



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

EFFECTO DE MATRIZ EXTRACELULAR EN  
LA DIFERENCIACION DEL TROFOBLASTO  
DE RATON

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

MARIA GUADALUPE MARTINEZ HERNANDEZ

TUTOR: DR. FELIPE VADILLO ORTEGA

COMITÉ TUTORAL: DRA. ANNIE PARDO CEMO  
DR. LUIS FELIPE JIMENEZ GARCIA  
DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN

MÉXICO, D.F.

MARZO, 2011



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.



Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 17 de enero de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTORA EN CIENCIAS de la alumna MARTÍNEZ HERNÁNDEZ MA. GUADALUPE con número de cuenta 74183838 con la tesis titulada: "EFECTO DE LA MATRIZ EXTRACELULAR EN LA DIFERENCIACIÓN DEL TROFOBLASTO DE RATÓN.", realizada bajo la dirección del: DR. FELIPE VADILLO ORTEGA

Presidente:	DRA. ANIE PARDO SEMO
Vocal:	DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA
Vocal:	DRA. LETICIA MORENO FIERROS
Vocal:	DR. JORGE CAMPOS CONTRERAS
Secretario:	DR. FELIPE VADILLO ORTEGA
Suplente:	DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN
Suplente:	DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA

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

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a 10 de marzo de 2011

*Mi del Coro Arizmendi*  
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga  
Coordinadora del Programa

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, de la UNAM su apoyo para la realización de mis estudios de Doctorado.

Este trabajo se llevó a cabo por el apoyo parcial de los recursos del Programa de Apoyos de Estudios de Posgrado PAEP con clave del Proyecto 101317.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada a lo largo de mis estudios, con número de registro 153927.

A la DGAPA por la beca parcial otorgada para realizar mi estancia en el extranjero a través del programa PASPA.

Este trabajo fue realizado en con el apoyo financiero de los programas:

The Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, NIH grants HD36764, HDO45966 y AA12057 del Dr. D.R. Armant. en la Wayne State University.

Programa de Investigación del Instituto Nacional de Perinatología a cargo del Dr. F. Vadillo Ortega.

A los proyectos de PAPIIT-DGAPA-UNAM IN212400, IN230611 a cargo del Dr. L.A. Baiza Gutman de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala

## **AGRADECIMIENTOS**

*Al Dr. Felipe Vadillo Ortega, por su apoyo, su confianza y sus sugerencias, asesoramiento e intervención a lo largo de este trabajo.*

*A la Dra. Annie Pardo Cemo, por su asesoramiento, sus enseñanzas, sus acertadas sugerencias y su confianza para concluir este proyecto.*

*Al Dr. Luis Felipe Jiménez García, por su apoyo en todo momento, sus enseñanzas, sugerencias y consejos que enriquecieron éste trabajo.*

*Al Dr. Luis Arturo Baiza Gutman, por su apoyo, su paciencia y confianza durante el desarrollo de este proyecto, así como sus observaciones tan acertadas.*

*A todo mi comité tutorial mil gracias, son un ejemplo a seguir.*

*Al Dr. David Randall Armant, por haber permitido trabajar en su laboratorio, por su apoyo y su amistad.*

*Al Dr. Diego Arenas Aranda, por sus comentarios en la revisión de este trabajo, su confianza y su amistad.*

*A la Dra. Leticia Moreno Fierros, por sus observaciones para mejorar este trabajo, así como su apoyo y confianza.*

*Al Dr. Jorge Campos Contreras, por sus sugerencias tan acertadas en la revisión de este trabajo así como su apoyo.*

*A Noemi, Susana y Toñita por su apoyo y amistad que me brindaron en el Laboratorio del Instituto de Perinatología*

*A mis amigos y compañeros de laboratorio, Sócrates, Alejandro, Elizabeth, Alejandra y Rubí, gracias.*

*A los amigos de la UMF: Jaime, Roberto, Rocío, Julia, Rafa, Isabel, Gerardo, Martha, Sergio y Carmelita.*

*A René Méndez por su gran apoyo en momentos difíciles y sobre todo por su amistad.*

*A mis amigos y compañeros de trabajo, José Luis Ortigosa, Elía, Edilberto, Aida, Mardonio, Martha Montes y Alicia, con quien he compartido momentos agradables.*

*A las caxiosas, por haberme permitido conocerlas y convivir con ellas logrando una buena amistad y un gran equipo: Araceli, Graciela, Elsa, Lilia y Cecilia.*

*A mis amigos con los que cuento siempre: Marisela, Tizoc, Gloria, Raúl, Jesús y Daleth, Margarita Díaz y Alba por los momentos que nunca se olvidan.*

A todos aquellos que en algún momento han estado conmigo en alguna etapa de mi vida, y que me han apoyado y ayudado con un agradecimiento eterno.....

No hay nada más hermoso que la naturaleza, la cual representa la vida.

Una semilla puede ser el éxito cuando se siembra y se cuida. Y cuando da sus frutos se siente una gran alegría.

Por eso doy gracias a la vida

## DEDICATORIA

*A la memoria de mis hermanos Rafael y Manuel, porque siempre están en mi pensamiento y en mi corazón.*

*A mi mamá Amparo por darme su amor, brindarme su apoyo y confianza durante toda mi vida siendo mi gran enseñanza, mi gran amiga a quien admiro por su gran fortaleza, gracias, con todo mi amor.*

*A mi esposo, Luis Arturo, por ser mi compañero, un guía, mi amigo, quien ha estado conmigo en todo momento apoyándome y dándome su amor, gracias con todo mi amor ya que eres lo mejor.*

*A mis grandes amores, mis hijos Berenice y Luis.*

# ÍNDICE

---

	<b>Página</b>
Lista de abreviaturas-----	I
Índice de figuras y tablas-----	II
Resumen-----	III
Abstract-----	IV
1. Introducción-----	1
1.1. Implantación embrionaria-----	4
1.2. Regulación uterina en la implantación-----	7
1.3. Invasión del trofoblasto-----	9
1.4. Sistema plasminógeno-plasmina-----	10
1.5. Metaloproteinasas de matriz extracelular-----	13
1.5.1. Tipos de metaloproteinasas-----	13
1.5.2. Funciones de las metaloproteinasas-----	15
1.5.3. Mecanismos que regulan la activación de MMPs-----	17
1.5.4. Células que producen MMPs-----	19
1.5.5. Gelatinasas-----	19
1.6. Matriz extracelular-----	21
1.6.1. Colágenas-----	21
1.6.2. Fibronectinas-----	23
1.6.3. Lamininas-----	24
1.6.4. Tenacinas-----	24
1.7. Moléculas de adhesión-integrinas-----	26
2. Antecedentes-----	28
3. Planteamiento del problema-----	31
4. Hipótesis-----	32
5. Objetivos-----	32
5.1. Objetivo general-----	32

5.2. Objetivos Particulares-----	32
6. Material y métodos-----	33
6.1. Superovulación y apareo de ratones-----	33
6.2. Obtención y cultivo de embriones-----	33
6.3. Expansión, adhesión y extensión-----	34
6.4. RT-PCR-----	35
6.5. Inmunolocalización del PLAU y MMP9-----	36
6.6. Zimografía en geles copolimerizados con gelatina-----	37
6.7. Zimografía en caseína-plasminógeno-----	37
6.8. Activación de MMMP9-----	38
6.9. Actividad de Plasmina-----	39
6.10. Análisis estadístico-----	39
7. Resultado-----	40
7.1. Expresión genética de <i>Mmp9</i> y <i>Plau</i> -----	40
7.2. Inmunolocalización de MMP9 y PLAU en el trofoblasto-----	46
7.3. Regulación del desarrollo del blastocisto por la matriz extracelular-----	49
7.4. Análisis zimografico de las gelatinasas durante la diferenciación del blastocisto-----	51
7.5. Modulación de la expresión de las gelatinasas por la MEC-----	53
7.6. Análisis de los activadores de plasminogeno durante la diferenciación del trofoblasto por zimografía-----	56
7.7. Activación de MMP9 dependiente de plasminógeno-----	62
8. Discusión-----	65
8.1. Localización de MMMP9 y PLAU en las células trofoblásticas-----	66
8.2. Regulación de la expresión de MMP9 u PLAU por la matriz extracelular-----	69
8.3. Interacción de MMP9 y PLAU con proteínas de la MEC-----	71
8.4. Activación de la pro-MMP9-----	73
8.5. Participación del sistema de activadores de plasminógeno en la	

activación de MMP9-----	73
9. Conclusiones-----	76
10. Bibliografía-----	78

## ***LISTA DE ABREVIATURAS***

---

<b>AKT1</b> .....	Cinasa AKT1
<b>ANOVA</b> .....	Análisis de varianza
<b>APMA</b> .....	Acetato de p-aminofenil mercúrico
<b>Arg</b> .....	Arginina
<b>Asp</b> .....	Aspartato
<b>b-FGF</b> .....	Factor de crecimiento fibroblástico básico
<b>BSA</b> .....	Albúmina sérica de bovino
<b>Col IV</b> .....	Colágena tipo IV
<b>DAPI</b> .....	4',6' diamino-2-fenilindole
<b>DG</b> .....	Días de gestación
<b>EDTA</b> .....	Ácido etilen diamino tetracético
<b>EGF</b> .....	Factor de crecimiento epidérmico
<b>ERK</b> .....	Cinasa regulada extracelularmente
<b>FACIT</b> .....	Colágena asociada a fibras con interrupción en triple hélice
<b>FAK</b> .....	Cinasa de adhesión focal
<b>fg</b> .....	fentogramos
<b>FGF</b> .....	Factor de crecimiento fibroblástico
<b>FN</b> .....	Fibronectina
<b>Gapdh</b> .....	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
<b>Gli</b> .....	Glicina
<b>Glu</b> .....	Glutamato
<b>GPI</b> .....	Glicosilfosfatidil inositol
<b>h</b> .....	Horas
<b>HBEG</b> .....	Factor de crecimiento epidérmico que une heparina
<b>hCG</b> .....	Gonadotropina coriónica humana
<b>hMMP9</b> .....	pro-MMP9 humana
<b>IgG</b> .....	Inmunoglobulina G

**kDa**.....Kilodaltones  
**Leu**.....Leucina  
**LIF**.....Factor inhibidor de leucemia  
**Lis**.....Lisina  
**LN**.....Laminina  
**MAPK**.....Proteína cinasa activada por mitógenos  
**MCI**.....Masa celular interna  
**MEC**.....Matriz extracelular  
**Mg**.....Miligramo  
**min**.....Minutos  
**mL**.....Mililitro  
**mM**.....Milimolar  
**MMPs**.....Metaloproteinasas de la matriz extracelular  
**MMP2**.....Gelatinasa A/Metaloproteinasa de matriz extracelular 2  
**MMP9 y *Mmp9***....Gelatinasa B/ Metaloproteinasa de matriz extracelular 9  
**mRNA**.....RNA mensajero  
**MT-MMP**.....MMPs tipo membranal  
**NFkB**.....Factor nuclear kB  
**NIH**.....National Institute of Health  
**nm**.....Nanómetro  
**PAGE**.....Electroforesis en geles de poliacrilamida  
**PAI 1**.....Inhibidor del activador del plasminógeno tipo1  
**PAI 2**.....Inhibidor del activador de plasminogeno tipo 2  
**PAs**.....Activadores del plasminógeno  
**pb**.....Pares de bases  
**PBS**.....Solución salina amortiguada con fosfatos  
**PCR**.....Reacción en cadena de la polimerasa  
**pg**.....Picogramos  
**PI3K**.....Fosfatidil inositol 3 cinasa.

**PLAT**.....Activador del plasminógeno tisular  
**PLAU y *Plau*** .....Activador del plasminógeno tipo uroquinasa  
**PLAUR**.....Receptor de PLAU  
**Plg**.....Plasminógeno  
**PM**.....Peso molecular  
**PMSG**.....Suero de yegua preñada  
**RGD**.....Arg-Gli-Asp  
**RT-PCR**.....Transcriptasa reversa-reacción en cadena de la polimerasa  
**SDS**.....Dodecil sulfato sódico  
**seg**.....Segundos  
**TGF $\beta$** .....Factor de crecimiento transformante  $\beta$   
**TIMP 1, 2 y 3**.....Inhibidor tisular de las MMPs 1, 2 y 3.  
**TIMPs**.....Inhibidores tisulares de metaloproteinasas  
**TNF $\alpha$** .....Factor de necrosis tumoral  $\alpha$   
**UA**.....Unidades arbitrarias  
**Val**.....Valina  
**VEGF**..... Factor de crecimiento vasculo endotelial  
**ZP**.....Zona pelúcida  
 **$\mu$ M**.....Micromolar  
 **$\mu$ g**.....Microgramos

## **INDICE DE FIGURAS Y TABLAS**

---

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Etapas del proceso de implantación-----	6
<b>Figura 2</b> Sistema plasminógeno/plasmina, su activación y degradación de la MEC-----	12
<b>Figura 3.</b> Expresión temporal del mRNA de <i>Plau</i> durante la diferenciación del blastocisto.-----	41
<b>Figura 4.</b> Efecto de proteínas de la MEC durante la expresión de <i>Plau</i> durante la adhesión y extensión del trofoblasto-----	42
<b>Figura 5.</b> Amplificación lineal del mRNA de <i>Mmp9</i> de blastocistos de ratón-----	43
<b>Figura 6.</b> Expresión temporal del mRNA de <i>Mmp9</i> durante el desarrollo de blastocistos de ratón-----	44
<b>Figura 7.</b> Localización de PLAUI por inmunofluorescencia durante el desarrollo del blastocisto-----	47
<b>Figure 8.</b> Localización de MMP9 por inmunofluorescencia durante el desarrollo de blastocistos de ratón-----	48
<b>Figura 9</b> Análisis semicuantitativo de la Pro-MMP9 por zimografía de gelatina-----	52
<b>Figura 10.</b> Producción de MMP9 durante el desarrollo del blastocisto-----	54
<b>Figura 11.</b> Zimografía de plasminogeno-caseína de medio condicionado-----	58
<b>Figura 12.</b> Patrón temporal de los activadores de plasminogeno durante el desarrollo de blastocistos-----	59
<b>Figura 13.</b> Efecto de la MEC sobre la secreción de PLAUI durante el desarrollo de blastocistos-----	60
<b>Figura 14.</b> Activación de MMP9 mediada por plasminogeno-----	63
<b>Tabla 1.</b> Metaloproteinasas de matriz extracelular presentes en el humano-----	14
<b>Tabla 2.</b> Blastocistos adheridos y extendidos sobre diferentes sustratos-----	50

## **RESUMEN**

---

La expresión y secreción de proteasas como el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (PLAU) y la metaloproteínasa de la matriz extracelular 9 (MMP9), por las células trofoblásticas durante la implantación del blastocisto, es importante para la invasión de endometrio y remodelación de tejidos maternos. Sin embargo, la regulación de la expresión, la distribución tisular y la función de PLAU y MMP9 no se conocen con exactitud. En el presente estudio, la expresión y secreción de PLAU y MMP9 en embriones peri-implantacionales de ratón cultivados en condiciones no adherentes o sobre proteínas de matriz extracelular (fibronectina, laminina, colágena tipo IV) se analizaron por técnicas de RT-PCR, inmunocitoquímica y zimografía en gel. Se observó un aumento progresivo de la expresión del mRNA de *Plau* y *Mmp9* en los blastocistos cultivados desde el día 4 al 8 de gestación, seguido por un aumento progresivo en el contenido y secreción de las respectivas proteínas del día 6 al 9 de gestación. El activador del plasminógeno de tipo tisular (PLAT) de 55 kDa y el tipo uroquinasa (PLAU) formado por un triplete de 40, 37 y 31 kDa, estuvieron presentes en el medio condicionado, lisados embrionarios y adsorbidos a la superficie de la placa de cultivo. En el medio condicionado por los embriones predomina la forma zimogénica de la MMP9 de 105 kDa, mientras que en los lisados celulares se presentan tres formas de 105, 97 y 88 kDa. Los patrones de expresión temporales semi-cuantitativos de PLAU y MMP9 evaluados por zimografía en gel, fueron similares en los embriones no adherentes y los embriones cultivados sobre fibronectina, laminina o colágena tipo IV, sin embargo en colágena tipo IV y laminina se presentó una mayor expresión del mRNA de *Plau*, mientras que el mRNA de *Mmp9* fue regulado a la alta por colágena IV. Dímeros de MMP9 son adsorbidos en cubiertas de colágena IV o laminina. La MMP9 y PLAU se localizaron en la superficie del trofotodermo mural en el día 5 de preñez y subsecuentemente en la superficie de células gigantes poliploides del trofoblasto.

Cuando se agrega plasminógeno humano exógeno a los embriones en cultivo, éste es convertido a plasmina e induce la activación de la pro-MMP9 presente en el medio condicionado. El perfil de expresión de MMP9 en el desarrollo del trofoblasto fue prácticamente paralelo al de PLAU. Nuestros datos sugieren que la expresión PLAU y MMP9 son reguladas predominantemente por un programa de desarrollo intrínseco, modulado por la interacción con la matriz extracelular, que la cascada proteolítica durante la invasión y remodelación del endometrio depende de la presencia de plasminógeno proveniente de los tejidos maternos, el cual es convertido a plasmina por la acción del PLAU y que la plasmina participa en la activación de la MMP9. Tanto la plasmina como la MMP9 conducen a la proteólisis localizada de la matriz extracelular y regulan la actividad de factores de crecimiento durante la implantación embrionaria.

## ***ABSTRACT***

---

Expression and secretion of proteases, like urokinase-type plasminogen activator (PLAU) and matrix metalloproteinase 9 (MMP9) by trophoblast cells during blastocyst implantation is important for endometrial invasion and maternal tissue remodeling. However, the regulation of expression, tissue distribution and function of PLAU and MMP9 are not completely understood. In this study, expression and secretion of PLAU and MMP9 in mouse periimplantation embryos cultured in not adherent conditions or over extracellular matrix proteins (fibronectin, laminin, collagen IV) were analyzed by techniques of RT-PCR, immunocytochemistry and gel zymography. There was a progressive increase in *Plau* and *Mmp9* mRNA expression in blastocysts cultured on gestation days (GD) 4 to 8, leading to a progressive increase in PLAU and MMP9 protein content and secretion from GD 6 to 9. Tissue-type plasminogen activator (PLAT) of 55 kDa and PLAU (a triplet of 40, 37, and 31 kDa) were present in conditioned medium and embryo lysates, and were adsorbed to the culture plate surface. In blastocyst conditioned medium, the zymogenic form of MMP9 (105 kDa) is predominant, while, three forms of MMP9 at 105, 97 and 88 kDa are present in blastocyst lysates. The temporal expression pattern of PLAU and MMP9, according to semi-quantitative gel zymography, were similar in non-adhering embryos and embryos cultured on fibronectin, laminin, or type IV collagen, although type IV collagen and laminin upregulated *Plau* mRNA expression, whereas, type IV collagen upregulated *Mmp9* mRNA. Surfaces coated with type IV collagen or laminin adsorbed MMP9 dimers. By GD 5, MMP9 and PLAU are localized on the mural trophoblast and both subsequently appear on the surface of non-extended, polyploid trophoblast giant cells. Exogenous human plasminogen was transformed to plasmin by cultured embryos and activated endogenous MMP9. Indeed, the developmental expression profile of MMP9 was similar to that of PLAU. Our data

suggest that an intrinsic developmental program predominantly regulates PLAU and MMP9 expression during implantation, which is modulated by trophoblast interaction with extracellular matrix and that the protease cascade during invasion and remodeling of the endometrium is dependent on plasminogen provided by maternal tissues. Which is transformed to plasmin by endogenous PLAU activity and plasmin activates MMP9. Both enzymes, plasmin and MMP9 lead to localized matrix proteolysis and regulate growth factor activity during embryo implantation.

## **1. INTRODUCCION**

---

La implantación del blastocisto marca el inicio de una asociación estrecha entre tejidos de distinta constitución genética y es un proceso clave en los organismos que se desarrolla dentro de la madre y cuya nutrición depende de ella (Kimber y Cols., 2000). Es un proceso complejo que involucra una serie de interacciones entre el blastocisto y el endometrio y es esencial para el establecimiento de la placenta, órgano que proporciona el aporte nutritivo que sostiene el desarrollo de mamíferos euterios. En el ratón el desarrollo pre-implantacional culmina con la formación del blastocisto, cuatro días después de la fertilización. En el blastocisto podemos distinguir dos poblaciones celulares, el trofotodermo y la masa celular interna (MCI). Ambas rodean una cavidad llena de líquido, el blastocele, todo el conjunto está protegido por una cubierta resistente, la zona pelúcida (ZP). El trofotodermo se divide en trofotodermo polar, que recubre a la MCI (Gardner, 1982) y el que rodea al blastocele, llamado trofotodermo mural (Izquierdo, 1986).

El trofotodermo es el primer epitelio y el primer tejido que se diferencia durante el desarrollo de mamíferos (Burghardt, 2002) y establece el primer contacto físico y fisiológico con el epitelio luminal uterino para dar inicio al proceso de implantación, lo cual conduce al establecimiento del embarazo. Durante la implantación, el trofotodermo continua su diferenciación formando el trofoblasto quien participa en el establecimiento de esta conexión íntima con el endometrio, llegando a ser el principal constituyente de la placenta. De la MCI se originan el embrión propiamente dicho (Gilbert, 2010).

Los blastocistos del ratón en cultivo experimentan una serie de cambios similares a los que ocurren durante su implantación en el útero, por lo que se le ha llamado implantación *in vitro*, en cultivo, los blastocistos son capaces de romper y

escapar de la zona pelúcida, adherirse a los diferentes sustratos por medio del trofotodermo mural y este tejido migra y crece en extensión formando una monocapa de células aplanadas, las que se convierten en poliploides gigantes y adquieren la capacidad de producir hormonas y enzimas proteolíticas. Las células de la masa celular interna en cultivo tienen poca diferenciación, quedando sobremontada al centro del crecimiento trofoblástico y unida a él por células trofoblásticas diploides provenientes del trofotodermo polar. Cuando no se emplean condiciones especiales de cultivo, se diferencian principalmente las células del trofoblasto primario, por lo que se emplea como un modelo para el estudio de la diferenciación dicho tejido.

Para que éste proceso se efectúe se requiere la presencia de suero de bovino fetal, éste se ha sustituido por proteínas de matriz extracelular como fibronectina, laminina, colágena tipo IV, vitronectina o trombospondina ó con el co-cultivo con otras células. Cuando los blastocistos se co-cultivan sobre monocapas celulares, desplazan a las otras células, interactuando con el depósito dejado por ellas, de ahí que se piense que el sistema *in vitro*, imita a la interacción del trofoblasto con la matriz extracelular, lo que forma parte del proceso invasivo. Lo que indica que las proteínas de la matriz extracelular son indispensables para que ocurra la adhesión y extensión del trofoblasto en cultivo.

La capacidad del trofotodermo de adherirse a superficies cubiertas por proteínas de matriz extracelular se adquieren en el blastocisto tardío, cuando inicia su actividad invasiva, se ha encontrado que esta capacidad depende de la expresión de moléculas de adhesión y de receptores a proteínas de matriz extracelular, como las integrinas, cuya expresión experimenta cambios asociados con la capacidad del trofoblasto a adherirse con la matriz extracelular.

La información que se tienen acerca de los factores que modulan la diferenciación del trofoblasto durante el desarrollo pre-implantacional, se ha obtenido en modelos de estudio *in vitro*, debido a que el cultivo de embriones

humanos no es aceptado por aspectos éticos. Estudios con pequeños animales y primates no humanos han sido utilizados para determinar y comprender los eventos que ocurren en la implantación en el humano.

## ***1.1 IMPLANTACION EMBRIONARIA***

---

La implantación es un proceso característico de la reproducción de mamíferos euterios y metaterios que según Boving comprende tres mecanismos principales que son: de tipo muscular, de adherencia e invasión. Para que la implantación se lleve a cabo se requiere de una interacción coordinada entre el embrión y el útero. El embrión debe de haber alcanzado el estado de blastocisto y en el útero deben de haber ocurrido cambios dependientes de hormonas que lleven al desarrollo de un endometrio receptivo.

En el útero, los blastocistos se liberan de la zona pelúcida y se implantan en el endometrio. La adherencia del embrión al epitelio uterino se ha considerado como el estado inicial de la implantación (figura 1).

De acuerdo con la ubicación del blastocisto en el útero los tipos de implantación se clasifican en: central, excéntrica e intersticial. Por la forma en que el trofoblasto invade al endometrio se ha establecido otra clasificación por Schlafke y Enders (1975) que consideran tres tipos de implantación: por fusión, desplazamiento e intrusiva.

Dentro de los eventos que se presentan en este proceso se pueden distinguir las siguientes etapas, dependiendo de la especie:

1. Distribución, debido a la actividad contráctil del músculo liso, los embriones se distribuyen en la luz uterina, uniformemente a lo largo de los cuernos uterinos, ubicándose en los lugares de implantación.
2. Orientación, en ella los blastocisto adquieren la posición en que ocurrirá la implantación, en la rata y el ratón el polo adembrionario (en el que se encuentra el trofodermo mural) se dispone hacia la superficie antimesometrial del endometrio, en los sitios de implantación, y en este momento pierde la zona pelúcida.

3. Contacto o aposición, es el acercamiento entre las superficies del trofotodermo y el epitelio luminal uterino, llevándose por diferentes mecanismos dependiendo del organismo, entre otros: expansión del blastocisto, migración activa del blastocisto o edema del endometrio que conduce al envolvimiento del blastocisto.

En este momento las microvellosidades del trofotodermo mural y el epitelio luminal uterino se interdigitan, en el caso del ratón, El blastocisto manda señales que inducen la respuesta decidual del útero receptivo (Tabibzadeh y Babaknia, 1995), aumenta la permeabilidad vascular en los sitios de implantación.

4. Adhesión, se establece una interacción estrecha entre el trofotodermo y el epitelio endometrial, debido a la participación de moléculas de adhesión y formación de desmosomas siendo resistente a la ruptura por medios físicos.
5. Penetración e invasión, el trofoblasto penetra a través del epitelio uterino a capas más profundas del endometrio.

El grado de penetración varía según la especie, pudiendo ser desde la simple adhesión de epitelios hasta la penetración de capas profundas del endometrio donde el trofoblasto forma las vellosidades coriónicas, quedando bañadas por la sangre materna (Wang y Dey, 2006)

La adquisición por el blastocisto de un estado de competencia para la adhesión y la diferenciación uterina a un estado receptivo son eventos esenciales para el inicio y progreso de la implantación, lo que implica una serie compleja de eventos moleculares en el endometrio y la adquisición de las características que conducen a que el blastocisto se adhiera al epitelio luminal e interactúe con el endometrio.

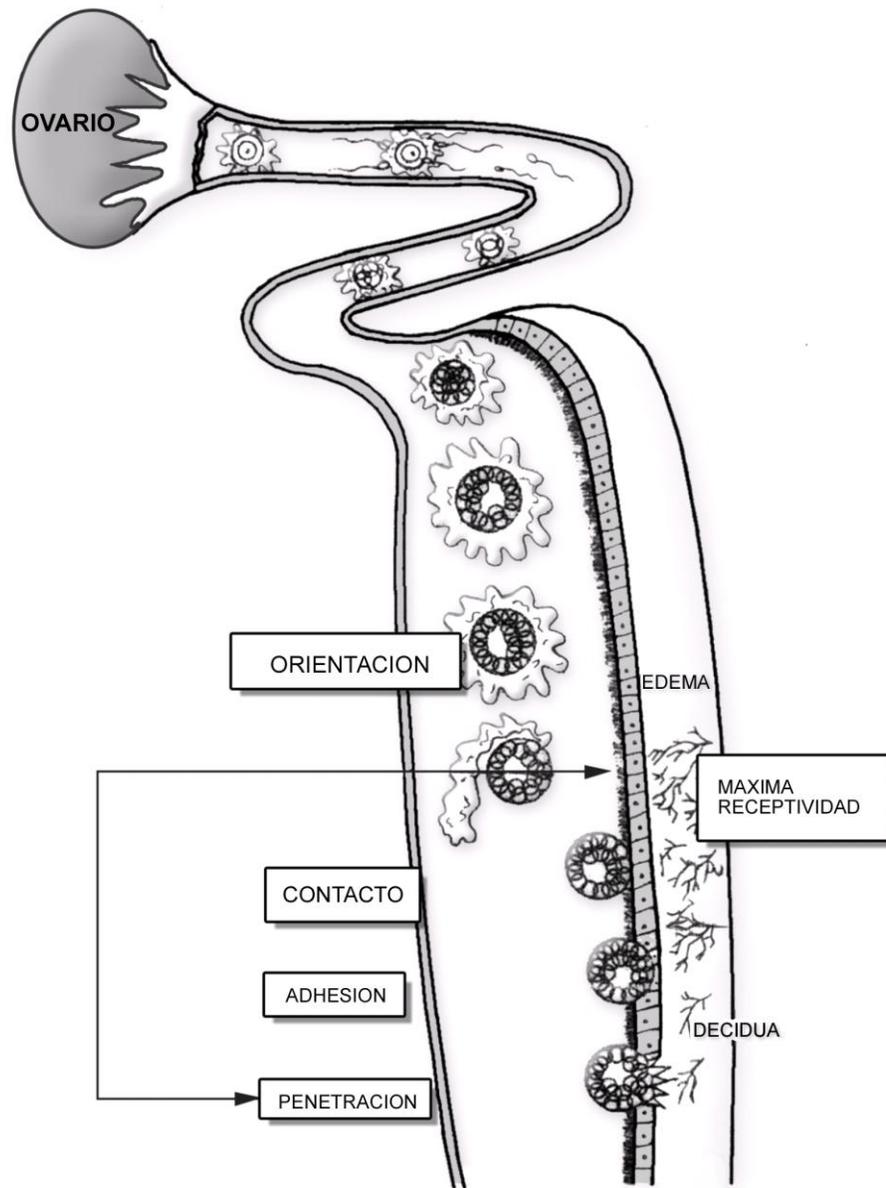


Figura 1 Etapas del proceso de implantación, modificado de Baiza, 1980

## ***1.2 REGULACION UTERINA EN LA IMPLANTACION***

---

Para que se dé la implantación del blastocisto, el útero debe haber alcanzado una fase receptiva o ventana de implantación, que corresponde a un período de tiempo transitorio y limitado en el cual el útero permite la adhesión del embrión y es sensible a las señales provenientes del mismo.

El desarrollo sincronizado del embrión al estado de blastocisto y la diferenciación del útero para lograr el estado receptivo son procesos críticos para la implantación (Dey, 2004; Paria y Cols., 1990; Psychoyos, 1973). Estos eventos son coordinados en los roedores por progesterona y estrógenos de manera espacio-temporal (Huet-Hudson y Cols., 1990). La secreción de estrógenos del ovario induce proliferación de células epiteliales glandulares y luminarias durante los dos primeros días de embarazo. Al tercer día, la progesterona formada del cuerpo lúteo induce la proliferación de las células estromales, la cual es potenciada por la secreción de estrógenos pre-implantacional, esto es la tarde del día 4 de preñez (Huet-Hudson y Cols., 1990).

El útero en respuesta a esteroides secretados por el ovario es programado en tres fases: prerreceptiva, receptiva y no receptiva. La primera ocurre al día 3 de preñez, la fase receptiva inicia al día 4 bajo la influencia de progesterona y secreción de estrógenos pre-implantacionales (Spencer, 2002). La implantación de blastocistos solamente ocurre en el útero receptivo, los requerimientos hormonales para la preparación uterina e implantación son diferentes dependiendo de la especie. Se han observado cambios en la expresión de moléculas de adhesión como la integrina  $\beta_3$  en la superficie celular uterina, en la conversión de un endometrio no receptivo a un estado receptivo. Por otra parte, citocinas como el factor inhibidor de leucemia (LIF) tienen un papel muy importante en la adquisición de la receptividad uterina (Bamberger, 2000).

El útero receptivo experimenta una serie de cambios en respuesta a las señales embrionarias, dentro de ellos, hay un incremento en la permeabilidad vascular en los sitios de aposición de los blastocistos (Psychoyos, 1973) detectados por inyección intravenosa de colorantes como el azul de Evans y azul de Tripán, que se unen a la albúmina y unidos a ella se acumulan en las zonas de implantación, por tener mayor permeabilidad vascular. Este incremento de permeabilidad vascular coincide con el inicio de adhesión entre el epitelio luminal y el blastocisto (Enders y Cols., 1967), posteriormente ocurren la decidualización localizada del estroma y apoptosis del epitelio luminal en los sitios de implantación (Parr y Cols., 1987), facilitando la invasión de las células trofoblásticas a través de las membranas basales subyacentes.

La adhesión del blastocisto con el epitelio luminal uterino y su subsecuente apoptosis, es acompañada por remodelación de la matriz extracelular y angiogénesis del estroma. Los mecanismos moleculares por los cuales se incrementa la permeabilidad vascular localizada y la angiogenesis están pobremente estudiados.

### ***1.3 INVASION DE TROFOBLASTO***

---

La invasión por el trofoblasto durante la implantación del embrión de mamíferos se ha homologado con la metástasis de células cancerosas. Durante este proceso se expresan en este tejido algunas proteínas como la metaloproteínasa de matriz extracelular 9, cinasa de adhesión focal (FAK) e integrinas como la  $\alpha\beta_3$ , lo que sugiere que estas moléculas participan en el comportamiento invasivo de las células trofoblásticas. El desarrollo de este fenotipo depende de la vía de señalización de la cinasa de fosfatil inositol 3 fosfato-cinasa Akt (PI3K - Akt1). Las células trofoblásticas producen diferentes citocinas, hormonas y enzimas, que modulan las respuestas inmune e inflamatorias y de remodelación vascular necesarias para el mantenimiento de la preñez (Bischof, 2000).

Debido a su comportamiento altamente invasivo, las células trofoblásticas al interactuar con proteínas de la matriz extracelular, secretan proteasas, capaces de degradar la matriz, y migrar a través de ella, por lo que la invasión es parcialmente dependiente de la actividad proteolítica.

Las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) y el sistema plasminógeno/plasmina son dos grupos principales de sistemas proteolíticos implicados en la degradación de la matriz necesarios para la implantación del embrión.

La invasión del endometrio debe ser controlada debido a la alta capacidad invasiva del trofoblasto, por lo que el tejido endometrial juega un papel importante, ya que por una parte la facilita por la regresión controlada del tejido decidual subyacente al embrión, y por otra evita que la invasión vaya más allá del estroma, esto debido a la producción de una gran masa de tejido decidual, así como la secreción de inhibidores de estas enzimas proteolíticas, como el inhibidor tisular de metaloproteinasas 3 (TIMP3), disminuyendo la invasividad (Alexander y Cols., 1996).

## ***1.4 SISTEMA PLASMINOGENO-PLASMINA***

---

El sistema del activador del plasminógeno/plasmina se ha considerado como uno de los pasos iniciales en la activación de la cascada proteolítica en procesos de migración celular y entre sus componentes podemos señalar a los activadores del plasminógeno, el plasminógeno y la plasmina, sus inhibidores como los inhibidores del activador del plasminógeno 1 y 2 (PAI-1 y PAI-2) y receptores en la membrana. Existen dos tipos de activadores de plasminógeno: el tipo uroquinasa (PLAU) y tipo tisular (PLAT), ambos pertenecen a la familia de las serina proteasas. Estos activadores participan en la formación de plasmina (enzima activa) a partir de plasminógeno (zimógeno inactivo).

El PLAT se ha relacionado con la fibrinólisis, para activar al plasminógeno, se asocia previamente a la fibrina (Aflalo, 2004). Estructuralmente está integrado por 5 dominios: uno tipo "finger" (residuos 4-50), otro similar al factor de crecimiento epidérmico (residuos 50-87), dos "kringles" cada uno de aproximadamente 80 residuos y el dominio de serina proteasa (residuos 276-527). Este activador se secreta en forma activa, es una proteína sérica que se sintetiza cuando se requiere la fibrinólisis (Ware y Cols., 2005)

El PLAU no se asocia con coágulos de fibrina, sino a un receptor de superficie celular específico (PLAUR) (Alfaro y Cols., 2005) y está integrado por 3 dominios: el similar al factor de crecimiento epidérmico ubicado en la porción amino terminal, el dominio "kringle" y el dominio de serina proteasa en el extremo carboxilo terminal (Castellino y Cols., 2005). El PLAU se produce y se secreta como una sola cadena polipeptídica inactiva, para activarse se escinde en dos cadenas, su activación se potencia al unirse a PLAUR en la superficie de las células a través del dominio similar al factor de crecimiento epidérmico. La unión del pro-PLAU a PLAUR induce su activación (Aflalo y Cols., 2007) que a su vez convierte el plasminógeno en plasmina.

La activación y actividad del PLAU, dependen de su unión a su receptor (Aflano y Cols. 2005, 2007). PLAU al unirse covalentemente al glicosil fosfatidilinositol (GPI) se ancla a la capa externa de la membrana celular, sin tener un dominio transmembranal (Afonso y Cols. 1999, Aflano y Cols. 2005). PLAU es una glicoproteína de 60 kDa, que se compone de tres dominios ricos en cisteína (D1, D2 y D3) conectados por regiones vinculadoras cortas (Aflano y Cols. 2005). El PLAU es una proteína multifuncional y se cree que participa en la regulación de varias condiciones fisiológicas y patológicas que implican la adhesión y migración celular donde se incluye la cicatrización de heridas, el reclutamiento de neutrófilos durante la inflamación, así como la invasión tumoral y metástasis (Afonso y Cols., 1999, Aflano y Cols., 2005). Estudios recientes han demostrado que las diversas funciones de PLAU no solo se incluyen procesos proteolíticos, sino también participan en la señalización intracelular (Bugge y Cols 1995, Caceres y Cols. 2008).

La activación del PLAU inicia una cascada de proteólisis en la superficie celular, que a su vez conduce a la degradación de la MEC, promoviendo así la migración celular, remodelación tisular, invasión, metástasis, implantación angiogénesis y organogénesis (Vassalli y Cols., 1994)

La regulación de PLAU juega un papel clave en la mediación de la degradación de MEC y la invasión celular, su actividad es controlada por los inhibidores del activador del plasminógeno (PAI) de los cuales PAI-1 es el inhibidor fisiológico predominante (Aflano y Cols. 2004, Bugge y Cols. 1995). PAI-1 es una glicoproteína que ejerce su acción inhibidora a través de la formación de un complejo covalente irreversible (Behrendt y Cols., 2003) con los sitios catalíticos de las enzimas activas. De esta manera se cree que PAI-1 controla la migración celular, la invasión tumoral y la angiogénesis (Carroll y Cols., 1993, Castellino y Cols., 2005).

La plasmina interviene en la degradación de la MEC, por digestión proteolítica directa de alguno de sus componentes (fibronectina, laminina y fibrina) o mediante la activación de otras proteasas incluyendo metaloproteasas y collagenasas (figura 2)

La plasmina es una serina proteasa, constituida por dos cadenas una pesada que comprende (Glu-1 a la Val 561) y una ligera formada a partir de (Arg 562 al Asp 791), la cadena pesada de plasmina esta formada por 5 dominios “kringle”, de 80 aminoácidos aproximadamente cada uno, caracterizados por la presencia de tres puentes disulfuro. La plasmina en solución es rápidamente inhibida por la  $\alpha_2$ -antiplasmina con quien forma un complejo covalente (Rouy y Cols., 1990). También es inhibida por aprotinina y  $\alpha_2$ -macroglobulina.

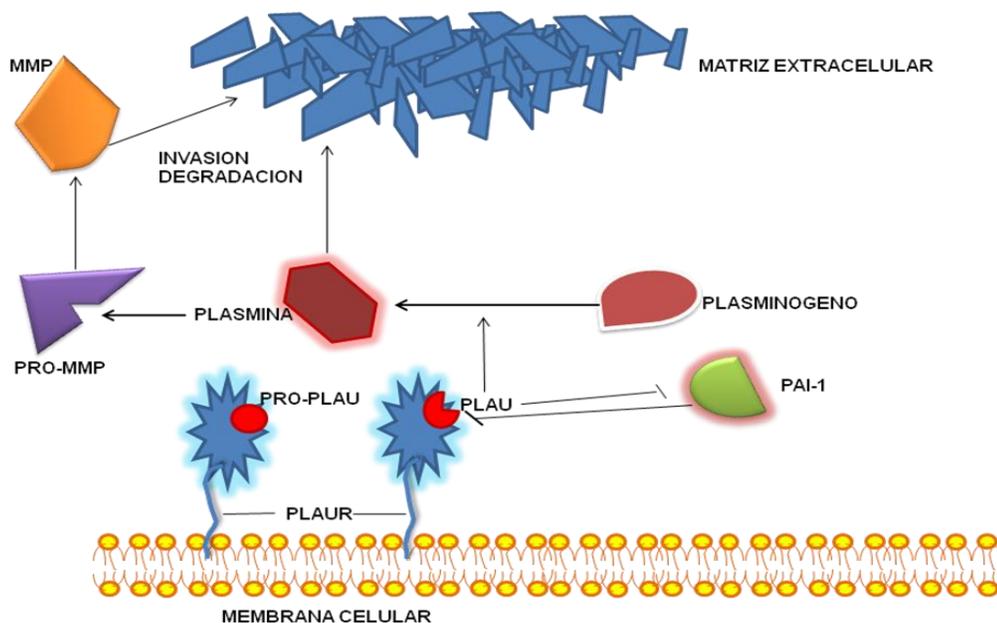


Figura 2 Sistema plasminogeno/ plasmina, su activación y degradación de la matriz extracelular.

## ***1.5 METALOPROTEINASAS DE MATRIZ EXTRACELULAR***

---

Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) son una familia de endopeptidasas dependientes de  $Zn^{++}$  y  $Ca^{++}$ , que en conjunto son capaces de degradar todos los componentes de la MEC, tanto de la membrana basal, como de la matriz intersticial. Los sustratos de las MMPs también incluyen una amplia variedad de proteínas, tales como moléculas quimiotácticas, de adhesión, inhibidores de proteasa, receptores de superficie celular, factores de coagulación y factores de crecimiento. Se conocen 26 tipos diferentes en humanos (Verma 2007, Sternlicht y Werb 2001). Su expresión, secreción y actividad en los tejidos normales dependen de un estricto control.

### ***1.5.1 TIPOS DE METALOPROTEINASAS.***

La mayoría de las MMPs son agrupadas por su homología de secuencia, composición de dominios, especificidad al sustrato, y su localización celular, dividiéndose en las siguientes subclases: colagenasas, gelatinasas, estromelinas, matrilisinas, metaloproteinasas tipo membrana (MT-MMP), y otras que no han sido completamente caracterizadas (Anteby y Cols . 2004; tabla 1).

La estructura básica de las MMPs comprende varios dominios: un dominio amino-terminal, un dominio catalítico, y un dominio carboxi-terminal (Bjorklund y Koivunen 2004). Todas las MMPs son sintetizadas como preproenzimas, generalmente son secretadas como pro-MMPs en forma inactiva. La estructura primaria de las MMPs esta integrada por algunos de los siguientes dominios: un péptido señal, un propeptide, un dominio catalítico que contiene un ion de zinc central para la catálisis, un enlazador, un dominio tipo hemopexina, un dominio de fibronectina tipo II, una región transmembrana, un dominio citoplasmático (que se encuentra en las MMPs tipos membrana), una secuencia de reconocimiento

de furina o un dominio tipo vitronectin (Thanabalasingam, 2005). Cada miembro de la familia MMP se caracteriza por una composición de dominio diferente, pero contienen un dominio propeptide de alrededor de 80 aminoácidos con un motivo PRCGVDPV conservado que liga al ion de zinc catalítico a través de los residuos de cisteína para mantener la latencia de la proenzima (Van Wart 1990). El dominio catalítico (alrededor de 170 aminoácidos) contiene un motivo de enlace de zinc HEXXHXXGXXH, todas las MMPs excepto MMP-7 tienen un dominio similar a hemopexina (aproximadamente 210 aminoácidos) en el carboxilo. El dominio de hemopexina se requiere para la digestión de colágena nativa por colagenasa-I, -II y III, así como para el enlace de TIMP-1 a la pro-MMP9 y TIMP-2 a pro-MMP2.

Tabla 1 Metaloproteinasas de matriz extracelular presentes en el humano

SUBGRUPO	MMP	NOMBRE	PM /kDa	SUSTRATO
1	MMP1	COLAGENASA INTERSTICIAL	57/52	Colagena fibrilar (I,II, III VII, X)
2	MMP8	COLAGENASA DE NEUTROFILO	85/64	Colágena I, II, III
3	MMP13	COLAGENASA 3	52/42	Colágena II
4	MMP18	COLAGENASA 4	-----	-----
5	MMP2	GELATINASA A	72/66	Gelatinas, colágena IV, V, VII, X, elastina, fibronectina
6	MMP9	GELATINASA B	92/86	Gelatinas, colágena IV, V elastina
7	MMP3	ESTROMELISINA 1	57/45	Proteoglicanos, laminina, fibronectina, colágena III, IV, V IX, Gelatina
8	MMP10	ESTROMELISINA 2	57/45	Proteoglicanos, fibronectina, colágena III, IV, V, gelatina
9	MMP11	ESTROMELISINA 3	51/44	Laminina, fibronectina
10	MMP27	HOMOLOGO DE ESTROMELISINA	-----	-----
11	MMP7	MATRILISINA (PUMP)	28/19	Proteoglicanos, laminina, fibronectina, gelatina, colágena IV,elastina
12	MMP26	MATRILISINA 2	-----	-----

13	MMP DE MATRIZ ASOCIADAS A LA MEMBRANA (MT-MMP)	MMP14	MT1 MMP	66/54	pro- MMP2
14		MMP15	MT2 MMP	72/62	Desconocido
15		MMP16	MT3 MMP	64/53	pro- MMP2
16		MMP17	MT4 MMP	57/53	Desconocido
17		MMP24	MT5 MMP	-----	-----
18		MMP25	MT6 MMP	-----	-----
19	OTRAS	MMP12	METALOELASTASA DE MACROFAGO	54/52	Elastina, fibronectina colagena Ix
20		MMP19	RASI 1	-----	Gelatinas
21		MMP20	ENAMELISINA	54/52	Amelogenina
22		MMP21	MMP IDENTIFICADA EN CROMOSOMA 1	-----	-----
23		MMP22	MMP IDENTIFICADA EN CROMOSOMA 1	-----	-----
24		MMP23	CA MMP	-----	-----
25		MMP28	EPILISINA	-----	-----
26		MMP29	SIN NOMBRE	-----	-----

### **1.5.2 FUNCIONES DE LAS METALOPROTEINASAS.**

Las MMPs participan en muchos procesos fisiológicos normales como el desarrollo embrionario, implantación, reabsorción ósea, angiogénesis y cicatrización de heridas, entre otros y en procesos patológicos como artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedades periodontales, crecimiento tumoral y metástasis (Qiu y Cols., 2004). Las MMPs regulan la invasión de células tumorales a través de sus interacciones con los componentes de la matriz extracelular, factores de crecimiento y moléculas de adhesión celular (Skrzypczak y Cols., 2001, Bamberger y Cols., 2000). Dentro de las metaloproteinasas, las gelatinasas (MMP9 y MMP2), han sido involucradas en la invasión de gliomas y células trofoblasticas y en la angiogénesis.

Las MMPs regulan el comportamiento celular de muchas maneras, incluyendo las interacciones célula-célula, célula-matriz y la activación o

inactivación de moléculas de señalización paracrina o autocrina así como de los receptores celulares. La degradación de la MEC y su invasión influye en la morfología de la célula, el movimiento, el citoesqueleto y el proceso de señalización (Sternlicht y Werb, 2001).

Estudios *in vitro*, han sugerido que el éxito de la implantación y placentación es el resultado entre el equilibrio de la secreción de MMPs por el trofoblasto y su inhibición por TIMPs (Niu y Cols., 2006, Dey y Cols., 2004). Las gelatinasas, MMP2 y MMP9, degradan colágena IV, el principal componente de la membrana basal, y por ello se han considerado enzimas clave en el proceso de implantación, lo que permite la invasión de las células del trofoblasto a través de la decidua y vasculatura materna. Las gelatinasas, principalmente la MMP2, en el humano, son secretadas por el embrión en la fase de blastocisto (Puistola y Cols., 1989, Wang y Cols., 2006). Estas pueden tener otras acciones importantes en el proceso de implantación, además de la degradación de MEC, incluyendo la regulación de la bioactividad de factores de crecimiento, citocinas y factores angiogénicos. La remodelación de la MEC del endometrio, tiene un papel crucial en el establecimiento de un embarazo exitoso. Además de regular la función celular, la diferenciación, la migración y proliferación. Desempeña un papel específico en la invasión del trofoblasto, placentación, la muerte celular y la formación de la cámara de implantación adecuada y funcional en torno al embrión.

Otra función puede ser la modulación de los factores angiogénicos, como la endotelina-1, un vasoconstrictor (Fernández y Cols., 1999) o angiostatinas, inhibidores de la angiogénesis (Patterson y Cols., 1997).

### **1.5.3 MECANISMOS QUE REGULAN LA ACTIVACION DE MMPs.**

Estas enzimas son secretadas como zimógenos inactivos (pro-MMP), su expresión y actividad proteolítica está regulada a diferentes niveles incluyendo la transcripción de genes, estabilidad del mRNA, compartimentalización celular, activación de pro-enzima y por los inhibidores endógenos.

Las MMPs y sus inhibidores endógenos, son regulados por diversos factores de transcripción, muchos miembros de la familia de las MMPs tienen elementos *cis* en sus secuencias promotoras lo que permite un control en su expresión específica en las células. Permitiendo que los factores de transcripción al ser fosforilados por proteínas de señalización se unan a los promotores de los genes de las MMPs. Dentro de los intermediarios de señalización involucrados en la activación de factores de transcripción se encuentran: el factor nuclear kapa B (NFkB), la proteína cinasa con actividad mitogenica (MAPK) y proteínas de la familia Smad. Dentro de los sitios involucrados en la regulación de los genes de MMPs se encuentra el de la proteína activadora 1 y 2 (AP-1 y AP- 2), la proteína 3 de enlace A (PEA3), el sitio de NFkB.

A nivel post-transcripcional, pueden ser reguladas a través de la estabilidad del mRNA, la cual es mediada por varios factores como es la unión de proteínas y micro RNAs (MIR) que interactúan con elementos *cis*, localizados en muchos sitios del RNA. Se ha establecido que el cortisol induce a la MMP13 en osteoblastos mediante su estabilidad transcripcional, favoreciendo el incremento de la unión de proteínas a los elementos ricos en AU donde hay elementos *cis*.

Por otra parte la compartimentalización se refiere al tiempo y lugar en que se liberan o encuentran las MMPs dentro del ambiente pericelular, lo cual determina la afinidad e interacción de la enzima con su sustrato. Las MMPs probablemente se pueden anclar a la membrana celular, manteniendo una alta concentración local de la enzima favoreciendo una actividad catalítica a sustratos

específicos dentro del espacio pericelular, presentándose así interacciones específicas entre las células y MMPs por ejemplo la unión de MMP2 a la integrina  $\alpha 2\beta 1$ , MMP9 a CD44, MMP7 a la superficie de proteoglicanos y colesterol, los cuales pueden actuar como mediadores de la actividad enzimática.

La activación a nivel de los zimógenos implica que la interacción tiol y  $Zn^{++}$  debe interrumpirse (“switch” de cisteína), esta activación puede ser por tres mecanismos diferentes:

- Modificación del tiol libre por compuestos fisiológicos (oxidantes, disulfuros) y no fisiológicos (agentes alcalinos, iones de metales pesados).
- Ruptura directa del prodominio por otras proteinasas.
- Perturbación química o alostérica del zimógeno, lo que provoca un corte autolítico del prodominio a nivel intra o intermolecular.

La activación implica la disociación de la Cis 73 del átomo de  $Zn^{++}$  esta Interrupción provoca que la cisteína reaccione con un tiol, evitando su reasociación, provocando una cascada de eventos que alteran su conformación, lo que causa el corte de su pro-péptido y por lo tanto su activación (Ra, 2007).

La inhibición de las formas activas de las MMPs es principalmente por parte de inhibidores tisulares endógenos, conocidos como TIMPs, los que constituyen una familia integrada por 4 miembros (TIMP 1, 2, 3 y 4) que son glicoproteínas, integradas por dos dominios (amino y carboxilo terminal). Los TIMPs inhiben a las MMPs en una relación 1:1 a través del dominio N-terminal del TIMP con el sitio activo de la MMP.

El equilibrio entre la activación y la inhibición impide la proteólisis excesiva o su inhibición. Varios factores como las citocinas, factores de crecimiento, ésteres de forbol, interacciones entre célula-célula y células-matriz controlan la expresión de MMPs (Van Wart, 1990). Las MMPs al ser secretadas pueden ser activadas extracelularmente por proteasas como plasmina, PLAU, plasminógeno, trombina,

elastasa, tripsina, quimotripsina y catepsinas. Otras como la MMP2 se activan en la superficie celular por una vía que incluye MT-MMP1 y TIMP-2.

Las MMPs también son inhibidas por la  $\alpha$ 2-macroglobulina en los fluidos corporales.

#### **1.5.4 CELULAS QUE PRODUCEN MMPs**

Existen varios tipos de células que producen MMPs como monocitos, macrófagos, neutrófilos, los linfocitos T, las células endoteliales, los fibroblastos, así como la microglía, astrocitos, oligodendrocitos y neuronas. En particular, la MMP2 y MMP9 son secretadas por la microglia y los astrocitos como formas activas.

#### **1.5.5 GELATINASAS**

Constituyen un subgrupo de MMPs integrado por la gelatinasa A (MMP2) y la gelatinasa B (MMP9). Su expresión se ha establecido en las células normales, como trofoblastos, osteoclastos, neutrófilos, macrófagos y en células cancerosas donde su producción es elevada.

Los factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento fibroblástico básico (b-FGF), factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ 1 y  $\beta$ 2) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), regulan el incremento de MMP2 y MMP9 (Skrzypczak y Cols., 2007, Huang y Cols., 1998).

La transcripción de la MMP9 y estromelisina (MMP3) depende de factores de transcripción, involucrados en las respuestas al estrés celular y morfogénesis de tejidos, incluyendo NF- $\kappa$ B, miembros de la familia ETS y AP-1 (Meisser y Cols., 1999). El EGF promueve la activación de la MMP9, posiblemente a través de la activación de la vía MAPK/ERK en el glioblastoma (Roth y Cols., 1999). Otros

estudios han demostrado previamente que la producción de MMP9 es inducida por cambios en el citoesqueleto a través de la proteína cinasa C (PKC), mediada por la activación de NF- $\kappa$ B (Licht y Cols., 2001). La vía MAPK/ERK es esencial para la regulación de MMP9 en los astrocitos por la estimulación inducida por PKC y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).

## **1.6 MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)**

---

La MEC es el material secretado por las células, localizándose entre los límites epiteliales y endoteliales, su presencia es variable, juega un papel fundamental en la estructura de los organismos, sin embargo no solo es una sustancia de soporte inerte, actualmente se le considera que tiene una función activa y compleja en la regulación de procesos básicos de las células que tienen contacto con ella, ejerciendo una función moduladora en procesos como la migración, proliferación, diferenciación celular y apoptosis, entre otras.

Se ha establecido que muchas de estas actividades son reguladas a través de receptores de la matriz extracelular como las integrinas. También se ha considerado a la MEC como un lugar de almacén de factores de crecimiento ( $TNF\alpha$ ,  $TGF\beta 1$  y FGF).

La MEC está integrada por una gran variedad de macromoléculas como las colágenas responsables de la resistencia mecánica, proteínas de adhesión como fibronectina, laminina y los proteoglicanos condroitinas, heparan sulfatos y tenascinas, que rodean a las células del tejido conectivo.

### **1.6.1 COLÁGENAS**

Las colágenas son los constituyentes más abundantes de la matriz extracelular y se les considera las proteínas estructurales de la matriz, constituyen una familia de glicoproteínas que contienen un alto porcentaje de glicina y prolina, se han descrito diferentes tipos de colágenas en vertebrados, teniendo en común dominios de estructura de triple hélice, dentro de su estructura primaria se presenta repeticiones de secuencias de tres aminoácidos Gli-X-Y, donde X e Y representan aminoácidos diferentes a la glicina, con frecuencia Y corresponde a la hidroxil-L-prolina.

Algunas colágenas forman fibras (colágena tipo I, II, III, V, XI), en ocasiones in vivo forman fibras heterotípicas (fibrillas hechas de más de un tipo

de colágena), estas colágenas presentan similitud estructural. Otras se encuentran formando láminas o membranas proteicas que rodean a los tejidos, (colágenas IV, VIII y X), pueden tener forma reticular (colágena tipo IV). La colágena tipo IV es el principal componente de las membranas basales, en donde se organizan en forma de red de cordones entrelazados donde atrapan moléculas como laminina o proteoglicanos de heparan sulfato. Hay otras que se encuentran asociadas a fibras como las colágenas IX, XII y XIV, las cuales participan en la formación de fibras junto con las colágenas fibrilares; ya que por sí solas no hacen, por lo que se denominan colágenas asociadas a fibras con interrupción en triple hélice (FACIT), comparten regiones de alta homología y estructuralmente presenta tres regiones funcionales: una está integrada por uno o dos dominios en triple hélice que sirven en la interacción de estas moléculas con las fibras, la segunda región comprende un dominio en triple hélice formando un brazo rígido que se proyecta hacia fuera de la fibra y la tercera región que permite la interacción con otros elementos de la matriz o con células. Este tipo de colágenas se secretan como se sintetizan, ya que no presentan un procesamiento proteolítico. Existe otro tipo de colágena originalmente llamada íntima, la cual forma filamentos en rosario (colágena tipo VI), esta forma un ensamble heterotrimérico de tres cadenas genéticamente distintas (alfa1, alfa2 y alfa 3) y presenta secuencias de aminoácidos que parecen tener importancia en la interacción de componentes de matriz con receptores celulares tipo integrinas. La colágena tipo VII es formadora de fibras de anclaje de cadena larga, es un homotrímero de cadenas alfa 1, es sintetizada por queratinocitos, sobre este tipo de colágena descansan algunos epitelios escamosos estratificados.

### **1.6.2 FIBRONECTINAS**

Las fibronectinas integran una familia de glicoproteínas multifuncionales, encontrándose en forma insoluble (formando parte de la MEC) o en forma soluble circulando en el plasma.

Están formadas por 2 subunidades polipéptidicas de 230 y 250 kDa unidas por puentes disulfuro. Esta familia está integrada por más de 20 miembros que derivan de un gen estructural único que presenta procesamiento alternativo del RNA y modificaciones postraduccionales diferentes (glicosilación y fosforilación). El procesamiento alternativo ocurre en tres sitios del transcrito primario y da origen a los múltiples polipéptidos que forman la familia de las fibronectinas. Estructuralmente la fibronectina está integrada por tres tipos de “motivos” repetidos o unidades básicas que se organizan en dominios funcionales, denominadas homologías tipo I, II y III.

Se han descrito 12 homologías tipo I, las cuales están involucradas en la actividad de unión a fibrina, además un sitio de unión de baja afinidad para heparina. Intercaladas en el agrupamiento amino terminal de las homologías tipo I se encuentran dos homologías tipo II, las cuales se han involucrado en la unión a colágena tipo I desnaturalizada. Finalmente entre dos agrupamientos de homologías tipo I se encuentra una región integrada por 15 a 17 homologías tipo III, la cual participa en la interacción con receptores de superficie celular y unión de alta afinidad con heparina. Se ha establecido que la región tipo III es responsable de las variaciones de la estructura primaria de la fibronectina que resultan del procesamiento alternativo del pre mRNA en tres sitios conocidos como extra dominio B, extra dominio A y segmento de conexión tipo III.

La fibronectina participa en procesos de adhesión, migración celular, en la opsonización y cicatrización entre otras. La fibronectina extracelular actúa como sustrato para la adhesión celular durante la embriogénesis y organogénesis, participando así en la gastrulación, migración de células de la cresta neural, diferenciación celular hematopoyéticas, etc.

Las células interactúan con la fibronectina a través de un receptor de membrana (proteína dimérica de 2 subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ ). Mientras que la fibronectina plasmática está implicada en actividades como la organización del coágulo y de diferentes partículas por el sistema reticuloendotelial.

### **1.6.3 LAMININAS**

Las lamininas son moléculas de adhesión celular que se encuentran formando parte de la MEC, integran una familia de glicoproteínas que se encuentran predominantemente en las membranas basales, participan en varias funciones fisiológicas, son esenciales para el desarrollo embrionario temprano y organogénesis. Las lamininas son glicoproteínas extracelulares heterotriméricas que se componen de diversas combinaciones de sus cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , son macromoléculas de 400 a 900 kDa. Se conocen cinco isoformas de la cadena  $\alpha$ , cuatro  $\beta$  y tres cadenas  $\gamma$  (Miner 2004b), a la fecha se conocen dieciséis tipos de lamininas, estas proteínas presentan sitios de unión a receptores (integrinas), por lo que se encuentran involucradas en la interacción célula-matriz. Estas interacciones se ha demostrado que son importantes durante el desarrollo del trofoblasto, la homeostasis de tejido y su remodelación.

### **1.6.4 TENACINAS**

Son proteínas multiméricas forman parte de la MEC, están integradas por módulos estructurales repetidos donde se incluyen: repetidos de fibronectina tipo III, de un fragmento similar al factor de crecimiento epidérmico y de un dominio globular compartido con fibrinógeno.

Se han descrito 3 miembros: tenacinas C, R y X. La tenacina C, es una proteína extracelular hexamérica, las diferentes subunidades se generan por un procesamiento alternativo de un transcrito primario común y están unidas por puentes disulfuro, se sobre expresan en tumores, se encuentran en tejidos en

desarrollo, incluyendo el sistema nervioso central. Se ha sugerido que es una proteína que modula la adhesión celular en algunos tejidos a través de su unión a diferentes integrinas.

La tenacina R tiene los mismos dominios que la tenacina C pero nunca forma hexámeros, es específica del sistema nervioso central y periférico, se expresa principalmente por oligodendrocitos durante la mielinización y la tenacina X está presente en músculo esquelético, el miocardio y testículos, su función es desconocida.

## ***1.7 MOLECULAS DE ADHESION- INTEGRINAS***

---

Las moléculas de adhesión celular al sustrato son consideradas reguladores esenciales de la migración celular, la diferenciación y la integridad del tejido y remodelación. Estas moléculas desempeñan un papel importante no solo en la inflamación y aterogénesis, sino que también participan en el proceso de invasión y metástasis (Bischof y Cols., 2000).

Las integrinas son receptores de superficie celular, glicoproteínas heterodiméricas de membrana, que participan en mediar la adhesión de las células a la matriz, compuestas por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , pueden unirse a varios componentes de la MEC y moléculas de adhesión celular, lo que influye en la adhesión, migración, invasión, la reorganización del citoesqueleto y la señalización celular (Burghardt y Cols., 2002). Las integrinas endometriales son hormono-dependiente y varían a lo largo del ciclo menstrual (Lessey, 1995) su variación en el endometrio puede jugar un papel importante para la implantación exitosa. Por su expresión en correlación con el tiempo de implantación, las integrinas  $\alpha V\beta 3$  y  $\alpha 4\beta 1$  se han considerado marcadores de la receptividad del útero (Lessey y Cols., 1994, Nardo y Cols., 2003).

$\alpha V\beta 3$  es altamente expresada en el momento de fijación del embrión y la expresión aberrante de  $\alpha V\beta 3$  se ha asociado con la infertilidad (Lessey y Cols., 1995 y 1996). Las mujeres con abortos involuntarios recurrentes presentan una menor concentración de las integrinas  $\alpha 4\beta 1$  y  $\alpha 5\beta 1$  en el estroma durante la ventana de implantación, que las mujeres con infertilidad sin causa aparente (Skrzypczak y Cols., 2001). El trofotodermo también expresa varias integrinas  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 4$  y  $\beta 5$ , lo que favorece que el blastocisto se adhiera a la superficie endotelial (Kabir y Cols., 2004). En el trofoblasto se modula la presencia del tipo de integrinas durante la invasión del estroma y durante la diferenciación, variando en las células no invasivas e invasivas (Bischof Y Cols., 2000). La participación de las integrinas es clave en la implantación, en ratones

hembra carentes del gen de la integrina  $\beta 1$ , los embriones se desarrollan normalmente a la fase de blastocisto, pero no tienen la capacidad para implantarse adecuadamente y mueren (Stephens y Cols., 1995).

## **2. ANTECEDENTES**

---

Los activadores del plasminógeno (PAs) han sido implicados en el inicio de las cascadas proteolíticas que median procesos invasivos. PAs son serina proteasas que convierten plasminógeno a plasmina, una proteasa de amplia especificidad, que controla el recambio de la MEC, directamente al degradar algunos de sus componentes o indirectamente al activar algunos miembros de la familia de MMPs (Lijnen, 2002, Castellino y Ploplis, 2005, Rijken y Lijnen, 2009). Éstas últimas, constituyen una familia de endopeptidasas que contienen zinc y que en conjunto pueden degradar a prácticamente todos los componentes de la MEC, entre ellas la MMP9, gelatinasa B, o colagenasa tipo IV de 92 kDa, ha sido involucrada en procesos invasivos por que es capaz de degradar colágena tipo IV, un componente de las membranas basales (Vu y Werb, 2000; Visse y Nagase, 2003).

La adhesión a la MEC y su degradación desempeñan una función importante en la implantación embrionaria. La interacción especializada entre los tejidos embrionarios y maternos es única en el desarrollo de mamíferos e incluye la invasión del útero por el trofoblasto como paso inicial de la placentación (Armant, 2005). Las células del trofoblasto deben adherirse a la MEC, secretar proteinasas que la degradan y penetrar a zonas más profundas del endometrio. Diversas enzimas proteolíticas han sido implicadas en la invasión del endometrio, incluyendo al sistema de activación del plasminógeno (Strickland y Cols., 1976, Sappino y Cols., 1989, Teesalu y Cols., 1996, Zhang y Cols., 1996), serina proteasas (Tang y Rancourt, 2005, Sharma y Cols., 2006, Oozono y Cols., 2008), MMPs (Peters y Cols., 1999, Whiteside y Cols., 2001, Chen y Cols., 2007) y catepsinas (Afonso y Cols., 1997, Afonso y Cols., 1999) específicas de la implantación.

La secreción de proteasas funcionales por el embrión de ratón aumenta notoriamente durante la implantación. Las principales proteasas que secreta son el PLAU (Strickland y Cols., 1976, Zhang y Cols., 1996) y como enzima principal que degrada colágena tipo IV a la MMP9 (Behrendtsen y Cols., 1992, Peters y Cols., 1999, Whiteside y Cols., 2001, Chen y Cols., 2007). PLAU y MMP9 son expresados en las células del trofoblasto primario *in vitro* e *in vivo* (Sappino y Cols., 1989, Harvey y Cols., 1995, Reponen y Cols., 1995, Teesalu y Cols., 1996, Das y Cols., 1997, Peters y Cols., 1999, Whiteside y Cols., 2001) y se ha considerado como un marcador de la diferenciación del trofoblasto (Strickland y Cols., 1976). Se ha propuesto que la MMP9 es la enzima que limita la velocidad de degradación de la MEC materna por el trofoblasto (Behrendtsen y Cols., 1992), debido a que la degradación de la MEC por trofoblastos extendidos en cultivo es inhibida por TIMP-1, anticuerpos bloqueadores de la función de la MMP9 y por el tratamiento de los blastocistos con oligonucleótidos antisentido para *Mmp9* (Whiteside y Cols. 2001).

Aunque los ratones “knockout” para *Plau* o *Mmp9* son fértiles, diversas evidencias indican que estas enzimas son importantes para la mayor eficiencia de la implantación embrionaria, así el bajo porcentaje de implantación se asocia con actividad reducida de PA (Aflalo y Cols. 2004, Aflalo y Cols. 2007). Se presenta falla en la implantación asociada a expresión reducida de PA en embriones de ratones mutantes homocigóticos *tw73* (Axelrod 1985) o con niveles reducidos MMP9 en embriones que carecen de uno de los factores de transcripción que la regula Ets-2 (Yamamoto y Cols., 1998). Aún más, inhibidores generales de serina proteasas bloquean la invasión del trofoblasto (Sun y Cols., 2007).

La invasión del trofoblasto *in vivo* se confina al medio ambiente pericelular inmediato y puede ser alcanzado por la secreción local en áreas discretas de contacto con la MEC (van Hinsbergh y Cols., 2006) o por proteasas unidas a la superficie celular. PLAU se une con gran afinidad con su receptor de superficie

PLAUR, una proteína anclada a la membrana por una molécula de glicosilfosfatidilinositol (Rijken y Lijnen, 2009) o con baja afinidad a la integrina  $\alpha_v\beta_3$  (Tarui y Cols., 2006). La MMP9 también se une secundariamente a la membrana (Toth y Cols., 1999, Yu y Stamenkovic, 1999, Yu y Stamenkovic, 2000, Fridman, 2003, Stefanidakis y Cols., 2003, Karadag y Cols., 2005). La unión de PLAUR con su receptor amplifica y dirige su actividad proteolítica; debido a que, promueve la activación eficiente del plasminógeno (Stahl y Mueller, 1995, Castellino y Ploplis, 2005, Rijken y Lijnen, 2009). Por su parte la MMP9 asociada a la membrana promueve la migración celular, movilización y activación de factores del crecimiento, angiogénesis, e invasión tumoral (Yu y Stamenkovic, 1999, Yu y Stamenkovic, 2000).

La expresión de PLAUR y MMP9 al parecer son reguladas por la interacción del trofoblasto con la MEC. El cultivo sobre fibronectina o laminina induce la secreción de PLAUR por los blastocistos de ratón en cultivo, lo que parcialmente es el resultado del aumento del estado estable del mRNA para *Plau* (Zhang y Cols., 1996). La proteólisis estimulada por fibronectina es inhibida por hexapéptidos con la secuencia de reconocimiento a integrinas, Arg-Gli-Asp. Por su parte la secreción de gelatinasas es inducida en embriones humanos tempranos por laminina y fibronectina (Turpeenniemi-Hujanen y Cols., 1995) y en blastocistos de ratón en cultivo la fibronectina induce la expresión de MMP2 y MMP9 (Tie y Cols., 2000).

### ***3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA***

---

Como parte de los eventos que conducen a la penetración del endometrio, los embriones peri-implantacionales del ratón producen y secretan PLAU y MMP9, ambos se expresan tempranamente durante la diferenciación del trofotodermo/trofoblasto, primer tejido que se diferencia en el desarrollo de mamíferos y que se adhiere al epitelio uterino y participa en la penetración de endometrio y establecimiento de la placenta, además de ser un tejido con propiedades invasivas similares a las de las células tumorales. Ambas enzimas participan en una cascada proteolítica que conduce a la remodelación tisular durante la implantación embrionaria, así como en la regulación de la acción de diversos factores del crecimiento y procesos propios del proceso, cambios vasculares y angiogénesis, reacción decidua y desarrollo de la placenta.

Aunque hay varios estudios que investigan la secreción y función de PLAU y MMP9 durante el desarrollo peri-implantacional, el entendimiento de la función de ambas proteínas, los cambios temporales en su expresión, su distribución en la célula y los eventos que regulan su expresión durante la diferenciación del trofoblasto e implantación del blastocisto es incompleta. El propósito de este estudio fue analizar los cambios temporales en los niveles de los mRNA, la distribución tisular, concentración y secreción de PLAU y MMP9 durante el desarrollo de blastocistos de ratón en cultivo y su regulación por la interacción del trofoblasto con proteínas de la MEC, adicionalmente se evaluó la habilidad del sistema de estudio en activar plasminógeno y si este puede inducir la activación de la MMP9.

Como en los blastocistos del ratón en cultivo, se desarrolla predominantemente el trofoblasto primario, se emplea como un modelo para el estudio de la diferenciación de este tejido.

#### **4. HIPOTESIS**

---

El patrón de expresión temporal y cuantitativo de PLAU y MMP9 durante la diferenciación del trofoblasto, depende de la interacción con proteínas de la matriz extracelular y de la composición de ésta última.

#### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

---

Estudiar los cambios temporales en los niveles de los mRNA, la distribución tisular, concentración y secreción de PLAU y MMP9 durante el desarrollo de blastocistos de ratón en cultivo y su regulación por la interacción del trofoblasto con proteínas de la MEC, además evaluar la habilidad del sistema de estudio en activar plasminógeno y si este puede inducir la activación de la MMP9.

#### **5.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- a. Estudiar la expresión de PLAU y MMP9 como marcadores de diferenciación del trofoblasto, en blastocistos cultivados en ausencia de un sustrato adhesivo o sobre cubiertas de proteínas de MEC (fibronectina, laminina, o colágena IV).
- b. Establecer la inmunolocalización de MMP9 y PLAU durante la implantación *in vitro* de blastocistos a distintos tiempos de cultivo.
- c. Analizar si la adición de plasminógeno exógeno a los blastocistos en cultivo induce la activación de la pro-MMP-9, debido a su conversión a plasmina.

## **6. MATERIAL Y METODOS**

---

### **6.1 SUPEROVULACIÓN Y APAREO DE RATONES**

Se utilizaron ratones hembras de la cepa CF1, de 5 a 8 semanas de edad, las que se indujeron a superovular por medio de la inyección intraperitoneal (i.p.) de 5 UI de gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG), seguida 45 h después por la administración i.p. de 5 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG). Posteriormente fueron apareados con machos B6SJL/J (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA), al día siguiente la presencia de tapón vaginal indicó el primer día de preñez.

### **6.2 OBTENCION Y CULTIVO DE EMBRIONES**

La colección de blastocistos se llevó a cabo al 4º día de preñez entre las 12 y 14 h. Los cuernos uterinos fueron removidos y lavados con medio M2 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO), se recobraron los embriones bajo un microscopio estereoscópico de disección (Leica, Wetzlar, Germany). Los que fueron cultivados bajo aceite mineral en gotas de 5 µL de medio Ham F10 (Gibco BRL), conteniendo 1 mg/mL de albúmina de suero de bovino (BSA), 2.2 mM de lactato de calcio, 12.5 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 100 U/mL de penicilina y 0.1 mg/mL de estreptomicina. El cultivo se realizó en grupos de 4 embriones en cajas Petri de poliestireno de 35 mm (catálogo 1008, Falcon, Lincoln Park, NJ, USA). Se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada y con 5% de CO<sub>2</sub> en una incubadora de CO<sub>2</sub> (NAPCO).

Las placas de cultivo fueron cubiertas al incubarse durante toda la noche a 37° C, con 100 µg/mL de laminina de ratón, colágena tipo IV o fibronectina humana (Invitrogen), lavándose posteriormente con medio de cultivo por 5 veces.

Los embriones se transfirieron al 5<sup>o</sup> día de gestación sobre las diferentes cubiertas.

Se obtuvieron los medios en que fueron cultivados los embriones (medio condicionado) cada 24 h durante el período peri-implantación (día 4 al 9), remplazando el medio obtenido con medio recién suplementado. Estos medios se mezclaron con amortiguador de muestra 4X sin  $\beta$ -mercaptoetanol. El último día de cultivo (día 9) los embriones adheridos y extendidos fueron físicamente removidos con un capilar adaptado en forma de bastón y pulido a la llama (Sellens y Sherman, 1980), se transfirieron a otra gota y se lavaron por 5 veces con medio de cultivo, posteriormente los embriones se lisaron con amortiguador de muestra 1X no reductor (Tris-HCl 0.125 mM, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.006%, pH 6.8). Las superficie de cultivo también se lavaron 5 veces con medio de cultivo y las proteínas adsorbidas fueron extraídas con amortiguador de muestra no reductor 1X. Todas las muestras se mantuvieron a -70<sup>o</sup> C hasta su corrimiento zimográfico.

Para el análisis por inmunofluorescencia del trofoblasto extendido, blastocistos cultivados el día 4 fueron transferidos y cultivados en porta cámaras de 8 pozos, cuya superficie fue precubierta con fibronectina (Lab-Tek, NUNC, Naperville, IL) desde el día 5 y cultivados hasta el día 8 de preñez.

### ***6.3 EXPANSION, ADHESION Y EXTENSION***

Los embriones fueron revisados diariamente entre el medio día y 14 h con un microscopio de disección para establecer la proporción de blastocistos que se han expandido, que se liberaban de la zona pelucida, que se han adheridos y extendido al substrato. La adhesión se determinó, cuando las cajas de cultivo se rotaron y golpearon ligeramente y los embriones se mantenían adheridos, la extensión fue identificada por la prolongación de células trofoblástica sobre la base del embrión (Armant, 2006) en las superficies de cultivo.

## 6.4 RT-PCR

El total de RNA fue aislado de embriones de ratón y blastocistos extendidos, mediante el uso del Kit RNAeasy (QIAGEN, Valencia, CA). Este se retrotranscribió a cDNA y fue amplificado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando el Kit One Step RT-PCR (QIAGEN). Se utilizó como control interno la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (*Gapdh*), para establecer la integridad del RNA. Los iniciadores utilizados para *MMP9* fueron, el de sentido 5' TTGAGTCCGGCAGACAATCC 3'; antisentido 5' CCTTATCCACGCGAATGACG 3'; para *Plau* se utilizaron como iniciadores, sentido 5'GTGCCGCACACTGCTTCATT3', antisentido 5'CGTGCTGGTACGTATCTTCA3'. (Harvey y Cols., 1995) y para *Gapdh* fueron, sentido 5' GTATGTCGTGGAGTCTACTG 3'; antisentido 5' TACTCCTTGGAGGCCATGTA 3' (Ogawa y Cols., 2000). Para la evaluación semi-cuantitativa de los productos de PCR, se analizaron estos durante la fase de amplificación, antes de la fase de meseta, estableciendo la relación del ciclo y curva de dilución del mRNA determinado empíricamente para *Mmp9* o *Plau*, con respecto a *Gapdh*. Se realizó la transcripción reversa de los RNA durante 30 min a 50 °C y se inactivo la transcriptasa reversa. Se procedió a activar HotStart Taq polimerasa por incubación a 95 °C durante 15 min posteriormente se realizó la amplificación a 35 ciclos utilizando (desnaturalización a 94 °C por 45 seg, alineamiento de 62 °C a 45 seg, y la extensión por 1 min a 72 °C). Al término de los ciclos la temperatura se mantuvo a 72 °C por 10 min para permitir la síntesis de los productos amplificados. Estas condiciones fueron similares tanto para *Plau* como *Mmp9*. Estos productos de amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.2% y fueron teñidos con bromuro de etidio. Los geles fueron fotografiados y la relación entre la intensidad de cada banda se evaluó mediante el análisis densitométrico, utilizando el programa de análisis de imágenes, Image J (NIH, Bethesda, MD, USA).

## **6.5 INMUNOLocalización de PLAU y MMP9**

Los embriones fueron fijados por 30 min con paraformaldehído al 3% en salina amortiguada con fosfatos pH 7.4 (PBS), posteriormente se incubaron en glicina 0.15 M, pH 7.2 por 10 min. Algunos embriones fueron permeabilizados con Triton X 100 al 0.1% durante 10 min a temperatura ambiente. Los embriones se lavaron por 5 veces en PBS conteniendo 10 mg/mL de BSA (PBS-BSA), cada uno por 5 min, posteriormente los embriones se incubaron toda la noche a 4 °C en PBS-BSA con el anticuerpo de cabra contra el dominio carboxilo terminal de MMP9 humana (Santa Cruz, Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA), para PLAU se utilizó el anticuerpo policlonal purificado de cabra contra el dominio carboxilo terminal humano (Santa Cruz). Como control negativo se utilizó IgG de cabra (Laboratorios de Inmuno Research de Jackson, West Grove Pensilvania). Los anticuerpos primarios se detectaron utilizando el segundo anticuerpo de conejo anti-cabra IgG (Jackson) conjugados con fluoresceína o rojo Texas 10 µg/mL, los núcleos fueron teñidos con 4',6' diamino-2-fenilindole HCl (DAPI: Calbiochem, La Jolla, CA) 10 µg/mL, se incubaron a 37 °C por 1 h. Se enjuagaron los embriones y se procedió a montarlos con un medio semipermanente (Chemicon, Tamecula, CA). Los antígenos detectados con fluoresceína o rojo Texas y los nucleos teñidos con DAPI fueron observados a través de un microscopio confocal Zeiss 310 (Thornwood, Nueva York ), con longitudes de onda de excitación de 488, 543 y 364 nm respectivamente.

## **6.6 ZIMOGRAFIA EN GELES COPOLIMERIZADOS CON GELATINA**

La presencia de gelatinasas (MMP9 y MMP2) se determinaron por zimografía en gel. Medio de cultivo, lisados celulares y extracto de superficies de las placas de cultivo fueron analizadas por electroforesis bajo condiciones no reductoras en geles de poliacrilamida PAGE-SDS al 10% copolimerizados con gelatina de piel de porcino (G2625; Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo) 1 mg/mL. Alícuotas correspondientes a 8 embriones para los días 5 al 7 de gestación y 2.5 para los días 8 y 9 fueron procesadas para la electroforesis, esta se realizó a 4 °C y 15 mA/gel durante 1.5 h. Después del corrimiento, los geles se lavaron dos veces con Tritón X-100 al 2.5% por 30 min cada uno para remover el SDS y se incubaron durante 48 h a 37 °C en amortiguador revelador (50 mM Tris-HCl a pH 7.5 conteniendo 10 mM de CaCl<sub>2</sub>, 150 mM de NaCl y 0.5% de Tritón x-100). Posteriormente se tiñeron con azul de Coomassie R-250, las proteínas que degradaron gelatina se identificaron como zonas blancas de lisis en un fondo azul. Se utilizó como referencia pro-MMP9 purificada de humano (Chemicon, Temecula, CA) y estándares pre-teñidos de pesos moleculares conocidos de 27 a 180 kDa (SDS-7B, Sigma). Las imágenes de las zimografías fueron capturadas con un Sistema de Video Eagle Eye II (Stratagene), las zonas con actividad enzimática se cuantificaron por densitometría utilizando el programa Image J de NIH 1,62. La actividad enzimática fue expresada en unidades arbitrarias (UA) definidas automáticamente por el software.

## **6.7 ZIMOGRAFIA EN CASEINA-PLASMINOGENO**

Para determinar la presencia de activadores de plasminógeno, se utilizó la zimografía que nos permitiera observar la actividad caseinolítica dependiente de plasminógeno. Muestras de los medios de cultivo, lisados celulares y proteínas absorbidas a las superficies de cultivo, correspondientes de 2.5 a 8 embriones se

sometieron a un corrimiento electroforético bajo condiciones no reductoras, en geles de poliacrilamida-SDS al 10% copolimerizados con  $\alpha$ -caseína bovina 1 mg/mL (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo) y 10  $\mu$ g/mL de plasminógeno de plasma humano (528175, Calbiochem, La Jolla, CA). Marcadores de pesos moleculares 27-180 (SDS-7B, Sigma), pre-teñidos fueron corridos como referencia para estimar los pesos moleculares de los activadores de plasminógeno presentes. Después del corrimiento electroforético, los geles fueron lavados 2 veces por 30 min en Tritón X 100 al 2%, para remover el SDS y fueron incubados 24 h a 37 °C en glicina 100 mM, EDTA 10 mM pH 8.3. Se tiñeron con azul de Coomassie R-250. Proteínas con actividad caseinolítica dependientes de plasminógeno fueron identificadas como zonas claras de lisis en un fondo azul. Las imágenes de las zimografías fueron capturadas con un Sistema de Video Eagle Eye II (Stratagene), las zonas con actividad enzimática se cuantificaron por densitometría utilizando el programa Image J de NIH 1,62. La actividad enzimática fue expresada en unidades arbitrarias (UA) definidas automáticamente por el software. La uroquinasa de orina humana (Calbiochem, La Jolla, CA) fue utilizada como referencia.

## **6.8 ACTIVACION DE MMP9**

Como control positivo de la activación de la MMP9 se utilizó acetato de p-aminofenil mercúrico (APMA) (Nagase, 1997). Se preparó en fresco una solución de APMA 10 mM en etanol al 20%, se agregó a las muestras de medio condicionado del día 9 de gestación en amortiguador de Tris-HCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> pH 7.5 para tener una concentración final de APMA 1mM. La mezcla se incubó durante 2 h a 37 °C.

## **6.9 ACTIVIDAD DE PLASMINA**

La actividad de la plasmina se evaluó usando un sustrato cromogénico, D-Val- Leu-Lis-4-acetato de nitroanilina (Sigma), el cual fragmenta la plasmina en residuos peptídicos y 4-nitroanilina (Ellis y Cols., 1987). El ensayo se efectuó a 37 °C en 0.2 mL de una mezcla de reacción que contiene 50 mM de Tris pH 7.4, 110 mM de NaCl y 0.3 mM de el sustrato cromogénico. La absorbencia de 4-nitroanilina fue monitoreada por espectrofotometría a 405 nm. Para confirmar la especificidad se empleo un inhibidor de plasmina (aprotinina, 2 µg/mL).

## **6.10 ANALISIS ESTADISTICO**

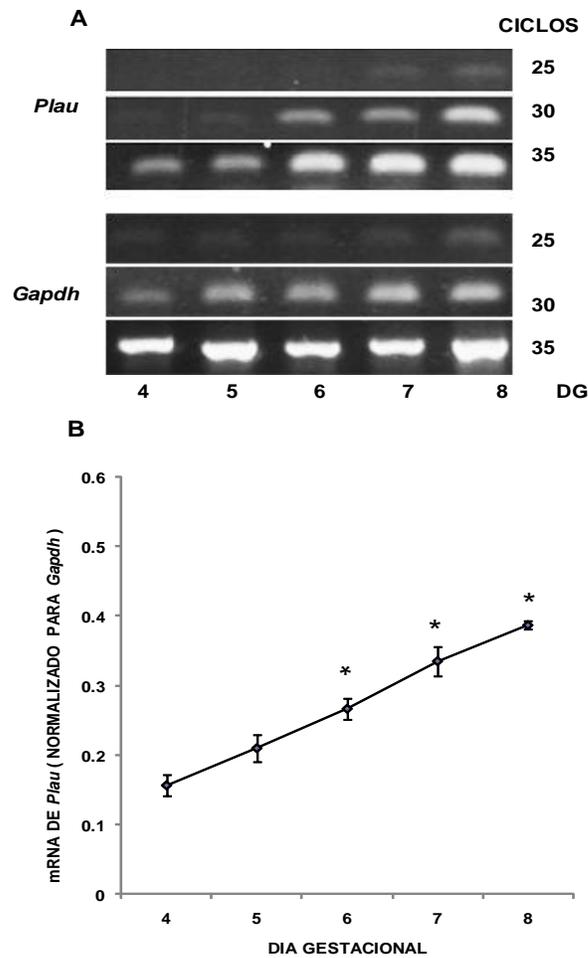
Cada experimento fue repetido por lo menos tres veces, los datos se representaron con la media y el error estándar. Se realizó una ANOVA para comparar los diferentes grupos experimentales y determinar si presentaban diferencias significativas, seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Los porcentajes se normalizaron en arco seno antes del análisis estadístico.

## 7. RESULTADOS

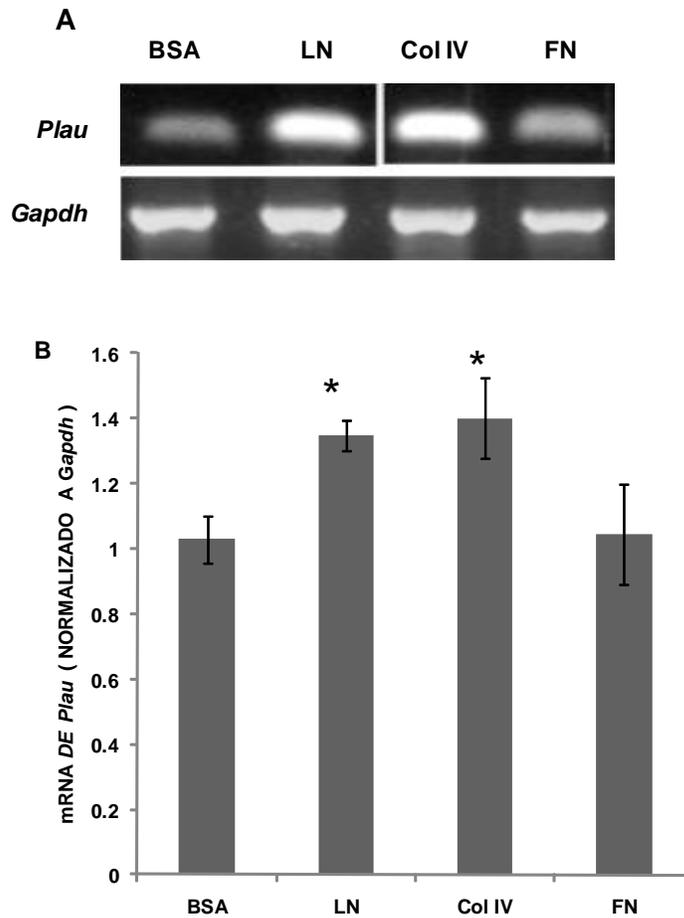
---

### 7.1 EXPRESION GENETICA DE *Mmp9* Y *Plau*

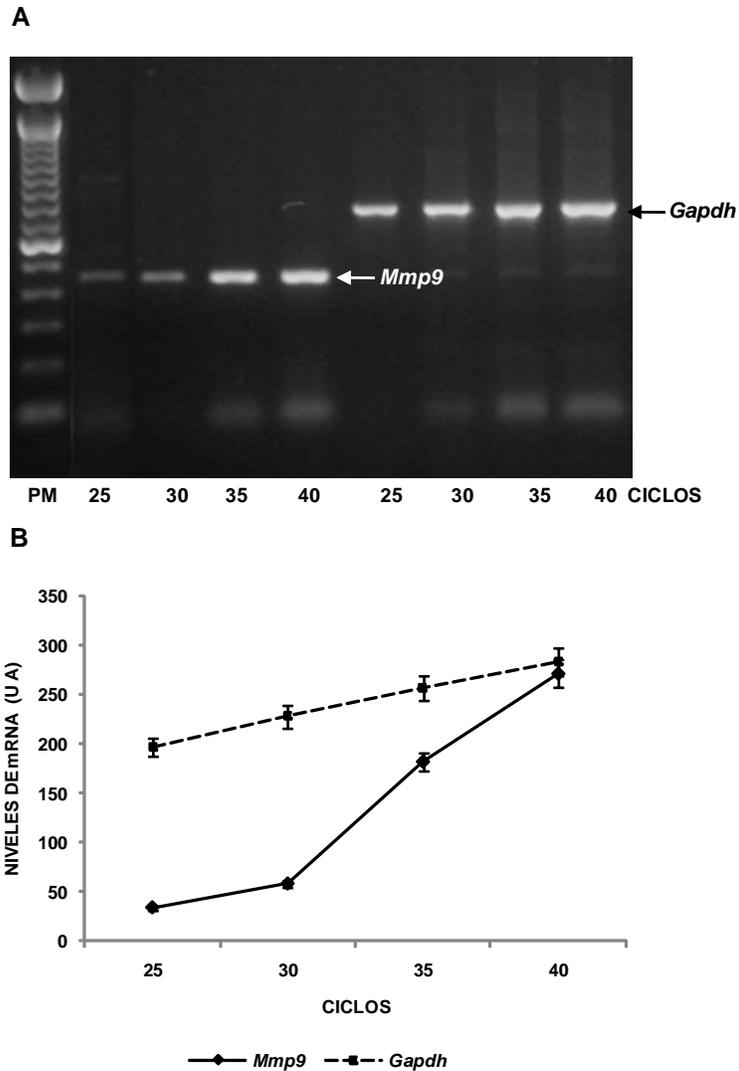
Al estudiar la expresión de los mRNA para *Mmp9* y *Plau* por RT-PCR, fueron generadas bandas únicas de amplificación del tamaño esperado para *Mmp9* (443 pb), *Plau* (194 pb) y *Gapdh* (729 pb), se obtuvo un incremento lineal de la intensidad de la banda de los mRNA para *Mmp9* hasta 40 ciclos y para el de *Plau* entre 25 y 35 ciclos (figuras 3 y 5). Los niveles del mRNA para *Mmp9* y *Plau* fueron estimados mediante el análisis densitométrico de las bandas de sus amplicones y sus valores se normalizaron con respecto a los obtenidos para *Gapdh*. La expresión de *Plau* y *Mmp9* al día 4 de gestación es baja y aumentan linealmente durante el período peri-implantacional (días 4 al 8) en blastocistos no adheridos, cultivados en cubiertas de BSA (figuras 3 y 6). Cuando los embriones se cultivaron en superficies recubiertas con proteínas de matriz extracelular, durante los días 5 a 8 de gestación, en donde el trofoblasto se adhiere y se extiende, la expresión de *Mmp9* aumentó significativamente cuando se cultivaron sobre colágena tipo IV ( $P < 0.05$ ), pero no hubo diferencias cuando se cultivaron sobre fibronectina o laminina (figura 6), para *Plau* se presentó un incremento significativo en colágena tipo IV y laminina, ( $P < 0.05$ ) pero no en fibronectina al compararse con embriones cultivados en BSA (figura 4).



**Figura 3. Expresión temporal del mRNA de *Plau* durante la diferenciación del blastocisto.** Blastocistos de ratón se cultivaron del día 4 al 8 de gestación en un medio no adhesivo (BSA) y se evaluó el mRNA de *Plau*. **A.** Se observa los productos del RT-PCR para *Plau* y *Gapdh*, correspondientes al RNA total de 1.5 embriones. **B.** Análisis densitométrico de las bandas a 30 ciclos de amplificación de *Plau*, normalizadas con *Gapdh*, se presenta la media y el error estándar de la media de 3 experimentos independientes con diferencias significativas en relación al 4 día de gestación (\*),  $p < 0.05$ .

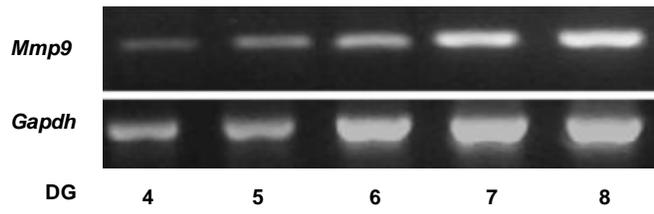


**Figura 4. Efecto de proteínas de la MEC durante la expresión de *Plau* durante la adhesión y extensión del trofoblasto.** Blastocistos fueron cultivados sobre BSA, fibronectina (FN), laminina (LN) o colágena IV (Col IV) durante los días 5 a 8 de gestación. Al día 8 el total de RNA fue extraído para determinar el mRNA de *Plau* y *Gapdh*. **A.** Se presenta los productos después de 30 ciclos de amplificación para *Plau* y *Gapdh*. **B.** Análisis densitométrico de las bandas amplificadas, normalizadas con *Gapdh*. Se presentan la media y el error estándar de la media de 3 experimentos independientes presentando diferencias significativas en relación al cultivo en BSA (\*),  $p < 0.05$ .

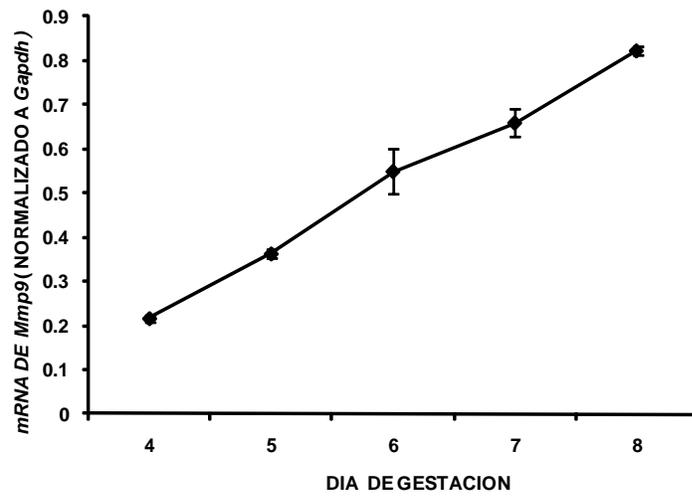


**Figura 5. Amplificación lineal del mRNA de *Mmp9* de blastocistos de ratón.** Amplificación a 25, 30, 35 y 40 ciclos del RNA correspondientes a 1.5 embriones para determinar la expresión del mRNA de *Mmp9* o *Gapdh*. **A.** Bandas de amplificación en geles de agarosa al 1.2% producidas por RT-PCR, y marcador de peso molecular de 100 pb como referencia (PM). **B.** Medición de la densidad de cada banda, se presenta la media y el error estándar de la media de 3 experimentos independientes.

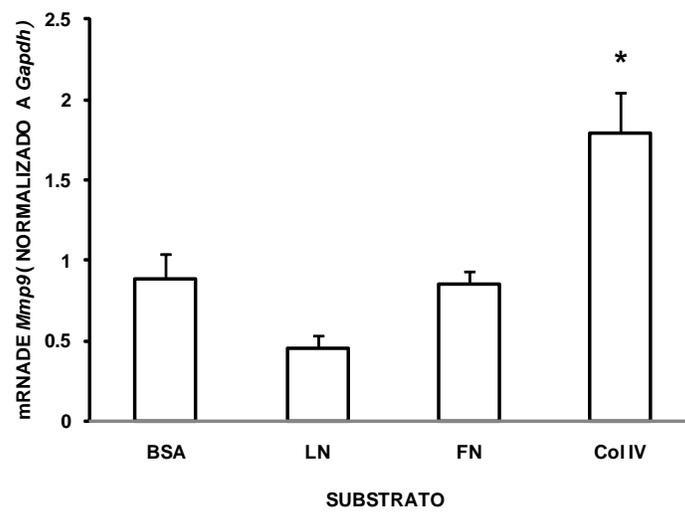
**A**



**B**



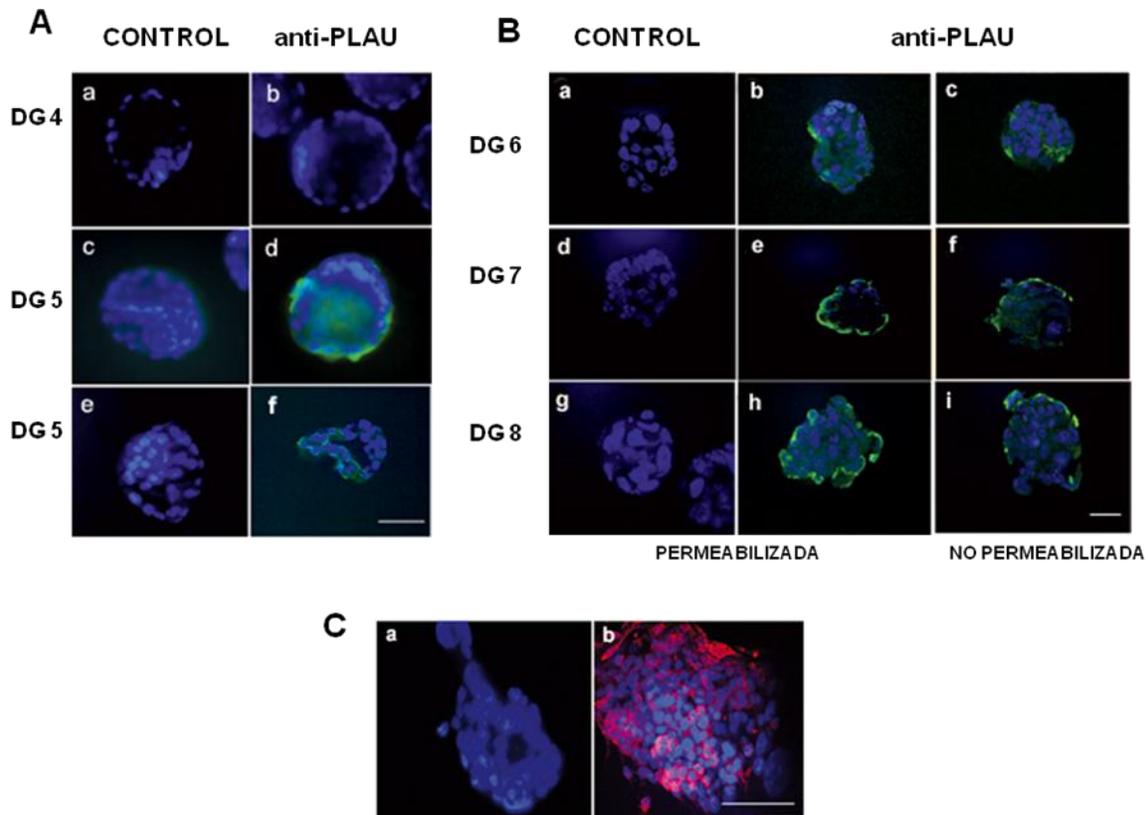
**C**



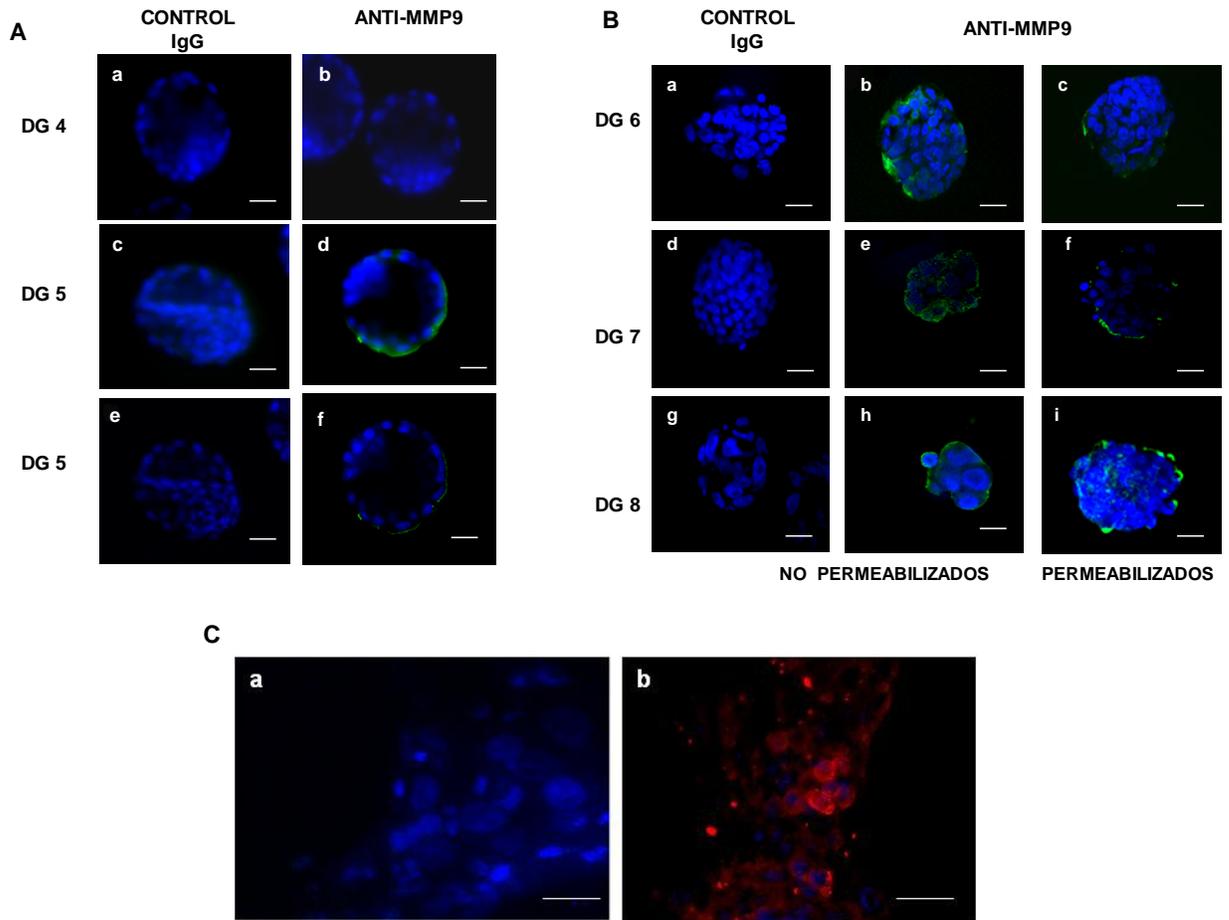
**Figura 6. Expresión temporal del mRNA de *Mmp9* durante el desarrollo de blastocistos de ratón.** Análisis por RT-PCR y densitometría a partir del RNA total de blastocistos cultivados del día 4 al día 8 de gestación (DG). Se presentan datos de 35 ciclos de amplificación. **A.** Expresión de bandas amplificadas en los diferentes DG. **B.** Cuantificación por densitometría de las bandas del mRNA de la *Mmp9* normalizada con *Gapdh*. **C.** Se presentan los niveles de mRNA de *Mmp9* estimados de embriones cultivados sobre BSA, fibronectina (FN), laminina (LN) y colágena IV (Col IV) del día 5 al 8 de gestación. Se presenta la media y error estándar de la media de 3 experimentos independientes, observando que solo en colágena IV se presentan diferencias significativas (\*)  $p < 0.05$ , con respecto a BSA.

## ***7.2 INMUNOLocalIZACION DE MMP9 Y PLAU EN EL TROFOBLASTO***

En blastocistos del día 5 de gestación la MMP9 y PLAU fueron localizados en la superficie del trofodermo mural, por inmunofluorecencia y microscopia confocal, la presencia de la MMP9 y del activador de plasminógeno no se detectó al día 4 de gestación, etapa en que se obtuvieron los blastocisto, en los días 6 al 9 de gestación en los embriones cultivados en BSA su localización se mantiene en la superficie de las células gigantes del trofoblasto. En embriones cultivados sobre una cubierta de fibronectina, donde los blastocistos se adhieren y extienden, ambas proteínas se localizan en la superficie de células grandes redondas que forman racimos, pero no en las extensiones de las células gigantes del trofoblasto (figuras 7 y 8). Con la tinción de embriones no permeabilizados con Triton X100 se confirmó la localización de la MMP9 en la superficie del trofoblasto en las condiciones de cultivo estudiadas Por otra parte se observó un incremento en la intensidad de las proteínas en un medio adherente (cubierta de fibronectina, con respecto al no adherente (cubierta de BSA).



**Figura 7. Localización de PLAU por inmunofluorescencia durante el desarrollo del blastocisto.** **A.** Blastocistos del día 4 (a, b) y día 5 de gestación (c, f) Grupo control con IgG de cabra (a, c, e), anti-PLAU de cabra (b, d, f) contrateñidos con DAPI. Imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia (a, b, c, d) y microscopía confocal (e, f). **B.** Los blastocistos fueron cultivados en medio no adhesivo (BSA) hasta los días 6 (a, c). 7 (d-f) y 8 (g-i) de gestación. Grupo control con anticuerpo IgG de cabra (a, d, g), anti PLAU de cabra (b, c, e, f, h, i). Imágenes con microscopía confocal, se presentan embriones permeabilizados (a, b, d, e, g, h) o no permeabilizados (c, f, i) indicando la presencia de PLAU en la superficie del trofoblasto. **C.** Blastocistos cultivados sobre fibronectina (FN) del día 5 al 8 de gestación, control incubado con IgG de cabra (a) y (b) con anticuerpo anti-PLAU. Por lo menos se examinaron 10 embriones en cada experimento. DG, día de gestación. Barra igual a 50  $\mu$ m.



**Figure 8. Localización de MMP9 por inmunofluorescencia durante el desarrollo de blastocistos de ratón.** **A.** Los blastocistos de los día de gestación (DG) 4 (a, b) y 5 (c, d, e, f), se marcaron con IgG de cabra no immune (a, c, e) o anti-MMP9 de cabra (b, d, f), como se describe en la metodología. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul), empleando un segundo anticuerpo marcado con fluoresceína (verde), a las imágenes e y f se les aplicó deconvolución. **B.** Embriones de ratón permeabilizados y no permeabilizados obtenidos de cultivos de blastocistos, del día 6 al 8 de gestación, imágenes de microscopia confocal. Marcados con IgG de cabra (a, d, g) o anti-MMP9 (b, c, e, f, h, i). Núcleos teñidos con DAPI y segundo anticuerpo marcado con fluoresceína. **C.** Blastocistos cultivados del día 5 a 8 de gestación sobre fibronectina (extendidos), marcados con IgG no immune de cabra (a) o anti-MMP9 (b). Núcleos teñidos con DAPI y segundo anticuerpo marcado con rojo Texas. Se examinaron por lo menos 10 embriones de cada grupo con resultados similares Barra = 50  $\mu$ m.

### ***7.3 REGULACION DEL DESARROLLO DEL BLASTOCISTO POR LA MATRIZ EXTRACELULAR***

La ruptura y liberación de la zona pelúcida de los blastocistos ocurrió en la misma proporción y velocidad en presencia o ausencia de un sustrato adhesivo. Al día 4 de gestación solo  $9.39 \pm 4.6\%$  de los blastocistos habían iniciado su liberación de la ZP, al medio día del día 5 de gestación la mitad de los embriones ( $57.5 \pm 13.8\%$ ) se habían liberado, mientras que al día 6 el  $90.8 \pm 7\%$  se había liberado de la ZP. Los blastocistos cultivados en BSA presentaron una adhesión transitoria, mientras que los cultivados en cubiertas de proteína de la MEC, el 90% de los blastocistos se habían adherido al día 6 de gestación, después de liberarse de la zona pelúcida.

Las proteínas de matriz extracelular permitieron que el trofoblasto se extendiera sobre sus cubiertas, lo que no se observa en cubiertas con BSA. Las proporciones de extensión fueron similares sobre todas las proteínas de matriz extracelular (fibronectina, laminina o colágena tipo IV).

**Tabla 2. Blastocistos adheridos y extendidos sobre diferentes sustratos.** Embriones colectados al 4 día de preñez fueron cultivados en grupos de 4 en microgotas en cajas Petri en presencia de BSA y un día después fueron cultivados sobre cubiertas de BSA, colágena IV (Col IV), laminina (LN) o fibronectina (FN), como se indica en material y métodos. Se presenta el porcentaje de embriones adheridos y extendidos, mostrándose las medias y desviación estándar de 4 experimentos con 16 embriones cada uno, observando diferencias significativas (\*)  $p \leq 0.05$  al comparar con los cultivos sobre un sustrato adhesivo. DG, días de gestación.

CULTIVO	DG 6		DG 7		DG 8	
	ADH	EXT	ADH	EXT	ADH	EXT
BSA	10 ± 6.5*	0*	11.9 ± 6*	0*	3 ± 3*	0*
Col IV	79 ± 2.9	40 ± 5.8	95 ± 2.5	91 ± 5.8	95 ± 2.5	95 ± 2.5
LN	82.5 ± 6	22 ± 8.5	96.7 ± 2	87 ± 6	96.7 ± 3	96.7 ± 3
FN	90.8 ± 3.3	51 ± 9.8	97 ± 3	96.8 ± 3	96.8 ± 3	96.8 ± 3

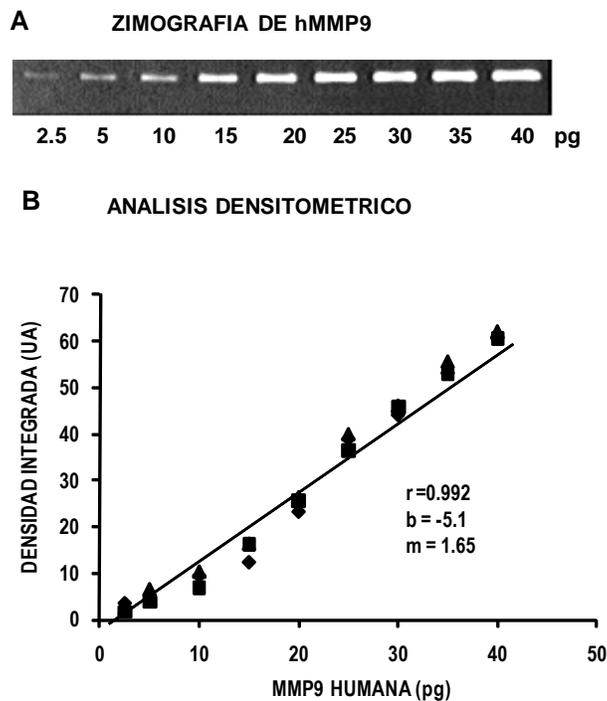
#### **7.4 ANALISIS ZIMOGRAFICO DE LAS GELATINASAS DURANTE LA DIFERENCIACION DEL BLASTOCISTO**

La zimografía en geles copolimerizados con gelatina es una prueba muy sensible para la detección y análisis semicuantitativo de las formas latentes y activas de la MMP2 y MMP9 (Le y Cols., 1999). La utilidad de la zimografía para evaluar la cantidad de proteasas se evaluó usando pro-MMP9 humana como estándar de referencia y medio condicionado del día 8 de gestación. Se observó una relación lineal entre la densidad de las bandas de MMP9 expresada en unidades arbitrarias (UA) y la concentración de pro-MMP9 en un rango de 5 a 40 pg (figura 9) o con la cantidad de medio condicionado, en el rango correspondiente entre 2.5 a 8 embriones del día 8 de gestación (datos no mostrados). En las zimografías de los embriones de peri-implantación y sus secreciones se presentaron 5 bandas con actividad gelatinolítica sensible al EDTA y de pesos moleculares (PM) estimados de 230, 165, 105, 97 y 87 kDa (figura 10).

Un PM de 105 kDa es consistente con la forma inactiva (zimógeno) de la MMP9 de ratón (Tanaka y Cols., 1993, Reponen y Cols., 1995). Las bandas de 97 y 87 kDa corresponden a los precursores no glicosilados o a formas parcialmente activas o activas de la enzima. La incubación con APMA convierte la pro-MMP9 de 105 kDa a la forma activa de 87 kDa (figura 14). La forma de 230 kDa puede representar la forma homodimérica de la MMP9 (Goldberg y Cols., 1992, Olson y Cols., 2000). Por otra parte la banda de 165 kDa no está bien caracterizada.

La zimografía del medio condicionado presentó principalmente la banda de 105 kDa, aunque la banda de 97 kDa solo aparece ocasionalmente en el día 6 de gestación. Las bandas de 105, 97 y 87 kDa fueron identificadas en lisados embrionarios. Los niveles de la forma dimérica y monomérica de MMP9 se presentan paralelamente en el medio condicionado y lisados embrionarios. La adsorción de MMP9 a las cubiertas de BSA y fibronectina fue muy tenue, pero en

las cubiertas de colágena tipo IV y laminina la forma dimérica de la MMP9 (230 kDa), se adsorbió fuertemente, también lo hizo pero en menor proporción la forma de 105 kDa. Se detectó una mayor cantidad de MMP9 en el medio condicionado que en los lisados embrionarios. El análisis semicuantitativo por zimografía de la MMP9 secretada durante el desarrollo del trofoblasto reveló una acumulación en los embriones cultivados en ausencia o en presencia de proteínas de la MEC. La enzima fue producida en el día 5 y 6 en pequeñas cantidades y su producción y secreción aumentó notablemente del día 7 al 9 de gestación (figura 10).

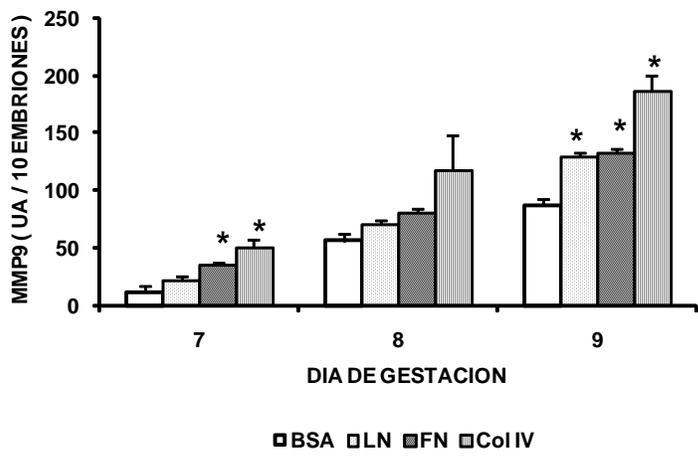
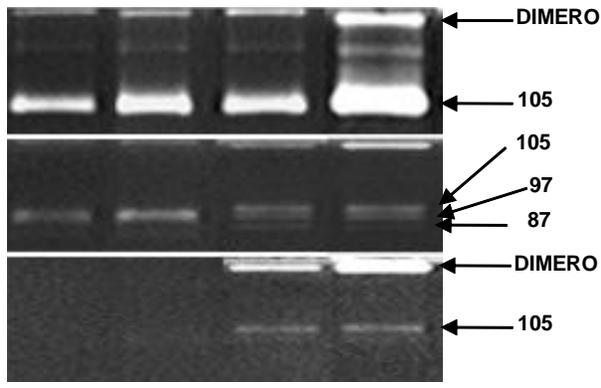
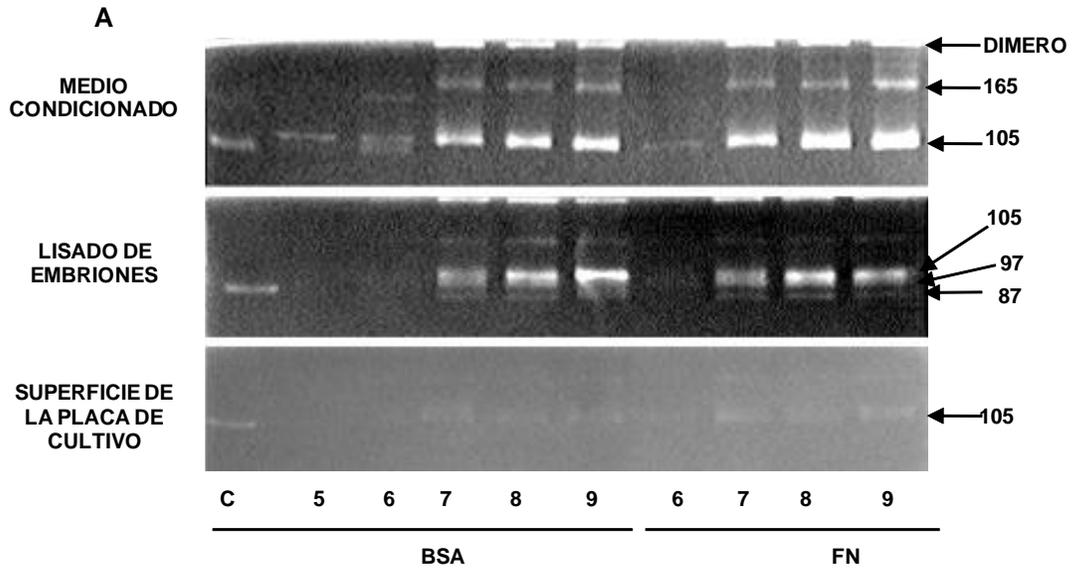


**Figura 9. Análisis semicuantitativo de la MMP9 por zimografía de gelatina.** Se analizaron diferentes cantidades de pro-MMP9 humana por zimografía en gelatina (A), seguida del análisis densitométrico de las bandas del gel (B). Se observa un incremento lineal en la densidad integrada expresada en unidades arbitrarias (UA) entre 2.5 y 40 pg de la enzima (N=3;  $r=0.992$ ). Se presenta la media y el error estándar de tres experimentos, en la gráfica se presentan los resultados de una regresión lineal.

## ***7.5 MODULACION DE LA EXPRESION DE LAS GELATINASAS POR LA MATRIZ EXTRACELULAR***

Para establecer si la secreción de las gelatinasas es modificada por la interacción del trofoblasto con proteínas de la MEC, los blastocistos fueron cultivados sobre fibronectina, laminina o colágena tipo IV. En estas condiciones de cultivo los embriones adheridos y extendidos, secretan mayor cantidad de MMP9 con respecto a condiciones no adherente (BSA), encontrándose la secreción de MMP9 mas abundante cuando los embriones se cultivaron sobre colágena tipo IV.

Por otra parte, ninguna de las proteínas empleadas indujo la forma monomérica activa de MMP9 (87 kDa), ni la gelatinasa A (MMP2) en el medio condicionado. Pero la forma dimérica inactiva pro-MMP9 estuvo presente en el medio condicionado en todas las condiciones estudiadas, pero siempre en niveles más bajos que la forma monomérica inactiva. En relación a las superficies de cultivo, después de remover los embriones, se demostró que la MMP9 extracelular se une a la colágena tipo IV y laminina, pero no a la fibronectina o BSA, uniéndose más la forma dímérica que la monomérica (figura 10 B).



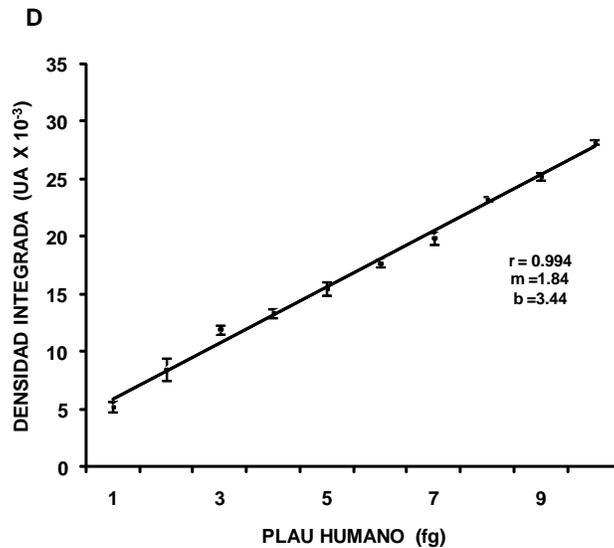
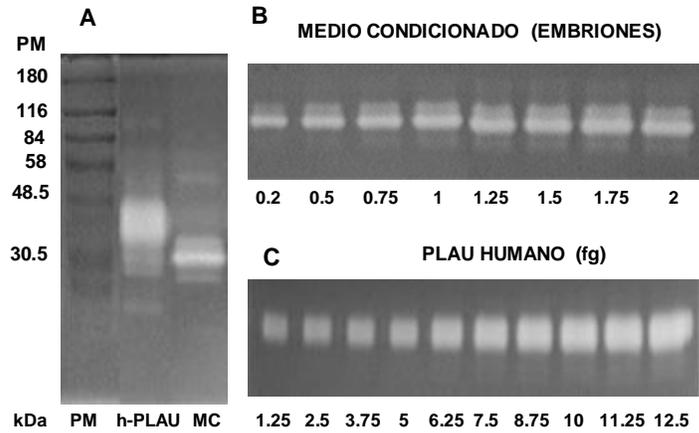
**Figura 10. Producción de MMP9 durante el desarrollo del blastocisto.** Medio condicionado, lisados embrionarios y proteínas adsorbidas a la superficie de la caja de cultivo, provenientes de embriones cultivados sobre BSA, fibronectina (FN), laminina (LN) o colágena tipo IV (Col IV) fueron analizados por zimografía en gel como se describe en material y métodos. **A.** Se analizó el medio condicionado proveniente de 100, 25, 8, 3 y 3 embriones a los días gestación (DG) 5, 6, 7, 8 y 9, respectivamente, cuando se cultivo sobre BSA o FN. Los lisados y proteínas adsorbidas a la superficie provenían de 12 embriones. Se tomó de referencia a pro-MMP9 humana (C). **B.** Embriones de ratón fueron cultivados del día 5 al 9 de gestación sobre precubiertas de BSA, FN, LN o Col IV, el medio condicionado fue cambiado diariamente, se tomaron muestras del día 9 de gestación, correspondientes a 3 embiones. Doce embriones se desprendieron para obtener los lisados y se extrajeron con amortiguador de muestra-SDS las proteínas absorbidas en la superficie de cultivo provenientes de 12 embriones, Todos los zimogramas presentados son el resultado de tres o más experimentos independientes. **C.** La secreción de MMP9 de blastocistos cultivados en las diferentes condiciones fue determinada después del cultivo del día 7 al 9 de gestación, en el medio condicionado. Se presentan las medias y el error estándar de las medias de 3 experimentos separados encontrándose diferencias con respecto al cultivo en BSA (\*),  $p < 0.05$

## **7.6 ANALISIS DE LOS ACTIVADORES DE PLASMINOGENO DURANTE LA DIFERENCIACION DEL TROFOBLASTO POR ZIMOGRAFIA**

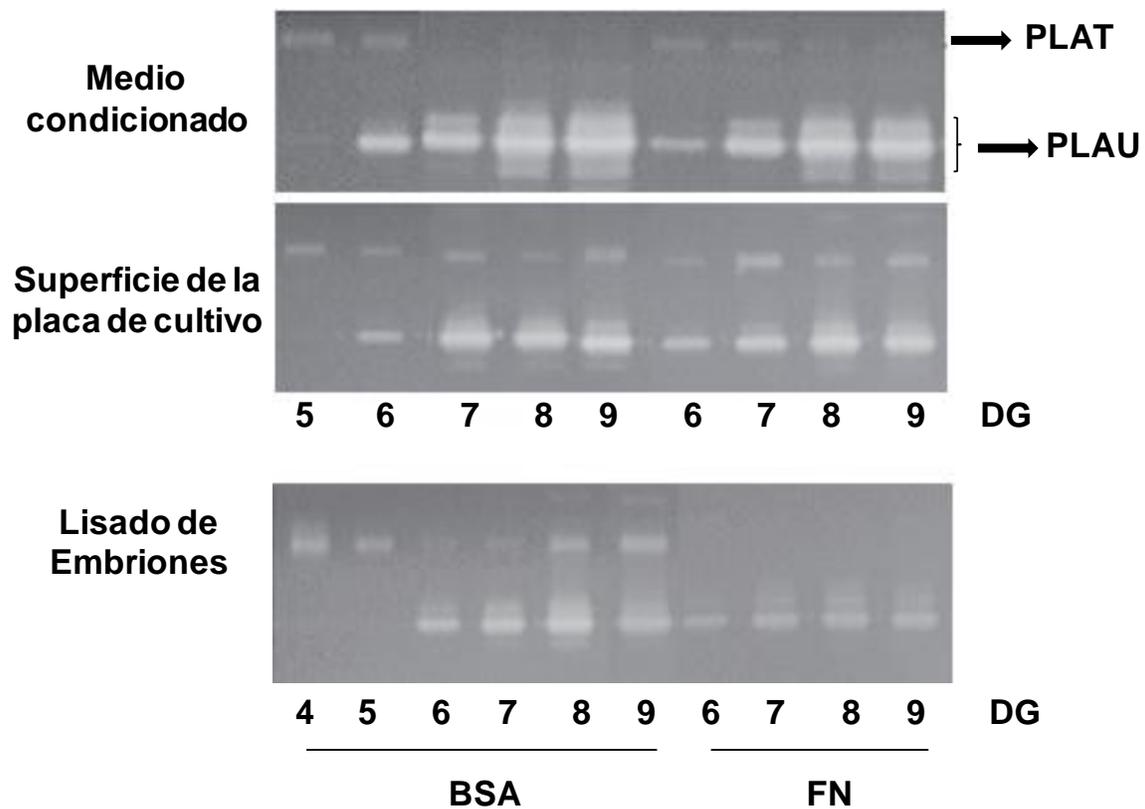
La validación del ensayo semicuantitativo de la actividad de la enzima se realizó por zimografía y densitometría de medio de cultivo de embriones del día 8 y 9 de gestación, y un estándar de PLAU de orina humana. Se observó una relación lineal entre la densidad integrada y la concentración de la enzima (1.25 a 12.5 fg) o la cantidad de medio condicionado analizado (proveniente de 0.5 a 2 embriones) (figura 11 B, C y D). En las muestras provenientes de los cultivos de embriones, se observaron 4 bandas con actividad caseinolítica dependientes de plasminogeno con pesos moleculares de 55, 40, 37 y 31 kDa, mientras que la uroquinasa de orina de humano presentó una banda de lisis a 45 kDa (figura 11 A). En el ratón, PLAU no esta glicosilada y por lo tanto tiene un peso molecular más bajo que la humana, que si lo está (Marshall y Cols., 1990). En el caso de los zimogramas control, donde no estaba presente el plasminógeno, no se presentaron áreas con actividad caseinolítica (datos no mostrados). La banda de 55 kDa corresponde al activador de plasminógeno tipo tisular (PLAT), mientras que las otras tres bandas de menor peso, corresponden a PLAU murino. Usando metodologías similares PLAU y PLAT fueron detectadas en blastocistos de ratón con pesos moleculares de 38 y 52 kDa respectivamente (Behrendtsen y Cols., 1992, Behrendtsen y Werb, 1997) o a 40 y 60 kDa por (Teesalu y Cols., 1996). Por lo tanto la banda de 40 kDa representa la forma de PLAU de dos cadenas y alto peso molecular, mientras que las bandas de 37 y 31 kDa son el resultado de su procesamiento proteolítico. La MMP3 (estromelisina 1) puede procesar a PLAU humana a la forma de 31 kDa, carente de la cadena no catalítica. En ratón se ha demostrado la presencia de MMP3 en blastocistos (Brenner y Cols., 1989) y que MMP3 u otra enzima cataliza el procesamiento de PLAU.

A través de la zimografía se observaron los patrones temporales en la

producción y secreción de PLAT y PLAU durante el desarrollo peri-implantacional de los embriones de ratón (figura 12). Los dos activadores de plasminógeno estuvieron presentes en el tejido embrionario, en el medio condicionado y fueron adsorbidos en las superficies de cultivo. En el día 4 y 5 de gestación el principal activador producido y secretado fue PLAT, mientras que PLAU se incrementa progresivamente del día 6 al 9 de gestación, siendo el principal activador en este período gestacional. Los niveles de PLAT en medio condicionado y lisados embrionarios disminuyen en el día 6 de gestación y presentaron un incremento en lisados celulares en el día 8 al 9 de desarrollo. Al comparar los zimogramas de embriones cultivados en BSA y fibronectina (figura 12), se observó que los patrones temporales en los niveles de ambas enzimas fueron similares, excepto en los niveles reducidos de PLAT en los blastocistos cultivados sobre fibronectina. El análisis densitométrico de PLAU de medio condicionado de embriones cultivados en ausencia o en presencia de proteínas de MEC reveló niveles comparables en la producción de PLAU durante el desarrollo de los blastocisto en cultivo. El grado de acumulación de PLAU en el día 9 de gestación en los lisados embrionarios y medio condicionado no fue afectado por la presencia de proteínas de la MEC, al ser evaluados por zimografía en caseína y densitometría (figura 13).



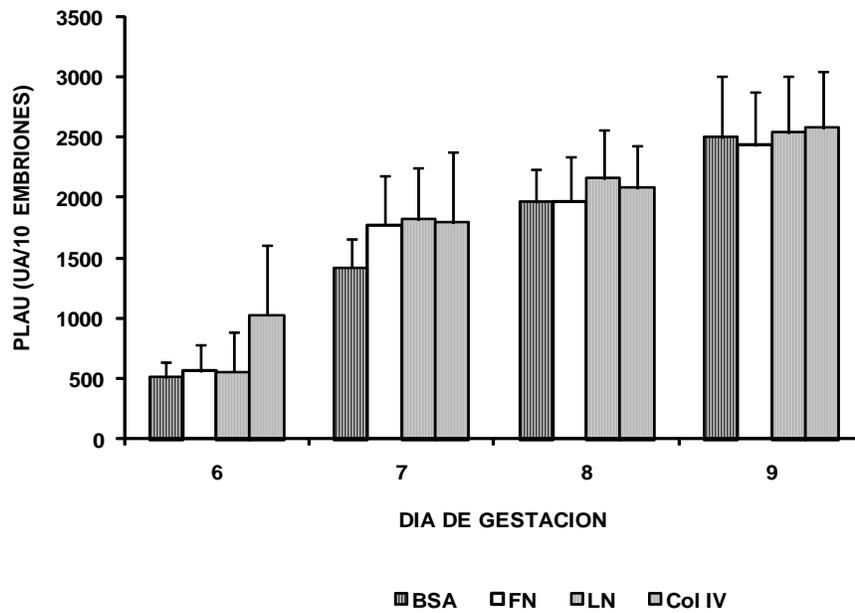
**Figura 11. Zimografía de plasminogeno-caseína de medio condicionado.** A. Uroquinasa humana (h-PLAU) y medio condicionado (MC) de embriones del día 9 de desarrollo se analizaron por zimografía, junto con estándares de peso molecular (PM). B-D Cantidades variables de medio condicionado (B) o PLAU humano (C) fueron analizados por el mismo procedimiento y analizados por densitometría (D). Se presentan la media y el error estándar de 3 experimentos independientes, en la gráfica se presenta los resultados de una regresión lineal.



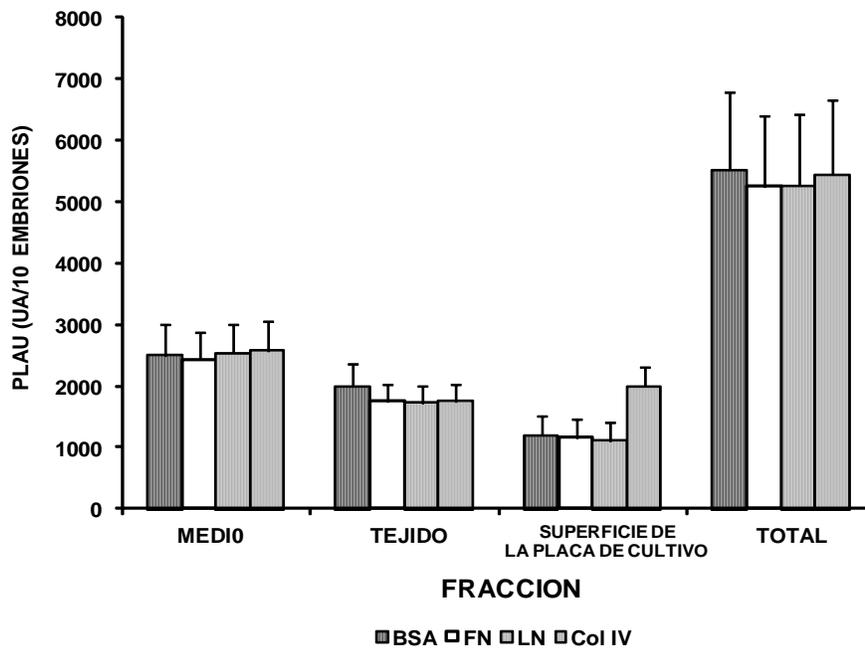
**Figura 12. Patrón temporal de los activadores de plasminógeno durante el desarrollo de blastocistos.** Zimografía de caseína-plasminógeno de proteínas de medio condicionado, adsorbidas a la superficie de cultivo y lisados embrionarios durante los días de gestación (DG) 4 al 9, utilizando embriones cultivados en BSA o fibronectina (FN). Para los ensayos se emplearon lo equivalente a 2 embriones para el medio condicionado y a 3 embriones para las proteínas adsorbidas a la superficie y los lisados embrionarios. Los zimogramas son representativos de al menos 3 experimentos independientes.



**A**



**B**

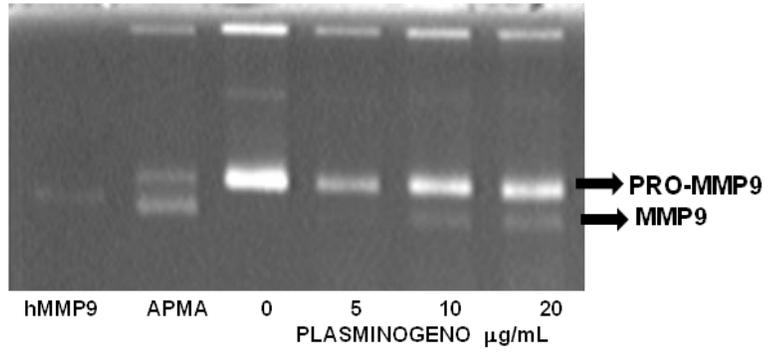
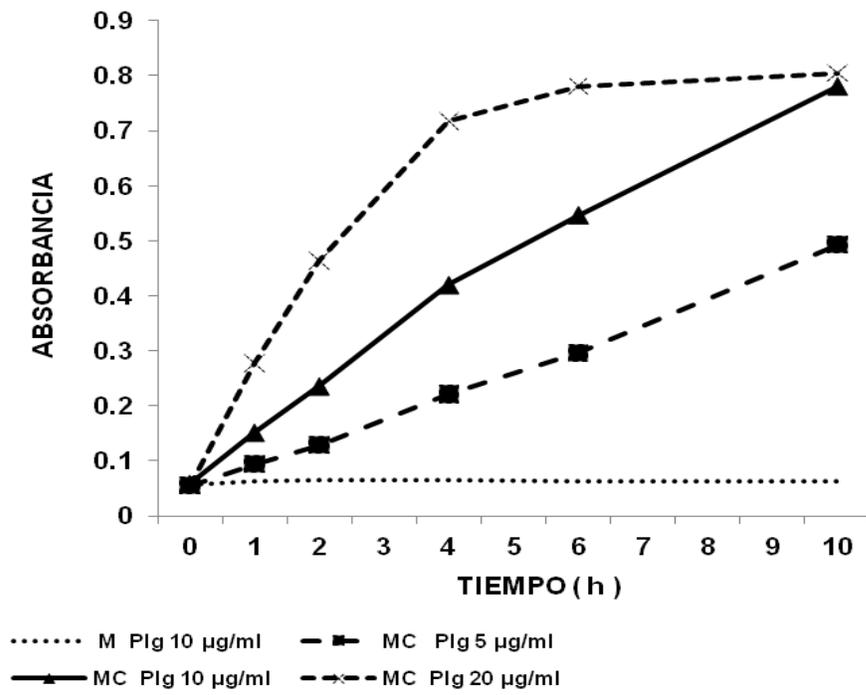


**Figura 13. Efecto de la MEC sobre la secreción de PLAU durante el desarrollo de blastocistos.** Blastocistos de ratón fueron cultivados en BSA, laminina (LN), fibronectina (FN) o colágena tipo IV (Col IV) como se indica en material y métodos, **A.** La secreción de PLAU fue analizada en el medio condicionado por zimografía y densitometría. **B.** Al día 9 de gestación, el medio condicionado en las últimas 24 h, lisados embrionarios (TEJIDO) y proteínas adsorbidas a la superficie de cultivo fueron recuperados y analizados para PLAU por zimografía en geles de caseína-plasminógeno y densitometría. Se presentan la media y el error estándar de tres experimentos independientes, no se encontraron diferencias significativas en los grupos estudiados.

## **7.7 ACTIVACION DE MMP9 DEPENDIENTE DE PLASMINOGENO**

Debido a que los blastocistos de ratón producen PLAU y pro-MMP9 en cultivo, consideramos que el PLAU embrionario puede convertir plasminógeno a plasmina, la cual puede activar proteolíticamente a MMP9. Por lo que cultivamos embriones por 48 h (día 7 al 9 de gestación), en ausencia y presencia de plasminógeno humano (5, 10 o 20  $\mu\text{g/mL}$ ). Después de este tiempo se obtuvieron los medios condicionados. Al realizar el corrimiento zimográfico en gelatina, se observó la activación de la MMP9 dependiente de la concentración de plasminógeno empleada; ya que en los cultivos sin plasminógeno solo se presentó una banda de MMP9 correspondiente a 105 kDa, mientras que en su presencia, se observó una banda adicional con actividad gelatinolítica de 88 kDa. Esta banda fue similar a la que se presenta cuando la pro-MMP9 del medio condicionado del día 9 de gestación se activó con APMA en ausencia de plasminógeno (figura 14 A). La producción dependiente de plasminógeno de la banda de 88 kDa fue inhibida con  $\alpha$  2-antiplasmina (datos no mostrados).

De manera simultanea, la actividad de plasmina en el medio condicionado aumenta proporcionalmente dependiendo de la concentración de plasminógeno, siendo necesaria la presencia de embriones en este proceso (figura 14 B) y es inhibida hasta en un 60% por amiloride, un inhibidor específico de PLAU (datos no mostrados).

**A****B**

**Figura 14. Activación de MMP9 mediada por plasminógeno.** Blastocistos de ratón fueron cultivados del día 7 al 9 de gestación en medio conteniendo plasminógeno (5, 10 o 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) o en su ausencia, analizándose el medio condicionado al día 9. **A.** Zimografía en gelatina del medio condicionado por los blastocistos, se tomó como referencia la pro-MMP9 humana (hMMP9) y medio condicionado sin plasminógeno tratado con APMA, lo que activa a la MMP9. La presencia de plasminógeno durante el cultivo activa también a MMP9 de manera dosis dependiente. **B.** Actividad de plasmina en el medio condicionado con plasminogeno, después de 2 días de cultivo, en presencia (MC) ó ausencia (M) de blastocistos.

## 8. DISCUSION

---

Examinamos los patrones de expresión temporal de MMP9 y PLAU, su regulación por proteínas de la MEC y el papel que tiene PLAU en la regulación de la actividad de MMP9, así como su distribución en blastocistos de ratón desarrollados *ex vivo* en condiciones libres de suero. La transcripción, traducción y secreción de MMP9 y PLAU aumentan progresivamente durante el desarrollo del trofoblasto. La expresión de sus mRNA se incrementó desde el día 4 hasta el día 8 de gestación, las respectivas proteínas se detectaron por primera vez al día 5 de desarrollo en la superficie del trofotodermo mural. La secreción de MMP9 al medio de cultivo fue detectada inicialmente al día 5 de gestación, y la secreción de PLAU al día 6, incrementando la secreción de ambas hasta el día 9. En general, los patrones temporales de expresión de MMP9 y PLAU fueron similares en embriones adheridos y extendidos en comparación con los no adheridos, siendo modulados cuantitativamente por la MEC. La expresión del mRNA de *Mmp9* se incrementó significativamente en cultivos sobre colágena tipo IV, y el mRNA de *Plau* aumentó. Por otra parte, a nivel de las proteínas evaluadas por zimografía en gel, no se encontraron diferencias para PLAU en condiciones adherentes y no adherentes, mientras que la acumulación de MMP9 aumentó en presencia de colágena IV, laminina y fibronectina al día 9 de gestación.

Patrones temporales similares en el contenido de PLAU durante el desarrollo de blastocistos de ratón en cultivo, han sido establecidos empleando un ensayo enzimático (Strickland y Cols., 1976, Sellens y Sherman, 1980, Zhang y Cols., 1996), pero la enzima solo fue evaluada en el medio condicionado o a través de zonas de lisis alrededor del embrión. Detectamos un día antes, al mRNA de *Plau* (día 4), que lo encontrado por Harvey y Cols. (1995), aunque se utilizaron los mismos iniciadores, esto fue debido probablemente a la forma de extracción del RNA.

El otro activador de plasminógeno PLAT, fue también detectado por zimografía en gel, éste presentó un patrón bifásico, encontrándose un mayor contenido del mismo a los días 4 y 5 y a los días 8 y 9. Su presencia en los primeros dos días, probablemente se debe a que es adsorbido a la superficie del embrión en su paso por el oviducto (Carroll y Cols., 1993). A los días 8 y 9 PLAT puede ser producido por células del endodermo parietal (Strickland y Cols., 1976) que primero aparecen y proliferan a partir del 5º día de gestación (Behrendtsen y Werb, 1997).

### ***8.1 LOCALIZACION DE MMP9 Y PLAU EN LAS CELULAS TROFOBLASTICAS***

La MMP9 y PLAU se observaron en la superficie de las células del trofodermo mural al día 5 de gestación, etapa en que el blastocisto es competente para la adhesión con el epitelio uterino y ocurre la aposición entre ellos *in vivo* (Armant, 2006). Las proteínas del epitelio uterino son posibles sustratos o ligandos para estas enzimas y pueden estar implicadas en la interacción entre estos tejidos al inicio de la implantación. Su localización en la superficie de las células trofoblásticas se confirmó con microscopia confocal en embriones no permeabilizados.

Posteriormente MMP9 y PLAU se concentraron en las membranas apicales de células gigantes redondas del trofoblasto, pero no se detectaron cuando el trofoblasto migra y se extiende sobre el sustrato adquiriendo una morfología aplanada. La cantidad de MMP9 presente en las membranas solo representa una fracción de la enzima que produce y secreta el embrión. La MMP9 extracelular es también importante en la invasión del tejido materno y activación de factores de crecimiento (Ramos-DeSimone y Cols., 1999, Mira y Cols., 2004). La falta de MMP9 y PLAU en las células migratorias del trofoblasto, sugiere que estas enzimas son secretada por ellas. Estudios ultraestructurales han sugerido que

colágena tipo IV y laminina desaparecen de la membrana basal antes que el trofoblasto alcance la superficie basal del epitelio luminal, por lo que la degradación de la membrana basal está a cargo de células deciduales en lugar de células trofoblásticas (Blankenship y Given, 1995). Sin embargo, una membrana basal rica en laminina tipo 2 y 4, colágena tipo IV y proteoglicanos de heparan sulfatos es formada alrededor de las células deciduales, la MMP9 producida por el trofoblasto durante su invasión, puede actuar sobre ésta última o participar en la remodelación de los vasos sanguíneos del endometrio y en la interacción del trofoblasto con el endotelio.

La MMP9 puede unirse a la superficie celular por el receptor de hialuronano o CD44 (Yu & Stamenkovic 1999, Yu & Stamenkovic 2000), a la cadena  $\alpha 2$  (IV) de la colágena IV unida a ella (Toth y Cols., 1999), a la forma membranal de la proteína Ku reparadora del DNA, (Monferran y Cols., 2004), o a las integrinas  $\alpha M\beta 2$ ,  $\alpha 1\beta 1$  (Stefanidakis y Cols., 2003, Stefanidakis y Cols., 2004),  $\alpha 5\beta 1$  o  $\alpha V\beta 5$  (Bjorklund *et al.*2004). La unión de MMP9 al receptor CD44 es selectiva, pero a veces no es observada en las células que expresan ambas moléculas (Stamenkovic, 2003). La asociación de MMP9 a CD44 o a integrinas puede ser mediada por la proteína de la matriz dentinaria 1 (Karadag y Cols., 2005).

Los receptores de CD44 y las integrinas  $\alpha 5$  y  $\alpha V$  están presentes en el trofotodermo de blastocistos capaces de implantarse (Sutherland y Cols., 1993, Matsumoto y Cols., 2004, Rout y Cols., 2004) y la distribución de  $\alpha V$  en blastocistos en cultivo es similar a la que encontramos para MMP9 (Rout y Cols., 2004). Otro ligando de la MMP9 del trofoblasto puede ser la laminina, la cual está presente alrededor de la superficie externa del blastocisto de murino en la etapa de implantación (Thorsteinsdottir, 1992, Carson y Cols., 1993).

PLAU puede unirse a la superficie del trofoblasto por medio de su receptor específico (PLAUR) o de la integrina  $\alpha V\beta 3$ , ambas son expresadas por los embriones periimplantacionales de ratón (Harvey y Cols.,1995, Teesalu y Cols., 1996, Rout y Cols., 2004) y enlazan PLAU, el primero con alta afinidad y

especificidad (Rijken y Lijnen, 2009) y la segunda con baja afinidad (Tarui y Cols., 2006). La unión de PLAU con su receptor amplifica y dirige su actividad proteolítica; debido a que, promueve la activación eficiente del plasminógeno (Ellis y Cols., 1991; Rijken y Lijnen 2009). La producción de PLAU y su unión a la superficie confiere al trofoblasto la habilidad de formar plasmina y esta puede participar en la remodelación del endometrio y en la activación de MMP9.

Se ha establecido que los sistemas proteolíticos asociados a la membrana contribuyen significativamente en la invasión del trofoblasto al endometrio (Cohen y Cols., 2006, Fujiwara, 2007).

La presencia de PLAU y MMP9 en la superficie celular puede facilitar la comunicación materno-embionaria a través de la activación de formas inactivas de moléculas de señalización, ya sea directa o indirectamente, como parte de un sistema proteolítico en cascada. Particularmente el factor de crecimiento epidérmico que une heparina (HBEGF), es expresado específicamente en las células del epitelio luminal adyacentes al blastocisto al inicio del día 5 de gestación, teniendo un papel crítico en la implantación del embrión (Das y Cols., 1994, Lim y Dey, 2009). El HBEGF como otros miembros de la familia de factores de crecimiento epidérmico, es producido como una proteína transmembrana y es secretado a través del rompimiento del dominio extracelular por una metaloproteinasas. HBEGF y sus receptores son expresados en el trofoblasto y en el epitelio uterino y su expresión transmembrana en el epitelio se ha considerado la primera respuesta molecular del epitelio uterino a las señales del blastocisto (Jessmon y Cols., 2009, Lim y Dey, 2009). La diferenciación del blastocisto *in vitro* de ratón es acelerada por el HBEGF desprendido del blastocisto del día 5 (Liu y Armant, 2004), debido posiblemente a la activación por PLAU de otra enzima que actúa sobre el HBEGF transmembrana ("sheddas"). Esto ha sido demostrado en células cancerosas, donde PLAU induce el desprendimiento de HBEGF y la transactivación de su receptor por un proceso mediado por MMPs (Guerrero y Cols., 2004), posiblemente MMP9 (Lucchesi y

Cols., 2004, Hurtado y Cols., 2007), además PLAU puede inducir la expresión de HBEGF (Caceres y Cols., 2008).

## **8.2 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MMP9 Y PLAU POR LA MATRIZ EXTRACELULAR**

Nuestros datos indican que la expresión temporal de MMP9 y PLAU durante el desarrollo del blastocisto en cultivo es regulada primariamente por un programa intrínseco y cuantitativamente modulada por su interacción con proteínas de la matriz extracelular, principalmente con colágena tipo IV; ya que en condiciones no adherentes, sin la adición de suero y en ausencia de proteínas de la MEC, el patrón de expresión de MMP9 y PLAU fue similar a lo observado en condiciones adherentes, lo que es consistente con los resultados obtenidos por Sellens y Sherman en 1980 y para el PLAU es paralelo con el patrón desarrollo *in vivo* (Teesalu y Cols., 1996).

Estudios previos mostraron que las proteínas de matriz incrementan la expresión de MMP9 en embriones tempranos humanos (Turpeenniemi-Hujanen y Cols., 1995) y en blastocistos de ratón (Tie y Cols., 2000) y (Zhang y Cols., 1996) encontraron que las interacciones de blastocistos de ratón con la MEC favorece el incremento de la expresión de PLAU. Un aumento en la expresión del mRNA de *Mmp9* en los blastocistos en cultivo fue inducida por la colágena tipo IV, mientras que la expresión del mRNA del *Plau* fue estimulada por colágena IV y laminina, los cambios en el mRNA solo se reflejaron en el aumento del contenido de la proteína en el caso de la MMP9, contenido que también aumentó en cultivos sobre fibronectina y laminina, sin un cambio aparente en el contenido del mensajero.

El incremento en la secreción de MMP9 inducido por colágena tipo IV se explica por los niveles de su mRNA, mientras que el mismo efecto inducido por fibronectina y laminina indica un mecanismo post-transcripcional debido a la

ausencia de cambios a nivel del respectivo mRNA. Tie y Cols., (2000) encontraron que fibronectina induce la expresión de MMP9 y MMP2 en los blastocistos del ratón, sin embargo no detectamos MMP2 por zimografía, datos que concuerdan con Chen y Cols., (2007), excepto cuando los embriones co-cultivados empiezan a agregarse. En nuestro caso disminuimos las posibles interacciones físicas entre los embriones, cultivando únicamente 4 embriones por gota de 5  $\mu$ L y excluyendo muestras en los que los embriones se agregaron. El papel regulador de proteínas de matriz extracelular en la expresión de MMP9 se ha descrito en otras células, para fibronectina (Mitra y Cols., 2006), laminina y colágena tipo IV (Leufgen y Cols., 2005).

A diferencia de Zhang y Cols. (1996) no encontramos que la fibronectina indujera la expresión de PLAU, lo que puede deberse a diferencias en las condiciones experimentales o a la contaminación de la fibronectina con proteasas o factores de crecimiento. Zhang y Cols., (1996) utilizaron un ensayo colorimétrico para la determinación de PLAU, bajo condiciones que podrían estar influenciadas por su inhibidor endógeno, el PAI.

Los blastocistos de ratón se adhieren y se extienden sobre colágena tipo I, II, III, IV, V y VI (Carson y Cols., 1988, Carson y Cols., 1993). Las integrinas  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 y  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 median la adhesión a colágenas nativas (Aumailley y Cols., 1996) y han sido implicadas en la regulación de la expresión de MMP9 (Mitra y Cols., 2004) por lo que pueden mediar la acción de la colágena IV en embriones de ratón. El mRNA de la integrina  $\alpha$ 2 se detecta por primera vez en el blastocisto tardío, lo que coincide con la adquisición de la competencia para la adhesión, mientras que el mRNA de la  $\alpha$ 1 se detecta hasta que el trofoblasto empieza a extenderse (Sutherland y Cols., 1993). En condiciones donde la triple hélice de colágena se desdobra exponiendo la secuencia RGD, la colágena tipo IV se une a través de las integrinas  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 o  $\alpha$ V $\beta$ 3 (Kitsiou y Cols., 2003), las cuales también se expresan en los blastocistos de ratón (Sutherland y Cols., 1993).

### **8.3 INTERACCIÓN DE MMP9 Y PLAU CON PROTEINAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR**

La captación de proteasas en la MEC puede regular su actividad catalítica, además de constituir un reservorio de las mismas. La MMP9, PLAU y PLAT se adsorben al sustrato que recubre la superficie de cultivo, la primera de manera más específica al unirse fuertemente a colágena tipo IV y laminina no así con BSA y fibronectina, PLAU y PLAT con poca especificidad uniéndose incluso a las cubiertas de BSA. La unión de MMP9 a colágena tipo I y IV ha sido descrita por (Allan y Cols., 1995, Makela y Cols., 1998), pero su unión con laminina ha sido controversial, un grupo de investigadores establece que MMP9 no se une a laminina ni fibronectina (Makela y Cols., 1998) y otro encuentra que la MMP9 se une a laminina (Allan y Cols., 1995), nuestros datos concuerdan con este último.

La forma dimérica de la MMP9 es la que más se unió a colágena IV y laminina comparado con la monomérica, posiblemente debido a su conformación, La unión de la pro-MMP9 a sus sustratos como la colágen IV es suficiente para inducir su actividad (Bannikov y Cols., 2002), lo que sugiere que la pro-MMP9 puede degradar colágena IV después de haberse unido a ella. El dímero de MMP9 es más estable que el monómero, por lo que su activación por estromelisina es mas lenta (Olson y Cols., 2000), el significado fisiológico de la unión preferencial del dímero a colágena IV y laminina no se conoce, lo que nos permite especular que la presencia de un dímero de activación lenta puede proporcionar un nivel adicional de control durante la degradación de la MEC. La homodimerización de la MMP9 podría indicar una disminución de su inhibidor TIMP-1, que al formar complejos con pro-MMP9 impide su dimerización (Goldberg y Colsl., 1992).

La unión de PLAU y PLAT a la superficie de cultivo aún en ausencia de proteínas de la MEC exógenas puede deberse a la producción de moléculas de adhesión por el mismo embrión que se adsorben a la superficie. La unión a la

superficie de cultivo de ambos depende del tipo celular (Stack y Cols., 1994), por ejemplo, ambos se asocian con la MEC producida por fibroblastos, neuronas y células endoteliales en cultivo (Krystosek y Seeds, 1986, Korner y Cols., 1993). PLAT se une de manera específica y saturable a la región amino terminal de la fibronectina o a al dominio globular carboxilo terminal de la cadena alfa de la laminina (Salonen y Cols., 1985, Moser y Cols., 1993, Goldfinger y Cols., 1998). La unión de PLAU a la MEC ha sido menos estudiada, sin embargo se ha determinado que su asociación con fibronectina (Salonen y Cols., 1985) o laminina (Goldfinger y Cols., 1998) es débil.

Nuestros datos indican que la MEC producida por los embriones peri-implantacionales tiene una alta capacidad de unir a los activadores del plasminógeno. Esta unión puede favorecer la formación de plasmina (Stack y Cols., 1990, Stack y Cols., 1994). Mientras que la colágena IV no es degradada por plasmina, la laminina y fibronectina si (Goldfinger y Cols., 1998, Bonnefoy y Legrand 2000, Uemura y Cols., 2005). El plasminógeno y plasmina se asocia a la MEC a través de sitios de unión a lisina (Moser y Cols., 1993), lo que protege a la plasmina de ciertos inhibidores y proteasas que puedan inactivarla, prolongando así su actividad proteolítica (Knudsen y Cols., 1986), pero cuando la plasmina esta soluble sus inhibidores la inactivan rápidamente. La modulación de la activación del plasminógeno por la MEC es un importante mecanismo regulador de los mecanismos proteolíticos asociados a la invasión de la matriz extracelular. Las propiedades trombogénicas y estimuladoras del crecimiento de la MEC son reguladas por los activadores de plasminógeno y plasmina a través de la liberación de factores de crecimiento unidos a la MEC y activación de proenzimas como la pro-MMP9 y la pro-trombina (Stack y Cols., 1990, Korner y Cols., 1993, Stack y Cols., 1994).

#### ***8.4 ACTIVACION DE LA PRO-MMP9***

Aunque la forma activa de la MMP9 no se encontró en el medio condicionado por blastocistos cultivados, la presencia de MMP9 de 97 kDa, en el medio condicionado y absorbida a la superficie sugiere una capacidad limitada para procesar pro-MMP9, la proteína de 97 kDa puede representar un intermediario en la activación de la MMP9, requiriéndose posiblemente algún factor materno que complemente la activación de esta enzima.

Behrendtsen y Cols. (1992), y Whiteside y Cols. (2001a) encontraron la forma activa de la MMP9 en medio condicionado por blastocistos de ratón, pero en cultivos utilizando suero ó matrigel como sustrato de adhesión, donde la participación de proteasas o factores del crecimiento adsorbidas a la superficie de cultivo no puede ser excluída. El matrigel contiene plasminógeno (Farina y Cols., 1996), activadores de plasminógeno, MMP2 y MMP9 (Mackay y Cols., 1993) y cuando el matrigel es reconstituido a 37 °C, se forma plasmina y la activación de MMP9 puede ser inducida (Farina y Cols., 1996).

La presencia de gelatinasa en los lisados embrionarios que pueden corresponder a la forma activa de la MMP9 indica la probable existencia de un mecanismo de activación de la enzima, asociado a la membrana celular, pero con capacidad limitada. Por lo anterior exploramos el papel potencial del sistema plasminógeno/ plasmina en la activación de la MMP9 por los blastocistos en cultivo, considerando que el plasminógeno puede ser proveído por la circulación materna.

#### ***8.5 PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA DE ACTIVACION DEL PLASMINOGENO EN LA ACTIVACIÓN DE MMP9***

La función del PLAU en la implantación del blastocisto al parecer depende de la generación de plasmina, la cual lleva a cabo la degradación de algunos

componentes de la MEC, así como la activación de zimógenos, como la pro-MMP9. El hallazgo de que la expresión de la MMP9 es paralela a la de PLAU y que se generó plasmina y se indujo la activación de la MMP9 después de agregar plasminógeno exógeno al cultivo embrionario, confirma la existencia de una cascada proteolítica que involucra al sistema plasminógeno-plasmina y metaloproteinasas, para facilitar la invasión del trofoblasto al endometrio. Al día 5 de gestación hay un incremento en la permeabilidad vascular en el útero, lo que se ha asociado con la liberación de proteínas plasmáticas hacia el líquido uterino, incluyendo al plasminógeno (Rockwell y Cols., 2002). Estos datos sugieren que la interacción materno-fetal es necesaria para la activación de proteasas durante la implantación embrionaria, teniendo el plasminógeno un papel muy importante, al generar plasmina la cual puede degradar fibronectina (Liotta y Cols., 1981, Hantai y Festoff, 1987) y laminina (Uemura y Cols., 2005).

La vía de activación de la MMP9 requiere del procesamiento proteolítico en su dominio amino terminal, lo que puede iniciarse por diferentes enzimas, como la plasmina y la estromelisina 1 (MMP3). Sin embargo, Behrendtsen y Cols., (1992), encuentra que la adición exógena de plasmina a blastocistos que se desarrollan en cultivo, al día 8 de gestación, no activa la MMP9. Sin embargo, la activación de MMP9 por plasmina en solución es muy ineficiente debido a la inestabilidad de la plasmina (Goldberg y Cols., 1992), siendo considerada la estromelisina 1 como el activador fisiológico de la MMP9 (Goldberg y Cols., 1992, Olson y Cols., 2000). La activación eficiente de MMP9 por plasmina se logra cuando las enzimas se unen a la superficie celular (Mazzieri y Cols., 1997). De acuerdo con nuestros datos, los activadores de plasminógeno se encuentran unidos a la célula trofoblástica y a la superficie de cultivo, lo que facilita la formación de plasmina y activación de MMP9. Consistente con lo anterior, la adición de plasminógeno induce la activación de MMP9 en macrófagos deficientes en la expresión de *Mmp3* (Lijnen y Cols., 1998).

No se puede excluir la posibilidad de que la activación de MMP9 pueda ser mediada por la MMP3 u otra enzima, durante la implantación del trofoblasto, pero a través de este trabajo se demuestra que el plasminógeno materno cumple con los requisitos para realizar esta función reguladora durante la invasión del trofoblasto al endometrio. Se ha propuesto que la acción combinada del sistema plasminogeno-plasmina y metaloproteinasas son esenciales para el desarrollo y función adecuada de la placenta (Solberg y Cols., 2003), en la regulación de la vascularización placentaria y en la diferenciación de la decidua. La activación de la MMP9 dependiente del plasminógeno que encontramos en el blastocisto tardío es consistente con esta sugerencia y puede explicar parcialmente como interactúan *in vivo*, ambos sistemas enzimáticos.

## 9. CONCLUSIONES

---

- El patrón temporal de expresión y secreción de PLAU Y MMP9 durante la diferenciación del trofoblasto en blastocistos en cultivo es dependiente primariamente de un programa intrínseco de desarrollo, modulado por la interacción de este tejido con proteínas de la matriz extracelular, principalmente con colágeno tipo IV y laminina.
- La acción de las proteínas de la matriz extracelular puede explicarse en algunos casos por un mecanismo transcripcional (aumento en la producción y secreción de MMP9 inducido por colágeno tipo IV) y en otros por un mecanismo postraduccional (aumento en la producción y secreción de MMP9 inducido por laminina o fibronectina).
- La localización de MMP9 y PLAU en la superficie del trofotodermo mural en los blastocistos de ratón del día 5 de gestación, cuando ocurre la aposición entre el trofotodermo y el epitelio luminal uterino, sugiere que estas participan en la interacción entre ambos tejidos y el diálogo materno embrionario responsable de inducir los cambios uterinos propios de la gestación temprana.
- La MMP9 y PLAU se asocian con proteínas de la matriz extracelular o secretadas por el embrión depositadas en la superficie de cultivo, la asociación de la MMP9 es más selectiva uniéndose preferentemente a colágeno IV y laminina, mientras que PLAU se une a la superficie aún cuando no se emplea una proteína de adhesión exógena. La forma dimérica de la MMP9 es la que se une preferencialmente a colágeno IV y laminina, comparado con su forma monomérica.
- Con base en que:
  - A. Los blastocistos cultivados en ausencia de suero secretan predominantemente pro-MMP9 y PLAU y ambas proteasas se asocian

a la superficie del trofodermo/trofoblasto y a proteínas de la matriz extracelular depositadas en la superficie de cultivo.

- B. Los patrones temporales de expresión de PLAU y MMP9 son paralelos durante la diferenciación del trofoblasto en blastocistos en cultivo.
- C. La adición de plasminógeno exógeno a los blastocistos en cultivo es seguida de su conversión a plasmina y de la activación de la MMP9, de manera dosis dependiente.

Se sugiere que durante la invasión del trofoblasto al endometrio, es clave la participación de una interacción materno-embionaria y de una cascada proteolítica que involucra al sistema plasminógeno/plasmina y la MMP9. En la que el plasminógeno proveniente de la circulación materna es convertido a plasmina por el PLAU presente en la superficie del trofoblasto, secretado por él o asociado a la matriz extracelular. La plasmina producida participa en la activación de MMP9 y ambas contribuyen a la remodelación uterina durante la implantación embionaria.

## 10. BIBLIOGRAFIA

---

- Aflalo ED, Sod-Moriah UA, Potashnik G & Har-Vardi I** 2004 Differences in the implantation rates of rat embryos developed in vivo and in vitro: possible role for plasminogen activators. *Fertility and Sterility* **81 Suppl 1** 780-785.
- Aflalo ED, Sod-Moriah UA, Potashnik G & Har-Vardi I** 2005 Expression of plasminogen activators in preimplantation rat embryos developed in vivo and in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology* **3** 7.
- Aflalo ED, Sod-Moriah UA, Potashnik G & Har-Vardi I** 2007 EGF increases expression and activity of PAs in preimplantation rat embryos and their implantation rate. *Reproductive Biology and Endocrinology* **5** 4.
- Afonso S, Romagnano L & Babiarz B** 1997 The expression and function of cystatin C and cathepsin B and cathepsin L during mouse embryo implantation and placentation. *Development* **124** 3415-3425.
- Afonso S, Romagnano L & Babiarz B** 1999 Expression of cathepsin proteinases by mouse trophoblast in vivo and in vitro. *Developmental Dynamics* **216** 374-384.
- Alexander CM, Hansell EJ, Behrendtsen O, Flannery ML, Kishnani NS, Hawkes SP & Werb Z** 1996 Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse implantation. *Development* **122** 1723-1736.
- Alfano D, Franco P, Vocca I, Gambi N, Pisa V, Mancini A, Caputi M, Carriero MV, Iaccarino I & Stoppelli MP** 2005 The urokinase plasminogen activator and its receptor: role in cell growth and apoptosis. *Thrombosis and Haemostasis* **93** 205-211.

**Allan JA, Docherty AJ, Barker PJ, Huskisson NS, Reynolds JJ & Murphy G** 1995  
Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components.  
*Biochemical Journal* **309 (Pt 1)** 299-306

**Anteby EY, C Greenfield, Yaron-S Natanson, Wohl-D Goldman, and Hamani Khudyak V I Ariel, S. Yagel** 2004 Vascular endothelial growth factor, epidermal growth factor from fibroblasts-4 growth and - 10 factor stimulating the trophoblast metalloproteinase-9 and plasminogen activator system. *Molecular Human Reproduction* **10** 229-235.

**Armant DR** 2005 Blastocysts don't go it alone. Extrinsic signals fine-tune the intrinsic developmental program of trophoblast cells. *Developmental Biology* **280** 260-280.

**Armant DR** 2006 Blastocyst culture. In *Placenta and Trophoblast Methods and Protocols*, Methods in Molecular Medicine, pp. 35-56. Eds M J Soares and J S Hunt. Totowa, NJ: Humana Press.

**Aumailley M, Mercier I & Horton MA** 1996 Functional domains of adhesion proteins. In: *Molecular biology of cell adhesion molecules*, pp. 71-86. New York, NY: John Wiley & Sons

**Axelrod HR** 1985 Altered trophoblast functions in implantation-defective mouse embryos. *Developmental Biology* **108** 185-190.

**Bamberger AM, S Jenatschke, HM Schulte, Loning Bamberger MC, T.** 2000 Factor inhibidor de leucemia (LIF) estimula el HLA-G promotor humano en células choriocarcinoma JEG3. *Endocrinology and Metabolism* **85** 3932-3936.

**Bannikov GA, Karelina TV, Collier IE, Marmer BL & Goldberg GI** 2002 Substrate binding of gelatinase B induces its enzymatic activity in the presence of intact propeptide. *Journal of Biological Chemistry* **277** 16022-16027

- Behrendt N, List K, Andreasen A, Dako K** 2003 The pro-urokinase plasminogen-activation system in the presence of serpin type inhibitors and the urokinase receptor: rescue of activity through reciprocal pro-enzyme activation *Biochemical Journal* **371** 277-287
- Behrendtsen O, Alexander CM & Werb Z** 1992 Metalloproteinases mediate extracellular matrix degradation by cells from mouse blastocyst outgrowths. *Development* **114** 447-456.
- Behrendtsen O & Werb Z** 1997 Metalloproteinases regulate parietal endoderm differentiating and migrating in cultured mouse embryos. *Developmental Dynamics* **208** 255-265.
- Brenner CA, Adler RR, Rappolee DA, Pedersen RA & Werb Z** 1989 Genes for extracellular-matrix-degrading metalloproteinases and their inhibitor, TIMP, are expressed during early mammalian development. *Genes and Development* **3** 848-859.
- Bischof P, Campana A.** 2000 Molecular mediators implantation. *Clinic of Obstetrics and Gynecology Bailliere*. **14** 801-814.
- Bjorklund M, Heikkila P & Koivunen E** 2004 Peptide inhibition of catalytic and non catalytic activities of matrix metalloproteinase-9 blocks tumor cell migration and invasion. *Journal of Biological Chemistry* **279** 29589-29597.
- Blankenship TN & Given RL** 1995 Loss of laminin and type IV collagen in uterine luminal epithelial basement membranes during blastocyst implantation in the mouse. *Anatomical Record* **243** 27-36.
- Bonnefoy A & Legrand C** 2000 Proteolysis of subendothelial adhesive glycoproteins (fibronectin, thrombospondin, and von Willebrand factor) by plasmin, leukocyte cathepsin G, and elastase. *Thrombosis Research* **98** 323-332.

**Brenner CA, Adler RR, Rappolee DA, Pedersen RA & Werb Z** 1989 Genes for extracellular-matrix-degrading metalloproteinases and their inhibitor, TIMP, are expressed during early mammalian development. *Genes and Development* **3** 848-859.

**Brooks PC, Stromblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP & Cheresh DA** 1996 Localization of matrix metalloproteinase MMP2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell* **85** 683-693

**Bugge TH, Flick MJ, Daugherty CC & Degen JL** 1995 Plasminogen deficiency causes severe thrombosis but is compatible with development and reproduction *Genes and Development* **9** 794-807.

**Burghardt RC, Johnson GA, Jarger LA, Ka H, Garlow JE, Spencer TE, Bazer FW** 2002 Integrins and Extracellular Matrix Proteins at the Maternal-Fetal Interface in Domestic Animals. *Cell, Tissues and Organs* **172** 202–217.

**Caceres M, Tobar N, Guerrero J, Smith PC & Martinez J** 2008 c-jun-NH2JNK mediates invasive potential and EGFR activation by regulating the expression of HB-EGF in a urokinase-stimulated pathway. *Journal of Cellular Biochemistry* **103** 986-993.

**Campbell S, Swann HR, Seif MW, Kimber SJ, Aplin JD** 1995 Cell adhesion molecules on the oocyte and preimplantation human embryo. *Human Reproduction* **10** 1571–1578.

**Carson DD, Tang JP & Gay S** 1988 Collagens support embryo attachment and outgrowth in vitro: effects of the Arg-Gly-Asp sequence. *Developmental Biology* **127** 368-375.

**Carson DD, Tang JP & Julian J** 1993 Heparan sulfate proteoglycan (perlecan) expression by mouse embryos during acquisition of attachment competence. *Developmental Biology* **155** 97-106.

**Carroll PM, Richards WG, Darrow AL, Wells JM & Strickland S** 1993 Preimplantation mouse embryos express a cell surface receptor for tissue plasminogen activator. *Development* **119** 191-198.

**Castellino FJ & Ploplis VA** 2005 Structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Thrombosis and Haemostasis* **93** 647-654.

**Chen L, Nakai M, Belton RJ, Jr. & Nowak RA** 2007 Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and matrix metalloproteinases during mouse embryonic development. *Reproduction* **133** 405-414.

**Cohen M, Meisser A & Bischof P** 2006 Metalloproteinases and human placental invasiveness. *Placenta* **27** 783-793.

**Das SK, Wang XN, Paria BC, Damm D, Abraham JA, Klagsbrun M, Andrews GK & Dey SK** 1994 Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation. *Development* **120** 1071-1083.

**Das SK, Yano S, Wang J, Edwards DR, Nagase H & Dey SK** 1997 Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the mouse uterus during the peri-implantation period. *Developmental Genetics* **21** 44-54

**Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H.** 2004 Molecular Cues to Implantation. *Endocrine Reviews* **25** 341–373.

**Ehnman M, Li H, Fredriksson L, Pietras K & Eriksson U** 2009 The uPA/uPAR system regulates the bioavailability of PDGF-DD: implications for tumour growth. *Oncogene* **28** 534-544.

**Ellis V, Behrendt N & Dano K** 1991 Plasminogen activation by receptor-bound urokinase. A kinetic study with both cell-associated and isolated receptor. *Journal of Biological Chemistry* **266** 12752-12758.

**Ellis V, Scully MF & Kakkar VV** 1987 Plasminogen activation by single-chain urokinase in functional isolation. A kinetic study. *Journal of Biological Chemistry* **262** 14998-15003.

**Enders A, Schlafke S** 1967 A morphological analysis of the early implantation stages in the rat. *American Journal of Anatomy* **120** 185-226

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

**Farina AR, Tiberio A, Tacconelli A, Cappabianca L, Gulino A & Mackay AR** 1996 Identification of plasminogen in Matrigel and its activation by reconstitution of this basement membrane extract. *Biotechniques* **21** 904-909.

**Fernandez-Patron C, Radomski MW, Davidge ST** 1999 Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circulation Research* **85** 906–911.

**Fridman R** 2003 Surface association of secreted matrix metalloproteinases. *Current Topics in Developmental Biology* **54** 75-100.

**Fridman, R., Toth, M., Peña, D., Mobashery, S** 1995 Activation of progelatinase B (MMP-9) por gelatinasa A. *Cancer Research* **55** 2548-2555

**Fujiwara H** 2007 Membrane-bound peptidases regulate human extravillous trophoblast invasion. *Placenta* **28 Suppl A** S70-75.

**Gardner RL** 1982 Investigation of cell lineage and differentiation in the extraembryonic endoderm of the mouse embryo. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* **68** 175–198.

**Gilbert SF** 2010 Developmental biology. Sinauer, Sunderland Massachusetts Chapter 7, 7<sup>th</sup> Edition.

**Godar S, Horejsi V, Weidle UH, Binder BR, Hansmann C & Stockinger H** 1999 M6P/IGFII-receptor complexes urokinase receptor and plasminogen for activation of transforming growth factor-beta1. *European Journal of Immunology* **29** 1004-1013.

**Goldberg GI, Strongin A, Collier IE, Genrich LT & Marmer BL** 1992 Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase and activation of the proenzyme with stromelysin. *Journal of Biological Chemistry* **267** 4583-4591.

**Goldfinger LE, Stack MS & Jones JC** 1998 Processing of laminin-5 and its functional consequences: role of plasmin and tissue-type plasminogen activator. *Journal of Cell Biology* **141** 255-265.

**Gong Y, Hart E, Shchurin A & Hoover-Plow J** 2008 Inflammatory macrophage migration requires MMP-9 activation by plasminogen in mice. *Journal of Clinical Investigation* **118** 3012-3024.

**Guerrero J, Santibanez JF, Gonzalez A & Martinez J** 2004 EGF receptor transactivation by urokinase receptor stimulus through a mechanism involving Src and matrix metalloproteinases. *Experimental Cell Research* **292** 201-208.

**Hantai D & Festoff BW** 1987 Degradation of muscle basement membrane zone by locally generated plasmin. *Experimental Neurology* **95** 44-55.

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

**Huang HY, Wen Y, Irvine JC, Kruessel JS, Soong YK, Polan ML** 1998 Cytokine mediated regulation of TIMP-1, TIMP-3 and 92-kDa Type IV collagenase messenger RNA expression in human endometrial stroma cells. *Journal of Clinical Endocrinology* **83** 1721-1729.

**Hurtado M, Lozano JJ, Castellanos E, Lopez-Fernandez LA, Harshman K, Martinez AC, Ortiz AR, Thomson TM & Paciucci R** 2007 Activation of the epidermal growth factor signalling pathway by tissue plasminogen activator in pancreas cancer cells. *Gut* **56** 1266-1274.

**Huet-Hudson Y M, Chakraborty C, De S K, Suzuki Y, Andrews G K, Dey S K** 1990. Estrogen regulates synthesis of EGF in mouse uterine epithelial cells. *Molecular Endocrinology* **4** 510-523.

**Izquierdo, L** 1986 Desde la especificación regional a la diferenciación celular en el desarrollo preimplantacional de mamíferos. *Archivos de Biología y Medicina. Experimental* **19** 279-300

**Jessmon P, Leach RE & Armant DR** 2009 Diverse functions of HBEGF during pregnancy. *Molecular Reproduction and Development* **76** 1116-1127

**Kabir-Salmani M, Shiokawa S, Akimoto Y, Sakai K, Iwashita M.** 2004 The role of alpha(5)beta(1)-integrin in the IGF-I-induced migration of extravillous trophoblast cells during the process of implantation. *Molecular Human Reproduction* **10** 91–97.

**Karadag A, Fedarko NS & Fisher LW** 2005 Dentin matrix protein 1 enhances invasion potential of colon cancer cells by bridging matrix metalloproteinase-9 to integrins and CD44. *Cancer Research* **65** 11545-11552.

**Kimber SJ & Spanswick C** 2000 Blastocyst implantation: the adhesion cascade. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **11** 77–92

**Kitsiou PV, Tzinia AK, Stetler-Stevenson WG, Michael AF, Fan WW, Zhou B & Tsilibary EC** 2003 Glucose-induced changes in integrins and matrix-related functions in cultured human glomerular epithelial cells. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* **284** F671-F679.

**Knudsen BS, Silverstein RL, Leung LL, Harpel PC & Nachman RL** 1986 Binding of plasminogen to extracellular matrix. *Journal of Biological Chemistry* **261** 10765-10771.

**Korner G, Bjornsson TD & Vlodavsky I** 1993 Extracellular matrix produced by cultured corneal and aortic endothelial cells contains active tissue-type and urokinase-type plasminogen activators. *Journal of Cellular Physiology* **154** 456- 465.

**Krussel JS, P Bielfeld, ML Polan, Simon C.** 2003 Regulation of embryo implantation. *European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology.* **110** 2-9

**Krystosek A & Seeds NW** 1986 Normal and malignant cells, including neurons, deposit plasminogen activator on the growth substrata. *Experimental Cell Research* **166** 31-46.

**Lee S, Jilani SM, Nikolova GV, Carpizo D & Iruela-Arispe ML** 2005 Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *Journal of Cell Biology* **169** 681-691.

**Lefebvre O, Regnier C, Chenard MP, Wendling C, Chambon P, Basset P & Rio MC** 1995 Developmental expression of mouse stromelysin-3 mRNA. *Development* **121** 947-955.

**Legrand C, Polette M, Tournier JM, 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.

**Leksa V, Godar S, Schiller HB, Fuertbauer E, Muhammad A, Slezakova K, Horejsi V, Steinlein P, Weidle UH, Binder BR & Stockinger H** 2005 TGF-beta-induced apoptosis in endothelial cells mediated by M6P/IGFII-R and 614 mini-plasminogen. *Journal of Cell Science* **118** 4577-4586.

**Lessey BA** 1995 Endometrial integrins. *The Endocrinologist*. **5** 214–221

**Lessey BA, Castelbaum AJ, Buck CA, Lei Y, Yowell CW, Sun J** 1994 Further characterization of endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy. *Fertility and Sterility*. **162** 497–506

**Licht P, Russu V, Wildt L** 2001 On the role of human chorionic gonadotrophin (hCG) in the embryo-endometrial microenvironment: implications for differentiation and implantation. *Seminars in Reproductive Medicine* **19** 37–47

**Lijnen HR** 2002 Matrix metalloproteinases and cellular fibrinolytic activity. *Biochemistry* **67** 92-98.

**Lijnen HR, Silence J, Van Hoef B & Collen D** 1998 Stromelysin-1 (MMP-3) independent gelatinase expression and activation in mice. *Blood* **91** 2045-2053.

**Lim HJ & Dey SK** 2009 HB-EGF: a unique mediator of embryo-uterine interactions during implantation. *Experimental Cell Research* **315** 619-626.

**Liotta LA, Goldfarb RH, Brundage R, Siegal GP, Terranova V & Garbisa S** 1981 Effect of plasminogen activator (urokinase), plasmin, and thrombin on glycoprotein and collagenous components of basement membrane. *Cancer Research* **41** 4629-4636.

**Liu Z & Armant DR** 2004 Lysophosphatidic acid regulates murine blastocyst development by transactivation of receptors for heparin-binding EGF-like growth factor. *Experimental Cell Research* **296** 317-326.

**Lucchesi PA, Sabri A, Belmadani S & Matrougui K** 2004 Involvement of metalloproteinases 2/9 in epidermal growth factor receptor transactivation in pressure-induced myogenic tone in mouse mesenteric resistance arteries. *Circulation* **110** 3587-3593.

**Mackay AR, Gomez DE, Cottam DW, Rees RC, Nason AM & Thorgeirsson UP** 1993 Identification of the 72-kDa (MMP-2) and 92-kDa (MMP-9) gelatinase/type IV collagenase in preparations of laminin and Matrigel. *Biotechniques* **15** 1048-1051.

**Makela M, Salo T & Larjava H** 1998 MMP-9 from TNF alpha-stimulated keratinocytes binds to cell membranes and type I collagen: a cause for extended matrix degradation in inflammation? *Biochemical and Biophysical Research Communications* **253** 325-335

**Mars WM, Jo M & Gonias SL** 2005 Activation of hepatocyte growth factor by urokinase-type plasminogen activator is ionic strength-dependent. *Biochemical Journal* **390** 311-315.

**Marshall BC, Sageser DS, Rao NV, Emi M & Hoidal JR** 1990 Alveolar epithelial cell plasminogen activator. Characterization and regulation. *Journal of Biological Chemistry* **265** 8198-8204.

- Matsumoto H, Daikoku T, Wang H, Sato E & Dey SK** 2004 Differential expression of ezrin/radixin/moesin (ERM) and ERM-associated adhesion molecules in the blastocyst and uterus suggests their functions during implantation. *Biology of Reproduction* **70** 729-736.
- Matsuoka H, Sisson TH, Nishiuma T & Simon RH** 2006 Plasminogen-mediated activation and release of hepatocyte growth factor from extracellular matrix. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **35** 705-713.
- Mazzieri R, Masiero L, Zanetta L, Monea S, Onisto M, Garbisa S & Mignatti P** 1997 Control of type IV collagenase activity by components of the urokinase-plasmin system: a regulatory mechanism with cell-bound reactants. *EMBO Journal* **16** 2319-2332.
- Meisser A, P Cameo, D Islami, una Campana, Bischof P.** 1999 Effects of interleukin-6 on cytotrophoblastic cells. *Molecular Human Reproduction* **5** 1055-1058.
- Mira E, Lacalle RA, Buesa JM, de Buitrago GG, Jimenez-Baranda S, Gomez-Mouton C, Martinez A & Manes S** 2004 Secreted MMP9 promotes angiogenesis more efficiently than constitutive active MMP9 bound to the tumor cell surface. *Journal of Cell Science* **117** 1847-1857.
- Mitra A, Chakrabarti J, Banerji A & Chatterjee A** 2004 Binding of alpha2 monoclonal antibody to human cervical tumor cell (SiHa) surface alpha2beta1 integrin modulates MMP-2 activity. *Gynecologic Oncology* **94** 33-39.
- Monferran S, Paupert J, Dauvillier S, Salles B & Muller C** 2004 The membrane form of the DNA repair protein Ku interacts at the cell surface with metalloproteinase 9. *EMBO Journal* **23** 3758-3768

- Mori, K., Dwek, R. A., Downing, A. K., Opdenakker, G., Rudd, P. M.** 1995 The activation of type 1 and type 2 plasminogen by type I and type II tissue plasminogen activator. *Journal of Biological Chemistry* **270** 3261-3267
- Moser TL, Enghild JJ, Pizzo SV & Stack MS** 1993 The extracellular matrix proteins laminin and fibronectin contain binding domains for human plasminogen and tissue plasminogen activator. *Journal of Biological Chemistry* **268** 18917-18923.
- Nagase H.** 1997 Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biological Chemistry* **387** 151-160
- Nakatsuji Y and Nishio, N Tani, K. Adachi, H Ohmichi, Hisamoto K, K Morishige, Kurachi H, K Tasaka, and Murata, Koichiro N.** 2003 Of epidermal growth factor increases the activity of invading cells choriocarcinoma BeWo through the induction of the expression of the Integrin alpha 2. *Endocrinology* **50** 703-714.
- Naldini L, Vigna E, Bardelli A, Follenzi A, Galimi F & Comoglio PM** 1995 Biological activation of pro-HGF (hepatocyte growth factor) by urokinase is controlled by a stoichiometric reaction. *Journal of Biological Chemistry* **270** 603-611.
- Nardo LG, Nikas G, Makrigiannakis A, Sinatra F, Nardo F.** 2003 Synchronous expression of pinopodes and alpha v beta 3 and alpha 4 beta 1 integrins in the endometrial surface epithelium of normally menstruating women during the implantation window. *Journal of Reproductive Medicine* **48** 355–36
- Noel A, Maillard C, Rocks N, Jost M, Chabottaux V, Sounni NE, Maquoi E, Cataldo D & Foidart JM** 2004 Membrane associated proteases and their inhibitors in tumour angiogenesis. *Journal of Clinical Pathology* **57** 577-584.
- Niu R, Okamoto T, Iwase K, Nomura S, Mizutani** 2000 Quantitative Analysis of Matrix Metalloproteinase-2 and -9 and their Tissue Inhibitors-1 and -2 in Human Placenta through gestation. *Life Sciences* **66** 1127–1137.

**Ogata, Y., Enghild, J. J., Nagase, H** 1992 Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. *Journal of Biological Chemistry* **267** 3581-3584

**Ogawa K, Funaba M, Mathews LS & Mizutani T** 2000 Activin A stimulates type IV collagenase (matrix metalloproteinase-2) production in mouse peritoneal macrophages. *Journal of Immunology* **165** 2997-3003.

**Olson MW, Bernardo MM, Pietila M, Gervasi DC, Toth M, Kotra LP, Massova I, Mobashery S & Fridman R** 2000 Characterization of the monomeric and dimeric forms of latent and active matrix metalloproteinase-9. Differential rates for activation by stromelysin 1. *Journal of Biological Chemistry* **275** 2661-2668.

**Oozono S, Yamauchi N, Nishimura K, Matsumoto K, Watanabe R, Kubota K, Aramaki S, Sato F, Wood C, Soh T, Kizaki K & Hattori MA** 2008 Expression of rat uterine serine proteinases homologous to mouse implantation serine proteinase 2. *Journal of Experimental Zoology B Molecular Development and Evolution* **310** 642-649.

**Paria BC, Dey SK.** 1990 Preimplantation embryo development in vitro: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **8** 456-4761.

**Parr EL, Tung HN, Parr MB** 1987 Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rat. *Biology of Reproduction* **36** 211-225.

**Patterson BC, Sang QA.** 1997 Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9). *Journal of Biological Chemistry* **272** 28823-28825.

**Peters TJ, Albieri A, Bevilacqua E, Chapman BM, Crane LH, Hamlin GP, Seiki M & Soares MJ** 1999 Differentiation-dependent expression of gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 in trophoblast cells. *Cell and Tissue Research* **295** 287-296.

**Psychoyos A** 1973 Hormonal control of ovoimplantation *Vitam Horm* **31** 201-256

**Puistola U, Ronnberg L, Martikainen H, Turpeenniemi-Hujanen T** 1989 The human embryo produces basement membrane collagen (type IV collagen)-degrading protease activity. *Human Reproduction* **4** 309–311.

**Quax PH, Grimbergen JM, Lansink M, Bakker AH, Blatter MC, Belin D, van Hinsbergh VW & Verheijen JH** 1998 Binding of human urokinase-type plasminogen activator to its receptor: residues involved in species specificity and binding. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **18** 693-701.

**Qiu Q, M Yang, BK Tsang, Gruslin A.** 2004 EGF-trophoblast induced secretion of MMP-9 and TIMP-1 involves the activation of both PI3k and MAPK signaling pathways. *Reproduction* **128** 355-363.

**Ra HJ, Parks WC.** 2007 Control of matrix metalloproteinase catalytic activity *Matrix Biology* **26** 587-596.

**Ramos-DeSimone N, Hahn-Dantona E, Siple J, Nagase H, French DL & Quigley JP** 1999 Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *Journal of Biological Chemistry* **274** 13066-13076

**Reponen P, Leivo I, Sahlberg C, Apte SS, Olsen BR, Thesleff I & Tryggvason K** 1995 92-kDa type IV collagenase and TIMP-3, but not 72-kDa type IV collagenase or TIMP-1 or TIMP-2, are highly expressed during mouse embryo implantation. *Developmental Dynamics* **202** 388-396.

- Rijken DC & Lijnen HR** 2009 New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *Journal of Thrombosis & Haemostasis* **7** 4-13.
- Rockwell LC, Pillai S, Olson CE & Koos RD** 2002 Inhibition of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor action blocks estrogen-induced uterine edema and implantation in rodents. *Biology of Reproduction* **67** 1804-1810.
- Roztocil E, Nicholl SM, Galaria, II & Davies MG** 2005 Plasmin-induced smooth muscle cell proliferation requires epidermal growth factor activation through an extracellular pathway. *Surgery* **138** 180-186.
- Rudd PM, Joao HC, Coghil E, Fiten P, Saunders M, Opdenakker G, Dwek RA** 1994 Glycoforms modify the dynamic stability and functional activity of an enzyme *Biochemistry* **33** 17-22
- Roth I, Fisher SJ.** 1999 IL-10 is an autocrine inhibitor of human placental cytotrophoblast MMP-9 production and invasion. *Developmental Biology* **205** 194–204.
- Rout UK, Wang J, Paria BC & Armant DR** 2004  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 3$  and the platelet-associated integrin  $\alpha IIb\beta 3$  coordinately regulate adhesion and migration of differentiating mouse trophoblast cells. *Developmental Biology* **268** 135-151.
- Rouy D, Cano A** 1990 The mechanism of activation of plasminogeno at the fibrin surface by tissue type plasminogeno activator in a plasma milieu *in vitro* *Biochem J* **271** 51-57
- Salamonsen LA, Nie G.** 2002 Newly identified endometrial genes of importance for implantation. *Journal of Reproductive Immunology* **53** 212-225

- Salonen EM, Saksela O, Vartio T, Vaheri A, Nielsen LS 685 & Zeuthen J 1985** Plasminogen and tissue-type plasminogen activator bind to immobilized fibronectin. *Journal of Biological Chemistry* **260** 12302-12307.
- Sappino AP, Huarte J, Belin D & Vassalli JD 1989** Plasminogen activators in tissue remodeling and invasion: mRNA localization in mouse ovaries and implanting embryos. *Journal of Cell Biology* **109** 2471-2479.
- Sellens MH & Sherman MI 1980** Effects of culture conditions on the developmental programme of mouse blastocysts. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* **56** 1-22.
- Sharma N, Liu S, Tang L, Irwin J, Meng G & Rancourt DE 2006** Implantation Serine Proteinases heterodimerize and are critical in hatching and implantation. *BMC Developmental Biology* **6** 61.
- Sherman M, Salomon DS. 1975** The relationships between the early mouse embryo and its environment. En: Market C. L., Papaconstantinou P: *The Developmental Biology of Reproduction*. Academic Press New York 277-309
- Solberg H, Rinkenberger J, Dano K, Werb Z & Lund LR 2003** A functional overlap of plasminogen and MMPs regulates vascularization during placental development. *Development* **130** 4439-4450.
- Spencer TE, Bazer FW 2002** Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. *Frontiers in Biosciences* **7** 1879-1898.
- Skrzypczak J, Mikolajczyk M, Szymanowski K 2001** Endometrial receptivity: expression of alpha3beta1, alpha4beta1 and alphaVbeta1 endometrial integrins in women with impaired fertility. *Reproductive Biology* **1** 85-94.

**Skrzypczak J, Wirstlein P, Miko'ajczyk M, Ludqikowski G** 2007 TGF superfamily and MMP2, MMP9, TIMP1 genes expression in the endometrium of women with impaired. *Folia Histochemica et Cytobiologica* **45 (1)** 143-148

**Stack MS, Rinehart AR & Pizzo SV** 1994 Comparison of plasminogen binding and activation on extracellular matrices produced by vascular smooth muscle and endothelial cells. *European Journal of Biochemistry* **226** 937-943.

**Stack S, Gonzalez-Gronow M & Pizzo SV** 1990 Regulation of plasminogen 703 activation by components of the extracellular matrix. *Biochemistry* **29** 4966-4970.

**Stahl A & Mueller BM** 1995 The urokinase-type plasminogen activator receptor, a GPI706 linked protein, is localized in caveolae. *Journal of Cell Biology* **129** 335-344.

**Stamenkovic I** 2003 Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *Journal of Pathology* **200** 448-464.

**Stefanidakis M, Bjorklund M, Ihanus E, Gahmberg CG & Koivunen E** 2003 Identification of a negatively charged peptide motif within the catalytic domain of progelatinases that mediates binding to leukocyte beta 2 integrins. *Journal of Biological Chemistry* **278** 34674-34684.

**Stefanidakis M & Koivunen E** 2006 Cell-surface association between matrix metalloproteinases and integrins: role of the complexes in leukocyte migration and cancer progression. *Blood* **108** 1441-1450.

**Stefanidakis M, Ruohutula T, Borregaard N, Gahmberg CG & Koivunen E** 2004 Intracellular and cell surface localization of a complex between alphaMbeta2 integrin and promatrix metalloproteinase-9 progelatinase in neutrophils. *Journal of Immunology* **172** 7060-7068.

- Stephens LE, Sutherland AE, Klimanskaya IV, Andrieux A, Meneses J, Pedersen RA, Damsky CH.** 1995 Deletion of beta 1 integrin in mice results in inner cell mass failure and periimplantation lethality. *Genes and Development* **9** 1883–1895
- Sternlicht MD, Werb Z.** 2001 How Matrix Metalloproteinases Regulate Cell Behavior. *Annual Review of Cell and Development Biology* **17** 463–516.
- Strickland S, Reich E & Sherman MI** 1976 Plasminogen activator in early embryogenesis: enzyme production by trophoblast and parietal endoderm. *Cell* **9** 231-240.
- Sun ZG, Shi HJ, Gu Z, Wang J & Shen QX** 2007 A single intrauterine injection of the serine protease inhibitor 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride reversibly inhibits embryo implantation in mice. *Contraception* **76** 250-255.
- Sutherland AE, Calarco PG & Damsky CH** 1993 Developmental regulation of integrin expression at the time of implantation in the mouse embryo. *Development* **119** 1175-1186
- Tabibzadeh S, Babaknia A** 1995 The signals and molecular pathways involved in implantation a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. *Human Reproduction* **10(6)** 1574-1602
- Thanabalasingam U, Veinot JP, Chretien M, Seidah NG, Fleck E, Graf K** 2005 Furin-like proprotein convertases are central regulators of the membrane type matrix metalloproteinase-pro-matrix metalloproteinase-2 proteolytic cascade in atherosclerosis. *Circulation* **111** 2820–2827.
- Tanaka SS, Togooka Y, Sato H, Seiki M, Tojo H & Tachi C** 1998 Expression and localization of membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) in trophoblast cells of cultured mouse blastocysts and ectoplacental cones. *Placenta* **19** 41-48.

**Tang L & Rancourt DE** 2005 Murine implantation serine proteinases 1 and 2: structure, function and evolution. *Gene* **364** 30-36.

**Tarui T, Akakura N, Majumdar M, Andronicos N, Takagi J, Mazar AP, Bdeir K, Kuo A, Yarovoi SV, Cines DB, Takada Y.** 2006 Direct interaction of the kringle domain of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and integrin  $\alpha\beta 3$  induces signal transduction and enhances plasminogen activation. *Thrombosis & Haemostasis* **95** 524–34.

**Teesalu T, Blasi F & Talarico D** 1996 Embryo implantation in mouse: fetomaternal coordination in the pattern of expression of uPA, uPAR, PAI-1 and alpha 2MR/LRP genes. *Mechanisms of Development* **56** 103-116.

**Tie G, Cao Y, Zhao X & Duan EK** 2000 Induction of matrix metalloproteinase-9 and -2 activity in mouse blastocyst by fibronectin-integrin interaction. *Chinese Science Bulletin* **45** 1266-1270.

**Thorsteinsdottir S** 1992 Basement membrane and fibronectin matrix are distinct entities in the developing mouse blastocyst. *Anatomical Record* **232** 141-149.

**Toth M, Sado Y, Ninomiya Y & Fridman R** 1999 Biosynthesis of alpha 2(IV) and alpha1(IV) chains of collagen IV and interactions with matrix metalloproteinase-9. *Journal of Cellular Physiology* **180** 131-139.

**Turpeenniemi-Hujanen T, Feinberg RF, Kauppila A & Puistola U** 1995 Extracellular matrix interactions in early human embryos: implications for normal implantation events. *Fertility and Sterility* **64** 132-138.

**Uemura A, Nakamura M, Kachi S, Nishizawa Y, Asami T, Miyake Y & Terasaki H** 2005 Effect of plasmin on laminin and fibronectin during plasmin-assisted vitrectomy. *Archives of Ophthalmology* **123** 209-213.

- Van Hinsbergh VW, Engelse MA & Quax PH** 2006 Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **26** 716-728.
- Van Wart HE, Birkedal-Hansen, H** 1990 The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **87** 5578–5582
- Vassalli JD, Dayer JM, Wholwend A, Belin D** 1994 Concomitant secretion of prourokinase and of plasminogen activator-specific inhibitor by cultured human monocytes-macrophages. *Journal of Experimental Medicine* **159** 1653-1658
- Verma RP, Hansch C.** 2007 Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical biological functions and (Q) SARs. *Biorganic and Medical Chemistry* **15** 2223-2268
- Vigano P, S Mangioni, M Pompeii, Chiodo** 2003 i. embryo cross Talk-mother - A review. *Placenta* **24** S56-S61
- Visse R, Nagase H** 2003 Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation Research* **92(8)** 827-839
- Vu TH, Werb Z** 2000 Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes & Development* **14** 2123-2133.
- Wang H, Dey SK** 2006 Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat. Rev. Genet* **7 (3)** 185-199
- Ware LB, Bastarache, JA, Wang L** 2005 Coagulation and fibrinolysis in human acute lung injury -New therapeutic targets? *Keio Journal of Medicine* **54(3)** 142-149

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

**Willer LM, Pedersen RA** 1977 Morphology of mouse egg cylinder development in vitro: A light and electron microscopy study. *Journal of Experimental Zoology* **200** 389-402

**Yehualaeshet T, O'Connor R, Green-Johnson J, Mai S, Silverstein R, Murphy-Ullrich JE & Khalil N** 1999 Activation of rat alveolar macrophage-derived latent transforming growth factor beta-1 by plasmin requires interaction with thrombospondin-1 and its cell surface receptor, CD36. *American Journal of Pathology* **155** 841-851

**Yamamoto H, Flannery ML, Kupriyanov S, Pearce J, McKercher SR, Henkel GW, Maki RA, Werb Z, Oshima RG.**1998 Defective trophoblast function in mice with a targeted mutation of Ets2. *Genes & Development* **12** 1315-1326.

**Yu Q & Stamenkovic I** 1999 Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes and Development* **13** 35-48

**Yu Q & Stamenkovic I** 2000 Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes & Development* **14** 163-176

**Yu WH, Woessner JF, Jr., McNeish JD & Stamenkovic I** 2002 CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling *Genes & Development* **16** 307-323

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