciación del trofoblasto e invasión (Plaks, *et al.*, 2013). Otros miembros de la familia de las MMPs se han encontrado expresados en el trofoblasto incluyendo MMP-3, -7 o -12; esta última fue recientemente descrita por ejecutar elastólisis durante la remodelación de la arteria espiral uterina (Harris, *et al.*, 2010). Además uPA y su receptor, uPAR, se cree que juegan un papel crucial en la movilidad del trofoblasto. Por ejemplo, el TNF- α regula la supresión de la movilidad del trofoblasto controlada por el incremento en la regulación del inhibidor de uPA, el inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1 (PAI-1) (Bauer, *et al.*, 2004). Interesantemente, uPA puede también ejecutar una función pro-migratoria en el trofoblasto independiente de su actividad proteolítica (Liu, *et al.*, 2003). Datos recientes indican que sorprendentemente solo un pequeño número de miembros de MMPs son indispensables para el movimiento celular en un ambiente que requiere la proteólisis de la MEC. Mientras que los movimientos de fibroblastos y tumores celulares en explantes de piel o matrices artificiales dependen de la actividad de la MMP de membrana tipo 1 (MMP-MT-1), la delecion de MMP-2, -3, -8, -9 y -13 no afecta la capacidad móvil de estas células. Además, hay evidencia sólida de la degradación proteolítica de la MEC en la invasión de células de cáncer (Wolf y Friedl, 2011).

Otros estudios reportan que las proteasas también tienen propiedades antitumorígenicas, en ensayos clínicos usando inhibidores globales de metaloproteinasas o inhibidoes del plasminógeno en tratamientos contra el cáncer (Lopez-Otin y Matrisian, 2007). Consecuentemente, ahora es reconocido que la actividad proteolítica durante cualquier tipo de proceso invasivo, tiene más sustratos

alternativos que componentes de la MEC (Egeblad y Werb, 2002). Estos descubrimientos han aumentado los esfuerzos para identificar nuevos sistemas de proteasas y funciones que controlen la movilidad celular así como procesos relacionados incluyendo: proliferación, angiogénesis, autofagia, adhesión o diferenciación (Wolf y Friedl, 2011).

Como se mencionó anteriormente, en el embarazo, el cigoto comienza a dividirse y alcanza la cavidad uterina al cuarto día después de la fertilización. La invasión del endometrio por el trofoblasto se observa para el quinto o sexto día de desarrollo (Isaka, 2003). El establecimiento del embarazo en mamíferos depende en parte de la secreción de proteínas específicas del embrión temprano. Diversos estudios indican que MMPs y activadores del plasminógeno son las principales moléculas que participan en la implantación embrionaria y desarrollo (Wang, *et al.*, 2003), por lo que conocer su regulación es altamente importante para el desarrollo embrionario.

Sistema de activación del plasminógeno

La plasmina es una serina-proteasa que a nivel fisiológico participa en procesos tales como remodelación tisular, remoción de coágulos sanguíneos y procesos invasivos de implantación y metástasis. Esta enzima es la forma activa del zimógeno plasminógeno, el cual es secretado principalmente por el hígado y en muy pequeña cantidad por otros órganos: riñones, glándulas adrenales, cerebro, testículos, corazón, pulmones, útero, retina, bazo, timo e intestino (Castellino y Ploplis, 2005). El zimógeno es activado por los activadores del plasminógeno tipo tisular (tPA) y uroquinasa (uPA), y algunas otras enzimas. El corte de la cadena lineal del plasminógeno provoca un cambio conformacional del sitio catalítico, que le confiere actividad enzimática sobre su sustrato. La plasmina degrada algunos componentes de la matriz extracelular, como laminina, fibrina y fibronectina, pero también participa directa o indirectamente en la cascada proteolítica que activa a las MMPs y estas últimas son capaces de degradar prácticamente a todos los componentes de la MEC (figura 5).

Los activadores del plasminógeno, tanto el tPA como el uPA, pertenecen a la familia de las serina proteasas. El tPA participa principalmente en el sistema fibrinolítico. Está formado por una cadena polipeptídica de 530 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.*, 2002). La función del primero es la de unirse con gran afinidad al receptor del uPA (uPAR) en las superficies celulares. El uPA de una cadena presenta baja actividad proteolítica, pero cuando la plasmina 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.*, 1990).

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.*, 1994). En embriones peri-implantacionales de ratón y humano se secreta una gran cantidad de uPA, por parte del trofoblasto, debido a su carácter altamente invasivo (Aflalo, *et al.*, 2004 y Coulam, *et al.*, 2006).

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

PAI-1 juega un papel muy importante en varias funciones 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 de proteasa de uPA, por lo tanto no transforma el plasminógeno en plasmina y se inhibe la degradación de MEC (figura 5). Así PAI-1 es importante ya que inhibe la degradación de la MEC mediada por plasmina, además de estar involucrada en un gran número de patologías como son diabetes tipo 2 y cáncer (Libby, 2000; Hayden, *et al.*, 2005).

Durante la implantación embrionaria el trofoblasto produce uPA y su expresión es regulada por las interacciones de éste con el sustrato. La producción de esta enzima en el trofoblasto del ratón es inducida por fibronectina y laminina (Castillo-Trápala, 2007).

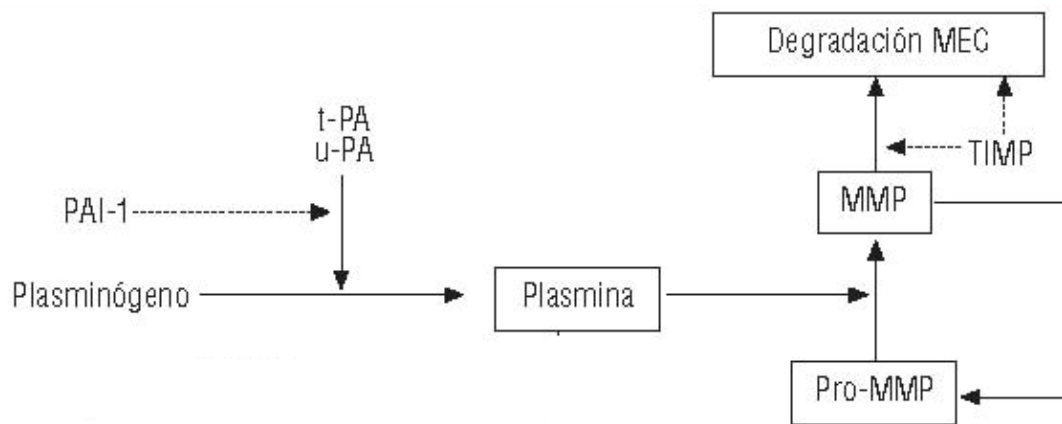


Figura 5. Degradación de la MEC regulada por el sistema plasminógeno/plasmina

Regulación de MMPs y PAs por EROs

El papel de EROs en la regulación de MMPs y uPA se ha reportado recientemente. EROs aumentan la expresión y actividad de MMP-9 en diferentes tipos celulares como en células de piel humana (Han, *et al.*, 2001) y del epitelio corneal (Gordon, *et al.*, 2009). La sobre-expresión de la superóxido dismutasa (SOD) mitocondrial en

células de fibrosarcoma incrementa los niveles de MMP-1 y la inyección in vivo de éstas células provocan metástasis pulmonar (Connor, *et al.*, 2007). En un estudio más reciente Nelson, *et al.*, (2006) demostraron que la expresión de MMP-1 puede ser dependiente del estado redox con la participación de las MAPK, interviniendo dos de ellas, la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) y la cinasa Janus (JNK). El H₂O₂ puede inactivar fosfatasa importantes para la vía de señalización de MAPK (Reth, 2002; Stone y Yang, 2006) involucradas en la expresión de MMPs y TIMPs (Nelson y Melendez, 2004; Wu, 2006; Yan y Boyd, 2007). Se ha reportado que TNF- α inicia la cascada de señalización activando la cinasa del inhibidor de NF κ B o I κ β y MAPK principalmente, y regulando la activación de los factores de transcripción AP-1 y NF- κ β (MacEwan, 2002; Bradley y Pober, 2001).

La hiperglucemia a través de la producción de EROs puede afectar la actividad de las MMPs en diferentes tipos celulares (Nagasse y Woessenr, 1999). En ocasiones las concentraciones altas de glucosa provocan una reducción en las actividades de las MMPs (Gharagozlian, *et al.*, 2006), sin embargo en células endoteliales altas concentraciones de glucosa (25 mM) inducen la expresión y actividad de MMP-9 (Death, *et al.*, 2003). Mientras que no afectan la secreción de MMP-9 en células de trofoblasto humano (Belkacemi, *et al.*, 2005).

Como se mencionó anteriormente, entre las proteinasas más estudiadas en el proceso de invasión embrionaria se encuentran las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 (Elliot, *et al.*, 2001; Rioux y Castonguay, 2000; Kniss, *et al.*, 2001). La MMP-9 incrementa en un mecanismo mediado por MAPK en diferentes tipos celulares (Holvoet, *et al.*, 2003; Moon, *et al.*, 2004; Wiehler, *et al.*, 2004). Lin, *et al.*, (2008) sugieren que MAPK involucra TNF- α al inducir la secreción de proMMP-9 y que la expresión es dependiente del tipo celular. MMP-9, ha sido desde hace mucho tiempo reconocida como una de las enzimas principales en la degradación proteolítica de la MEC durante la implantación embrionaria (Bjorklund y Koivunen, 2005). Debido a que la invasión del trofoblasto durante la gestación es similar a la

invasión de células tumorales (Isaka, *et al.*, 2003), existen diversos estudios donde han encontrado cómo el estrés oxidante participa en su regulación.

Se ha demostrado que un efecto sinérgico de factores de crecimiento es necesario para incrementar la expresión genética de MMPs (Tian, *et al.*, 2007). EGF es un potente inductor de la expresión y activación de MMP-9, y puede aumentar la invasión y motilidad en diferentes tipos celulares (Kondapaka, *et al.*, 1997; Rothhut, *et al.*, 2007). TGF- β puede estimular la producción de EROs (Liu, 2008; Koli, *et al.*, 2008), e inhibidores de NF- κ B inhiben la secreción de MMP-9 y uPA (Park, *et al.*, 2005). TGF- β también aumenta la expresión de MMP-2 junto con la invasividad (Gloire, *et al.*, 2006, Binker, *et al.*, 2011; Gomes, *et al.*, 2012). NF- κ B es también el principal regulador del VEGF y ha sido reportado que la expresión de éste aumenta la expresión de MMP-9 y uPA (Yao, *et al.*, 2005; Wu, *et al.*, 2009; Ghosh, *et al.*, 2012; Lee y Kim, 2012). Por lo que *in vivo*, usando modelos murinos, se ha demostrado que la actividad de NF- κ B es una clave para la progresión de la invasión; ya que al usar inhibidores de NF- κ B se suprime la expresión de moléculas relacionadas con la invasión como MMP-9, MMP-2 y uPA (Wu, *et al.*, 2009)

NF- κ B además se muestra como una molécula clave en el control de la invasión en parte por su acción inductora de MMPs y PAs. La respuesta de NF- κ B puede depender de la expresión de sus genes corriente abajo, los cuales pueden ser afectados por otras vías de señalización. Las cascadas MAPK/ERK son otra vía crucial de señalización en la invasión (Calvisi, *et al.*, 2006; Coleman, 2003). MAPK, incluyendo ERK, p38 y JNK participan en la invasión (Berra *et al.*, 1995; Schonwasser *et al.*, 1998). MAPK son requeridas para la migración celular y pueden ser activadas por EROs mediante una gran variedad de procesos celulares (Kruger y Reddy, 2003; Kenmorgant, *et al.*, 2004). Un incremento de los niveles de EROs aumenta la actividad de MAPK en la invasión. Se ha reportado que EROs tienen un papel central en la activación de ERK (Wu, 2006; Nguyen, *et al.*, 2011). Sin embargo, la correlación positiva entre el incremento de la generación de EROs y la invasión, los mecanismos por los cuales los antioxidantes actúan para suprimir el

desarrollo del cáncer y cómo MAPK son activadas por EROs para desencadenar la migración celular, aun no se conocen con profundidad (Lee, *et al.*, 2009).

El estrés oxidante es un potente activador de las MMPs y PAs. EROs puede romper el “switch” de cisteína que mantiene en latencia de pro-MMPs, llevando a la activación de diferentes MMPs, incluyendo MMP-9 y uPA (Tobar, *et al.*, 2010). Por otro lado, el empleo para el tratamiento o prevención de la diabetes, de agentes antioxidantes, o que interfieren con la acción de NF- κ B o MAPK puede ser potencialmente muy útil en el futuro, el antioxidante N-acetilcisteína (NAC) es uno de ellos y reviste especial importancia, no solo por su acción antioxidante, sino por interferir con la acción de NF- κ B, además de que reduce la actividad de MMP-9 en placenta humana (Lappas, *et al.*, 2011).

ANTECEDENTES

En la implantación embrionaria en mamíferos el blastocisto penetra a distintas profundidades de la pared uterina mediante un proceso invasivo (Carson, *et al.*, 2000), en el que participan enzimas proteolíticas que degradan la matriz extracelular y que se producen tanto por el blastocisto como por los tejidos uterinos, como las MMPs (Martínez-Hernández, *et al.*, 2011; Visse y Nagase, 2003), en especial las gelatinasas A (MMP-2) y B (MMP-9), las cuales degradan colágena tipo IV, V, VI y X, gelatina (colágena desnaturalizada) y elastina (Björklund y Koivunen, 2005; Nagase, *et al.*, 2006). La MMP-9 es expresada en células del trofoblasto primario del blastocisto *in vivo* e *in vitro* y secretada abundantemente por el blastocisto de ratón durante la implantación (Wang, *et al.*, 2003).

Uno de los mecanismos para la regulación de las MMPs, es el sistema de activación del plasminógeno. En él, el zimógeno plasminógeno es convertido a su forma activa, la plasmina, por los activadores del plasminógeno (uPA y tPA). Por su parte la plasmina degrada a la fibrina, activando a diversas MMPs (MMP-3, MMP-9) o digiere de manera limitada algunas proteínas de la MEC (Filippov, *et al.*, 2005). Diversos estudios indican que MMP-9 y el uPA actúan como reguladores importantes de la degradación de la MEC durante la implantación (Martínez-Hernández, *et al.*, 2011; Whiteside, *et al.*, 2001; Xu, *et al.*, 2001).

La exposición a concentraciones altas de glucosa produce en diferentes tipos celulares cambios en la síntesis y degradación de la MEC (McGinn, *et al.*, 2004; Bai, *et al.*, 2006; Ko *et al.*, 2006; Dzung Van Huyen, *et al.*, 2007; Lan, 2008), en parte por alterar la expresión de las MMPs y uPA (Ha y Lee, 2005; Wolf, *et al.*, 2005). Debido al aumento en la producción de EROs o de productos de glicación avanzados (AGEs), en parte porque los AGEs aumentan la expresión de citocinas, como TNF- α , TGF- β 1 y el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) (Dzung Van Huyen, *et al.*, 2007; Kim, *et al.*, 2007; Lan, 2008). La formación de EROs inducida por altas concentraciones de glucosa, se ha vinculado a varias rutas

metabólicas, entre ellas la ruta del sorbitol, la glicación de proteínas, la autooxidación de glucosa y activación de la protein-cinasa C (Robertson, *et al.*, 2004).

Concentraciones altas de glucosa en el medio modifican la expresión y actividad de MMP-9 dependiendo de su concentración y del tipo celular, encontrándose resultados contradictorios. Así, concentraciones de glucosa de 12 a 25 mM, disminuyeron la actividad de MMP-9 en queratinocitos al incrementar la expresión de TIMPs (Lan, 2008), mientras que glucosa 14 mM disminuye su expresión en embriones de rata (Doung Van Huyen, *et al.*, 2007), mediante la acción de TGF- β 1 y CTGF. Además, la glucosa (25 mM) no modificó la secreción de MMP9 en células endoteliales del cordón umbilical humano (Gharagozlian, *et al.*, 2006), aunque en otro estudio la misma concentración de glucosa aumentó la expresión y actividad de MMP-9 en células vasculares (Death, *et al.*, 2003). Mientras que 10 mM de glucosa no afectó la secreción de MMP-9, uPA y PAI-1 en células de trofoblasto humano (Belkacemi, *et al.*, 2005).

Hemos encontrado que la exposición de los blastocistos de ratón a glucosa en alta concentración causa un aumento la conversión de plasminógeno a plasmina por el medio condicionado por los embriones y un aumento en el contenido de MMP-9 unida al embrión (Sánchez-Santos, 2009).

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; Bai, *et al.*, 2006; Ko, *et al.*, 2006). La hiperglucemia altera la expresión de las MMPs debido a que aumenta el estrés oxidativo e induce la formación de AGEs en las proteínas de la MEC promoviendo cambios en su función biológica (Ha y Lee, 2005; Wolf, *et al.*, 2005; Bai, *et al.*, 2006). Sin embargo existe controversia en cuanto a la activación y/o inhibición de MMP-9 por altas concentraciones de glucosa en diferentes tipos celulares. La invasión del epitelio uterino por la implantación del blastocisto es promovida por la MMP-9 y cualquier

cambio en la concentración de glucosa puede alterar la capacidad invasiva del embrión.

RELEVANCIA E IMPACTO DEL PROYECTO EN EL ÁREA DE ESTUDIO

Son poco conocidos los factores que regulan la expresión de MMP-9 y uPA en el trofoblasto durante su diferenciación y adquisición del estado invasivo, además de cómo lo anterior, puede ser alterado por diferentes condiciones patológicas que generan estrés oxidante, como la diabetes gestacional. Éste proyecto contribuirá a entender la acción de la hiperglucemia en el desarrollo temprano del blastocisto de mamífero, en especial, de la diferenciación del trofoblasto y adquisición de su estado invasivo, esclareciendo la participación de las EROs en dicho proceso. Lo anterior, a su vez, contribuirá a entender parte de los mecanismos generales en la regulación de expresión y función de proteasas extracelulares, y de su participación en diversas enfermedades que alteran la morfostasis de los tejidos (fibrosis, invasividad en cáncer, etc.).

HIPÓTESIS

El estrés oxidante causado por la exposición a concentraciones altas de glucosa (25 mM) modifica la expresión de MMP-9 y uPA en blastocistos de ratón y aumenta el potencial invasivo del trofoblasto derivado de los blastocistos en cultivo.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar el efecto del estrés oxidante sobre la extensión del trofoblasto y la expresión de MMP-9 y uPA en blastocistos de ratón *in vitro*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

Determinar si altas concentraciones de glucosa (25 mM) cambian la producción de EROs, la expresión de MMP-9 y uPA y si su acción es evitada por antioxidantes.

Evaluar si inhibidores de la producción de EROs disminuyen la expresión de MMP-9 y uPA, con glucosa a altas concentraciones (25 mM).

METODOLOGÍA

Animales.

Para todos los experimentos se utilizaron hembras vírgenes CD-1 que se aparearon con machos de la misma cepa. Los ratones fueron proporcionados por el Bioterio de la FES Iztacala, UNAM, y se mantuvieron a una temperatura de 22 °C, con un fotoperiodo de 12 h luz: 12 h de obscuridad, comida y agua *at libitum*.

Obtención y cultivo de blastocistos de ratón.

Los blastocistos fueron colectados al cuarto día de preñez; los cuernos uterinos fueron removidos y lavados con medio HAM-F-10 (Sigma), pre-equilibrado a 37°C. Se cultivaron 20 blastocistos por poza, del día 4 al 7 (equivalentes de gestación; EG), conteniendo 100 µl del mismo medio con albúmina sérica bovina (BSA) al 0.1%, penicilina G 100U/ml y estreptomycin 100µg/ml (Armant, 2006; Sherman, 1978), en placas de 96 pozos, pre-equilibradas por 2 h en la incubadora de CO₂ (37°C en una atmósfera húmeda y 5% de CO₂, Napco). Los embriones fueron inspeccionados diariamente. El medio condicionado fue remplazado al día 7 EG con medio fresco de tratamiento. Después de dos días de tratamiento (9 EG), los embriones fueron colectados y el medio condicionado fue recuperado

Tratamientos

Los tratamientos duraron 48 h del día 7 al 9 EG. Primero se evaluó la tolerancia a la glucosa de los embriones, con tres diferentes concentraciones de glucosa (5.6, 25 and 40 mM respectivamente) y los respectivos controles osmóticos con glucosa 5.6 mM mas manitol hasta alcanzar la concentración indicadas. Una vez elegida la concentración adecuada de glucosa (25 mM), los embriones fueron cultivados con seis tratamientos: tratamiento 1 (T1): glucosa 5.6 mM (control); T2: control osmótico, (manitol 19.4 mM); T3: alta glucosa (G, glucosa 25 mM); T4: co-tratamiento con alta glucosa más N-acetylcysteina (NAC, 5 mM); T5: co-tratamiento con alta glucosa más apocinina (10 µM) y T6: co-tratamiento con alta glucosa más rotenona (0.1 µM). Apocinina y rotenona inhiben la generación de EROs por Nox o por la cadena transportadora de electrones, respectivamente. También se utilizaron N-methyl-L-

arginine (L-NAME) y allopurinol (Sigma Chemical Co) que inhiben respectivamente a óxido nítrico sintasa y xantina oxidasa, otras fuentes de EROs.

Ensayo de invasión y crecimiento de trofoblasto

Los embriones fueron colectados y cultivados como se describió antes en condiciones no-adherentes (sin suero o proteínas de MEC exógenas), después de los tratamientos del día 7 al 9 EG, con el propósito de evaluar la composición de estirpes celulares de los embriones y de permitir y evaluar el grado de extensión del crecimiento trofoblástico, se adicionó al cultivo del día 9 EG, suero fetal bovino (SFB) al 10%. Después de 5, 10 y 24 h de incubación, se tomaron fotografías y se midió el área de extensión del trofoblasto usando el software ImageJ 1.62 del NIH. Algunos embriones fueron fijados en ácido acético glacial (25 %) y etanol absoluto (75 %) por un minuto y teñidos con aceto-orceína (Rafferty, 1970) para una mejor medición del crecimiento trofoblástico y del área de los núcleos de las células del trofoblasto extendidas usando el mismo programa. La extensión del trofoblasto ha sido considerada como una medida de motilidad y capacidad invasiva del trofoblasto (González, *et al.*, 2012). Los embriones fueron observados y fotografiados en un microscopio invertido de contraste (Olympus CKX41)

Estimación de EROs y mitocondrias.

Para determinar si altas concentraciones de glucosa incrementan EROs en embriones de ratón, se utilizó un ensayo de fluorescencia. La prueba fluorescente 2', 7'-dichlorofluoresceína diacetato (DCFDA, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) fue usada para monitorear la acumulación intracelular de EROs. Este método se basa en la conversión oxidativa de la DCFDA no-fluorescente a la DCF fluorescente por H₂O₂ intracelular. Los embriones fueron transferidos el día 9 EG a cajas de 8 pozas (LabTek, NUNC, Naperville, IL, USA), posteriormente se midieron las EROs según el siguiente procedimiento. Los blastocistos del día 9 EG de los diferentes tratamientos se lavaron e incubaron con PBS pre-equilibrado durante 30 min para quitar el exceso de rojo fenol del medio de cultivo, después se incubaron por 30 min a 37°C con DCFDA 10 µM, posteriormente se lavaron y se fijaron con

paraformaldehído al 3% a 4°C durante toda la noche, se lavaron con PBS, después se agregó una solución 1:1 de PBS-Glicerol y se guardaron a -4°C hasta su observación. Las imágenes se capturaron con un microscopio confocal Zeiss Axiovert 100 M, Version 2.3 (software LCM510, lámpara 274748). Se utilizó en una longitud de onda de excitación de 488 nm, y emisión de 513 nm, posteriormente se evaluó la intensidad de fluorescencia relativa (%) de dichlorofluoresceína (DCF) mediante un procesador de imágenes obtenidas del software.

Para investigar si las EROs se producen en la mitocondria, después de aplicar DCFDA, se utilizó MitoFluor Red 589 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) un colorante fluorescente para mitocondrias. Después de que los blastocistos del día 9 EG se fijaron con paraformaldehído al 3% a 4°C durante toda la noche, se lavaron con PBS, fueron incubados con MitoFluor Red 589 50 nM por 15 min, después se agregó una solución 1:1 de PBS-Glicerol y se guardaron a -4°C hasta su observación. Las imágenes se capturaron con un microscopio confocal Zeiss Axiovert 100 M, Version 2.3 (software LCM510, lámpara 274748). Se utilizó en una longitud de onda de excitación de 622 nm.

Análisis de mRNA

Se utilizó RT-PCR tiempo real para evaluar el efecto de altas concentraciones de glucosa (25 mM) sobre las concentraciones de los mRNA de *uPa*, *Pai-1*, *Mmp-9* and *Timp-*. El RNA total se aisló con TRIZOL (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). RNA (1 µg) fue transcrito por 60 min a 37 °C, entonces la transcriptasa reversa fue inactivada a 95 °C por 15 min. 1 µL de una dilución 1:20 de la reacción de cDNA fue amplificada usando el equipo de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas, Thermo Scientific, Pittsburgh, PA, USA). El análisis de PCR del rRNA de *18s* fue utilizado como control de RNA, se usaron primers específicos para *uPa*, *Pai-1*, *Mmp-9* y *Timp-1*. Para *Mmp-9*: sentido 5' TTGAGTCCGGCAGACAATCC 3'; antisentido 5' CCTTATCCACGCGAATGACG 3' y *Timp-1*: 5'CGCAGATATCCGGTACGCCTA3' y antisentido 5'CACAAGCCTGGATTCCGTGG3; para *uPa* fueron: sentido 5'

GTGCCGCACACTGCTTCATT 3'; antisentido 5' CGTGCTGGTACGTATCTTCA 3' y *Pai-1* sentido 5'CAATGTGTCATTTCCGGCTGCTGT3' y antisentido 5'TTGACCAGGAGCTGCTGTCTCTTT3' (Harvey, *et al.*, 1995). Para 18S: sentido 5' CGCGGTTCTATTTTGGT 3'; antisentido 5' AGTCGGCATCGTTTATGGTC 3'. (Susuki *et al.*, 2007). Las temperaturas utilizadas para la reacción de amplificación de cada ciclo fueron: desnaturalización 95°C por 30 seg., alineación de 1 min a 57 °C (*18s*, *uPa* y *Mmp-9*), 58 °C (*Timp-1*), y 60 °C (*Pai-1*), y extensión 72°C por 1 minuto, por 40 ciclos. Después del ciclo final la temperatura se mantuvo a 72 °C por 10 minutos. La expresión relativa de los genes fue determinada con el método CT comparativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Los niveles relativos de mRNA de *uPa*, *Pai-1*, *Mmp-9* y *Timp-1* fueron normalizados con *18s*, y entonces los cambios en relación al control fueron determinados considerando el control como 1.

“Western Blot”.

La concentración de proteínas de uPA y PAI-1 fueron evaluadas por “Western blot”. Proteínas totales se aislaron de grupos de 20 embriones con el reactivo de TRIZOL (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUUA). Después de la extracción del mRNA, las proteínas fueron calentadas por 5 min a 95 °C en amortiguador de Laemmli y separadas por electroforesis en geles de PAGE-SDS al 10% a 150 volts durante una hora. La transferencia se hizo en membranas de polyvinylidene difluoride (PVDF, Bio-Rad, Hercules, CA, EEUUA) a 30 Volts durante toda la noche. Las membranas fueron bloqueadas con BSA al 5 %, 1 % w/v Tween 20 en TBS pH 7.6 por 1 h, e incubados con los anticuerpos primarios (1:1000), los anticuerpos policlonales de conejo contra uPA (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EEUUA), PAI-1 (Abcam, Cambridge, MA, EEUUA) o β -Actina (Santa Cruz Biotechnology) toda la noche a 4°C. Las membranas fueron lavadas por 30 min y posteriormente incubadas por una hora con el anticuerpo secundario anti-conejo IgG de cabra (Jackson ImmunoResearch, Baltimore Pike, PA, EEUUA) a una concentración de 1:5000. Posteriormente las proteínas fueron detectadas por quimioluminiscencia amplificada de peroxidasa utilizando el “kit” Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche diagnostics, Indianapolis, IN, EEUUA). Cada banda de

proteína fue normalizada con la intensidad de β -Actina. Los niveles de uPA y PAI-1 fueron expresados en unidades arbitrarias obtenidas automáticamente por el software.

Actividad de uPA.

Esta se midió en un procedimiento de dos pasos, primero se incubaron las muestras con plasminógeno 10 μ g/ml por 18 h a 37 °C, después se evaluó la plasmina formada por un ensayo amidolítico. El sustrato natural de la plasmina es la fibrina. La plasmina corta uniones pépticas 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 específico contiene D-Val-Leu-Lis-4-nitroanilina-acetate, de éste se libera p-nitroanilina (p-NA), de modo que mientras que la p-NA liberada por la acción de la plasmina es color amarillo (absorbe a 405 nm), el sustrato cromogénico es incoloro (no absorbe a 405 nm). Por lo tanto la actividad de la plasmina es proporcional a la intensidad del color desarrollado y puede cuantificarse. La liberación de p-NA (a 405 nm) en función del tiempo, se evaluó utilizando un lector de ELISA. Cada ensayo fue realizado por duplicado.

Zimografía

Se evaluó por zimografía el contenido de MMP-9. Se corrieron alícuotas del medio condicionado correspondientes a 6 embriones al día 9 equivalente de gestación (EG), además se evaluaron lisados embrionarios. Todas estas muestras se procesaron por electroforesis bajo condiciones no reductoras en un gel de poliacrilamida-SDS al 10% conteniendo 1mg/ml de gelatina de piel de porcino (G2625; Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo). Esta se corrió a 4 °C, aplicando 15 mA/gel durante 2 h. Después de teñir con azul de Coomassie, los zimogramas fueron captados en un analizador de geles de Alpha Innotech Corporation con un gabinete Multi-ImageTM y la zona de actividad enzimática fue valorada por densitometría, usando el software del aparato (alpha-Imager 2000). La cantidad de enzima se

expresó en unidades arbitrarias (UA) proporcionadas automáticamente por el mismo. Estándares preteñidos de pesos moleculares conocidos 27-180 kDa (SDS-7B, Sigma) fueron usados como referencia.

Análisis estadístico.

Todos los datos se representan con la media y su error estándar de al menos 3 experimentos independientes. Se utilizó el análisis ANOVA, con un nivel de significancia $P \leq 0.05$, seguido de la prueba de Tukey.

RESULTADOS

Efecto de la alta glucosa a altas concentraciones sobre el desarrollo in vitro de blastocistos de ratón.

En las condiciones no adherentes (sin suero ni proteínas de matriz extracelular exógenas), al día 7 EG, la mayoría de los blastocistos han perdido la zona pelúcida (85%), el blastocele se colapsa o reduce de tamaño y se ha formado una masa esférica e irregular de células. Generalmente del día 7 al 9 EG, las células externas son más grandes, redondas y con poca adhesión entre ellas y corresponden a las células gigantes de trofoblasto (CGT), mientras que el centro de la masa celular tiene una apariencia compacta. En algunos embriones, algunas células de trofoblasto se extienden sobre el sustrato (figura 6a). La apariencia global de los embriones cultivados con glucosa a alta concentración (25 y 40 mM) y sus controles osmóticos fue similar a la de los cultivados con glucosa 5.6 mM. Sin embargo, la proporción de embriones con extensión del trofoblasto es mayor con glucosa 25 mM y menor en el control osmótico de 40 mM, adicionalmente el grado de extensión es mayor en presencia de glucosa 25 y 40 mM (figuras 6a y 6b).

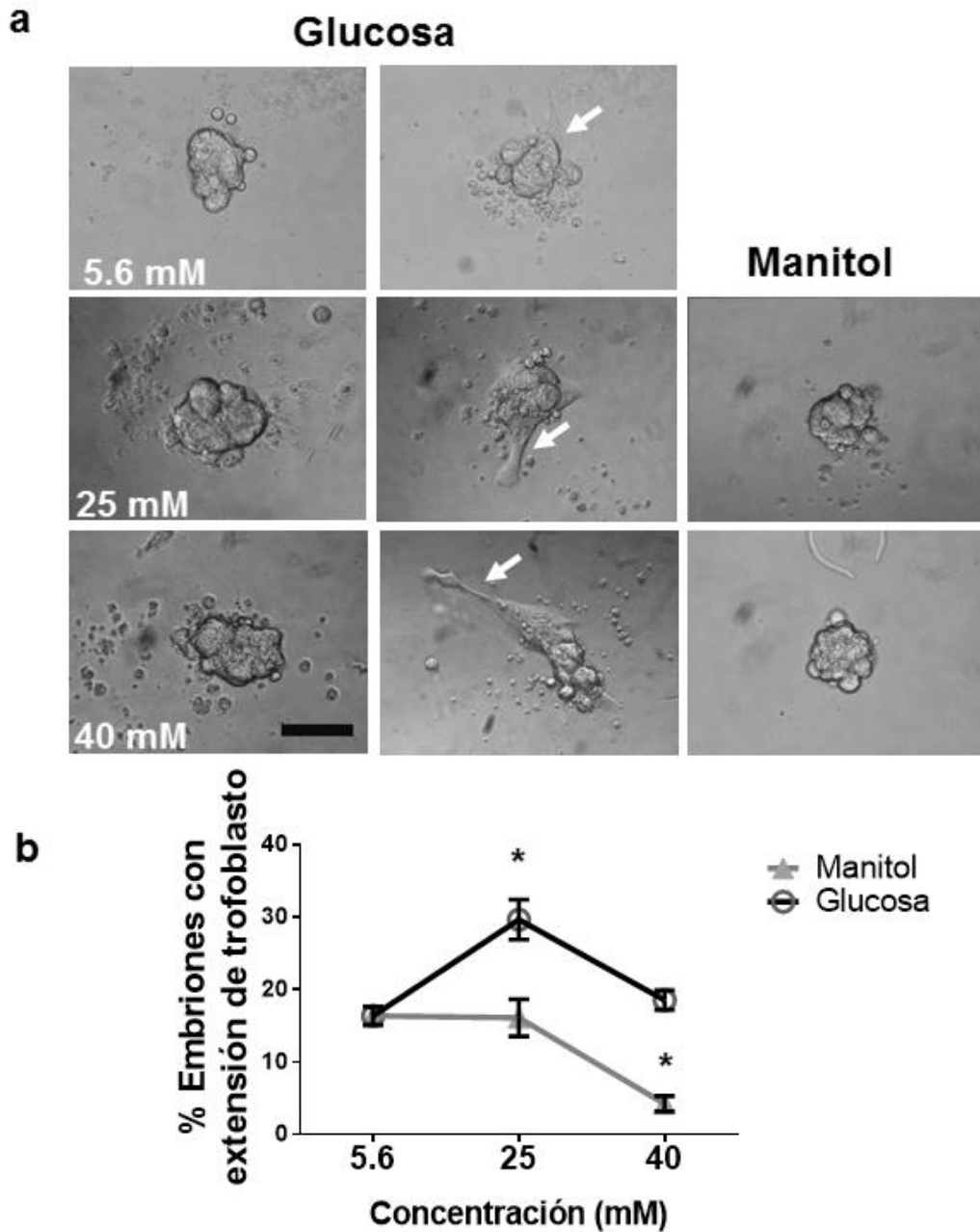


Figura 6. Efecto de la glucosa sobre el desarrollo in vitro de blastocistos. Los blastocistos obtenidos al día 4 EG, fueron cultivados en medio HAM-F10, conteniendo glucosa 5.6 mM, hasta el día 7 EG; del día 7 al 9 EG, fueron cultivados con manitol y alta glucosa (25 y 40 mmol/L). **a.** Imágenes representativas de algunos embriones con o sin extensión de trofoblasto (flechas), barra 100 μ m. **b.** Embriones con extensión de trofoblasto. * diferente significativamente al control ($p < 0.001$, ANOVA).

Alta glucosa aumenta el potencial invasivo del trofoblasto

Al día 9 EG se agregó suero al 10% al cultivo para identificar a los tipos de células que forman a las estructuras esféricas desarrolladas en condiciones no adherentes y de evaluar la habilidad del trofoblasto de extenderse sobre el sustrato. Cuando se agregó el suero, las células periféricas iniciaron a extenderse sobre el sustrato, formando extensiones celulares con lamelipodios, estructuras que aumentaron después de 5 h de la adición del suero, tiempo en que algunas células gigantes del trofoblasto exhibieron largas protrusiones que se retrajeron cuando éstas células se separaron de crecimiento trofoblástico principal (figura 7a). Sobre el centro del crecimiento trofoblástico una masa redondeada de células se presentó al principio de la extensión sobre el sustrato, posteriormente las mayoría de células de esta masa se desagregó y extendió sobre el sustrato (figuras 7a, 7b y 8a). A las 24 h de la exposición al suero los embriones estaban formados principalmente de células gigantes del trofoblasto extendidas, solo ocasionalmente se presentaron pequeños grupos de células derivadas de la masa celular interna. Estos resultados indican que el mantenimiento y diferenciación de células del trofoblasto fue favorecido en nuestras condiciones de cultivo y que las estructuras esferoides derivadas del blastocisto estaban formadas principalmente por células del trofoblasto, incluyendo al grupo control.

El área de extensión del trofoblasto incrementó significativamente después de 10 h con suero y alta glucosa (25 y 40 mM, figura 7b). Se encontró que en las primeras 10 h de exposición al suero, alta glucosa indujo un incremento mas rápido en el área de extensión del trofoblasto (figura 7a).

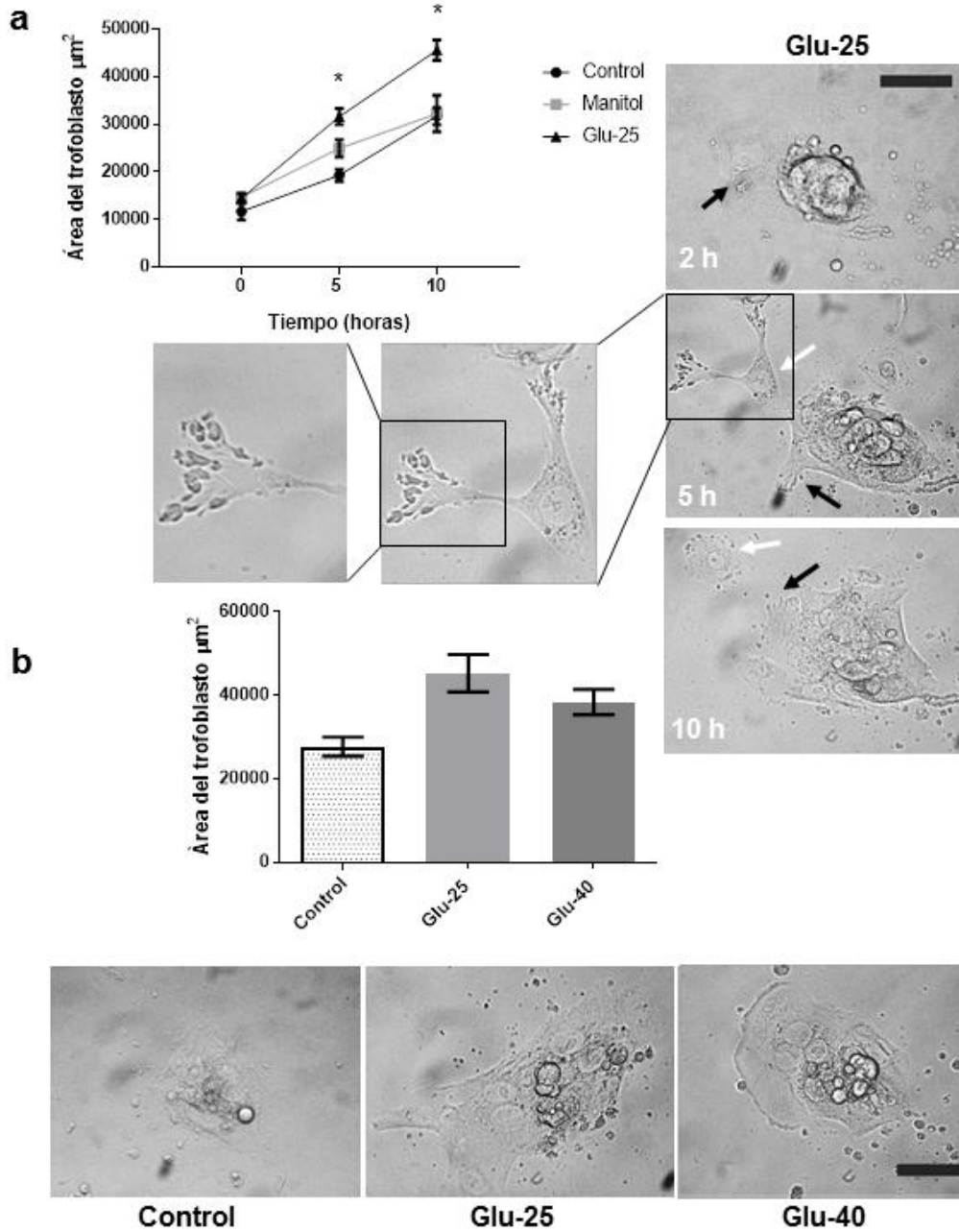


Figura 7 La extensión del trofoblasto incrementa con altas concentraciones de glucosa. **a:** Crecimiento trofoblástico a 10 horas con suero, control, Glu-25 (glucosa 25 mM), y Glu-40 (glucosa 40 mM) y un ejemplo de crecimiento trofoblástico con glucosa 25 mM a 2, 5, y 10 horas con suero al 10% (día 9 EG). **b:** Crecimiento trofoblástico a 10 h de exposición al suero. Barra 100 μm . * Diferente significativamente al control ($p < 0.001$, ANOVA).

Como se mencionó anteriormente, después de evaluar la tolerancia a la glucosa de los embriones, con diferentes concentraciones de glucosa (5.6, 25 y 40 mM). Se eligió la concentración de glucosa 25 mM para los tratamientos posteriores, debido a que la de 40 mM es muy alta. NAC y apocinina disminuyeron significativamente el área de extensión del trofoblasto, previniendo el aumento en el potencial invasivo del trofoblasto inducido por alta glucosa (figura 8a y 8b). Sin embargo en presencia de rotenona, se observaron embriones con poco crecimiento trofoblástico, incluso los embriones fueron más pequeños que el grupo control (figura 8a y 8b). Los tratamientos con apocinina en embriones con 5.6 mM de glucosa no afectaron el área de extensión del trofoblasto. En contraste los tratamientos con NAC inducen mayor extensión del trofoblasto, mientras rotenona disminuye el crecimiento trofoblástico y reduce el número de células (Figura 8a, 8b). Estos datos indican que ni NAC ni apocinina tienen un efecto deletéreo en el cultivo de blastocistos, mientras rotenona inhibe el crecimiento trofoblástico y reduce el número celular en el grupo control y en alta glucosa (25 mM). Por lo anterior los efectos de la rotenona observados en los siguientes experimentos no son debidos exclusivamente a que evitan la formación de EROs por la mitocondria, sino también a un efecto tóxico que inhibe el desarrollo de los blastocistos.

También se observaron grandes núcleos en las células del trofoblasto expuestas a altas concentraciones de glucosa (figura 8c). El área nuclear indica un mayor contenido de ADN asociado con la poliploidia característica de la diferenciación de las células gigantes del trofoblasto, dicha área incrementó de manera importante en la presencia de glucosa comparada con el control, indicando mayor diferenciación del trofoblasto.

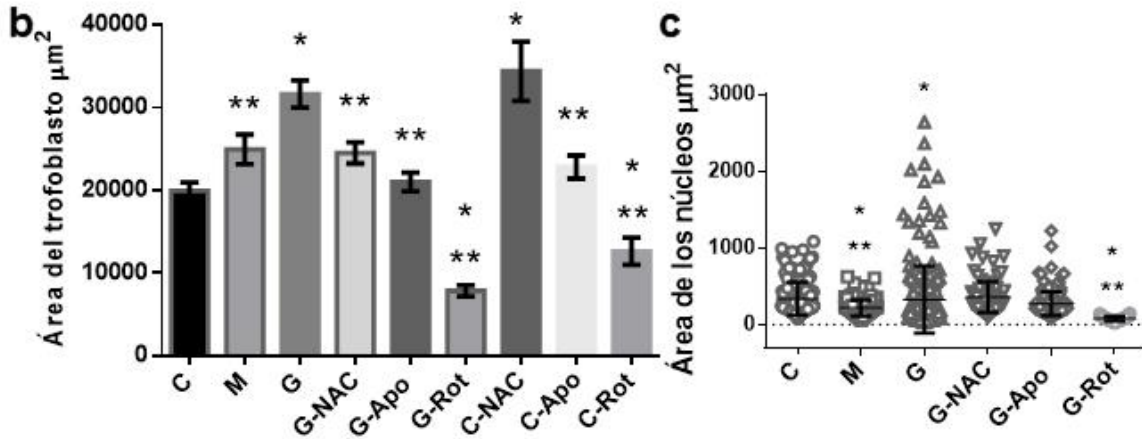
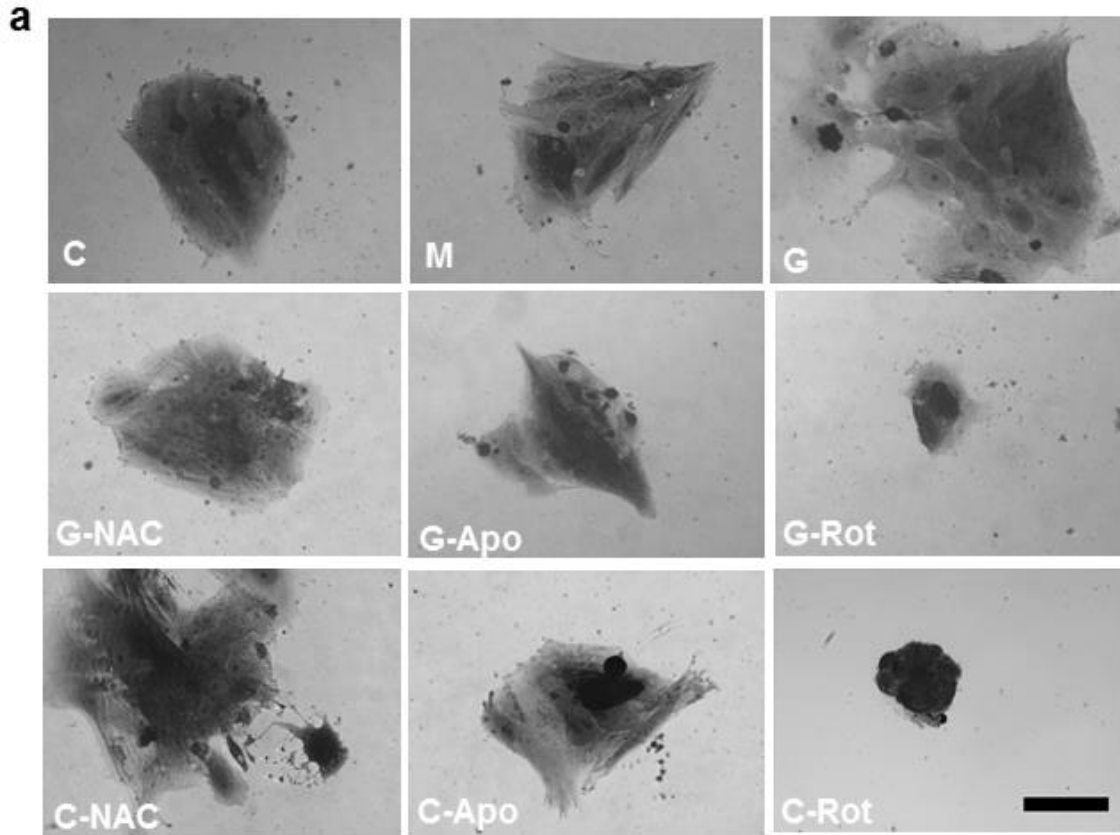


Figura 8. Efecto de alta glucosa en la extensión y diferenciación del trofoblasto. **a y b**: Área de extensión del trofoblasto y **c**) el área de los núcleos del trofoblasto después de 5 horas con suero agregado al día 9 EG después de los distintos tratamientos por 2 días; control glucosa 5.6 mM (C), control manitol 25 mM (M), glucosa 25 mM, (G), glucosa 25 mM más N-acetil-cisteína (G-NAC), más apocinina (G-Apo) o más rotenona (G-Rot) y control más NAC (C-NAC), más apocinina (C-Apo) o más rotenona (C-Rot). Los blastocistos fueron fijados y teñidos con aceto-orceína. * Diferente significativamente con el control, ** diferente significativamente a la glucosa alta ($p < 0.001$, ANOVA).

Alta glucosa aumenta la producción de EROs

Como se mencionó anteriormente, se evaluó el incremento de EROs inducido por altas concentraciones de glucosa (25 mM), observándose el aumento significativo en la intensidad de fluorescencia relativa de diclorofluoresceína (DCF) en embriones de ratón cultivados con glucosa 25 mM en relación al control (figura 9). El aumento en la concentración de EROs inducida por alta glucosa fue prevenida por NAC, apocinina, y rotenona (figura 9) indicando que son producidas por Nox y posiblemente las mitocondrias. L-NAME o allopurinol no previnieron la producción de EROs en nuestro modelo excluyendo la participación de óxido nítrico sintasa y la xantina oxidasa. Cuando se usó un marcador de mitocondrias (figura 10), se encontró que en parte las EROs colocalizaban con las mitocondrias indicando la posible participación de éstas en la producción de EROs dependiente de alta glucosa, sin embargo los datos provienen de observaciones a pequeño aumento (10X) lo que puede llevar a interpretar como colocalización a la ubicación de las señales en zonas cercanas, y se requieren observaciones a mayor aumento para tener datos de colocalización mas confiables.

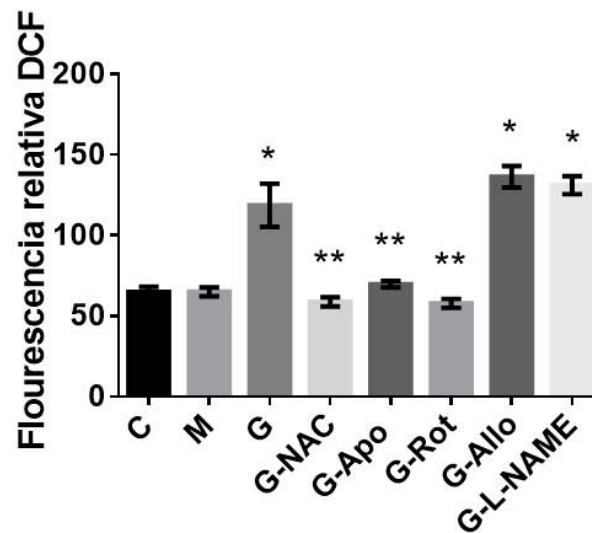
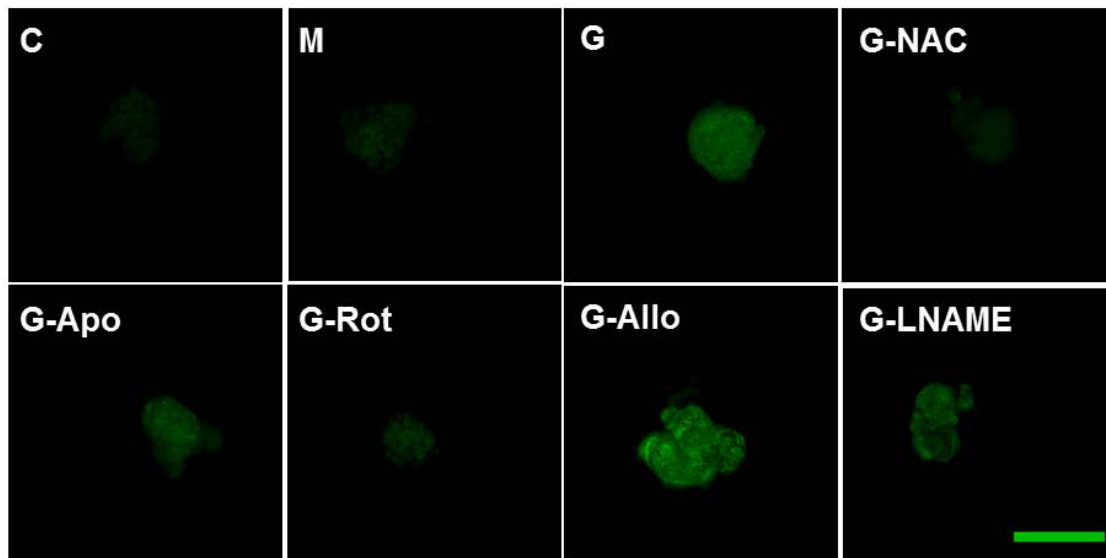


Figura 9. La producción de EROs incrementa con altas concentraciones de glucosa en embriones de ratón. Control glucosa 5.6 mM (C), control Manitol 25 mM (M), G (glucosa 25 mM), Glucosa más N-acetilcisteína (G-NAC), Glucosa más Apocinina (G-Apo), Glucosa más Rotenona (G-Rot), Glucosa más Allopurinol (G-Allo) y Glucosa más L-NAME (G-L-NAME). Scale bar 100 μ m. Las imágenes presentadas son representativas de los niveles de fluorescencia. * Diferente significativamente al control, ** diferente significativamente a la glucosa alta ($p < 0.001$, ANOVA).

A pesar de lo anterior, el posible papel de la mitocondria como fuente de EROs se observa en los tratamientos con alta glucosa (figura 10), en los que se presentaron una alta colocalización entre EROs y mitocondria.

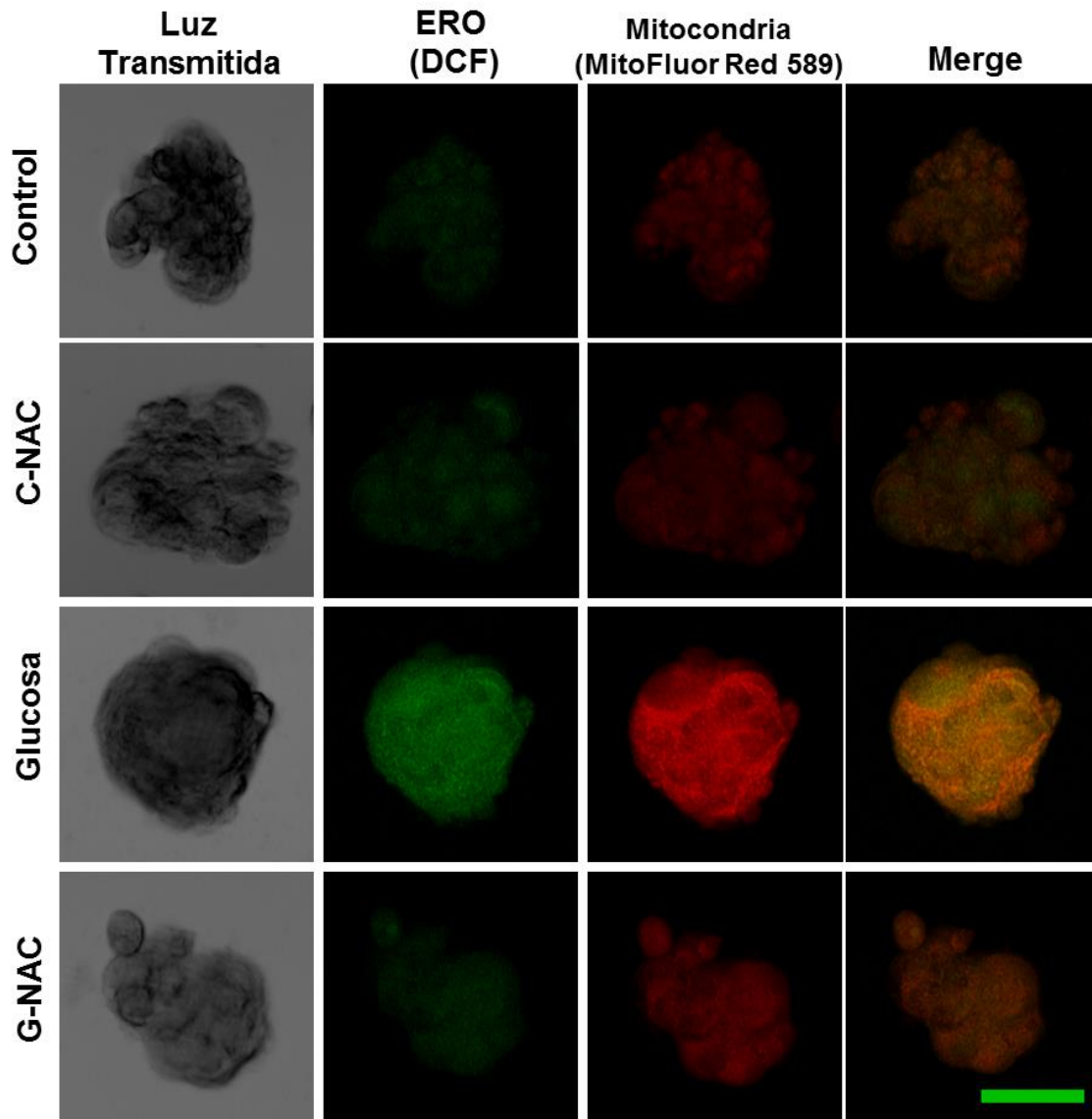


Figura 10. Efecto de altas concentraciones de glucosa sobre la generación de EROs mitocondriales en embriones de ratón en cultivo. Los blastocistos fueron cultivados del día 7 al 9 ED con glucosa 5.6 mM (Control), Control más N-acetilcisteina (C-NAC), glucosa 25 mM (Glucosa) y Glucosa más NAC (G-NAC). Después del tratamiento, los blastocistos fueron teñidos para EROs (verde), seguido por la tinsión para mitocondrias con MitoFluor Red 589 (rojo). Barra 50 μ m. Micrografías representativas de al menos 20 blastocistos.

Alta glucosa aumenta la expresión y actividad de uPA en blastocistos de ratón

Expresión de uPA

Los niveles de mRNA, proteína y actividad de uPA fueron incrementados significativamente después del tratamiento con alta glucosa (figuras 11a, 11b y 12). El incremento del mRNA de *uPa* inducido por alta glucosa fue prevenido por NAC y apocinina; rotenona no lo disminuyó significativamente (figura 11a). Los niveles de proteína también incrementaron con alta glucosa, y este incremento fue prevenido apocinina y rotenona (figura 11b). NAC, apocinina o rotenona no solo previnieron el aumento en la actividad de uPA inducido por alta glucosa (figura 12a), sino que adicionalmente, estos compuestos disminuyeron significativamente la actividad de uPA en relación al grupo control (figura 12b). Estos resultados sugieren que la expresión de uPA es regulada por el estrés oxidante en el blastocisto de ratón durante la implantación.

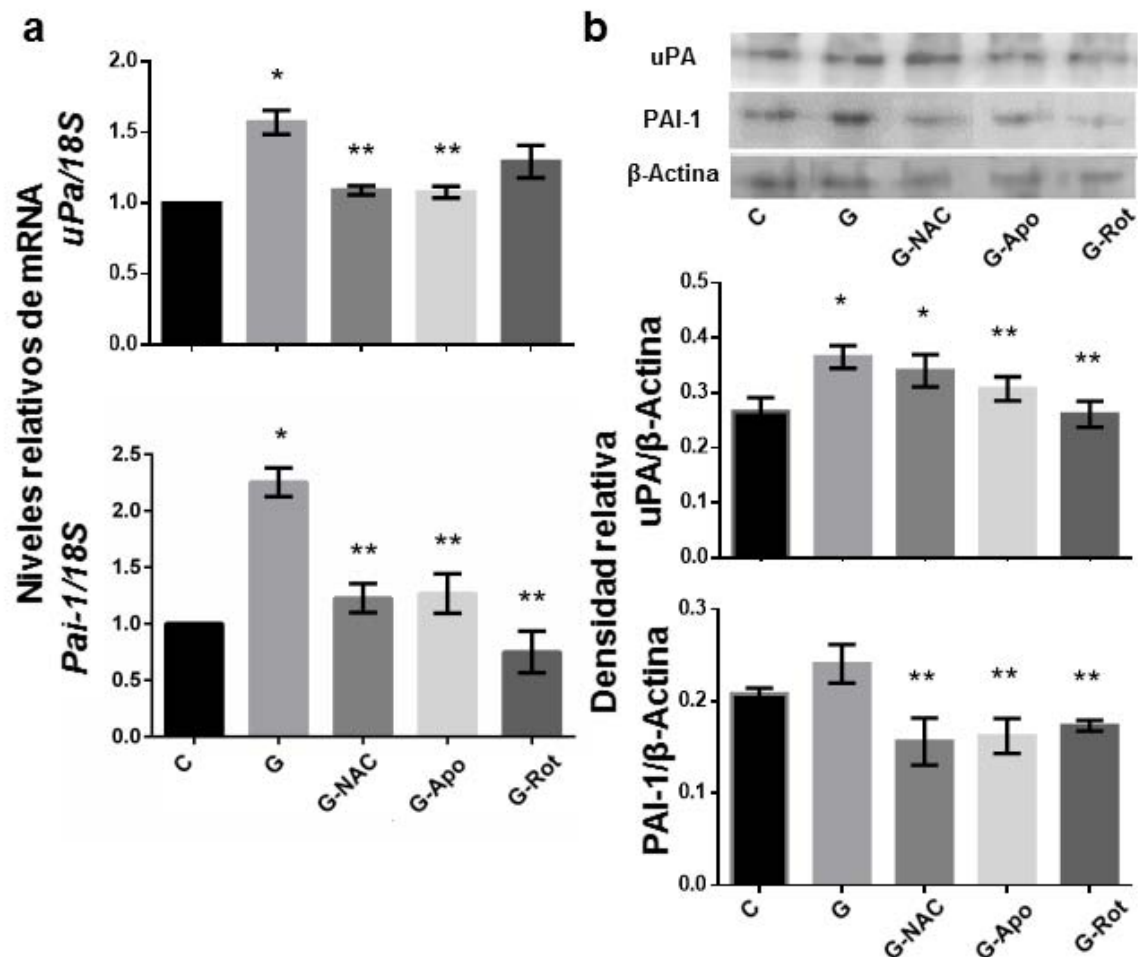


Figura 11. Efecto de altas concentraciones de glucosa sobre la expresión de uPA y PAI-1 en embriones de ratón en cultivo. Los blastocistos fueron cultivados del día 7 al 9 ED con glucosa 5.6 mM (Control, C), glucosa 25 mM (G), Glucosa con N-acetilcisteína (G-NAC), Glucosa con Apocinina (G-Apo), y Glucosa con Rotenona (G-Rot). Después de los tratamientos, el RNA y proteínas totales fueron aislados con TRIZOL. **a:** El mRNA de *uPa* y *Pai-1* fue analizado por RT-PCR tiempo real, usando el rRNA 18s como un control de expresión endógena. Los datos se presentan como número de veces de cambio en relación al control. **b:** Western blot de uPA, PAI-1 y β-Actina, y análisis densitométrico de las bandas del gel expresadas como unidades arbitrarias de las densidades relativas. * Diferente significativamente al control, ** diferente significativamente a la glucosa alta ($p < 0.001$, ANOVA).

Efecto de la glucosa sobre la actividad de uPA en blastocistos en cultivo.

El cambio en la actividad de activadores del plasminógeno en el medio condicionado bajo diferentes condiciones se muestra en la figura 12, se observa que la actividad de activadores del plasminógeno aumenta en relación a la concentración de glucosa. En 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 la figura 12. En la figura 12 se observa que la capacidad de activar al plasminógeno aumenta significativamente en los cultivos con 25 mM de glucosa ($P \leq 0.05$), pero cuando se cultiva con NAC, ésta disminuye al reducir éste significativamente la cantidad de plasmina formada. Al igual de en los cultivos con NAC, apocinina y rotenona disminuyeron de manera significativa la capacidad de formar plasmina a partir de plasminógeno en los cultivos con glucosa (figura 12).

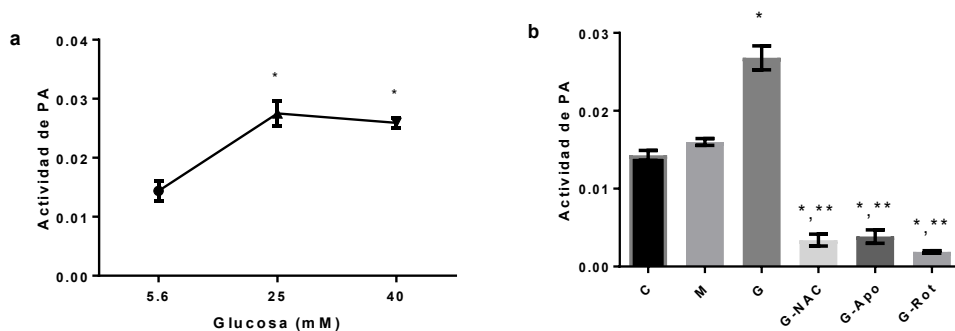


Figura 12. Efecto de altas concentraciones de glucosa sobre la actividad de uPA. El medio condicionado obtenido del día 9 EG fue incubado con plasminógeno, y su conversión a plasmina fue evaluada por un ensayo amidolítico. **a:** Efecto de distintas concentraciones de glucosa. **b:** Participación de EROs. Plasmina (PA). Control glucosa 5.6 mM (C), glucosa 25 mM (G), Glucosa con N-acetilcisteína (G-NAC), Glucosa con Apocinina (G-Apo), Glucosa con Rotenona (G-Rot). * Diferente significativamente al control, ** diferente significativamente a la glucosa alta ($p < 0.001$, ANOVA).

Alta glucosa incrementa la expresión de PAI-1 en blastocistos en ratón.

Alta glucosa incrementa significativamente los niveles del mRNA de *Pai-1* comparados con el grupo control. NAC, apocinina y rotenona previenen el incremento del mRNA de *Pai-1* inducidos por alta glucosa (figura 11a). Los niveles de proteína de PAI-1 incrementaron con alta glucosa, pero no significativamente. Sin embargo, NAC, apocinina y rotenona disminuyeron los niveles de proteína de PAI-1 en presencia de alta glucosa (figura 11b). Estos resultados sugieren que el aumento de mRNA de *Pai-1* inducido por alta glucosa es regulada por el estrés oxidante.

Alta glucosa regula la expresión de MMP-9 en blastocistos de ratón.

Expresión de MMP-9 y TIMP-1

Alta glucosa incrementa los niveles del mRNA de *Mmp-9* (figura 13a). NAC, apocinina y rotenona previenen este incremento. Además, altas concentraciones de glucosa disminuyen los niveles del mRNA de *Timp-1*, pero solo NAC revierte el efecto la glucosa.

Secreción y contenido celular de MMP-9.

Se observó en el medio condicionado y lisados celulares, una banda gelatinolítica principal de 105 kDa correspondiente a la Pro-MMP-9 de ratón (Figura 13b). En la figura 13b se observan zimogramas representativos del medio condicionado de cultivos y lisados celulares con glucosa. Además se observa que las bandas de Pro-MMP-9 en los cultivos con glucosa son más intensas que las del grupo control, tanto en el medio condicionado como en los lisados celulares, encontrándose diferencias significativas entre ellas cuando se evalúan por densitometría ($P \leq 0.05$; figura 13b). Alta glucosa incrementa la actividad gelatinolítica de MMP-9 en el medio condicionado y lisados celulares de embriones de ratón (figura 13b). Los inhibidores de EROs, apocinina y rotenona disminuyen dicha actividad tanto en el medio condicionado como en los lisados celulares. Sin embargo, NAC sólo disminuye la actividad de MMP-9 en los lisados celulares. En conjunto, éstos datos sugieren que MMP-9 es regulada por EROs.

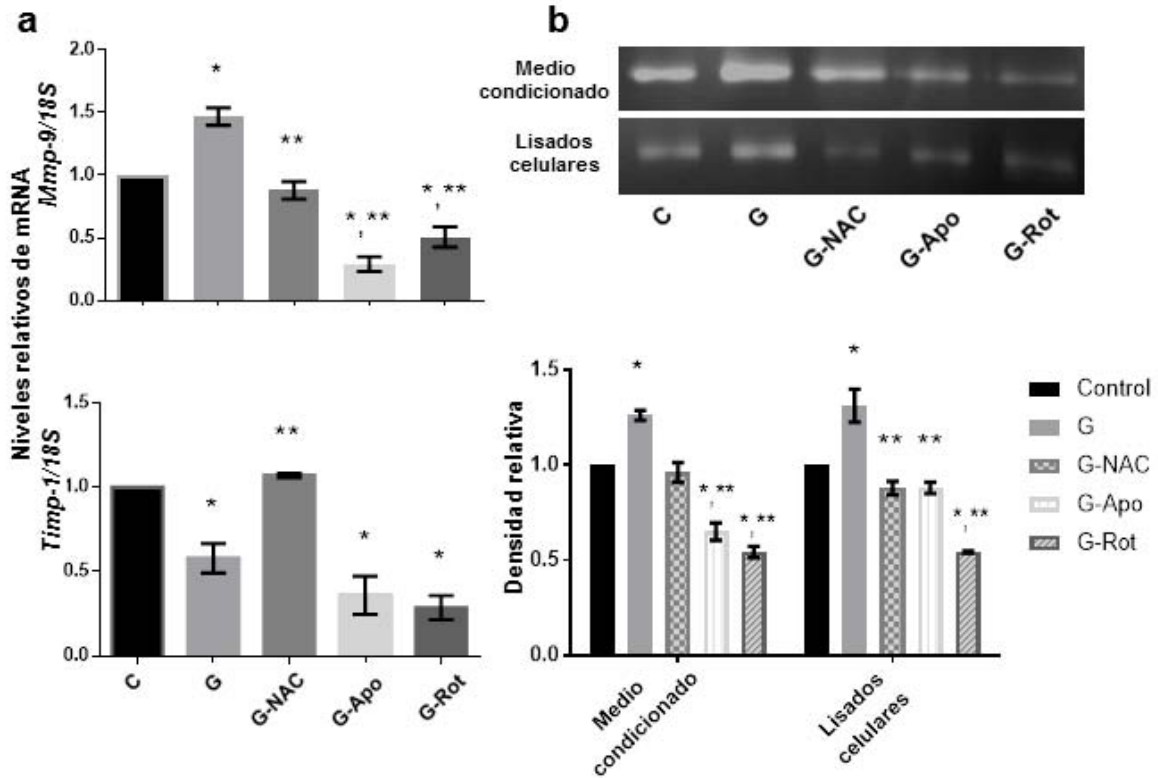


Figura 13. El efecto de altas concentraciones de glucosa sobre MMP-9 en embriones de raton en cultivo. Los blastocistos fueron cultivados del día 7 al 9 ED con glucosa 5.6 mM (Control, C), glucosa 25 mM (G), Glucosa con N-acetylcysteina (G-NAC), Glucosa con Apocinina (G-Apo), y Glucosa con Rotenona (G-Rot). **a:** El mRNA de *Mmp-9* y *Timp-1* fue analizado por RT-PCR tiempo real, usando el rRNA *18s* como control de expresión endógena. **b:** Zimografía en gelatina representativa del medio condicionado y lisados celulares y análisis densitométrico de las bandas del gel expresadas como unidades arbitrarias relativas. En ambos casos se le asignó el valor de 1 al control. * Diferente significativamente al control, ** diferente significativamente a la glucosa alta ($p < 0.001$, ANOVA).

DISCUSIÓN

La evidencia de un efecto negativo de las altas concentraciones de glucosa durante el desarrollo pre-implantacional ha sido documentada en diversos estudios (Diamond, *et al.*, 1991; Pampfer, *et al.*, 1997; Ramin, *et al.*, 2010; Cagnone, *et al.*, 2012). Sin embargo la exposición a altas concentraciones de glucosa tiene diferentes efectos a largo plazo dependiendo del estadio de desarrollo, específicamente si la exposición ocurre durante la ovulación, fertilización, compactación, formación del blastocisto o posteriormente (Wyman, *et al.*, 2008). Así, por ejemplo, altas concentraciones de glucosa perjudican la expansión del blastocisto y la ruptura y liberación de la zona pelúcida, afectando a la implantación embrionaria (Pantaleon, *et al.*, 2010), lo que ocurre antes de la etapa considerada en este estudio.

Se ha sugerido que altas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo puede influenciar la invasión del trofoblasto. Nosotros reportamos por primera vez que la exposición a alta glucosa (25 mM) durante el desarrollo del blastocisto (del día 7 al 9 EG) promueve la diferenciación de células gigantes del trofoblasto y el aumento en su potencial invasivo. De acuerdo con nuestros resultados, glucosa 25 mM incrementa el crecimiento trofoblástico (Fraser, *et al.*, 2007); además, una excesiva expansión del trofoblasto es inducida por la pre-exposición a glucosa 28 mM en blastocistos cultivados *in vitro* (Leunda-Casi, *et al.*, 2001).

La diferenciación y la capacidad invasiva de las células del trofoblasto están finamente controladas durante la placentación (Sharma, *et al.*, 2016). Estudios *in vitro* reportan que altas concentraciones de glucosa podrían contribuir a una anormal migración del trofoblasto y/o invasión, las cuales están asociadas con mayores complicaciones durante el embarazo (Basak, *et al.*, 2015). MMP-9 es una molécula clave asociada con la remodelación celular asociada con la invasión del trofoblasto y angiogénesis (Luo, *et al.*, 2011). Recientes reportes sugieren que niveles alterados de MMP-9 pueden ser los reguladores en el desarrollo de la resistencia a la insulina e inflamación en las complicaciones con diabetes

gestacional (Lappas, *et al.*, 2011). De acuerdo con nuestros resultados, glucosa 25 mM incrementa la expresión de MMP-9 en células del trofoblasto y alterando la invasión del trofoblasto (Basak, *et al.*, 2015). El desarrollo de la placenta requiere de la invasión del trofoblasto y de la remodelación de los tejidos que involucran el balance de las MMPs y la expresión de sus inhibidores tisulares (Chang y Yang, 2013). Glucosa 30 mM incrementa MMP-9 y disminuye la expresión de TIMP-1, induciendo un fenotipo invasivo en células de trofoblasto humanas (Chang y Yang, 2013). En este estudio glucosa 25 mM incrementa la expresión de MMP-9 y disminuye los niveles del mRNA de *Timp-1* en trofoblasto derivado de blastocistos de ratón, esta evidencia sugiere que la expresión/activación de MMP-9 regula la proliferación, migración y los procesos invasivos durante la implantación del ratón.

uPA cataliza la formación de plasminógeno a plasmina, comenzando una cascada proteolítica que contribuye al rompimiento de la MEC (Ha y Lee, 2005; Wolf, *et al.*, 2005), regulando la activación de MMP-9 e incrementando la capacidad invasiva del trofoblasto. uPA se expresa en las células de trofoblasto y participa en la activación de MMP-9 durante la implantación embrionaria (Martínez-Hernández, *et al.*, 2011). Aunque se ha reportado que glucosa 10 mM disminuyó la actividad de uPA y redujo la invasión del trofoblasto (Belkacemi, *et al.*, 2005), nosotros encontramos que glucosa 25 mM incrementa la expresión y actividad de uPA, junto con el aumento del potencial invasivo del trofoblasto. De acuerdo con nuestros resultados, altas concentraciones de glucosa incrementaron los niveles de uPA y MMP-9 en diversas líneas celulares de cáncer y han sido relacionados con su capacidad invasiva y migratoria (Lin, *et al.*, 2015; Flores-López, *et al.*, 2016). Las células del trofoblasto y tumorales tienen características similares, incluyendo el incremento en la expresión de proteasas que pueden jugar un papel activo en los mecanismos de migración e invasión (Ferreti, *et al.*, 2007).

El incremento en la expresión de uPA, PAI-1 y MMP-9 inducida por alta glucosa es prevenido por el antioxidante y depurador de EROs, NAC. NAC es un derivado de L-cisteína que actúa como un carroñero de radicales libres por su grupo sulfidrido, y

también es un precursor de glutatión (un agente reductor endógeno, que mantiene el balance redox). NAC en diferentes tipos celulares previene del estrés inducido por altas concentraciones de glucosa (Flores-López, *et al.*, 2016), y disminuye la expresión y actividad de uPA inducida por diferentes estímulos (Kim *et al.*, 2010; Tobar, *et al.*, 2010), aunque el mecanismo específico no ha sido elucidado (Lu, *et al.*, 2011). Otros estudios han reportado que la acumulación intracelular de EROs es atenuada por NAC (Kim, *et al.*, 2016). Además, EROs exógenas por si solas inducen la expresión y promueven la actividad de uPA (Kim, *et al.*, 2007; Lee, *et al.*, 2009). Consistentes con estos resultados, este estudio también demuestra que altas concentraciones de glucosa incrementan la expresión de uPA a través de la generación de EROs, la cual es inhibida por el tratamiento con NAC en células de trofoblasto.

Se ha reportado que NAC mantiene la supervivencia celular en ovocitos y embriones de mamífero (Choe, *et al.*, 2010) y que a 1.5 mM incrementa el porcentaje de mórulas que se desarrollan a blastocistos (Whitaker y Knight, 2010). El efecto de antioxidante de NAC fue dependiente de la concentración, cuando se empleó a 0.5 y 1 mM aumentó las EROs en los embriones cultivados con glucosa 25 mM (datos no mostrados), solo con la dosis de 5 mM se notó una reducción en las EROs en las mismas condiciones, lo que indica que esta concentración puede ser empleada, para evaluar la participación de las EROs en la acción de la glucosa a altas concentraciones, como se uso en éste trabajo.

La acción de la NAC (5 mM) en los blastocistos en desarrollo cultivados con glucosa 25 mM redujo los niveles de EROs inducidos por alta glucosa. Dentro de los efectos de NAC en los cultivos en presencia de glucosa 25 mM, observamos:

1. Previene el aumento en la extensión del trofoblasto.
2. Previene el aumento en las EROs.
3. Previene el aumento en el contenido de Pro-MMP-9 en el medio condicionado y lisados embrionarios.

4. Previene el aumento en la expresión de MMP-9 y la reducción en el mensajero de *Timp-1*.
5. Previene el aumento en los mRNA de *uPa* y *Pai-1*.

La acción de la NAC en los embriones cultivados con glucosa es más compleja que la simple reducción de las EROs; ya que su efecto depende de su concentración, NAC (5 mM) disminuye el estrés oxidante; aunque no se evaluaron los mecanismos antioxidantes o la modificación oxidativa de macromoléculas (carbonilación de proteínas o lipoperoxidación). Adicionalmente NAC puede aumentar la poza de glutatión, y sus efectos pueden deberse en parte a la glutatiónilación de proteínas u otras acciones de este tripéptido.

Los experimentos realizados con apocinina indican una clara participación de Nox en la producción de EROs inducida por alta glucosa y como mediadora de los efectos de alta glucosa sobre la diferenciación e invasividad del trofoblasto y en la expresión de uPA, PAI-1, MMP-9 y TIMP-1. Lo que es apoyado por el encuentro que el estrés oxidativo causado por Nox, induce la expresión de uPA (Tobar, *et al.*, 2010), PAI-1 (Samad, *et al.*, 1997) y MMP-9 (Shin, *et al.*, 2008). Nox ha sido encontrada en trofoblasto secundario del cono ectoplacental al día 7.5 de gestación y en células gigantes del trofoblasto derivadas de éstos conos (Bevilacqua, *et al.*, 2010) y la actividad de Nox es esencial para la actividad fagocítica del trofoblasto en ratón (Gomes, *et al.*, 2012). Las Nox tienen la función de producir O_2^{\bullet} , también están relacionadas con las vías de señalización, como MAPK, y también con la activación del factor de transcripción NF- κ B. Finalmente, estas enzimas se han asociado con los procesos de diferenciación y muerte celular (Binker, *et al.*, 2011). Está bien establecido que las Nox son responsables de la generación intracelular de EROs, desencadenada por la diferentes factores de crecimiento al unirse a sus receptores, al inducir proliferación celular, diferenciación o apoptosis (Choi, *et al.*, 2005).

De acuerdo con nuestros resultados, en diferentes tipos celulares, apocinina disminuye migración, invasión y la expresión de MMP-9 (Li, *et al.*, 2017). Nuestros

datos proveen evidencia por primera vez de la presencia de Nox en trofoblasto primario de ratón, indicando el rol de Nox en la migración e invasión del trofoblasto durante la implantación embrionaria en ratón.

Aunque nuestros datos sugieren la posibilidad de la participación de las mitocondrias en la producción de EROs inducida por alta glucosa, esto no puede establecerse certeza con base en ellos debido a que la rotenona altero el desarrollo de los blastocistos en cultivo y los datos de correlación fueron a poca amplificación. Se requieren adicionalmente otras estrategias metodológicas, para ello, entre ellas el empleo de un mimético de la superóxido dismutasa mitocondrial y realizar la observación de la colocalización entre EROs y mitocondrias a mayor aumento.

Como se mencionó anteriormente, la asociación de glucosa con migración de células de cáncer ha sido ampliamente investigada (Lin, *et al.*, 2015), sin embargo aún no está claro el mecanismo de cómo la glucosa puede incrementar y promover la invasión y modificar la expresión de proteasas y sus inhibidores. Se sabe que altas concentraciones de glucosa incrementan EROs, las cuales pueden regular la actividad de los factores de transcripción sensibles al estado redox, como AP1 y NF- κ B. Este último fue encontrado en el trofoblasto durante la implantación en ratón (Muggia, *et al.*, 1999). La región promotora de uPA y MMP-9 contiene un elemento de unión a NF- κ B (Uemura, *et al.*, 2001; Tronov, *et al.*, 2002; Tobar, *et al.*, 2010; Gutsche, *et al.*, 2016), lo cual podría implicar la posible participación de este factor en el incremento en la expresión de MMP-9 y uPA inducido por glucosa en el trofoblasto derivado del blastocistos de ratón, observado en el presente trabajo (figura 14). Lo que concuerda con el hecho de que un inhibidor específico de NF- κ B, reduce significativamente el aumento de la invasión y la expresión de uPA y PAI-1 en células de cáncer (Moreau, *et al.*, 2011).

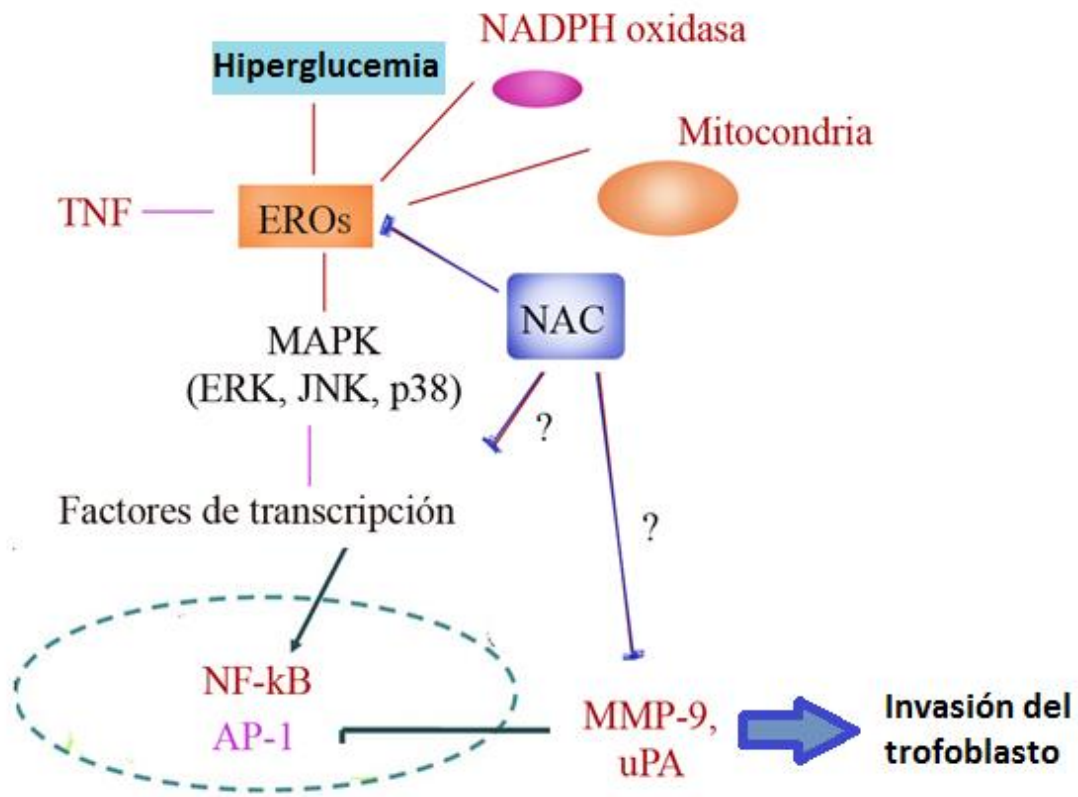


Figura 14. Esquema de la participación del estrés oxidante sobre la expresión de MMP-9 y uPA y potencial invasivo del trofoblasto inducidos por hiperglicemia.

CONCLUSIONES

En este trabajo hemos encontrado un aumento en las EROs, y de la expresión de MMP-9, uPA y PAI-1, junto con la disminución de la expresión de TIMP-1 en trofoblasto derivado de blastocistos de ratón cultivados con altas concentraciones de glucosa, lo que estuvo asociado con promoción de la diferenciación de células gigantes del trofoblasto y de su potencial invasivo.

La acción de la alta concentración de glucosa sobre la diferenciación y potencial invasivo del trofoblasto, y en la expresión de uPA, PAI-1, MMP-9 y TIMP-1 es mediada por EROs, lo que se desprende de los experimentos realizados con NAC.

El aumento en la concentración de EROs por alta glucosa es dependiente de la actividad de la Nox y posiblemente de la cadena respiratoria mitocondrial, para establecer con mayor certeza de esta última se requiere de experimentos adicionales.

Un posible mecanismo de la acción de la alta glucosa en el trofoblasto derivado de blastocistos de ratón es que el aumento de las EROs induzcan la activación de un factor de transcripción sensible al estado redox, como el NFkB y que éste induzca cambios en la expresión génica asociados con la promoción de la diferenciación y potencial invasivo del trofoblasto. Esta propuesta está basada en estudios en otros modelos experimentales y se requieren de mas experimentos para validarla en el modelo estudiado.

Comprender la regulación de la expresión de MMPs y uPA durante la pre-implantación es clave para explicar la incidencia de abortos espontáneos, pre-eclamsia, y restricción del crecimiento intrauterino asociado con diabetes.

BIBLIOGRAFÍA

Alfalo ED, Sod-Moriah UA, Potashnick G, Har-Vardi I. Differences in the implantation rates of rat embryos developed in vivo and in vitro: possible role for plasminogen activators. *Fert and Steril* 2004; 81:780-85.

Aslan M, Ozben T. Oxidants in receptor tyrosine kinase signal transduction pathways. *Antiox & Redox Signal* 2003; 5:781-8.

Bacharova R. Gene expression during oogenesis and oocyte development in mammals. *Dev Biol.* 1985; 1:453–524

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

Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3:205–214

Basak S, Das MK, Srinivas V, Duttaroy AK. The interplay between glucose and fatty acids on tube formation and fatty acid uptake in the first trimester trophoblast cells, HTR8/SVneo. *Mol Cell Biochem* 2015; 401:11–19.

Bauer S, Pollheimer J, Hartmann J, Husslein P, Aplin JD, Knofler M. Tumor necrosis factor- α inhibits trophoblast migration through elevation of plasminogen activator inhibitor-1 in first-trimester villous explant cultures. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89: 812–822

Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007; 87:245–313.

Bevilacqua E, Hoshida MS, Amarante-Paffaro A, Albieri-Borges A, Gomes SZ. Trophoblast phagocytic program: roles in different placental systems. *Int J Dev Biol* 2010; 54:495–505.

Belkacemi L, Lash GE, Macdonald-Goodfellow SK, Caldwell JD, Graham CH. 2005. Inhibition of human trophoblast invasiveness by high glucose concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 90:4846–4851.

Berezowsky J, Zbieranowsky I, Demers J, Murray D. DNA ploidy of hydatidiform moles and nonmolar conceptuses: A study using flow and tissue section image cytometry. *Mod Pathol* 1995; 8:775-781

Berra E, Diaz-Meco MT, Lozano J, Frutos S, Municio MM, Sanchez P. Evidence for a role of MEK and MAPK during signal transduction by protein kinase C zeta. *EMBO J* 1995; 14:6157-63

Behrendtsen N, List K, Andreasen A, Dano K. The pro-urokinase plasminogen-activation system in the presence of serpin-type inhibitors and the urokinase receptor: rescue of activity through reciprocal pro-enzyme activation. *Biochem J* 2003; 371:277-87

Biadasiewicz K, Sonderegger S, Haslinger P, Haider S, Saleh L, Fiala C et al. Transcription factor AP-2 alpha promotes EGF-dependent invasion of human trophoblast. *Endocrinology* 2011; 152:1458–1469

Binker MG, Binker-Cosen AA., Gaisano HY, de Cosen RH, Cosen-Binker LI. TGF- β 1 increases invasiveness of SW1990 cells through Rac1/ROS/NF- κ B/IL-6/MMP-2. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 405:140–145

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

Bradley JR, Pober JS. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene* 2001; 20:6482–6491.

Buchanan TA, Xiang AH. Gestational diabetes mellitus. *J Clin Invest* 2005; 115: 485–491.

Cagnone GL, Dufort I, Vigneault C, Sirard MA. Differential gene expression profile in bovine blastocysts resulting from hyperglycemia exposure during early cleavage stages. *Biol Reprod* 2012; 86(2):50.

Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, Farina M, Conner EA, Lee JS. Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC. *Gastroenterology* 2006; 130:1117–1128.

Castellino FJ, Ploplis VA. Structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Thromb Haemost* 2005; 93:647-654.

Castillo-Trápala A. 2007. Procesamiento del plasminogeno durante la implantacion in vitro de blastocistos de raton. (Tesis de Maestría). UNAM. México.

Caughey AB, Cheng YW, Stotland NE, Washington AE, Escobar GJ. Maternal and paternal race/ethnicity are both associated with gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 202:616.e1–5.

Chang SC, Yang WCV. Hyperglycemia induces altered expressions of angiogenesis associated molecules in the trophoblast. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013:457971.

Chiarugi P. PTPs versus PTKs: The redox side of the coin. *Free Radical Research* 2005; 39:353-64

Choe C, Shin YW, Kim EJ, Cho SR, Kim HJ, Choi SH, Han MH, Han J, Son DS, Kang D. Synergistic effects of glutathione and β -mercaptoethanol treatment during in vitro maturation of porcine oocytes on early embryonic development in a culture system supplemented with L-cysteine. *J Reprod Dev* 2010; 56(6):575-82.

Choi MH, Lee IK, Kim GW, Kim BU, Han YH, Yu DY, et al. Regulation of PDGF signalling and vascular remodeling by peroxiredoxin II. *Nature* 2005; 435:347-53.

Chu SY, Callaghan WM, Kim SY, Schmid CH, Lau J, England LJ, and Dietz PM. Maternal obesity and risk of gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2007; 30:2070– 2076.

Cockburn K, Rossant J. Making the blastocyst: lessons from the mouse. *J Clin Invest* 2010; 120(4):995–1003

Cockroft DL. Regional and temporal differences in the parietal endoderm of the midgestation mouse embryo. *J Anat* 1986; 145:35-47

Coleman WB. Mechanisms of human hepatocarcinogenesis. *Curr Mol Med* 2003; 3:573–588.

Connor KM, Hempel N, Nelson KK, Dabiri G, Gamarra A, Belarmino J, Van De Water L, Mian BM, Melendez JA. Manganese superoxide dismutase enhances the invasive and migratory activity of tumor cells. *Cancer Res* 2007; 67:10260–10267

Copp AJ. Interaction between inner cell mass and trophectoderm of the mouse blastocyst. II The fate of the polar trophectoderm. *J Embryol Exp Morphol* 1979; 51:109-120.

Coulman CB, Jeyendran RS, Fishel LA, Roussev R. Multiple thrombophilic gene mutations are risk factors for implantation failure. *Reprod Biomed* 2006; 12(3):322-27

Coustan DR, Lowe LP, Metzger BE. The hyperglycemia and adverse pregnancy outcome (HAPO) study: can we use the results as a basis for change? *J Matern Fetal Neonatal Med* 2010; 23: 204–209.

Cross JC, Werb Z, Fisher SJ. Implantation and the placenta: Key pieces of the development puzzle. *Science* 1994; 266:1508-1518

Cross JC. Trophoblast function in normal and preeclamptic pregnancy. *Fet Mat Med Rev* 1996; 8:57-66

Death AK, Fisher EJ, McGrath KCY, Yue DK. High glucose alters matrix metalloproteinase expression in two key vascular cells: potential impact on atherosclerosis in diabetes. *Atherosclerosis* 2003; 168(2):263-269.

Diamond MP, Pettway ZY, Logan J, Moley K, Vaughn W, DeCherney AH. Dose-response effects of glucose, insulin, and glucagon on mouse pre-embryo development. *Metabolism: clinical and experimental* 1991; 40(6):566–570.

Dickinson BC, Chang CJ. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nature Chem Biol* 2011; 7(8):504-11.

Duong Van Huyen JP, Viltard M, Nehiri T, Freund N, Bélaïr MF, Martinerie C, Lelongt B, Bruneval P, Lelièvre-Pégorier M. Expression of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 is altered during nephrogenesis in fetuses from diabetic rats. *Lab Invest* 2007; 87:680–689.

Dyce J, George M, Goodall H, Fleming TP. Do trophoctoderm and inner cell mass cells in the mouse blastocyst maintain discrete lineages? *Development* 1987; 100(4):685–698.

Edwards RG, Purdy JM, Steptoe PC, Walters DE. The growth of human preimplantation embryos in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 1981; 141(4):408–416.

Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 161–174

Elliott CL, Allport VC, Loudon JA, Wu GD, Bennett PR. Nuclear factor-kappa B is essential for the up-regulation of interleukin-8 expression in human amnion and cervical epithelial cells. *Mol Hum Reprod* 2001; 7:787–90.

Ferretti C, Bruni L, Dangles-Marie V, Pecking AP, Bellet D. Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts. *Hum Reprod Update* 2007; 13:121–141.

Finkel T, Serrano M, Blasco MA. The common biology of cancer and ageing. *Nature* 2007; 448:767–774.

Filippov S, Koenig GC, Chun TH, Hotary KB, Ota I, Bugge TH. MT1-matrix metalloproteinase directs arterial wall invasion and neointima formation by vascular smooth muscle cells. *J Exp Med* 2005; 202:663-71.

Fleming PJ, Warren PD, Crisholm JC, Johnson MH. Trophoctodermal processes regulate the expression of totipotency within the inner cell mass of the mouse expanding blastocyst. *J Embryol Exp Morphol* 1984; 84, 63-90.

Flores-López LA, Martinez-Hernandez MG, Viedma-Rodriguez R, Diaz-Flores M, Baiza-Gutman LA. High glucose and insulin enhance uPA expression, ROS formation and invasiveness in breast cancer-derived cells. *Cell Oncol* 2016; 39(4):364-378.

Fraser RB, Waite SL, Wood KA and Martin KL. Impact of hyperglycemia on early embryo development and embryopathy: in vitro experiments using a mouse model. *Hum Reprod* 2007; 22(12):3059–3068.

Fröhlich JD, Huppertz B, Abuja PM, König J, Desoye G. Oxygen modulates the response of first-trimester trophoblasts to hyperglycemia. *Am J Pathol* 2012; 180(1):153-164.

Gardner RL y Davies TJ. Lack of coupling between onset of giant-transformation and genome endoreduplication in the mural trophoctoderm of the mouse blastocyst. *J Exp Zool* 1993; 265, 54-60

Gardner RL, Papaioannou VE y Barton SC. Origin of the ectoplacental cone and secondary giant cells in mouse blastocyst reconstituted from isolated trophoctoder and inner cell mass. *J Embryol Exp Morphol* 1973; 30: 561-572.

Geiszt M, Kopp JB, Várnai P, Leto TL. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:8010–8014

Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later, *Biochem Pharmacol* 2006; 72:1493–1505

Gharagozlian S, Henriksen T, Kolset SO. High glucose and N-(carboxymethyl)lysine bovine serum albumin modulate release of matrix metalloproteinases in cultured human endothelial cells. *Eur J Nutr* 2006; 45(5):283-90.

Ghosh S, Basu M, Roy SS. ETS-1 regulates vascular endothelial growth factor-induced matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-13 expression in human ovarian carcinoma cell SKOV-3. *J Biol Chem* 2012; 287(18):15001-15015.

Gomes LR, Terra LF, Wailemann RA, Labriola L, Sogayar MC. TGF-beta1 modulates the homeostasis between MMPs and MMP inhibitors through p38 MAPK and ERK1/2 in highly invasive breast cancer cells. *BMC Cancer* 2012; 12(1):26.

González IM, Martin PM, Burdsal C, Sloan JL, Mager S, Harris T, Sutherland AE. Leucine and arginine regulate trophoblast motility through mTOR-dependent and independent pathways in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol* 2012; 361(2):286-300.

Gordon GM, Ledee DR, Feuer WJ, Fini ME. Cytokines and signaling pathways regulating matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in corneal epithelial cells. *J Cell Physiol* 2009; 221:402-411.

Gutsche K, Randi EB, Blank V, Fink D, Wenger RH, Leo C, Scholz CC. Intermittent hypoxia confers pro-metastatic gene expression selectively through NF-κB in inflammatory breast cancer cells. *Free Radic Biol Med* 2016; 101:129-142

Ha H, Lee HB. Reactive oxygen species amplify glucose signalling in renal cells cultured under high glucose and in diabetic kidney. *Nephrology* 2005; 10(Suppl):S7-S10.

Han YP, Tuan TL, Hughes M, Wu H, Garner WL: Transforming growth factor-β-and tumor necrosis factor-α-mediated induction and proteolytic activation of MMP-9 in human skin. *J Biol Chem* 2001; 276:22341-22350

Harris, L.K., Smith, S.D., Keogh, R.J., Jones, R.L., Baker, P.N., Knofler, M. et al. Trophoblast- and vascular smooth muscle cell-derived MMP-12 mediates elastolysis during uterine spiral artery remodeling. *Am J Pathol.* 2010; 177: 2103–2115

Harvey MB, Leco KJ, Arcellana-Panlilio MY, Zhang X, Edwards DR, Schultz GA. Proteinase expression in early mouse embryos is regulated by leukaemia inhibitory factor and epidermal growth factor. *Development* 1995; 121(4):1005-1014.

Hayden MR, Sowers JR, Tyagi SC. The central role of vascular extracellular matrix and basement membrane remodeling in metabolic syndrome and type 2 diabetes: the matrix preloaded. *Cardiovasc Diabetol* 2005; 4:9

Holvoet S, Vincent C, Schmitt D, Serres M. The inhibition of MAPK pathway is correlated with downregulation of MMP9 secretion induced by TNF-alpha in human keratinocytes. *Exp Cell Res* 2003; 290:108–119.

Isaka, K., Usuda, S., Ito, H., Sagawa, Y., Nakamura, H., Nishi, H. et al. Expression and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in human trophoblasts. *Placenta* 2003; 24: 53–64

Kenmorgant S, Zicha D, Parker PJ. PKC controls HGFdependent c-Met traffic, signalling and cell migration. *EMBO J* 2004; 23:3721-34

Kim H, Seo JY, Roh KH, Lim JW, Kim KH. Suppression of NF-κB activation and cytokine production by N-acetylcysteine in pancreatic acinar cells. *Free Radic Biol Med* 2000; 29:674–683

Kim HS, Kim HJ, Park KG, Kim YN, Kwon TK, Park JY, Lee KU, Kim JG, Lee IK. α-Lipoic acid inhibits matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting NF-κB transcriptional activity. *Exp Mol Med* 2007; 39(1):116-113.

Kim MJ, Kim DH, Na HK, Surh YJ. TNF-α induces expression of urokinase-type plasminogen activator and β-catenin activation through generation of ROS in human breast epithelial cells. *Biochem Pharmacol* 2010; 80(12):2092–2100.

Kim JW, Park SY, You YH, Ham DS, Lee SH, Yang HK, Jeong IK, Ko SH, Yoon KH. Suppression of ROS production by exendin-4 in PSC attenuates the high glucose-induced islet fibrosis. *PLoS One* 2016; 11(12):e0163187.

Kniss DA, Rovin B, Fertel RH, Zimmerman PD. Blockade NF-κB activation prohibits TNF-α induced cyclooxygenase-2 gene expression in ED27 trophoblast-like cells. *Placenta* 2001; 22:80–89

Ko SH, Hong OK, Kim JW, Ahn YB, Song K, Cha BY, Son HY, Kim MJ, Jeong IK, Yoon KH. High glucose increase extracellular matrix production in pancreatic stellate cells by activating the rennin-angiotensin system. *J Cell Biochem* 2006; 98(2):343-355

Koli K, Myllärniemi M, Keski-Oja J, Kinnula VL. Transforming growth factor- β activation in the lung: focus on fibrosis and reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10:333-342.

Kondapaka SB, Fridman R, Reddy KB. Epidermal growth factor and amphiregulin up-regulate matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human breast cancer cells. *Int J Cancer* 1997; 70:722–726.

Kowluru RA, Mishra M. Oxidative stress, mitochondrial damage and diabetic retinopathy. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1852:2474-2483.

Kruger JS, Reddy KB. Distinct mechanisms mediate the initial and sustained phases of cell migration in epidermal growth factor receptor-overexpressing cells. *Mol Cancer Res* 2003; 1:801-9

Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:181–189.

Lan C-CE, Liu I-H, Fang A-H, Wen C-H y Wu C-S. Hyperglycaemic conditions decrease cultured keratinocyte mobility: implications for impaired wound healing in patients with diabetes. *Brit J Dermat* 2008; 159:1103–1115

Langer O. Changing the diagnosis criteria of type 2 diabetes in pregnancy: do the ends justify the means? *J Matern Fetal Neonatal Med* 2010; 23: 234–238.

Lappas M, Hiden U, Froehlich J, Desoye G, Haugel-de Mouzon S, Jawerbaum A. The role of oxidative stress in the pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15(12):3061–4100.

Lauenborg J, Grarup N, Damm P, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, Pedersen O, and Hansen T. Common type 2 diabetes risk gene variants associate with gestational diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94:145–150.

Lee KH, Kim JR. Regulation of HGF-mediated cell proliferation and invasion through NF- κ B, JunB, and MMP-9 cascades in stomach cancer cells. *Clin Exp Metas* 2012; 29(3):263-72.

Lee KH, Kim SW, Kim JR. Reactive oxygen species regulate the generation of urokinase plasminogen activator expression and cell invasion via mitogen-activated protein kinase pathways after treatment with hepatocyte growth factor in stomach cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2009; 28(1):73.

Leunda-Casi A, de Hertogh R, Pampfer S. Control of trophectoderm differentiation by inner cell mass-derived fibroblast growth factor-4 in mouse blastocysts and corrective effect of FGF-4 on high glucose-induced trophoblast disruption. *Mol Reprod Dev* 2001; 60:38-46.

Leunda-Casi A, De Hertogh R, Pampfer S. Decreased expression of fibroblast growth factor-4 and associated dysregulation of trophoblast differentiation in mouse blastocysts exposed to high D-glucose in vitro. *Diabetologia* 2001; 44(10):1318-1325.

Li YY, Shi ZM, Yu XT, Feng P, Wang XJ. The effects of urotensin II on migration and invasion are mediated by NADPH oxidase-derived reactive oxygen species through the c-Jun N-terminal kinase pathway in human hepatoma cells. *Peptides* 2017; 88:106-114.

Lijnen HR, Arza B, Van Hoel B, Collen D, Declerck PJ. Inactivation of plasminogen activator inhibitor-1 by specific proteolysis with stromelysin-1 (MMP-3). *J Biol Chem* 2000; 275(48):37645-50.

Lin CC, Tseng HW, Hsieh HL, Lee CW, Wu CY, Cheng CY, Yang CN. Tumor necrosis factor- α induces MMP-9 expression via p42/p44 MAPK, JNK, and nuclear factor- κ B in A549 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 229(3):386-98.

Lin CY, Lee CH, Huang CC, Lee ST, Guo HR, Su SB. Impact of high glucose on metastasis of colon cancer cells. *World J Gastroenterol* 2015; 21(7):2047-2057.

Librach, C.L., Werb, Z., Fitzgerald, M.L., Chiu, K., Corwin, N.M., Esteves, R.A. et al. 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *J Cell Biol* 1991; 113: 437-449

Libby P, Lee RT. Matrix matters. *Circulation* 2000. 102:1874-6.

Liu J, Chakraborty C, Graham CH, Barbin YP, Dixon SJ, Lala PK. Noncatalytic domain of uPA stimulates human extravillous trophoblast migration by using phospholipase C, phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase. *Exp Cell Res* 2003; 286:138-151

Liu RM. Oxidative stress, plasminogen activator inhibitor 1, and lung fibrosis. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10:303-319.

Lopez-Otin C, Matrisian LM. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 2007; 7:800-808.

Lu Y, Qin W, Shen T, Dou L, Man Y, Wang S, Xiao C, Li J. The antioxidant N-acetylcysteine promotes atherosclerotic plaque stabilization through suppression of RAGE, MMPs and NF- κ B in ApoE-deficient mice. *J AtherosclerThromb* 2011; 18(11):998-1008.

Luo J, Qiao F, Yin X. Hypoxia induces FGF2 production by vascular endothelial cells and alters MMP9 and TIMP1 expression in extravillous trophoblasts and their invasiveness in a cocultured model. *J Reprod Dev* 2011; 57:84-91.

MacAuley A, Cross JC y Werb Z. Reprogramming the cell cycle for endoreduplication in rodent trophoblast cells. *Mol Biol Cell* 1998; 9:795-807

MacEwan DJ. TNF ligands and receptors—a matter of life and death. *Br J Pharmacol* 2002; 135:855–875

MacPhee, DJ, Jones DH, Barr KJ, Betts DH, Watson AJ, Kidder GM. Differential development of Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase isozymes in preimplantation development of the mouse. *Dev Biol* 2000; 222:436-498.

Manchanda N, Schwartz BS. Interaction of single-chain urokinase and plasminogen activator inhibitor type 1. *J Biol Chem* 1995; 270(34):20032-35.

Martínez-Hernández MG, Baiza-Gutman LA, Castillo-Trápala A, Armant DR. Regulation of proteinases during mouse peri-implantation development: Urokinase-type plasminogen activator expression and cross-talk with matrix metalloproteinase 9. *Reproduction* 2011; 141:227-239.

McGinn S, Poronnik P, Gallery ED, Pollock CA. The effects of high glucose and atorvastatin on endothelial cell matrix production. *Diabet Med* 2004; 21(10):1102-1107.

Monteiro LJ, Norman JE, Rice GE, Illanes SE. Fetal programming and gestational diabetes mellitus. *Placenta* 2016; 30(1):54–60

Moon SK, Cha BY, Kim CH. MAPK1/3 mediates TNF-alpha-induced matrix metalloproteinase-9 expression in human vascular smooth muscle cells via the regulation of NF-kappaB and AP1: involvement of the ras dependent pathway. *J Cell Physiol* 2004; 198:417–427.

Moreau M, Mourah S, Dosquet C. β -Catenin and NF- κ B cooperate to regulate the uPA/uPAR system in cancer cells. *Int J Cancer* 2011; 128(6):1280-92

Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 2009; 417:1-13.

Nelson KK, Subbaram S, Connor KM, Dasgupta J, Ha XF, Meng TC, Tonks NK, Melendez JA. Redox-dependent matrix metalloproteinase-1 expression is regulated by JNK through Ets and AP-1 promoter motifs. *J. Biol. Chem* 2006; 281:14100–14110.

Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274(31):21491-4.

Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006; 69:562-573.

Nelson KK, Melendez JA. Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. *Free Radic Biol Med* 2004; 37:768–784.

Nguyen HL, Zucker S, Zarrabi K, Kadam P, Schmidt C, Cao J. Oxidative stress and prostate cancer progression are elicited by membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Mol Cancer Res* 2011; 9(10):1305-18.

Pampfer S, Vanderheyden I, McCracken JE, Vesela J, De Hertogh R. Increased cell death in rat blastocysts exposed to maternal diabetes in utero and to high glucose or tumor necrosis factor-alpha in vitro. *Development* 1997;124(23):4827–4836.

Pantaleon M, Tan HY, Kafer GR, Kaye PL. Toxic effects of hyperglycemia are mediated by the hexosamine signaling pathway and O-linked glycosylation in early mouse embryos. *Biol Reprod* 2010;82:751–758.

Parfyonova YV, Plekhanova OS, Tkachuk VA. Plasminogen activators in vascular remodeling and angiogenesis. *Biochemistry (Moscow)* 2001; 67(1):119-34.

Park MJ, Lee JY, Kwak HJ, Park CM, Lee HC, Woo SH, Jin HO, Han CJ, An S, Lee SH, Chung HY, Park IC, Hong SI, Rhee CH. Arsenic trioxide (As₂O₃) Inhibits invasion of HT1080 human fibrosarcoma cells: role of nuclear factor-kB and reactive oxygen species. *J Cell Biochem* 2005; 95:955–969

Pedersen RA, Wu K, Balakier H. Origin of the inner cell mass in mouse embryos: cell lineage analysis by microinjection. *Dev Biol.* 1986; 117(2):581–595.

Pepper MSA, Sappino P, Stoklin R, Montesano R, Orci L, Vassalli JD. Upregulation of urokinase receptor expression on migrating endothelial cells. *J Cell Biol* 1993; 122(3):673-84.

Plaks V, Rinkenberger J, Dai J, Flannery M, Sund M, Kanasaki K et al. Matrix metalloproteinase-9 deficiency phenocopies features of preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110: 11109–11114

Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarpotto E. Oxidative stress and cell signalling. *Curr Med Chem* 2004; 11:1163-82

Ra HJ, Parks WC. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Bio* 2007; 26:587–596.

Rafferty KA. *Methods in experimental embryology of the mouse.* The Johns Hopkins Press, Baltimore, USA, 1970 pp 22-23.

Ramin N, Thieme R, Fischer S, Schindler M, Schmidt T, Fischer B, Navarrete Santos A. Maternal diabetes impairs gastrulation and insulin and IGF-I receptor expression in rabbit blastocysts. *Endocrinology* 2010; 151(9):4158–4167.

Reth M. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat Immunol* 2002; 3:1129–1134.

Rioux N, Castonguay A. The induction of cyclooxygenase-1 by a tobacco carcinogen in U937 human macrophages is correlated to the activation of NF- κ B. *Carcinogenesis* 2000; 21:1745–1751.

Robertson PR, Harmon J, Tran OP. Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes* 2004; 53 (Suppl. 1):S119-124

Rossant J, Cross JC. Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat Rev Genet* 2001; 2:538-548

Rossant J, Tam PL. *Mouse Development*. Academic Press 2002; 155-179p

Rossant J. Mouse and human blastocyst-derived stem cells: vive les differences. *Development* 2015; 142:9-12

Rossant J. Chapter fifteen - Making the mouse blastocyst: past, present, and future. *Curr Top Dev Biol* 2016; 117:275-288

Rothhut B, Ghoneim C, Antonicelli F, Soula-Rothhut M. Epidermal growth factor stimulates matrix metalloproteinase-9 expression and invasion in human follicular thyroid carcinoma cells through focal adhesion kinase. *Biochimie* 2007; 89:613–624.

Samad F, Yamamoto K, Pandey M. Elevated expression of transforming growth factor-beta in adipose tissue from obese mice. *Mol Med* 1997; 3:37–48.

Sánchez-Santos A. 2009. Efecto de diversas concentraciones de glucosa sobre la expresión de la metaloproteínasa de la matriz extracelular 9 (MMP-9) en blastocistos de ratón en cultivo. (Tesis de Maestría). UNAM. México.

Schonwasser DC, Marais RM, Marshall CJ, Parker PJ. Activation of the mitogen-activated protein kinase/ extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Mol Cel Biol* 1998; 18:790-8.

Sharma S, Godbole G, Modi D. Decidual control of trophoblast invasion. *Am J Reprod Immunol* 2016; 75:341–350.

Shin MH, Moon YJ, Seo JE, Lee Y, Kim KH, Chung JH. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase, xanthine oxidase, and mitochondrial electron transport system mediate heat shock-induced MMP-1 and MMP-9 expression. *Free Radic Biol Med* 2008; 44:635–645

Staun-Ram E, Shalev E. Human trophoblast function during the implantation process. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3:56.

Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E. Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2(59):1-13.

Stone JR, Yang S. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antiox Redox Signal* 2006; 8:243–270

Suh YA, et al. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 1999; 401:79–82.

Teesalu T, Blasi F, Talarico D. Expression and function of the urokinase type plasminogen activator during mouse hemochorial placental development. *Dev Dynam* 1998; 213:27-38.

Tessalu T, Masson R, Basset P, Blasi F, Talarico D. Expression of matrix metalloproteinases during murine chorioallantoic placenta maturation. *Dev Dynam* 1999; 214:248-258.

Tian YC, Chen YC, Chang CT, Hung CC, Wu MS, Phillips A, Yang CW. Epidermal growth factor and transforming growth factor-beta1 enhance HK-2 cell migration through a synergistic increase of matrix metalloproteinase and sustained activation of ERK signaling pathway. *Exp Cell Res* 2007; 313:2367–2377.

Tobar N, Villar V, Santibañez JF. ROS-NF- κ B mediates TGF-b1-induced expression of urokinase-type plasminogen activator, matrix metalloproteinase-9 and cell invasion. *Mol Cell Biochem* 2010; 340:195–202.

Torloni MR, Betran AP, Horta BL, Nakamura MU, Atallah AN, Moron AF, Valente O. Prepregnancy BMI and the risk of gestational diabetes: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Obes Rev* 2009; 10:194–203.

Tronov VA, Konstantinov EM, Petrakou E, Tsilimigaki S, Piperakis SM. Nicotinamide "protects" resting lymphocytes exposed to hydrogen peroxide from necrosis but not from apoptosis. *Cell Biol Toxicol* 2002; 18(6):359–367.

Uemura S, Matsushita H, Li W, Glassford AJ, Asagami T, Lee KH, Harrison DG, Tsao PS. Diabetes Mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity. Role of oxidative stress. *Circ Res* 2001; 88:1291-1298.

Vassalli JD, Dayner JM, Wholwend A, Belin D. Concomitant secretion of prourokinase and of plasminogen activator-specific inhibitor by cultured human monocytes-macrophages. *J Exp Med* 1984; 159:1653-58.

Vestweber D, Gossler A, Boller K, Kemler R. Expression and distribution of cell adhesion molecule uvomorulin in mouse preimplantation embryos. *DevBiol.* 1987; 124(2):451–456.

Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92(8):827-39.

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

Ware LB, Bastarache JA, Wang L. Coagulation and fibrinolysis in human acute lung injury – New therapeutic targets? *Keio J Med* 2005; 54(3):142-49.

Whitaker BD, Knight JW. Effects of N-acetyl-cysteine and N-acetyl-cysteine-amide supplementation on in vitro matured porcine oocytes. *Reprod Domest Anim* 2010; 45(5):755-9.

Whiteside EJ, Jackson MM, Herington AC, Edwards DR, Harvey MB. Matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 are key regulators of extracellular matrix degradation by mouse embryos. *Biol Reprod* 2001; 64:1331-1337.

Wieczorek E, Reszka E, Gromadzinska J, Wasowicz W. Genetic polymorphism of matrix metalloproteinases in breast cancer. *Neoplasma* 2012; 2:1-2.

Wiehler S, Cuvelier SL, Chakrabarti S, Patel KD. p38 MAP Kinase regulates rapid matrix metalloproteinase-9 release from eosinophils. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 315:463–470

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

Wolf K, Friedl P. Extracellular matrix determinants of proteolytic and non-proteolytic cell migration. *Trends Cell Biol* 2011; 21: 736–744

Wu WS. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer Metas Rev* 2006; 25:695–705.

Wu JM, Sheng H, Saxena R, Skill NJ, Bhat-Nakshatri P, Yu M, Nakshatri H, Maluccio MA. NF- κ B inhibition in human hepatocellular carcinoma and its potential as adjunct to sorafenib based therapy. *Cancer Lett* 2009; 278:145–155.

Wyman A, Pinto AB, Sheridan R, Moley KH. One-Cell Zygote transfer from diabetic to nondiabetic mouse results in congenital malformations and growth retardation in offspring. *Endocrinology* 2008; 149(2):466–469.

Xu P, Wang Y, Piao Y, Bai S, Xiao Z, Jia Y. 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* 2001; 65:240-246.

Yan C, Boyd DD. Regulation of Matrix Metalloproteinase Gene Expression. *J Cell Physiol* 2007; 211:19–26.


Yao DF, Wu XH, Zhu Y, Shi GS, Dong ZZ, Yao DB. Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor, microvascular density and their clinicopathologic features in human hepatocellular carcinoma, *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4:220–226.

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

Zybina EV, Zybina TG. Polytene chromosomes in mammalian cells. *Int Rev Cytol* 1996; 165:53-119.

RESEARCH ARTICLE

Hyperglycemia-induced mouse trophoblast spreading is mediated by reactive oxygen species

Alejandra Sánchez-Santos^{1,2} | María G. Martínez-Hernández¹ |
Alejandra Contreras-Ramos³ | Clara Ortega-Camarillo⁴ | Luis A. Baiza-Gutman^{1,2} ¹Laboratorio de Biología del Desarrollo, Unidad de Morfología y Función, FES-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepanitla, Estado de México, México²Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán, C.P. Ciudad de México, México³Departamento de Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental, Hospital Infantil de México Federico Gómez, México DF, México⁴Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México DF, México

Correspondence

Luis Arturo Baiza-Gutman, Laboratorio de Biología del Desarrollo, Unidad de Morfología y Función, FES Iztacala, UNAM, Avenida de los Barrios 1, Los Reyes Ixtacala, Tlalnepanitla, C. P. 54090, Estado de México, México.
E mail: labaiza@unam.mx

Funding information

Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Universidad Nacional Autónoma de México, Grant number: 220818; Programa de Apoyo a los Profesores de Carrera para la Formación de Grupos de Investigación, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Grant number: FESI-DIP-PAPCA-2016-19; Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Doctoral fellowship, Grant number: 210446

During embryo implantation, the outer layer of the blastocyst interacts with the endometrium giving rise to the development of the trophoblast cell lineage. The cells in this lineage participate in the penetration of endometrium due to their motility and invasive properties. The mechanisms that regulate the differentiation and invasive ability of these cells are essential for the establishment and maintenance of an efficient exchange between maternal and fetal tissues during pregnancy. In this context, hyperglycemia can induce oxidative stress causing alterations in the placenta. This study evaluated the role of reactive oxygen species (ROS) in the actions of high glucose concentration (HG) on trophoblast spreading and the expression of extracellular proteases in cultured mouse conceptuses. Blastocysts from gestational day 4 (GD4) were cultured until GD7 in HAM-F10 medium and further treated for 48 hr with HG (25 mM glucose) from GD7 to GD9. This treatment induced larger trophoblast outgrowths and increased ROS concentration, which was associated with increased expression levels of urokinase-type plasminogen activator (PLAU), plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1), and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9). These effects were prevented by treatment with the non-specific antioxidant N-acetylcysteine (NAC) or apocynin, an inhibitor of NADPH oxidase. Our data suggest that the HG-induced trophoblast spreading and the expression of PLAU, PAI-1, and MMP-9 were mediated by the production of ROS via NADPH oxidase activity. Our results shed light on placental alterations in gestational diabetes mellitus.

KEYWORDS

blastocyst, high glucose, MMP-9, reactive oxygen species, trophoblast, urokinase

Abbreviations: DCFDA, 2', 7' dichlorofluorescein diacetate; ECM, extracellular matrix; FBS, fetal bovine serum; GD, gestation day; HG, high glucose concentration; L-NAME, N^ω-nitro-L-arginine-methyl ester; MMP-9, matrix metalloproteinase 9; MMPs, matrix metalloproteinases; NAC, N-acetylcysteine; NOX, NADPH oxidase; NF-κB, nuclear factor-kappaB; PAI-1, plasminogen activator inhibitor type 1; PLAU, urokinase type-plasminogen activator; ROS, reactive oxygen species; TGCs, trophoblast giant cells; TIMP-1, tissue inhibitor of metalloproteinases 1.

1 | INTRODUCTION

Maternal diabetes is associated with a pro-oxidant and pro-inflammatory intrauterine environment, resulting in structural, and functional alterations of the placenta and embryonic development. This condition has principally been attributed to hyperglycemia (Aires & Dos Santos, 2015; Lappas et al., 2011). High concentrations of glucose (HG) lead to increased production of reactive oxygen species (ROS), causing the modification of gene expression and changes in the synthesis and degradation of the extracellular matrix (ECM) (Duong Van Huyen et al., 2007; Kim et al., 2016; Lan, Liu, Fang, Wen, & Wu, 2008). Alterations in ECM degradation during endometrial invasion have been implicated in the pathogenesis of premature labor and preeclampsia (Lappas et al., 2011). The implantation of the conceptus (the product of conception, including the embryo or its precursors, and the extraembryonic tissues) in mammals involves several steps beginning with the attachment of the blastocyst to the uterine wall and ending upon formation of the placenta (Herington & Bany, 2009). The blastocyst penetrates the uterine wall during embryo implantation via an invasive process (Carson et al., 2000). The invasion of the blastocysts is controlled by components of the conceptus itself and maternal microenvironment. This process requires the production and activation of extracellular proteolytic enzymes, including plasminogen activation system enzymes, and matrix metalloproteinases (MMPs) that degrade the ECM (Cortina, Litwin, Rial Hawila, & Miranda, 2017; Martínez-Hernández, Baiza-Gutman, Castillo-Trápala, & Armant, 2011; Staun-Ram & Shalev, 2005).

The plasminogen activation system is comprised of plasminogen, as well as its activators (e.g., urokinase type-plasminogen activator or PLAU, also known as urokinase), plasminogen and PLAU receptors, and enzymatic inhibitors, including the plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1). PLAU catalyzes the conversion of plasminogen to plasmin, which can degrade various components of the ECM and to participate in the activation of MMPs (Castellino & Ploplis, 2005; Martínez-Hernández et al., 2011). Several studies have indicated that PLAU and MMP-9 regulate ECM degradation during conceptus implantation (Martínez-Hernández et al., 2011; Wang et al., 2003; Whiteside, Jackson, Herington, Edwards, & Harvey, 2001; Xu et al., 2001), thereby regulating the migration and invasion of the trophoblast. Recent reports suggested that PLAU and MMP-9 are part of a proteolytic cascade involved in ECM degradation during trophoblast invasion of the endometrium. PLAU initiates this cascade by regulating the activation of MMP9 and leading to the breakdown of the ECM (Martínez-Hernández et al., 2011). Additionally, MMP-9 and PLAU are essential proteases associated with cellular remodeling during placental angiogenesis (Luo, Qiao, & Yin, 2011).

The disruptive effects of HG and diabetes mellitus during preimplantation embryo development have been reported in several studies (Cagnone, Dufort, Vigneault, & Sirard, 2012; Diamond et al., 1991; Fraser, Waite, Wood, & Martin, 2007; Jarmuzek, Wielgos, & Bomba-Opon, 2015; Pampfer, Vanderheyden, McCracken, Vesela, & De Hertogh, 1997; Pantaleon, Tan, Kafer, & Kaye, 2010; Ramin et al., 2010; Wyman, Pinto, Sheridan, & Moley, 2008). HG (27 mM glucose)

altered the formation of the blastocyst by impairing blastocyst expansion and hatching (Pantaleon et al., 2010). Continuous or short exposure (GD4–GD5) to HG (25 or 28 mM glucose, respectively) increased trophoblast outgrowth during mouse blastocyst development in culture, indicating an enhanced invasive potential (Fraser et al., 2007; Leunda-Casi, de Hertogh, & Pampfer, 2001a, 2001b). Although the effect of HG on the expression of proteinases has not been studied in this model, proteinase expression levels were found to be dependent on the glucose concentration in a first-trimester human trophoblast cell line (HTR8/SVneo). Specifically, 10 mM glucose led to a decrease in PLAU activity, and reduced invasiveness (Belkacemi, Lash, Macdonald-Goodfellow, Caldwell, & Graham, 2005) while 25 mM glucose stimulated the expression of MMP-9, which is a marker of invasiveness (Basak, Das, Srinivas, & Duttaroy, 2015).

The aim of the present study was to determine whether HG environment during the development of cultured mouse blastocysts impairs trophoblast spreading and extracellular proteolytic systems, increasing ROS production. To this end, we tested two glucose concentrations 5.6 and 25 mM, which mimic physiological and diabetic glucose levels in maternal circulation, respectively. A higher glucose concentration (40 mM) was used in some experiments to evaluate the glucose tolerance of conceptuses. Additionally, the role of NADPH oxidase in the action of HG was tested using its inhibitor apocynin.

2 | RESULTS

Blastocysts obtained on GD4 and cultured in non-adherent conditions (without serum or exogenous ECM proteins) were treated with HG from GD7 to GD9. This period was selected because adhesion competence or the ability to bind ECM proteins is acquired in culture on GD7 (Armant, 2005), and this stage is followed by trophoblast giant cells (TGCs) differentiation and spreading as well as increased expression of PLAU and MMP-9 at GD8 and 9 (Martínez-Hernández et al., 2011).

2.1 | Effect of HG on in vitro blastocyst development and trophoblast outgrowth

In non-adherent conditions at GD 7, most of the blastocysts have lost the zona pellucida (85%), the blastocoel was reduced in size and the conceptus comprised an irregular spherical mass of cells. External cells became generally larger from GD7 to GD9 (TGCs), exhibiting rounded borders associated with little intercellular adhesion. The center of the cell mass was compact and only a small number of conceptuses exhibited slight spreading of trophoblast cells (17%; Figure 1a). Conceptuses cultured in the presence of 25 and 40 mM glucose, as well as their respective osmotic controls were similar to those in the 5.6 mM glucose control group (Figure 1a). However, the proportion of conceptuses with trophoblast outgrowth was increased in 25 mM glucose group (30%) and reduced in the osmotic control containing 5.6 mM glucose and 34.4 mM mannose (Figure 1b). Larger trophoblast outgrowths were observed in the HG condition (Figure 1a).

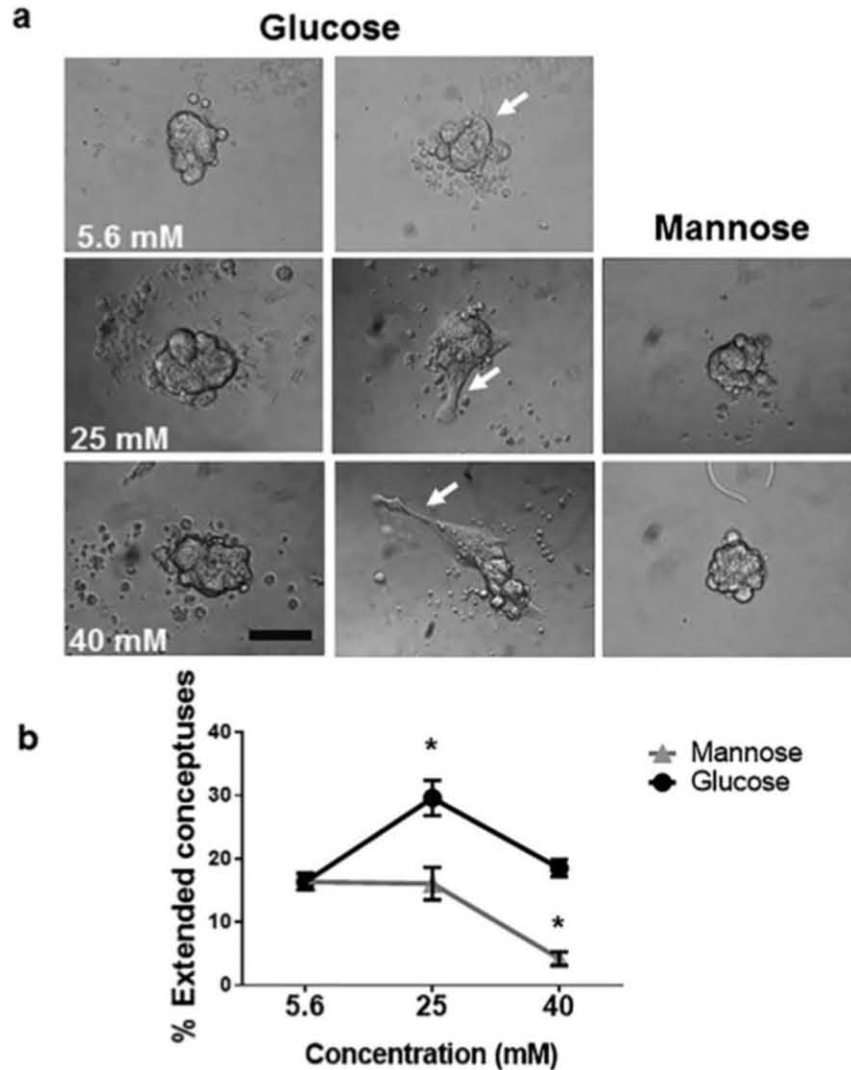


FIGURE 1 The effect of glucose on blastocyst in vitro development. Blastocysts obtained at GD4 were cultured in HAM-F10 containing 5.6 mM glucose until GD7. From GD7 to GD9, the blastocysts were cultured with 25 or 40 mM glucose or in the osmotic controls containing 5.6 mM glucose adjusted with mannose to reach 25 or 40 mM. (a) representative images of conceptuses after the treatment with and without trophoblast extension (white arrows). Magnification 40 \times , scale bar 100 μ m. (b) the proportion of extended conceptuses. The data are presented as the mean and S.E.M. from three independent experiments. * $p < 0.001$ compared with the 5.6 mM glucose control

Fetal bovine serum (FBS) was added to cultures at GD9 to identify the cell types in the spherical structures that developed in non-adherent conditions (trophoblast or inner cell mass derivatives) and to assess the ability of conceptuses to extend over a substrate. When FBS was added, the peripheral cells began the spreading over the substrate, forming cell extensions with lamellipodia. These structures increased at 5 hr after serum addition. At this time some TGCs exhibited large protrusions that were retracted when the cells were separated from the major outgrowth (Figure 2b). Over the center of the outgrowths, a rounded mass of cells was present at the beginning of the spreading. This mass became disaggregated and its predominant TGCs progressively spread over the culture surface (Figures 2a, 2b, and 3a). At 24 hr of FBS addition,

conceptuses in the control and HG conditions predominantly were comprised of extended TGCs with occasional small groups of inner cell mass derivatives. This result indicated that the maintenance and differentiation of trophoblast cells were favored in our culture conditions and that the spheroid conceptuses at GD9 were predominantly comprised of trophoblast cells, even in the control group.

Considering the area of trophoblast extension at 5 hr and 10 hr after serum addition, the extent of trophoblast outgrowth was higher in conceptuses cultured in 25 mM glucose compared with the outgrowths observed in the osmotic control or 5.6 mM glucose conditions (Figure 2a). When the trophoblast extension areas were compared after of 10 hr with FBS (Figures 2c), it was observed that the

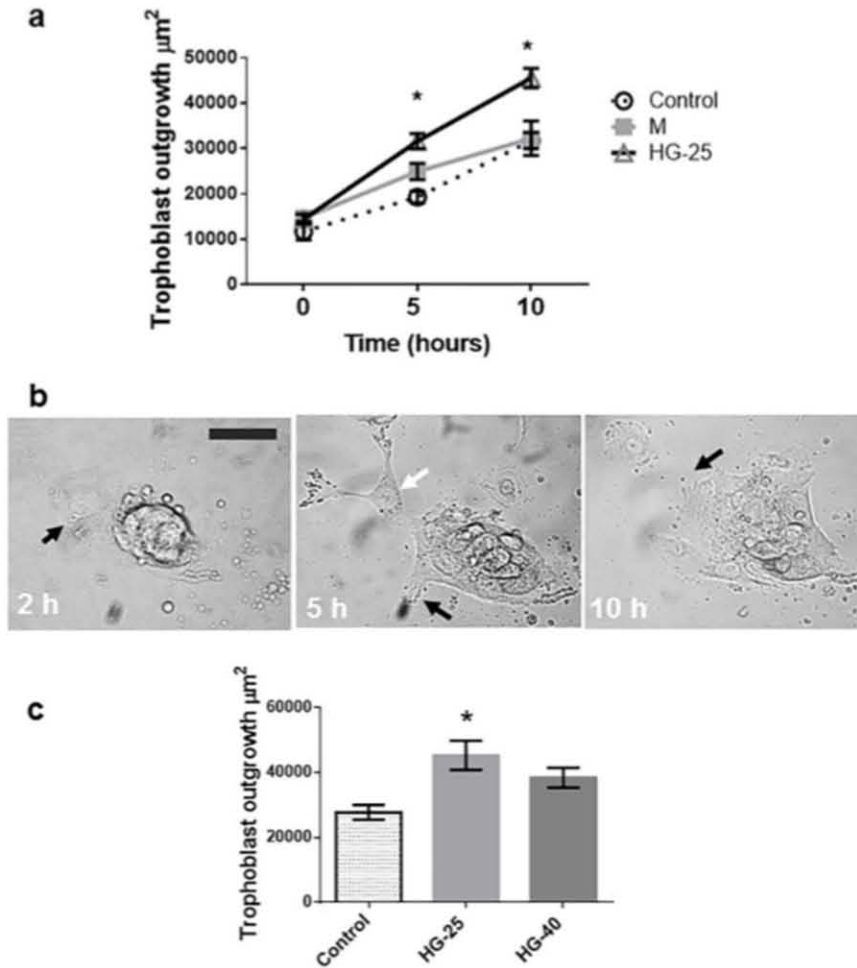


FIGURE 2 Trophoblast spreading was increased by HG treatment. FBS was added to conceptuses treated from GD7 to GD9 with 5.6 mM (control), 25 mM (HG-25), 40 mM glucose (HG-40) or 5.6 mM glucose and 19.4 mM mannose (M). (a) The area of trophoblast outgrowth was measured at several time points. (b) An example of the development of a conceptus cultured with 25 mM glucose after serum addition. A giant trophoblast cell that migrated outside the principal outgrowth (white arrows) and cell extensions with lamellipodia (black arrows) are shown. (c) trophoblast outgrowth areas 10 hr after serum addition are shown in relation to glucose concentration. Magnification 40 \times , scale bar 100 μ m. Data are presented as the mean and S.E.M. from three independent experiments. * $p < 0.001$ in relation to the control group

conceptuses cultured in 25 mM and 40 mM glucose had similar trophoblast extension areas, indicating that both glucose concentrations promoted trophoblast extension over the substrate.

To determine whether ROS mediated the effects of HG on trophoblast spreading, cultures were treated with the antioxidant N-acetylcysteine (NAC) or inhibitors of the major sources of ROS, apocynin for NADPH oxidase (NOX), and rotenone for the electron transfer chain. NAC and apocynin significantly decreased the trophoblast outgrowth area of the conceptuses, preventing the increased trophoblast spreading induced by HG (Figures 3a and 3b). However, conceptuses with few cells and smaller trophoblast outgrowths were observed in the presence of rotenone (Figures 3a and 3b). Apocynin treatment of conceptuses growing in 5.6 mM glucose did not affect the outgrowth area. In contrast, NAC treatment induced a greater extension of the trophoblast, whereas rotenone

prevented trophoblast spreading and reduced the number of cells (Figures 3a and 3b). These data indicate that neither NAC nor apocynin had deleterious effects on cultured conceptuses, whereas rotenone inhibited trophoblast spreading, and reduced the cell number in both normal glucose and HG groups.

As an indication of TGCs differentiation, the nuclear sizes were evaluated because a high correlation has been reported between nuclear size and DNA content in these cells (Barlow & Sherman, 1972). We observed some largest nuclei in conceptuses exposed to HG compared with controls (Figure 3c), indicating that trophoblast cell differentiation was promoted by HG. This increase in nuclear size was prevented by treatment with NAC or apocynin. In the osmotic control, the outgrowth area or TGCs nuclear size were not affected, indicating that the effects of HG on trophoblast differentiation and spreading were not due to increased osmotic stress (Figures 2a, 3a, 3b, and 3c).

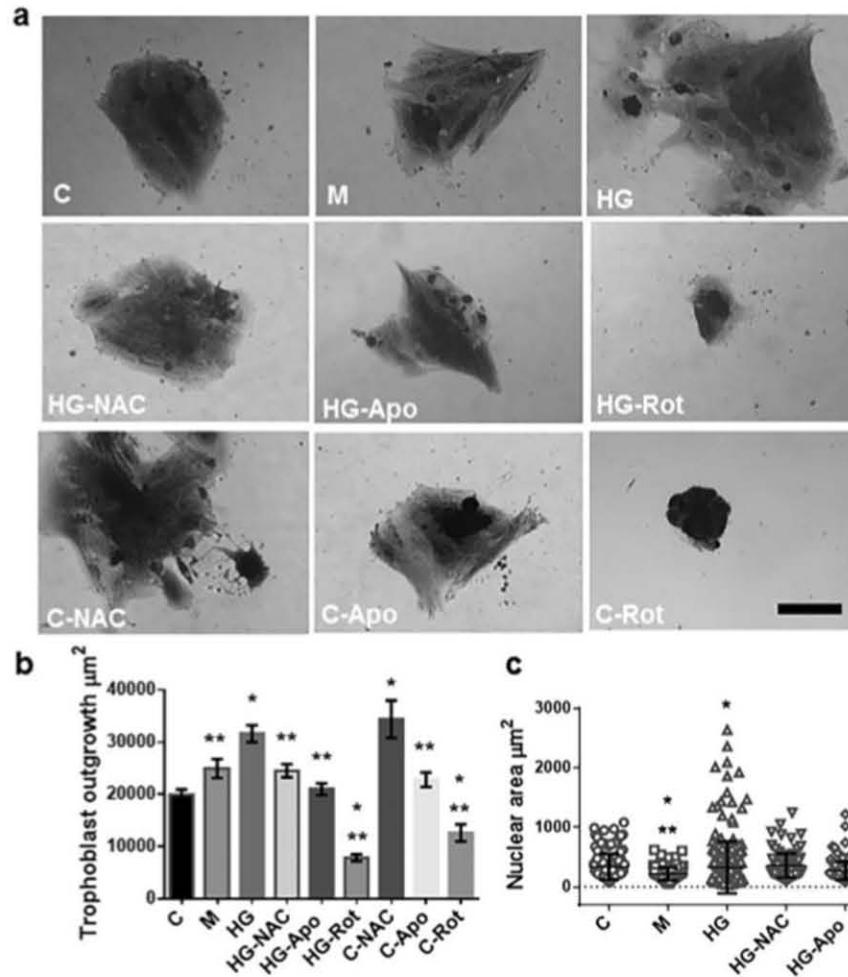


FIGURE 3 The HG-dependent increase of trophoblast outgrowth was mediated by ROS. FBS was added after the GD7 to the GD9 culture of conceptuses with 5.6 mM glucose (C), 5.6 mM glucose plus 19.4 mM mannose (M), 25 mM glucose (HG). Additionally, C and HG groups were co-treated with N-acetylcysteine (C-NAC and HG-NAC), apocynin (C-Apo and HG-Apo) or rotenone (C-Rot and HG-Rot). After 10 hr of incubation with FBS, conceptuses were fixed and stained with aceto-orcein and pictured (a) and total surface (b) and nuclear areas (c) were estimated in trophoblast outgrowths. Magnification 40×, scale bar 100 µm. Data are presented as the mean and S.E.M. from three independent experiments, * $p < 0.001$ compared with control, ** $p < 0.001$ significantly different from HG

2.2 | The production of ROS was enhanced by HG and mediated by NOX

ROS levels were evaluated to determine whether ROS formation was induced by HG. HG significantly increased dichlorofluorescein diacetate-sensitive cellular ROS in cultured mouse conceptuses (Figure 4); however, the levels of ROS were not changed on the osmotic control with mannose. The HG-induced accumulation of ROS was prevented by treatment with NAC or apocynin, indicating that the ROS were, at least in part, produced by NOX. Other inhibitors of ROS production such as N^G -nitro- L -arginine-methyl ester (L-NAME) or allopurinol, did not reduce ROS production (data not shown), excluding the participation of nitric oxide synthases and xanthine oxidase in the production of ROS induced by HG. Given that rotenone affected the in

vitro development of blastocyst, the role of mitochondria in the production of ROS induced by HG remains to be studied.

2.3 | HG regulated the expression of PLAU and PAI-1 in mouse conceptuses

The mRNA, protein, and activity levels of PLAU were increased significantly after HG treatment, as was the mRNA level of *Pai-1*; however PAI-1 protein level was not affected (Figures 5a, 5b, and 6a). The treatment with NAC or apocynin prevented the HG-induced increase in *Plau* and *Pai-1* mRNA, and in PLAU protein and activity levels (Figures 5a, 5b, and 6a). Furthermore, PLAU activity was significantly increased by 40 mM glucose (Figure 6a). Additionally,

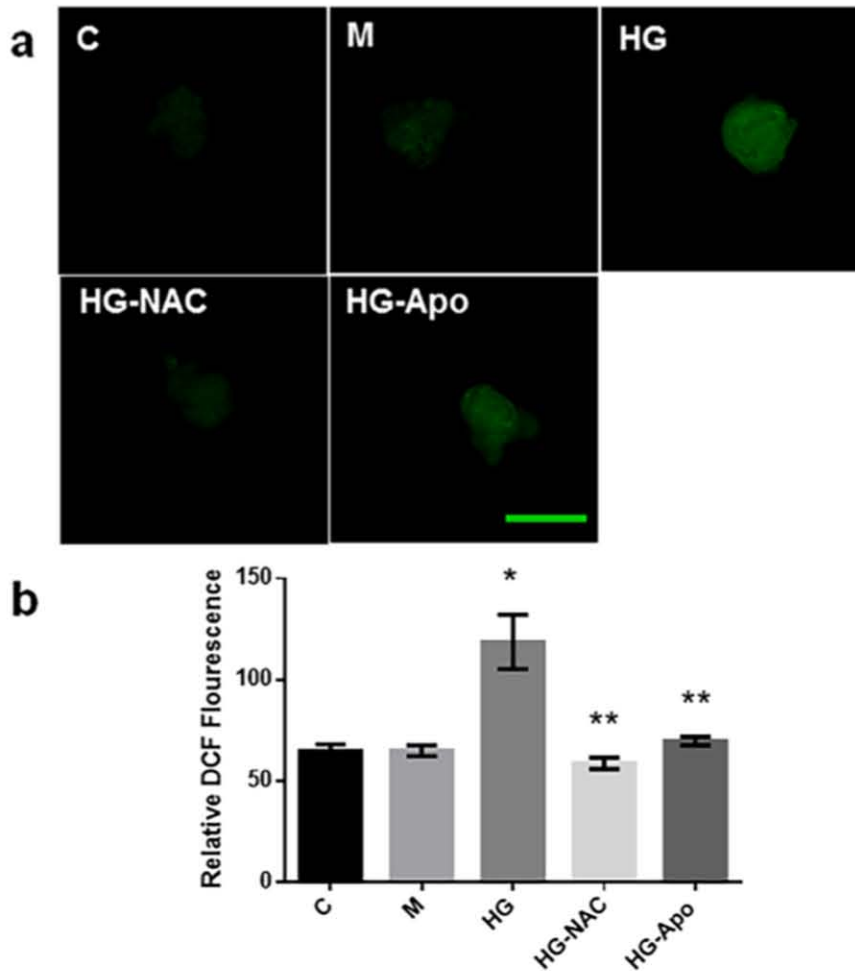


FIGURE 4 The ROS generation was increased by HG in cultured mouse conceptuses. The mouse conceptuses were cultured from GD7 to GD9 with 5.6 mM glucose (control), 5.6 mM glucose plus 19.4 mM mannose (M), 25 mM glucose (HG) or HG plus N-acetylcysteine (HG-NAC) or apocynin (HG-Apo). The DCF fluorescent intensity is dependent on ROS levels and was visualized using a confocal microscope (a). The levels of fluorescence are presented (b). The images are representative of at least 10 conceptuses per treatment. Scale bar 100 μ m. Data are presented as the mean and S.E.M. from three independent experiments, * $p < 0.001$ significantly different from C, ** $p < 0.001$ significantly different from HG

treatment with NAC or apocynin significantly diminished the activity of PLAU relative to the control group (Figure 6b). These findings indicate that HG not only increased the ability of trophoblasts to degrade the ECM but also promoted TGCs differentiation.

2.4 | HG regulated the expression of MMP-9 in mouse conceptuses

MMP-9 expression was examined to determine if it was coordinately regulated with PLAU by HG. HG increased *Mmp-9* mRNA levels (Figure 7a), whereas NAC or apocynin prevented this increase. Conversely, HG decreased the mRNA levels of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (*Timp-1*), however, only NAC prevented the effect of HG in this case (Figure 7a). Only a gelatinolytic band of 105 kDa

corresponding to Pro-MMP-9 was detected by gelatin zymography, whereas the band at 87 kDa corresponding to active MMP-9 was not observed. HG increased the levels of Pro-MMP-9 in conditioned medium and cell lysates of mouse conceptuses after treatment from GD7 to GD9 (Figure 7b) and these increases were prevented by apocynin treatment, however, NAC treatment prevented the increase in pro-MMP-9 only in cell lysates. These data suggest that the induction of the expression of MMP-9 by HG was mediated by ROS.

3 | DISCUSSION

Here, we show that HG can induce the differentiation of mouse trophoblast cells and increase their migratory/invasive potential,

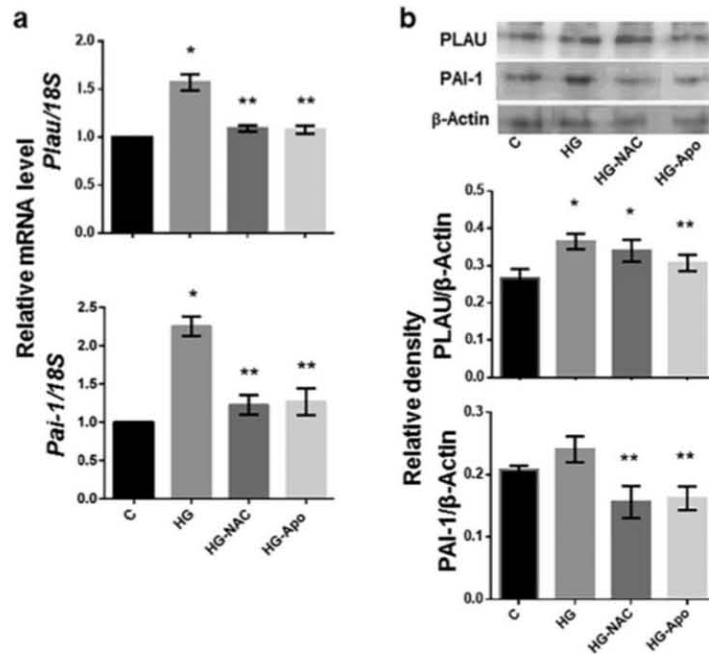


FIGURE 5 Effect of HG on PLAU and PAI-1 expression in cultured mouse conceptuses. Conceptuses were cultured from GD7 to GD9 with 5.6 mM glucose (C), 5.6 mM glucose plus 19.4 mM mannose (M), 25 mM glucose (HG), HG plus N-acetylcysteine (HG-NAC) or HG plus apocynin (HG-Apo). After the treatments, total RNA and proteins were isolated using the TRIZOL method. (a) *Plau* and *Pai-1* mRNA levels were analyzed using real-time RT-PCR with the 18s rRNA as an endogenous expression control. The folds of change in expression relative to the control group (5.6 mM glucose) are presented, the value of which was defined as 1. (b) PLAU, PAI-1, and β -actin protein levels were analyzed by Western blot (upper panel) followed by densitometry analysis. The results are expressed as the ratio of PLAU and PAI-1 to β actin. Data are presented as the mean and S.E.M. from three independent experiments. * $p < 0.001$ significantly different from the control, ** $p < 0.001$ significantly different from HG

according to the results of Fraser et al. (2007); Leunda-Casi et al. (2001a, 2001b). We report for the first time that the induction of mouse trophoblast differentiation by HG (25 mM) is mediated by ROS. It is also shown that this effect is associated with the increased expression of PLAU, its inhibitor PAI-1, and MMP-9, as well as decreased expression of TIMP-1.

The HG-induced increase in trophoblast cell spreading ability was established using a new approach and can be considered an indication of increased motility and invasive ability of trophoblast cells (González et al., 2012). Specifically, trophoblast spreading was restricted by the absence of exogenous serum or ECM proteins, and further spreading was allowed by the addition of serum. In these conditions, trophoblast cells acquire the characteristics of migratory cells (cytoplasmic prolongations and lamellipodia). The proliferation, differentiation, and invasion of trophoblast cells must be coordinated for placental development (Aires & Dos Santos, 2015) and HG-induced trophoblast spreading and invasion competence may contribute to pathological placental changes and major complications during pregnancy (Basak et al., 2015; Jarmuzek et al., 2015; Sharma, Godbole, & Modi, 2016).

Our data indicate that the HG-induced increase in levels of PLAU and MMP-9 expression was correlated with higher TGCs differentiation and increased trophoblast outgrowths. In this way, PLAU and MMP-9 have been considered to be markers of TGCs differentiation in

blastocysts developed in culture (Harvey et al., 1995; Sellens & Sherman, 1980) and contribute to the invasive potential of trophoblast cells. In contrast, the HG-induced reduction in the expression of TIMP-1, a major MMP-9 inhibitor, also contributes to a higher degradative potential of trophoblast cells. Increased levels of *Pai-1* mRNA induced by HG treatment can be related to a higher potential of trophoblast cells to synthesize PAI-1 in response to different stimuli, given that its protein concentration was not affected. The function of PAI-1 is debated and has been shown to have an anti-migratory effect via the inhibition of PLAU or a pro-migratory action via mechanisms that are not well established. PAI-1 is expressed in mature TGCs in vivo (Teesalu, Blasi, & Talarico, 1996) and in vitro (Harvey et al., 1995). Increased levels of PAI-1 expression have been associated with increased invasiveness of cancer cells (Flores-López, Martínez-Hernández, Viedma-Rodríguez, Díaz-Flores, & Baiza-Gutman, 2016; Kwaan, Mazar, & McMahon, 2013). According to our results, HG enhances the expression levels of PLAU, MMP-9, and PAI-1 in several cancer cell lines, and these proteins have been correlated with higher migratory and invasive ability (Flores-López et al., 2016; Lin et al., 2015). Trophoblast and tumor cells have similar characteristics, including the increased expression of proteases that may play active roles in migration and invasion (Ferretti, Bruni, Dangles-Marie, Pecking, & Bellet, 2007).

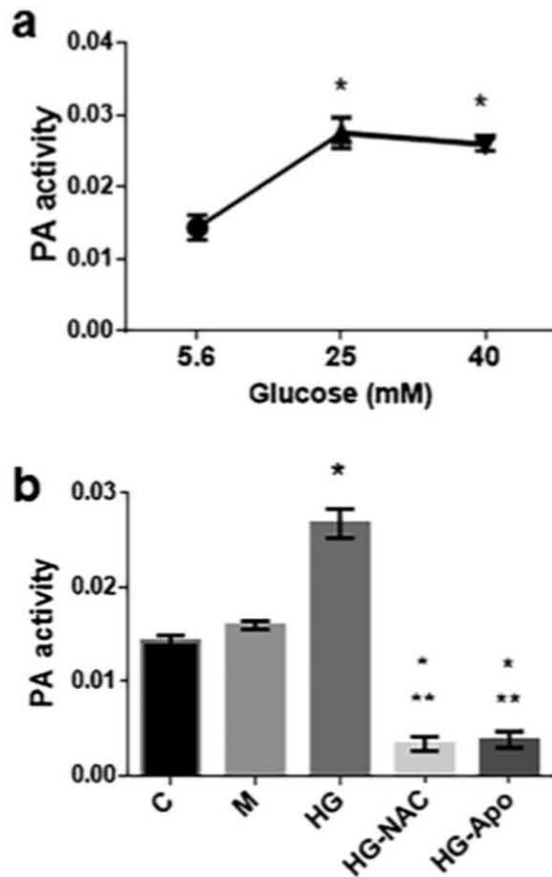


FIGURE 6 Effect of HG on plasminogen activator (PA) activity. Conceptuses were cultured from GD7 to GD9 with 5.6 mM glucose (C), 5.6 mM glucose plus 19.4 mM mannose (M), 25 mM glucose (HG), 40 mM glucose, HG plus N-acetylcysteine (HG-NAC), or HG plus apocynin (HG-Apo). After the treatments, the conditioned medium was obtained and incubated with plasminogen and its conversion to plasmin was evaluated using an amyolytic assay. (a) The PA activity was dependent on glucose concentration. (b) HG-induced increase in PA activity was dependent on ROS. Data are presented as the mean and S.E.M. from three independent experiments. * $p < 0.001$ significantly different from control (5.6 mM glucose), ** $p < 0.001$ significantly different from HG

Our findings suggested that the increased trophoblast spreading and PLAU, MMP9, and PAI expression induced by HG are mediated by ROS, given that the production of ROS was increased under HG conditions and several effects of HG were prevented by NAC. ROS (particularly H_2O_2) play important roles in oxidative biosynthetic reactions and act as signaling agents in many physiological conditions. The specific mechanism of the effects of NAC has not been completely elucidated (Lu et al., 2011), although it has been attributed to the reduction of ROS levels. NAC is a derivative of L-cysteine, which has antioxidant properties and acts as a scavenger of free radicals via its sulfhydryl group. NAC is also a precursor of an endogenous reducing agent glutathione, the principal intracellular antioxidant. NAC prevents

the HG-induced stress in different cell types and decreases PLAU expression and activity in several contexts (Kim, Kim, Na, & Surh, 2010; Tobar, Villar, & Santibañez, 2010), including HG (Flores-López et al., 2016). The action of NAC is likely dependent on the glucose concentration. Surprisingly, NAC promoted trophoblast outgrowth in the presence of normal glucose levels, which may be associated with its use in protein synthesis or with stronger antioxidant defenses due to the replenishment of glutathione. GSH levels were found to be lower in embryos cultured in vitro than in embryos developing in vivo. Moreover, a reduction in intracellular GSH levels has been associated with the decreased developmental ability of early preimplantation mouse embryos (Gardiner & Reed, 1994; Horikoshi, Takeo, & Nakagata, 2016).

The inhibitory action of apocynin on the effects on HG indicates an important role of NOX in mediating the effects of HG. Functional NOX has been observed in mouse ectoplacental cones of 7.5 GD conceptuses and in cultured TGCs derived from these cones (Bevilacqua, Hoshida, Amarante-Paffaro, Albieri-Borges, & Gomes, 2010; Gomes et al., 2012). ROS generation by NOX has been associated with the phagocytic activity of the post-implantation trophoblast (Gomes et al., 2012). In this study, apocynin prevented the HG-induced increases in PLAU, PAI-1, and MMP-9 expression, decreasing trophoblast spreading. In agreement with our results, apocynin was previously shown to decrease migration, invasion, and MMP-9 expression in different cell types (Li, Shi, Yu, Feng, & Wang, 2017). Our data provide evidence for the presence of NOX in the earlier primary mouse trophoblast, indicating the participation of NOX in the regulation of trophoblast gene expression, migration and spreading.

Unfortunately, the role of mitochondria in the production of ROS induced by HG could not be established using rotenone, an inhibitor of the respiratory chain; due that this compound had a deleterious effect on blastocyst development in culture. Therefore, another strategy is required to better delineate the role of ROS production by mitochondria in the effects of HG. For example, mitochondrial superoxide dismutase mimetics could be used to address this question.

The mechanism by which glucose can regulate protease expression is unclear. It is possible that ROS regulate the activity of transcriptions factors, such as nuclear factor-kappaB (NF- κ B), which is sensitive to redox changes (Gloire & Piette, 2009). NF- κ B was found to be expressed in the trophoblast during mouse blastocyst implantation (Muggia, Teesalu, Neri, Blasi, & Talarico, 1999). The promoter regions of PLAU and MMP-9 contain a binding element to NF- κ B (Gutsche et al., 2016; Tobar et al., 2010; Tronov, Konstantinov, Petrakou, Tsilimigaki, & Piperakis, 2002; Uemura et al., 2001), which could explain the increase in MMP-9 and PLAU levels in mouse conceptuses. Exogenous ROS induce the expression and promoter activity of the gene of PLAU (Kim et al., 2010; Lee, Kim, & Kim, 2009) and a specific inhibitor of NF- κ B significantly reduced the enhancement of PLAU and PAI-1 expression and cancer cell invasion (Moreau, Mourah, & Dosquet, 2011). In addition, oxidative stress caused by NOX induces the expression of PLAU (Tobar et al., 2010), PAI-1 (Samad, Yamamoto, & Pandey, 1997) and MMP-9 (Shin et al., 2008) via NF- κ B activation.

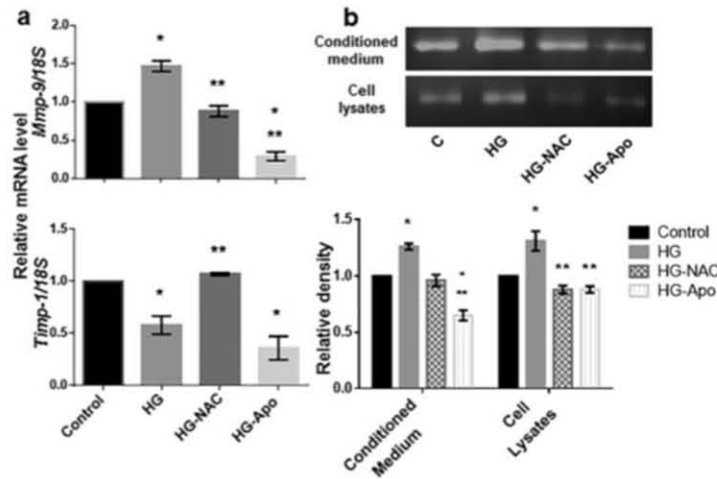


FIGURE 7 Effect of HG on MMP-9 expression in cultured mouse conceptuses. Conceptuses were cultured from GD7 to GD9 with 5.6 mM glucose (Control, C), 25 mM glucose (HG), HG plus N-acetylcysteine (HG-NAC) or apocynin (HG-Apo). (a) *Mmp-9* and *Timp-1* mRNA levels were analyzed using real-time RT-PCR with 18s rRNA as an endogenous expression control. Standardized data were used and presented as the fold change relative to the control levels (5.6 mM glucose), the value of which was set to 1. (b) Representative gelatin zymography result for conditioned medium and cell lysates. Densitometry readings of the gel bands are expressed as arbitrary units of relative densities, using the control value as 1. Data are presented as the mean and S.E.M. from at least three independent experiments. * $p < 0.001$ significantly different from control, ** $p < 0.001$ significantly different from HG

Although the role of NF- κ B in mouse TGCs had not been completely defined, it could play a role in modulating the expression of genes in these cells during the endometrial invasion, tissue remodeling, and placental morphogenesis.

The dysregulation of MMPs, PLAU, and their inhibitors during the peri-implantation stage is an important factor in diabetes-associated placental alterations, spontaneous abortions, pre-eclampsia, and intrauterine growth restriction. All of these proteins and events require further investigation. In this work, it was found that a hyperglycemic environment promotes trophoblast spreading in early mouse conceptuses via up-regulation of PLAU, MMP-9, and PAI-1 and the downregulation of TIMP-1. Moreover, it was found that these effects were mediated by ROS.

4 | MATERIALS AND METHODS

4.1 | Animals

All of the experiments were performed using CD1 mice provided by the Animal Care Facility of FES Iztacala, UNAM. Animal care and handling were conducted following the institutional regulations. These experiments were approved by the FES-Iztacala Ethical Committee, UNAM. The mice were maintained at 22 °C, food, and water were provided ad libitum and the photoperiod was 12 hr light: 12 hr darkness.

4.2 | Production and culture of embryos

Blastocysts were obtained from 5- to 7-week-old female CD1 mice that were superovulated and mated with fertile CD1 males, as

described previously (Armant, 2006). Blastocysts were collected on GD 4, with the day of vaginal plug observation being defined as GD1. The uterine horns were removed and flushed with HAM-F10 medium (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO). The blastocysts were recovered under a stereo dissecting microscope and groups of 20 conceptuses were cultured in 96 well microplates, in 100 μ l HAM-F10 medium containing 1 mg/ml BSA (0.1%), 2.2 mM calcium lactate, 12.5 mM NaHCO₃, 100 IU/ml penicillin and 0.1 mg/ml streptomycin. The cultures were maintained at 37 °C in a 5% CO₂/air incubator (NAPCO 6500) and inspected daily. Conditioned medium was harvested and replaced at GD7 with fresh treatment medium. The conceptuses were collected after 2 days of treatment (GD9) and the conditioned medium was recovered.

4.3 | Treatments

GD7 conceptuses were cultured with the following treatments; 1) 5.6 mM glucose (glucose normal or control); 2) osmotic control with 5.6 mM glucose and 19.4 mM mannose; 3) HG (25 mM glucose); 4) co-treatment with HG plus 5 mM N-acetylcysteine; 5) HG plus 10 μ M apocynin; and 6) HG plus 0.1 μ M rotenone. Apocynin and rotenone inhibit the generation of ROS via NOX or mitochondrial electron transport, respectively. Additionally, in some experiments, 40 mM glucose was used to evaluate whether trophoblast spreading and PLAU activity were dependent on the glucose concentration. In these experiments, mannose was added to control for osmolality (5.6 mM glucose plus 34.4 mM mannose). Other inhibitors of the ROS production were used, including N^ω-methyl-L-arginine (L-NAME) and allopurinol (Sigma Chemical Co.).

4.4 | Trophoblast cell spreading assay and morphometric analyses

Embryos were collected and cultured as described above in non-adherent conditions (without serum or exogenous ECM proteins). After treatments from GD7 to GD9, FBS was added to a final concentration of 10%, and the cultures were analyzed for trophoblast outgrowth at specific intervals over the next 24 hr. For comparative purposes, trophoblast extension was measured after 10 hr of serum addition using NIH ImageJ 1.62 software. The conceptuses were observed and photographed under a phase-contrast inverted microscope (Olympus CKX41, Tokyo, Japan). The conceptuses were fixed with glacial acetic acid (25%) and absolute ethanol (75%) for one minute and stained with aceto-orcein (Rafferty, 1970). The nuclear and trophoblast areas were evaluated using NIH Image J 1.62 software.

4.5 | ROS determination

The fluorescent probe 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA, Molecular Probes, Eugene, OR) was used to monitor the net intracellular accumulation of ROS. This method is based on the oxidative conversion of non-fluorescent DCFDA to fluorescent DCF by intracellular hydrogen peroxide. The conceptuses were transferred at GD9 to eight-well chamber slides (LabTek, NUNC, Naperville, IL) and ROS were measured as follows. The mouse conceptuses were washed with PBS and incubated for 30 min with DCFDA (10 μ M) at 37 °C. The conceptuses were then washed with PBS and fixed in PBS containing 3% w/v paraformaldehyde at 4 °C overnight, after which they were refrigerated in 1:1 PBS-glycerol solution until observation. The fluorescence of DCF staining was detected at 488 nm using a confocal microscope (Zeiss Axiovert 100 M, Version 2.3, software LCM510, 274748).

4.6 | Analysis of mRNA

Real-time RT-PCR was used to evaluate the effects of HG on *Plau*, *Pai-1*, *Mmp-9* and *Timp-1* mRNA levels. Total RNA was isolated using TRIzol reagent (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA) from groups of 20 conceptuses collected at GD9. RNA (1 μ g) was reverse transcribed for 60 min at 37 °C, after which the reverse transcriptase was inactivated at 95 °C for 15 min. One microliter of a 1:20 dilution of the cDNA reaction was amplified using Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas, Thermo Scientific, and Pittsburgh, PA). PCR analysis of 18s rRNA was used as a control for RNA integrity and loading accuracy. The following specific primers were used; sense 5'-GTGCCGCACACTGCTTCATT-3' and antisense 5'-CGTGCTGGTACGTATCTTCA-3' for *Plau*; sense 5'-CAATGTGTCAATTCGGCTGCTGT-3' and antisense 5'-TTGACCAGGAGCTGCTGTCTCTTT-3' for *Pai-1*; sense 5'-TTGAGTCCGGCAGACAATCC-3' and antisense 5'-CCTTATCCACGCGAATGACG-3' for *Mmp-9*; sense 5'-CGCAGATATCCGGTACGCCTA-3' and antisense 5'-CACAAGCCTGGATTCGGTGG-3' for *Timp-1* mRNAs (Harvey et al., 1995); and sense 5'-CGCGTTCTATTTTGTGGT-3' and antisense 5'-AGTCGGCATCGTTTATGGTC-3' for 18s rRNA (Vinciguerra, Santini, Claycomb, Ladurner, & Rosenthal,

2010). The amplification reaction included 40 cycles of heat denaturation at 95 °C for 30 s, followed by annealing for 1 min at 57 °C (18s, *Plau*, and *Mmp-9*), 58 °C (*Timp-1*) or 60 °C (*Pai-1*), and extension for 1 min at 72 °C. After the final cycle, the temperature was maintained at 72 °C for 10 min. The relative expression of the genes was determined using the comparative CT method ($2^{-\Delta\Delta CT}$) using their respective baselines as reference points. Relative mRNA levels of *Plau*, *Pai-1*, *Mmp-9*, and *Timp-1* were normalized with 18s rRNA, the values for the 5.6 mM glucose group were set to one and the changes in relation to this control were determined.

4.7 | Western blot

The PLAU and PAI-1 protein levels were evaluated by Western blot, as follows. Total protein was isolated from groups of 20 conceptuses after RNA extraction, following the TRIzol reagent instructions (Ambion). The proteins were heated for 5 min at 95 °C, separated by electrophoresis on 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Bio-Rad, Hercules, CA). The membranes were blocked with 5% w/v of BSA, 1% w/v Tween 20 in Tris-buffered-saline (TBS) pH 7.6 for 1 hr and incubated at 4 °C overnight with rabbit polyclonal antibodies against PLAU (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas), PAI-1 (Abcam, Cambridge, MA) or β -Actin (Santa Cruz Biotechnology) (all diluted 1:1000). The blots were washed for 30 min followed by incubation for 1 hr with the secondary antibody (diluted 1:5000). A secondary goat anti-rabbit IgG antibody was used (Jackson ImmunoResearch, Baltimore Pike, PA). The targeted proteins were detected by enhanced peroxidase chemiluminescence using the Lumi-Light Western Blotting Substrate kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Each protein band was normalized to the intensity of β -Actin. PLAU and PAI-1 levels were expressed in arbitrary units that were automatically set by the software.

4.8 | Plasminogen activator activity

We used two-steps amyolytic assay carried out at 37 °C to determine PLAU activity. Plasminogen was converted to plasmin by PLAU and plasmin activity was measured using the specific chromogenic substrate, D-Val-Leu-Lys-4 nitroanilide acetate (Sigma Chemical Co.). This substrate is cleaved by plasmin into a residual peptide and 4-nitroaniline (Ellis, Scully, & Kakkar, 1987). Conditioned medium was obtained at GD9, centrifuged at 11,000g for 2 min and frozen at -70 °C. Conditioned medium was first incubated for 18 hr with 10 μ g/ml human plasminogen (Calbiochem, La Jolla, CA) in a 0.2 ml reaction mixture containing 50 mM Tris pH 7.4 and 110 mM NaCl, then 0.3 mM of the chromogenic substrate was added, and the absorbance of 4-nitroaniline was monitored spectrophotometrically at 405 nm.

4.9 | Gel zymography

In the conditioned medium and cell lysates, MMP-9-dependent gelatinolytic activity was assayed using substrate-gel

electrophoresis (Legrand et al., 2001) with 10% polyacrylamide–SDS gels containing 1 mg/ml bovine gelatin (Sigma Chemical Co.) as the enzyme substrate. Non-denaturing conditions were used for these analyses. After electrophoresis, the gels were washed twice for 30 min in 2% (v/v) Triton X-100 to remove SDS and then incubated for 48 hr at 37 °C with 50 mM Tris–HCl (pH 7.5) containing 10 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, and 0.5% Triton X-100, pH 8.3. After staining with Coomassie blue R-250, the zymograms were imaged with the G:Box Gene Documentation System (Syngen, Frederick, MD) and the zones of enzymatic activity were quantified as integrated densities by densitometry analysis using NIH ImageJ 1.62 software. The MMP-9 levels were expressed in arbitrary units that were set automatically by the software. The values for the 5.6 mM glucose group were set to 1 and the changes in relation to this control were determined.

4.10 | Statistical analysis

Each experiment was performed at least three times. The data are presented as the mean ± standard error of the mean (S.E.M). All of the data were compared using ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs. Norma Angélica Moreno Mendoza and Felipe Vadillo Ortega for helpful discussion and criticisms during the realization of this project and Dr. Alonso Vilches-Flores for his assistance with RT-PCR. A Sánchez-Santos was a doctoral fellow of CONACYT (210446), and this study constitutes part of her Ph.D. dissertation for the Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM (México). This work was supported by the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Universidad Nacional Autónoma de México, grant number IN 220818 and the Programa de Apoyo a los Profesores de Carrera para la Formación de Grupos de Investigación, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, FESI-DIP-PAPCA-2016-19.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that no conflicts of interest could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

ORCID

Luis A. Baiza-Gutman  <http://orcid.org/0000-0002-3669-4185>

REFERENCES

Aires, M. B., & Dos Santos, A. C. (2015). Effects of maternal diabetes on trophoblast cells. *World Journal of Diabetes*, 6(2), 338–344.

Armant, D. R. (2005). Blastocysts don't go it alone. Extrinsic signals fine-tune the intrinsic developmental program of trophoblast cells. *Developmental Biology*, 280, 260–280.

Armant, D. R. (2006). Blastocyst culture. In M. J. Soares, & J. S. Hunt, (Eds.), *Placenta and trophoblast methods and protocols, methods in molecular medicine* (pp. 35–56). Totowa, NJ: Humana Press.

Barlow, P. W., & Sherman, M. I. (1972). The biochemistry of differentiation of mouse trophoblast: Studies in polyploidy. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 27(2), 447–465.

Basak, S., Das, M. K., Srinivas, V., & Duttaroy, A. K. (2015). The interplay between glucose and fatty acids on tube formation and fatty acid uptake in the first trimester trophoblast cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 401, 11–19.

Bevilacqua, E., Hoshida, M. S., Amarante-Paffaro, A., Albieri-Borges, A., & Gomes, S. Z. (2010). Trophoblast phagocytic program: Roles in different placental systems. *International Journal of Developmental Biology*, 54, 495–505.

Belkacemi, L., Lash, G. E., Macdonald-Goodfellow, S. K., Caldwell, J. D., & Graham, C. H. (2005). Inhibition of human trophoblast invasiveness by high glucose concentrations. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90, 4846–4851.

Cagnone, G. L., Dufort, I., Vigneault, C., & Sirard, M. A. (2012). Differential gene expression profile in bovine blastocysts resulting from hyperglycemia exposure during early cleavage stages. *Biology of Reproduction*, 86(2), 50.

Carson, D. D., Bagchi, I., Dey, S. K., Enders, A. C., Fazleabas, A. T., Lessey, B. A., & Yoshinaga, K. (2000). Embryo implantation. *Developmental Biology*, 223, 217–237.

Castellino, F. J., & Ploplis, V. A. (2005). Structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Thrombosis and Haemostasis*, 93, 647–654.

Cortina, M. E., Litwin, S., Rial Hawila, M. R., & Miranda, S. (2017). Multiqarity, upregulates placental plasminogen and urokinase-type plasminogen activator. *American Journal of Reproductive Immunology*, 77, 12633.

Diamond, M. P., Pettway, Z. Y., Logan, J., Moley, K., Vaughn, W., & DeCherney, A. H. (1991). Dose-response effects of glucose, insulin, and glucagon on mouse pre-embryo development. *Metabolism*, 40(6), 566–570.

Duong Van Huyen, J. P., Viltard, M., Nehiri, T., Freund, N., Bélar, M. F., Martinerie, C., ... Lelièvre-Pégorier, M. (2007). Expression of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 is altered during nephrogenesis in fetuses from diabetic rats. *Laboratory Investigation*, 87, 680–689.

Ellis, V., Scully, M. F., & Kakkar, V. V. (1987). Plasminogen activation by single-chain urokinase in functional isolation. A kinetic study. *The Journal of Biological Chemistry*, 262, 14998–15003.

Ferretti, C., Bruni, L., Dangles-Marie, V., Pecking, A. P., & Bellet, D. (2007). Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts. *Human Reproduction Update*, 13, 121–141.

Flores-López, L. A., Martínez-Hernández, M. G., Viedma-Rodríguez, R., Díaz-Flores, M., & Baiza-Gutman, L. A. (2016). High glucose and insulin enhance uPA expression, ROS formation and invasiveness in breast cancer-derived cells. *Cellular Oncology*, 39(4), 364–378.

Fraser, R. B., Waite, S. L., Wood, K. A., & Martin, K. L. (2007). Impact of hyperglycemia on early embryo development and embryopathy: In vitro experiments using a mouse model. *Human Reproduction*, 22(12), 3059–3068.

Gardiner, C. S., & Reed, D. J. (1994). Status of glutathione during oxidant-induced oxidative stress in the preimplantation mouse embryo. *Biology of Reproduction*, 51(6), 1307–1314.

Gloire, G., & Piette, J. (2009). Redox regulation of nuclear post-translational modifications during NF-kappaB activation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11, 2209–2222.

Gomes, S. Z., Lorenzon, A. R., Vieira, J. S., Rocha, C. R. R., Bandeira, C., Hoshida, M. S., ... Bevilacqua, E. (2012). Expression of NADPH oxidase by trophoblast cells: Potential implications for the postimplanting mouse embryo. *Biology of Reproduction*, 86(2), 56, 1–11.

- González, I. M., Martin, P. M., Burdsal, C., Sloan, J. L., Mager, S., Harris, T., & Sutherland, A. E. (2012). Leucine and arginine regulate trophoblast motility through mTOR-dependent and independent pathways in the preimplantation mouse embryo. *Developmental Biology*, 361(2), 286–300.
- Gutsche, K., Randi, E. B., Blank, V., Fink, D., Wenger, R. H., Leo, C., & Scholz, C. C. (2016). Intermittent hypoxia confers pro-metastatic gene expression selectively through NF- κ B in inflammatory breast cancer cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 101, 129–142.
- Harvey, M. B., Leco, K. J., Arcellana-Panlilio, M. Y., Zhang, X., Edwards, D. R., & Schultz, G. A. (1995). Proteinase expression in early mouse embryos is regulated by leukaemia inhibitory factor and epidermal growth factor. *Development*, 121(4), 1005–1014.
- Herington, J. L., & Bany, B. M. (2009). Do molecular signals from the conceptus influence endometrium decidualization in rodents? *Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular and Developmental Evolution*, 312(8), 797–816.
- Horikoshi, Y., Takeo, T., & Nakagata, N. (2016). N-acetyl cysteine prolonged the developmental ability of mouse two-cell embryos against oxidative stress at refrigerated temperatures. *Cryobiology*, 72(3), 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.05.002>.
- Jarmuzek, P., Wielgos, M., & Bomba-Opon, D. (2015). Placental pathologic changes in gestational diabetes mellitus. *Neuroendocrinology Letters*, 36(2), 101–105.
- Kim, M. J., Kim, D. H., Na, H. K., & Surh, Y. J. (2010). TNF- α induces expression of urokinase-type plasminogen activator and β -catenin activation through generation of ROS in human breast epithelial cells. *Biochemical Pharmacology*, 80(12), 2092–2100.
- Kim, J. W., Park, S. Y., You, Y. H., Ham, D. S., Lee, S. H., Yang, H. K., ... Yoon, K. H. (2016). Suppression of ROS production by exendin-4 in PSC attenuates the high glucose-induced islet fibrosis. *PLoS ONE*, 11(12), e0163187.
- Kwaan, H. C., Mazar, A. P., & McMahon, B. J. (2013). The apparent uPA/PAI-1 paradox in cancer: More than meets the eye. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 39, 382–391.
- Lan, C. C. E., Liu, I. H., Fang, A. H., Wen, C. H., & Wu, C. S. (2008). Hyperglycaemic conditions decrease cultured keratinocyte mobility: Implications for impaired wound healing in patients with diabetes. *British Journal of Dermatology*, 159, 1103–1115.
- Lappas, M., Hiden, U., Froehlich, J., Desoye, G., Haugel-de Mouzon, S., & Jaberbaum, A. (2011). The role of oxidative stress in the pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *Antioxidants Redox Signaling*, 15(12), 3061–4100.
- Lee, K. H., Kim, S. W., & Kim, J. R. (2009). Reactive oxygen species regulate the generation of urokinase plasminogen activator expression and cell invasion via mitogen-activated protein kinase pathways after treatment with hepatocyte growth factor in stomach cancer cells. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 28(1), 73.
- Legrand, C., Polette, M., Tournier, J. M., de Bentzmann, S., Huet, E., Monteau, M., & Birembaut, P. (2001). UPA/plasmin system-mediated MMP-9 activation is implicated in bronchial epithelial cell migration. *Experimental Cell Research*, 264, 326–336.
- Leunda-Casi, A., de Hertogh, R., & Pampfer, S. (2001a). Control of trophoctoderm differentiation by inner cell mass-derived fibroblast growth factor-4 in mouse blastocysts and corrective effect of FGF-4 on high glucose-induced trophoblast disruption. *Molecular Reproduction and Development*, 60, 38–46.
- Leunda-Casi, A., De Hertogh, R., & Pampfer, S. (2001b). Decreased expression of fibroblast growth factor-4 and associated dysregulation of trophoblast differentiation in mouse blastocysts exposed to high D-glucose in vitro. *Diabetologia*, 44(10), 1318–1325.
- Li, Y. Y., Shi, Z. M., Yu, X. T., Feng, P., & Wang, X. J. (2017). The effects of urotensin II on migration and invasion are mediated by NADPH oxidase-derived reactive oxygen species through the c-Jun N-terminal kinase pathway in human hepatoma cells. *Peptides*, 88, 106–114.
- Lin, C. Y., Lee, C. H., Huang, C. C., Lee, S. T., Guo, H. R., & Su, S. B. (2015). Impact of high glucose on metastasis of colon cancer cells. *World Journal of Gastroenterology*, 21(7), 2047–2057.
- Lu, Y., Qin, W., Shen, T., Dou, L., Man, Y., Wang, S., ... Li, J. (2011). The antioxidant N-acetylcysteine promotes atherosclerotic plaque stabilization through suppression of RAGE, MMPs, and NF- κ B in ApoE-deficient mice. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 18(11), 998–1008.
- Luo, J., Qiao, F., & Yin, X. (2011). Hypoxia induces FGF2 production by vascular endothelial cells and alters MMP9 and TIMP1 expression in extravillous trophoblasts and their invasiveness in a cocultured model. *Journal of Reproduction and Development*, 57, 84–91.
- Martínez-Hernández, M. G., Baiza-Gutman, L. A., Castillo-Trápala, A., & Armant, D. R. (2011). Regulation of proteinases during mouse peri-implantation development: Urokinase-type plasminogen activator expression and cross-talk with matrix metalloproteinase 9. *Reproduction*, 141, 227–239.
- Moreau, M., Mourah, S., & Dosquet, C. (2011). β -Catenin and NF- κ B cooperate to regulate the uPA/uPAR system in cancer cells. *International Journal of Cancer Journal International Du Cancer*, 128(6), 1280–1292.
- Muggia, A., Teesalu, T., Neri, A., Blasi, F., & Talarico, D. (1999). Trophoblast giant cells express NF- κ B during early mouse development. *Developmental Genetics*, 25, 23–30.
- Pampfer, S., Vanderheyden, I., McCracken, J. E., Vesela, J., & De Hertogh, R. (1997). Increased cell death in rat blastocysts exposed to maternal diabetes in utero and to high glucose or tumor necrosis factor- α in vitro. *Development*, 124(23), 4827–4836.
- Pantaleon, M., Tan, H. Y., Kafer, G. R., & Kaye, P. L. (2010). Toxic effects of hyperglycemia are mediated by the hexosamine signaling pathway and O-linked glycosylation in early mouse embryos. *Biology of Reproduction*, 82, 751–758.
- Rafferty, K. A. (1970). *Methods in experimental embryology of the mouse* (pp. 22–23). Baltimore, USA: The Johns Hopkins Press.
- Ramin, N., Thieme, R., Fischer, S., Schindler, M., Schmidt, T., Fischer, B., & Navarrete Santos, A. (2010). Maternal diabetes impairs gastrulation and insulin and IGF-I receptor expression in rabbit blastocysts. *Endocrinology*, 151(9), 4158–4167.
- Samad, F., Yamamoto, K., & Pandey, M. (1997). Elevated expression of transforming growth factor-beta in adipose tissue from obese mice. *Molecular Medicine*, 3, 37–48.
- Sellens, M. H., & Sherman, M. I. (1980). Effects of culture conditions on the developmental programme of mouse blastocysts. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 56, 1–22.
- Sharma, S., Godbole, G., & Modi, D. (2016). Decidual control of trophoblast invasion. *American Journal of Reproductive Immunology*, 75, 341–350.
- Shin, M. H., Moon, Y. J., Seo, J. E., Lee, Y., Kim, K. H., & Chung, J. H. (2008). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase, xanthine oxidase, and mitochondrial electron transport system mediate heat shock-induced MMP-1 and MMP-9 expression. *Free Radical Biology & Medicine*, 44, 635–645.
- Staun-Ram, E., & Shalev, E. (2005). Human trophoblast function during the implantation process. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3, 56.
- Teesalu, T., Blasi, F., & Talarico, D. (1996). Embryo implantation in mouse: Fetomaternal coordination in the pattern of expression of uPA, uPAR, PAI-1 and α 2MR/LRP genes. *Mechanisms of Development*, 56, 103–116.
- Tobar, N., Villar, V., & Santibañez, J. F. (2010). ROS-NF- κ B mediates TGF- β 1-induced expression of urokinase-type plasminogen activator, matrix metalloproteinase-9 and cell invasion. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 340, 195–202.
- Tronov, V. A., Konstantinov, E. M., Petrakou, E., Tsilimigaki, S., & Piperakis, S. M. (2002). Nicotinamide "protects" resting lymphocytes exposed to hydrogen peroxide from necrosis but not from apoptosis. *Cell Biology and Toxicology*, 18(6), 359–367.

- Uemura, S., Matsushita, H., Li, W., Glassford, A. J., Asagami, T., Lee, K. H., ... Tsao, P. S. (2001). Diabetes Mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity. Role of oxidative stress. *Circulation Research*, 88, 1291–1298.
- Vinciguerra, M., Santini, M. P., Claycomb, W. C., Ladurner, A. G., & Rosenthal, N. (2010). Local IGF-1 isoform protects cardiomyocytes from hypertrophic and oxidative stresses via SirT1 activity. *Aging*, 2(1), 43–62.
- Wang, H. M., Wen, Y., Mooney, S., Li, H., Behr, B., & Lake, P. M. (2003). Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase expression in human preimplantation embryos. *Fertility and Sterility*, 80(2), 736–742.
- Whiteside, E. J., Jackson, M. M., Herington, A. C., Edwards, D. R., & Harvey, M. B. (2001). Matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 are key regulators of extracellular matrix degradation by mouse embryos. *Biology of Reproduction*, 64, 1331–1337.
- Wyman, A., Pinto, A. B., Sheridan, R., & Moley, K. H. (2008). One-Cell Zygote transfer from diabetic to nondiabetic mouse results in congenital malformations and growth retardation in offspring. *Endocrinology*, 149(2), 466–469.
- 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. *Biology of Reproduction*, 65, 240–246.

How to cite this article: Sánchez-Santos A, Martínez-Hernández MG, Contreras-Ramos A, Ortega-Camarillo C, Baiza-Gutman LA. Hyperglycemia-induced mouse trophoblast spreading is mediated by reactive oxygen species. *Mol Reprod Dev.* 2018;1–13.
<https://doi.org/10.1002/mrd.22965>