

## Tesis de Licenciatura

# Actividad de las metaloproteasas en el proceso de implantación del trofoblasto y en el tejido placentario sano y diabético

Pustovrh, María Carolina

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

### Cita tipo APA:

Pustovrh, María Carolina. (). Actividad de las metaloproteasas en el proceso de implantación del trofoblasto y en el tejido placentario sano y diabético. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario\\_nBIO000730\\_Pustovrh](http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000730_Pustovrh)

### Cita tipo Chicago:

Pustovrh, María Carolina. "Actividad de las metaloproteasas en el proceso de implantación del trofoblasto y en el tejido placentario sano y diabético". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. .

[http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario\\_nBIO000730\\_Pustovrh](http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000730_Pustovrh)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Ciencias Biológicas

Seminario de Licenciatura

***Actividad de las metaloproteasas en el  
proceso de implantación del trofoblasto y  
en el tejido placentario sano y diabético.***

Autora: María Carolina Pustovrh

Directora: Dra. Elida González

Codirectora: Dra. Alicia Jawerbaum

Centros de Estudios Farmacológicos y Botánicos  
(CEFYOBO)

Marzo 2000



## AGRADECIMIENTOS

A Elida y Alicia por guiarme en los primeros pasos de la investigación con dedicación, paciencia y respeto, por el cariño y la contención que me brindan todos los días.

A Marita y Debora por su ayuda incondicional y su preciosa amistad.

A Verónica, Jorge, Alejandro, Elisa, Mariana, Virginia, Mercedes, Diego, Rami, Alicia Motta, Alicia Faletti por socorrerme en todos los momentos con la mayor de las voluntades.

A mis padres, Gloria y Carlos, por su amor y por su esfuerzo.

A mis hermanos Pablo e Iván, por su cariño y apoyo.

A mis tíos Luciano, Olga, Juan Carlos, Rina y mi prima María Rita, por con su cariño y su compañía.

A mis amigos: Hernán, Florencia, Mónica, Silvina y Emilia, por los buenos momentos compartidos, por contenerme en los momentos difíciles, y por todo el cariño que me brindan.

Agradezco especialmente la colaboración brindada por los Doctores: Mario Pesaresi, Mario Baier, Sabina Gotusso y Paula Micone pertenecientes a la División Tocoginecología, Departamento Materno Infantil, Hospital General de Agudos Carlos Durand. Y al Dr. Luis Voloschin, Laboratorio de Investigaciones en Neuroendocrinología de la Reproducción Humana (LINERH-CONICET).



## INDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>2</b>
METALOPROTEASAS	2
IMPLANTACION EMBRIONARIA	5
PLACENTA	9
OXIDO NITRICO	12
RADICALES LIBRES DEL OXIGENO	14
DIABETES MELLITUS	17
<b>HIPOTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>21</b>
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	<b>22</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>27</b>
<i>Capítulo 1: ACTIVIDAD DE LA METALOPROTEASA 2 DURANTE LA IMPLANTACION DEL TROFOBLASTO Y SU MODULACIÓN POR OXIDO NÍTRICO EN LA RATA.</i>	<b>27</b>
<i>Capítulo 2: ACTIVIDAD DE LA METALOPROTEASA 9 EN EL TEJIDO PLACENTARIO HUMANO A TERMINO.</i>	<b>32</b>
<i>Capítulo 3: REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE MMP9 EN EL TEJIDO PLACENTARIO DE GESTANTES DIABÉTICAS PREGESTACIONALES.</i>	<b>38</b>
<i>Capítulo 4: REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE MMP9 EN EL TEJIDO PLACENTARIO DE PACIENTES DIABETICAS GESTACIONALES.</i>	<b>49</b>
<b>DISCUSION</b>	<b>59</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>65</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>67</b>

## RESUMEN

En el presente trabajo evaluamos el rol de las gelatinasas, enzimas pertenecientes a la familia de las metaloproteasas, durante la implantación embrionaria y en el tejido placentario a término.

Los resultados obtenidos indican que la actividad de la MMP2 se encuentra aumentada en los días que rodean a la implantación embrionaria en la rata, siendo este un fenómeno local, ya que la actividad de la enzima es mayor en los sitios de nidación. Durante el período de implantación se describe un aumento de la actividad de la enzima sintetizadora de óxido nítrico, el cual modula la permeabilidad y la vasodilatación vascular. Al evaluar una posible regulación de la actividad de la MMP2 por NO encontramos que existe un efecto positivo sobre la misma.

Otro proceso en el cual las metaloproteasas tienen una importante participación, es el desarrollo y mantenimiento de la función placentaria. En la placenta humana la actividad de la MMP9 se encuentra aumentada hacia el final de la gestación. Con el objeto de comprender las anomalías reproductivas inducidas por la patología diabética, se caracteriza la actividad de la MMP9 en tejido placentario sano y de gestantes que sufren diabetes pregestacional y gestacional. Encontramos que ésta se presenta alterada por la patología diabética. Se observa un aumento de actividad en el caso del órgano proveniente de mujeres diabéticas pregestacionales y una disminución en el tejido placentario a término de pacientes diabéticas gestacionales.

Estudiamos asimismo que el NO modula la actividad MMP9 en tejido placentario de mujeres sanas y diabéticas pregestacionales, lo cual no ocurre en el caso de las diabéticas gestacionales. En la preñez a término los niveles de NO se encuentran incrementados, facilitando la adecuada perfusión sanguínea del órgano placentario. En el caso de las placentas diabéticas sus valores se encontraron aumentados por encima del nivel normal.

Por otro lado, el incremento de radicales libres de oxígeno es un emergente de la patología diabética, y nuestros experimentos demuestran que las especies oxigenadas aumentan la actividad de la MMP9.

De esta forma, tanto los niveles de NO como los de radicales libres de oxígeno pueden modificar la actividad de las metaloproteasas en la placenta normal, determinando anomalías en la actividad de la metaloproteasa en la placenta diabética.



# INTRODUCCION

## 1). METALOPROTEASAS:

### *Características y clasificación*

Las metaloproteasas (MMPs) representan una familia de enzimas, estructural y funcionalmente emparentadas, responsables de la degradación (por proteólisis) de los componentes de la matriz extracelular (MEC), como son la membrana basal o el estroma extracelular.

Siendo importantes participantes de la remodelación del tejido sano, sus potenciales efectos peligrosos están altamente regulados a diferentes niveles. A nivel transcripcional la expresión de las MMPs es finamente controlada por varias citoquinas que actúan a través de la regulación positiva o negativa de sus genes. La activación de las metaloproteasas es regulada post-transcripcionalmente por activación proteolítica de las proenzimas latentes y por la interacción específica con inhibidores tisulares (TIMPs).

La matriz extracelular es una compleja red compuesta por proteínas constituyentes incluyendo colágeno y elastina, glicoproteínas como laminina, fibronectina, entactina y nidogén, así como varios proteoglicanos y glucosaminaglicanos, todos ellos conformando la arquitectura de la membrana basal y el estroma intersticial.

La integridad de la MEC es controlada por un equilibrio dinámico entre la síntesis y la degradación local de distintos componentes. Se considera que las MMPs son relevantes en los procesos fisiológicos de degradación de la matriz (Woessner, 1991).

Los distintos miembros de la familia MMPs han sido identificados por cADN y secuenciados. Las metaloproteasas se dividen tradicionalmente en tres subfamilias basadas en el sustrato específico que degradan:

- 1) Colagenasas (MMP1, MMP8, MMP13, MMP18) con una preferencia por el colágeno fibrilar.

- 2) Gelatinasas (MMP2 y MMP9) con una preferencia por el colágeno tipo IV o colágeno desnaturalizado (gelatina).
- 3) Estromelisininas (MMP3, MMP10 y MMP11) que degradan una amplia variedad de sustratos de la MEC, como proteoglicanos, laminina o fibronectina.

También han sido identificados otros miembros de esta familia:

- \* MMP integrales de membrana (MMP14 o MT1-MMP, MMP15, MMP16 y MMP17).
- \* Matrisilina (MMP7), Metaloelastasa (MMP12), MMP19, Enamelisina (MMP20).

Todos los miembros de la familia son secretados como proenzimas inactivas. Requieren  $\text{Zn}^{2+}$  intrínseco y  $\text{Ca}^{2+}$  extrínseco para su completa actividad. Además, son inhibidas *in vivo* por proteínas específicas, inhibidores tisulares de las metaloproteasas (TIMPs), e *in vitro* por agentes quelantes. (Woessner, 1991; Matrisian, 1992; Stetler-Stevenson y col., 1993).

#### *Función de las metaloproteasas*

Si bien el rol exacto de las MMPs no ha podido aún ser elucidado en detalle, estas enzimas están involucradas tanto en procesos fisiológicos como patológicos.

La actividad o expresión de las metaloproteasas está asociada a procesos de remodelación del tejido normal, como en el embarazo, el parto (Jeffrey, 1991), la dilatación del segmento bajo del útero (Rechberger y Woessner, 1993), la invasión de trofoblastos dentro del estroma endometrial (Cross y col., 1994), la involución de la glándula mamaria (Talhouk y col., 1992), la reabsorción ósea (Delaisse y col., 2000) y el proceso de angiogénesis (Liotta y col., 1991), entre otros.

Por otra parte las MMPs contribuyen al fenotipo de condiciones patológicas severas que están asociadas con la degradación progresiva de la matriz extracelular como osteoartritis (Brinckerhoff, 1992), enfermedad periodontal (Brinkedal-Hansen, 1993), inflamación (Baugh y col., 1999) y metastasis tumoral (Stetler-Stevenson y col., 1993).

No es sorprendente que las células involucradas en estos procesos patológicos sean potentes productores de MMPs, como lo son las células del tejido conectivo (fibroblastos, osteoblastos, condrocitos), células endoteliales, neutrófilos, macrófagos y células tumorales, entre otras.

### *Gelatinasas*

Como mencionamos anteriormente esta subfamilia está compuesta por dos miembros, la gelatinasa A de 72 KDa. (metaloproteasa 2) y la gelatinasa B de 92 KDa. (metaloproteasa 9). Estas clivan al colágeno tipo IV, importante componente de la membrana basal (Bonfil, 1998) que representa una barrera impermeable para la migración celular.

La gelatinasa A es la única MMP que es expresada constitutivamente por muchas células, y posee una distribución tisular ubicua. En su pasaje de proenzima a enzima activa participa una metaloproteasa de membrana, MT-MMP1. (Sato y col., 1994).

Recientes descubrimientos sugieren que la MMP2 activa está involucrada en la iniciación o regulación de respuestas celulares tales como proliferación, adhesión y migración. Esto modifica el concepto previo de las MMPs como simples removedoras de la MEC.

La gelatinasa B (MMP9), a diferencia de la MMP2 que es constitutivamente expresada en bajos niveles por muchas células, es normalmente expresada solo por los trofoblastos, osteoclastos, neutrófilos y macrófagos. Sin embargo esta expresión puede ser altamente inducida en una variedad de células por muchos agentes, incluyendo factores de crecimiento, citoquinas, moléculas de la MEC, moléculas de adhesión celular y agentes que alteren la forma de la célula.



### *Las gelatinasas y su relación con los procesos de implantación y el tejido placentario a término.*

Durante la implantación, el trofoblasto embrionario invaden el epitelio úterino. Este proceso requiere una extensiva degradación y remodelación de la MEC. Hay evidencias importantes de que las gelatinasas están involucradas en este proceso. Tanto la gelatinasas A como B han sido detectadas en trofoblastos de rata y humanos en cultivo (Librach y col. 1991)

El sinciciotrofoblasto humano cumple diferentes roles. A lo largo de la gesta participa en el transporte de nutrientes, metabolitos e inmunoglobulinas desde la circulación maternal a la fetal, y también como órgano endócrino y paracrino, secretando hormonas esteroideas y proteicas (Kliman,1985), y también poderosos agentes vasoactivos que actúan regulando el flujo de sangre materno-fetal.(Wetzka, B. Y col., 1996; Graf y col.,1996).

La gestación está asociada con un gran crecimiento y remodelación del útero y la placenta, y restructuración de estos tejidos durante estadíos específicos del embarazo, procesos en los cuales se encuentran involucradas varias metaloproteasas, entre ellas, la MMP9 (Vettriano y col., 1996). En la placenta humana esta gelatinasa es producida por las células residentes en la misma, particularmente los trofoblastos.

## **2). IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA**

La implantación embrionaria en los mamíferos es el resultado de la interacción entre dos tejidos, el endometrial y el trofoectodermo, que comienza con la fijación del blastocisto en el útero y culmina con la formación de un nuevo tejido, la placenta.

Son diversos los procesos de origen uterino que influyen sobre la implantación en mamíferos primates y no primates (Weitlauf, 1994; Guillomot y col., 1993; Hodgen y Itskovitz, 1998), aunque los mecanismos no han sido enteramente elucidados.

En todas las especies de mamíferos, el punto de contacto entre el blastocisto y el tejido materno está dado por las células del epitelio luminal del útero. Hay variaciones



importantes en la organización de dicho epitelio, el cual durante el ciclo reproductivo sufre diferentes cambios en la morfología celular y en su actividad metabólica. Estos cambios, tales como la proliferación celular, expresión de receptores a hormonas, aumento en la tasa de metabolismo y en la síntesis proteica, están regulados por hormonas esteroides (Strauss y Gurpide, 1992).

Es evidente entonces que, para que la implantación ocurra, se requieren cambios hormonales precisos que permitan al útero adquirir una capacidad potencial de sufrir la “reacción decidual” y es el embrión el que inducirá finalmente la autólisis de las células epiteliales y la decidualización de células del estroma.

En la rata los cambios hormonales previos a la implantación consisten en:

- 1) Un pre-estímulo con estradiol (proestro), el cual permite iniciar los cambios en el endometrio.
- 2) Secreción luteal de progesterona durante los primeros cuatro días de gestación, lo cual va a inducir la maduración del endometrio mediante proliferación, diferenciación celular y la expresión de receptores a esteroides y
- 3) Un pico estrogénico en la mañana del día 4 de preñez (día previo al de la implantación).

Este pico nidatorio de estrógenos induce el estado secretorio y de receptividad del endometrio hacia el estímulo de decidualización del embrión (Weitlauf, 1994; Hodgen y Itskovitz, 1988).

Posteriormente, el mantenimiento de las células deciduales requiere de una continua secreción de progesterona. Durante la implantación y en el período post-implantación ésta proviene del cuerpo lúteo, que es “rescatado” por señales embrionarias. Luego, en ratas y humanos, los esteroides secretados por la unidad fetoplacentaria son suficientes para mantener la gestación (Hodgen y Itskovitz, 1988).

La nidación entonces, sólo puede iniciarse cuando el embrión y el endometrio han alcanzado un estado preciso de sincronización. El blastocisto debe despojarse de la zona pelúcida, y el endometrio debe hacerse receptivo bajo control hormonal (Hodgen y Itskovitz, 1988). Además existen interacciones blastocisto-útero que ocurren durante la

implantación y modulan el desarrollo embrionario por un lado, y la receptividad uterina por el otro. Estas interacciones son mediadas por factores de crecimiento, moléculas de adhesión, citoquinas, etc.(Weitlauf, 1994).

En este periodo de receptividad uterina del embrión, el epitelio presenta una serie de cambios morfológicos en su superficie, como la pérdida de sitios aniónicos (que implican menor repulsión) (Hewitt y col., 1979), la reducción del glicocalix (que implica menor distancia para el contacto de los epitelios), la expresión de moléculas de adhesión celular (con lo que se hace más receptivo al blastocisto).

Estos cambios ocurren en un espacio de tiempo preciso llamado “ventana de implantación”(Hewitt y col., 1979). En la rata esta ventana temporal es entre los días 5 y 6 de gestación. Luego el tejido uterino se hace refractario a la presencia del embrión aún si se inserta artificialmente un blastocisto maduro (Weitlauf, 1994).

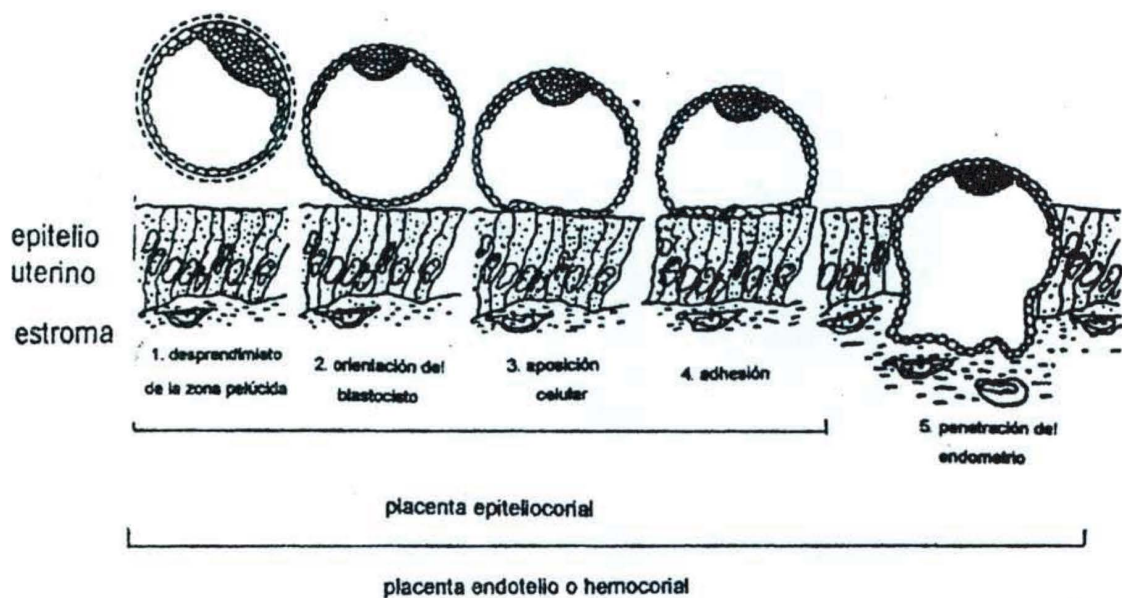
#### *Secuencia de eventos en el proceso implantatorio embrionario*

En el proceso implantatorio en mamíferos, ocurre sucesivamente la aposición de las superficies del trofodermo del blastocisto y del epitelio endometrial, que va a asegurar el anclaje del blastocisto en la cavidad uterina. Las membranas apicales de ambos entran en contacto íntimo a través de la reducción de las microvellosidades. Luego, la adhesión de las capas celulares adyacentes, interdigitación de las microvellosidades y formación de desmosomas entre ambas superficies, permiten al blastocisto quedar fijado al tejido materno. Finalmente se produce la invasión del trofoblasto dentro del endometrio uterino.(Figura I) (Hewitt y col., 1979).

El mecanismo por el cual el blastocisto penetra el epitelio y la lámina basal dependiera de la especie en cuestión y de la estructura tisular particular (Guillomot y col., 1993). En los roedores las células epiteliales se autolisan y son fagocitadas por el trofoblasto. En humanos se forman sincicios comunes con núcleos maternos y trofoblásticos, con propiedades invasivas y de migración. Por otro lado, existen distintos tipos de placentación. En roedores y en humanos es de tipo hemocorial ya que el trofoblasto



invade la lámina basal epitelial y penetra el tejido endometrial estableciendo una relación vascular definitiva con la madre.



**Figura I:** Esquema representando las distintas fases de la implantación en los mamíferos.

El disco embrionario ha sido arbitrariamente localizado en el lado opuesto al sitio de implantación. La fase 4 es la última fase de implantación en especies que presentan placentación de tipo epicorial.

(Reproduction in Mammals and Man, Edited by C.Thibault, M.C. Levasseur, R.H.F. Hunter. Ellipses, Paris, 1993, capítulo 20).

### 3). PLACENTA

#### *Desarrollo de la placenta humana*

En humanos, el crecimiento sostenido del sincicio produce la erosión del endometrio. Este proceso permite la penetración profunda del blasticisto en la pared del mismo, y hacia el décimoprimer día de la gestación el epitelio endometrial cambia morfológicamente en la zona que corresponde al sitio de implantación.

La erosión sostenida del endometrio muy vascularizado por los sinciciotrofoblastos produce asimismo erosión de los vasos sanguíneos maternos. La sangre de estos vasos se vacía en las lagunas de los sinciciotrofoblastos que rodean al embrión. De tal forma, la sangre materna ofrece nutrición para el desarrollo embrionario. Con el crecimiento y el desarrollo posteriores empieza a formarse la placenta, produciendo la separación resultante entre la sangre del embrión en desarrollo y la proveniente de la madre.

El corion se desarrolla a partir de células trofoblásticas y evoluciona hasta convertirse en la placa coriónica, que origina las vellosidades coriónicas.

Por su parte, los trofoblastos inducen cambios en el endometrio vecino, modificándolo para que se inicie la formación de la zona materna de la placenta. Este tejido materno alterado, llamado decidua, se subdivide en tres regiones: decidua capsular, decidua basal y decidua parietal.

- La decidua capsular queda interpuesta entre la luz uterina y el embrión en desarrollo.
- La decidua parietal, es la región del endometrio que reviste las paredes del útero en otras partes que no sean el sitio de adhesión del corion. No participa en la formación de la placenta discoidal al igual que la decidua capsular.
- La decidua basal queda interpuesta entre el embrión en desarrollo y el endometrio, forma la porción materna de la placenta.

Al principio todo el embrión está rodeado por la decidua que lo va a nutrir. La región del corion en contacto con la decidua capsular formará vellosidades cortas y de poca



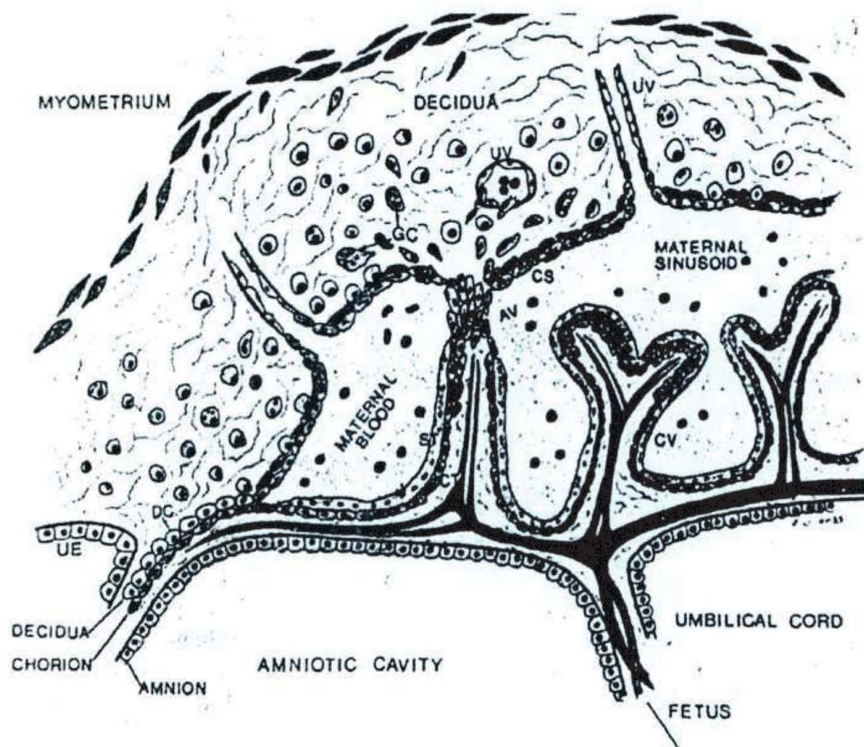
importancia, y por lo tanto su superficie permanecerá lisa; esta región del corion se conoce como *corion leve*.

La región de la placa coriónica en contacto con la decidua basal formará vellosidades coriónicas extensas, llamadas vellosidades primarias; por tanto, esta región del corion se conoce como *corion frondoso*, parte embrionaria de la placenta. Las vellosidades primarias están compuestas tanto por sinciotrofoblastos como por citotrofoblastos.

Con el desarrollo posterior, las células mesenquimatosas extraembrionarias entrarán en el centro de la vellosidad primaria, y la convertirán en vellosidades secundarias. El tejido conectivo de la vellosidad secundaria quedará vascularizado por lechos capilares extensos, que se unirán al lecho vascular en desarrollo del embrión.

Conforme prosigue el desarrollo, la población de citotrofoblastos disminuirá su crecimiento. La decidua basal formará grandes espacios vasculares, o lagunas, que quedarán divididas por los tabiques placentarios en compartimientos más pequeños, que son extensiones de la decidua. Las vellosidades secundarias se proyectarán hacia estos espacios vasculares y quedarán rodeados por la sangre materna, que se descarga y drena desde las lagunas por los vasos sanguíneos maternos de la decidua basal. La **figura II** (Lala, P.K., and Hamilton, G.S. (1996). Growth factors, proteases and protease inhibitors in the maternal-fetal dialogue. Placenta 17:546), representa en forma esquemática a la placenta a fin del primer trimestre de gestación. La mayor parte de las vellosidades no están fijas a la decidua basal, sino suspendidas en la sangre materna de las lagunas, y se conocen como vellosidades libres. Las vellosidades fijas a la decidua basal se llaman vellosidades de fijación o anclaje. Los capilares de las vellosidades libres y de anclaje se encuentran cerca de la superficie de la vellosidad, y están separados de la sangre materna por una pequeña cantidad de tejido conectivo y por los sinciotrofoblastos, que cubren a la vellosidad secundaria. Por tanto, la sangre materna y fetal no se mezclan. Nutrientes y oxígeno difunden y se transportan desde la sangre materna a través de los sinciotrofoblastos, el tejido conectivo y las células endoteliales de los capilares de las vellosidades para llegar a la sangre fetal. Estas estructuras forman lo que se ha llamado *barrera placentaria*.

La placenta no es sólo el sitio en el que se intercambian las sustancias nutritivas, productos de desecho y gases entre la sangre materna y fetal, pues, específicamente a nivel del sincitiotrofoblasto, es fundamental su función como órgano endócrino que secreta gonadotrofina coriónica humana, tirotrófina coriónica, progesterona, estrógenos y somatomamotrofina coriónica (hormona promotora del crecimiento y lactogénica). El tejido placentario también presenta función paracrina, sintetizando y secretando factores que regulan el flujo materno-fetal: prostaciclina y tromboxano (potentes reguladores del tono vascular) (Wetzka y col, 1996) y Endotelina I, cuya acción es crítica sobre el desarrollo y el crecimiento fetal. (Graf y col, 1996). Otro de los agentes secretados por las células deciduales es la relaxina, que se sugiere puede estar involucrada en la degradación de la MEC de las membranas fetales causando la activación de una cascada enzimática, dando por resultado final la actividad de la MMP9 (Qin, y col. 1997).





**Figura II: Diagrama esquemático que muestra la placenta al finalizar el tercer mes de gestación.**

Se muestran las relaciones de las vellosidades coriónicas y los trofoblastos con los tejidos maternos de la placenta. AV, vellosidad de anclaje mantiene conectada la placenta a la pared uterina; EVT, células trofoblásticas migrando hacia la punta de la vellosidad, columna celular, van a formar la capa de citotrofoblasto (CS), una capa ordenada de células o dispersas dentro del decidua como células intersticiales aisladas de trofoblasto que son altamente invasoras. Otras EVT invaden las venas uterinas, reemplazando el endotelio. Algunas EVT pueden invadir hasta el miometrio. CV: vellosidad coriónica; CT: citotrofoblasto; ST: sincitiotrofoblasto; DC: células deciduales; UE: epitelio uterino; UV: vasos sanguíneos uterinos. (Lala, P.K., and Hamilton, G.S., 1996. Growth factors, proteases and protease inhibitors in the maternal-fetal dialogue. *Placenta* 17:546).

#### **4). OXIDO NITRICO**

##### *Características generales*

El radical libre óxido nítrico (NO) es generado por la enzima Óxido Nítrico Sintasa (NOS), que convierte la L-arginina en L-citrulina y en NO en cantidades equimolares en presencia de  $O_2$  y NADPH. Luego el NO es rápidamente metabolizado por oxidación para dar nitratos y nitritos.

El óxido nítrico es un importante mediador biológico cuya vida media es de 7 segundos. Puede generar peroxinitritos, cuando se combina con radicales libres de oxígeno, que son agentes de alta toxicidad para la célula por su capacidad de nitrosilar proteínas (Ding y col., 1988; Miller y col., 1996).

La enzima NOS es un homodímero con un grupo hemo. Pertenece a la familia de los citocromos-P450, y utiliza como cofactores la tetrahidrobiopterina, la flavina adenilato dinucleótido (FAD) y la flavina mononucleótido (FMN).

Existen básicamente tres isoformas de la enzima NOS: El tipo I aislado de cerebro (cNOS), el tipo II aislado en macrófagos (iNOS) y el tipo tres aislado en el endotelio vascular (eNOS).

Tanto el tipo I como el III son constitutivas y calcio/calmodulina dependientes. El tipo II (forma inducible) es expresado en respuesta a diferentes factores como las citoquinas o endotoxinas y su actividad es calcio/calmodulina independiente.

Por lo general las enzimas constitutivas se asocian con la síntesis basal de NO mientras que la inducible estaría asociada a niveles mayores de síntesis de óxido nítrico en procesos inflamatorios e infecciosos (Kenneth, 1996) y también a determinados procesos fisiológicos como puede ser la ovulación y la implantación embrionaria (Shukovski y Tsafiriri, 1994; Novaro y col., 1997).

#### *Inhibidores de la síntesis de óxido nítrico*

Los glucocorticoides inhiben la expresión génica de la enzima iNOS, bloqueando la inducción de la misma en diferentes tejidos “*in vivo*”, sin afectar la actividad de la isoforma constitutiva de la NOS (Knowles y col., 1990).

El N<sup>w</sup>-nitro -L-arginina metil ester (L-NAME) y el N<sup>G</sup>-mono-Metil-L-Arginina (L-NMMA) inhiben competitivamente (son análogos del sustrato L-arginina) a las 3 isoformas de la NOS (Knowles y Moncada, 1994).

La Aminoguanidina (AG) inhibe competitivamente en forma selectiva a la isoforma inducible (Misko y col., 1993).

#### *Efectos biológicos del óxido nítrico*

El NO es mediador de múltiples funciones biológicas. Actúa como neurotransmisor, es un poderoso relajante del músculo liso en diversas especies (Kaley y Koller, 1995; Magness y col., 1997; Förstermann y col., 1994), media la citotoxicidad de los macrófagos (Förstermann y col., 1994), inhibe la agregación plaquetaria y la proliferación celular del músculo liso vascular (Norman y Cameron, 1996), modula el tono vascular aumentando el flujo sanguíneo (Norman y Cameron, 1996; Diket y col., 1994; Förstermann y col., 1994; Sladek y col., 1997), participa en los procesos de

necrosis, apoptosis y degradación de la matriz extracelular (Buhimschi y col., 1996) y en remodelado tisular, inflamación y daño tisular (Miller y col., 1996; Tasikiran y col., 1994, Evans, 1995).

Ha sido ampliamente demostrada su participación en eventos reproductivos tales como la ovulación (Bonello y col; Shukovski y Tsafiriri, 1994), la implantación (Novaro y col., 1997), y el parto (Buhimschi y col., 1996; Natuzzi y col., 1993; Yallampalli y col., 1993). Durante la gesta, niveles elevados de NO modulan la perfusión sanguínea placentaria, favoreciendo el desarrollo del embrión (Miller y col., 1996; Diket y col., 1994; Förstermann y col., 1994).

#### **4). RADICALES LIBRES DEL OXÍGENO**

##### *Formación de productos de reducción parcial del oxígeno*

La etapa final de la cadena respiratoria es la reducción de una molécula de oxígeno por la cesión de cuatro electrones ( $O^{2-}$ )<sub>2</sub>. La convergencia simultánea de cuatro electrones a este punto terminal es de gran importancia, pues si la reducción del oxígeno no es completa se forman productos tóxicos, con acción deletérea sobre moléculas constituyentes de las células.

Esos productos tóxicos son el peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) y los radicales libres superóxido ( $O_2^-$ ) e hidroxilo ( $HO\cdot$ ). El peróxido de hidrógeno y el anión superóxido se forman en reacciones que normalmente ocurren en el organismo. El anión superóxido es resultado de una reducción incompleta del oxígeno (una molécula de oxígeno adquiere un electrón); los radicales hidroxilos se generan por interacción del peróxido de hidrógeno con el anión superóxido:





Los radicales hidroxilo son mucho más reactivos que el peróxido de hidrógeno y el anión superóxido y, por lo tanto, son más tóxicos. Se cree que la toxicidad del  $O_2^-$  y el  $H_2O_2$  se debe a su capacidad de generar radicales hidroxilo.

Los efectos nocivos de estos radicales se ejercen sobre diferentes componentes celulares, como ADN, proteínas, lípidos y diversas enzimas: a) producen ruptura de ADN y modificaciones de sus bases nitrogenadas; b) oxidan grupos sulfhidrilos de proteínas (se forman enlaces S-S), alterando la estructura de la molécula; c) atacan ácidos grasos insaturados de lípidos componentes de membranas (formación de peróxidos). Esto causa, además de cambios conformacionales, disminución de la hidrofobicidad de las cadenas hidrocarbonadas y desestabiliza las membranas celulares, alterando su composición y fluidez. Por otra parte, los hidroperóxidos formados actúan como inhibidores de ciertas enzimas, por ejemplo enzimas del ciclo de Krebs como la Aconitasa. (Morton y col., 1998).

En procesos inflamatorios, algunos de causa autoinmune, los radicales libres de oxígeno son causa de daño tisular. Estos agentes han sido implicados como factor de envejecimiento.

Algunos  $O_2^-$  son producidos *in vivo* por activación de células fagocíticas. Muchas enzimas han sido identificadas como capaces de reducir el  $O_2$  a  $O_2^-$  (peroxidasa, produce  $O_2^-$  durante la reacción de oxidación; triptofano dioxigenasa y aldehído oxidasa, ambas presentes en hígado; Oxido Nítrico Sintetasa, libera  $O_2^-$  cuando los niveles de arginina son bajos) (Halliwell y Gutteridge, 1999,a) Pero de todas ellas la mejor estudiada es la Xantina Oxidasa, derivada de la purificación de la enzima xantina deshidrogenasa que cataboliza la oxidación de xantina en hipoxantina transfiriendo un electrón desde el sustrato al  $NAD^+$ , este mecanismo se encuentra distribuido ampliamente en el citosol de las células animales, pero no produce  $O_2^-$  normalmente *in vivo*. Sin embargo la conversión deshidrogenasa-oxidasa puede ocurrir cuando hay injuria tisular (Halliwell y Gutteridge, 1999a).

### *Enzimas antioxidantes*

Dada la toxicidad del peróxido de hidrógeno y de los radicales libres superóxido e hidroxilo, el organismo dispone de mecanismos eficaces de protección. En condiciones normales la concentración de estos agentes se mantiene en niveles muy bajos. Los principales mecanismos de defensa son:

a) Los aniones superóxido son eliminados en una reacción catalizada por la enzima Superóxido Dismutasa. En la reacción participan dos aniones superóxido y dos protones:



Se forma producto de esta reacción  $\text{H}_2\text{O}_2$  que también es un producto tóxico y debe ser eliminado. La SOD presenta dos isoformas la citosólica dependiente de Zn y Cu, y la que se encuentra en hígado dependiente de Mn.

b) La descomposición del peróxido de hidrógeno es catabolizada por la Catalasa, hemoproteína existente en casi todas las células, particularmente en el hígado, riñón, médula ósea y glóbulos rojos. La catalasa se encuentra en los peroxisomas, y cataliza la reacción:



c) la enzima Glutatión Peroxidasa, que cataboliza la reducción de hidroperóxidos orgánicos (ROOH) y de peróxido de hidrógeno en reacciones en la que participa el glutatión (GSH):



La glutatión peroxidasa está localizada en el citosol y en las mitocondrias. Esta enzima ayuda a mantener muy baja la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en los tejidos; convierte los ácidos



grasos peroxidados (ROOH) en derivados hidroxilados (ROH) y también puede revertir la oxidación de grupos sulfhidrilos. El glutatión oxidado (GSSG) es reducido por la Glutatión reductasa, enzima que utiliza NADPH como dador de equivalentes de reducción.

## **5). DIABETES MELLITUS**

### *Consideraciones generales de la enfermedad*

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica muy común ya que afecta al 1-2 % de la población mundial.

Hay dos tipos principales de diabetes, la insulino-dependiente o tipo I y la no-insulino-dependiente (NIDDM) o tipo II (Metzger, 1991; National Diabetes Data Group, 1979). La primera afecta a la cuarta parte de la población diabética y es la más severa.

Actualmente se sabe que la predisposición a padecer la diabetes tipo I es hereditaria. La diabetes tipo II es la más difundida y también presenta predisposición genética. Para el desarrollo de la enfermedad se requieren, además de una susceptibilidad genética, ciertos factores ambientales, tales como la excesiva ingesta de calorías y la obesidad.

La diabetes tipo II tiene su inicio luego de un estado prediabético, caracterizado por una relativa deficiencia en la secreción de la insulina. Inicialmente el defecto secretorio en las células  $\beta$  pancreáticas ocurre específicamente ante el estímulo de la sobrecarga de glucosa, pero con el tiempo se desarrolla la enfermedad en sí, principalmente en individuos mayores a 35-45 años (Efendic y col., 1984). Se detecta mediante curvas de tolerancia a la glucosa, ya que las glucemias basales pueden no estar alteradas. Una vez desarrollada la patología, se observa deficiente secreción de la insulina, y frecuentemente resistencia periférica a la hormona y obesidad (Mallof y Boyd, 1986). La resistencia periférica a la insulina implica fallas a nivel del receptor periférico de insulina, de forma tal que se necesita secretar cada vez más hormona en respuesta a la misma sobrecarga de glucosa, para normalizar la glucemia.



La patología diabética está acompañada por una serie de desórdenes vasculares y metabólicos causados por la hiperglucemia (Wentzel y col., 1995). Tal es el caso del adelgazamiento vascular de la membrana capilar que provoca un consecuente aumento de la permeabilidad vascular sistémica, la angiopatía, la retinopatía y la nefropatía (Williamson y col., 1993).

Cabe destacar que el estrés oxidativo juega un papel central en el daño tisular asociado con la diabetes. Posiblemente las fuentes de estrés oxidativo en la diabetes incluyan cambios en el balance redox (óxido-reducción) resultado de la alteración del metabolismo de los lípidos e hidratos de carbono, aumentando la generación de RLO de los niveles de antioxidantes.(Halliwell y Gutteridge, 1999,b). De igual manera se generan radicales libres de oxígeno a través de la autooxidación de glucosa, la vía de polioles, aumento en los niveles de prostaglandinas y glicosilación de proteínas (Gutteridge y col., 1990; Brownlee y col.; 1988).

Niveles de glucosa elevados inducen asimismo peroxidación lipídica, los peróxidos lipídicos en plasma de los pacientes diabéticos aparecen aumentados ( Halliwell y Gutteridge, 1999,b). Los mecanismos de defensa celular se encuentran drásticamente alterados en la patología diabética. Acompañando al aumento de RLO se puede observar mayor actividad SOD (Gandy y col, 1982; Uchigata y col., 1982; Kakkar y col., 1997), o menor actividad SOD, dependiendo del tejido, y el tiempo de desarrollo de la patología (Samuel, 1982; Wohaib y Godin, 1987).

#### *Alteraciones reproductivas en la diabetes mellitus*

La diabetes mellitus afecta la función reproductiva materna a diferentes niveles dependiendo de su severidad. Son complicaciones frecuentes la esterilidad, abortos espontáneos, muerte fetal intrauterina, macrosomía fetal y malformaciones congénitas que se observan en el 6-8 % de los hijos de madre diabética, tres veces más frecuentemente que en la población general (Eriksson y Hakan Borg, 1993). Se

observan también complicaciones en el trabajo de parto, toxemia y polihidroamnios (Pedersen y Molsted-Pedersen, 1981; Eriksson y Hakan Borg, 1993).

La causa de estas alteraciones radica en que las modificaciones fisiológicas propias del metabolismo durante el embarazo se ven agravadas como consecuencia de la hiperglucemia materna (Buchanan, 1991; O' Sullivan y col., 1973, Metzger, 1991). En épocas anteriores al auge de la terapia insulínica había una alta mortalidad materna, infertilidad, y pérdida fetal. El control glucémico con insulina revierte muchas alteraciones metabólicas maternas, pero tanto la gestación como el parto continúan presentando complicaciones en esta patología.

Dos modalidades de diabetes pueden presentarse en el embarazo: La **diabetes pregestacional**, en la cual la patología diabética es previa a la gestación y es principalmente tipo I; y la **diabetes gestacional**, que se desarrolla en algunas mujeres durante el embarazo cuando su páncreas no es capaz de compensar el mayor requerimiento insulínico inducido por las hormonas placentarias, y que se detecta a partir de la semana 20 de gestación. Se sabe que muchas de las mujeres con diabetes gestacional normalizaran sus glucemias durante el post parto, pero un alto porcentaje presentará diabetes tipo II en los años subsiguientes.

Modelos experimentales de diabetes han permitido comprender que múltiples sustancias y factores participan en el desarrollo de las anomalías placentarias y embrionarias durante la gesta. Estudios realizados en nuestro laboratorio muestran que existen anomalías ovocitarias, del embrión temprano y del embrión en etapa de organogénesis temprana en la diabetes experimental tipo I y tipo II (Jawerbaum y col., 1998b; Jawerbaum y col., 1998a, Novaro y col., 1998). Se considera que en la aparición de malformaciones inducidas por la diabetes tienen importancia los anómalos niveles de prostaglandinas, de óxido nítrico y de radicales libres de oxígeno (Jawerbaum y col., 1998b; Eriksson y Hakan Borg, 1993). El tejido uterino se encuentra afectado tanto a nivel metabólico como funcional en la rata diabética no preñada y durante la gesta (Jawerbaum y col., 1994; Jawerbaum y col. 1995; Gonzalez y col., 1996). En este tejido se encuentran elevados los niveles de óxido nítrico, y la producción de prostaglandinas (Novaro y col., 1998). En cuanto al tejido placentario, la diabetes modifica la



producción de prostaglandinas de forma tal que se incrementa el TXA<sub>2</sub> (prostanoides vasoconstrictor) y disminuyen los niveles de prostaciclina (prostaglandina vasodilatadora), perjudicando de esta forma el transporte de nutrientes materno fetal (Jawerbaum y col., 1996, Jawerbaum y col., 1997). Es interesante también que estas anomalías son inducidas por la hiperglucemia en tejido de rata sana (Jawerbaum y col., 1998c) y que además inhibidores de la óxido nítrico sintasa disminuyen los niveles de prostanoïdes vasoconstrictores (Jawerbaum y col., 1998a).

Dadas que las anomalías se inducen en la diabetes desde la concepción, en mujeres gestantes los mejores resultados en cuanto al desarrollo fetal se logran cuando el tratamiento insulínico tiene el efecto deseado desde el período preconcepcional y durante el período de desarrollo de órganos. Si bien es claro que cuanto mejor es el control metabólico, mejor es el desarrollo y función placentaria a término, no están aún clarificados los mecanismos íntimos que afectan el proceso de maduración placentaria en la diabetes.

Se considera de interés evaluar los niveles de metaloproteasas (cuya participación en los procesos de remodelación tisular son conocidos) en la placenta de mujeres diabéticas a término, y su modulación por NO. En este sentido, se ha descripto que en pacientes con diabetes gestacional, la expresión de la iNOS está aumentada en las placentas a término en las células endoteliales y trofoblastos, probable causa de desórdenes vasculares.

Dados estos antecedentes, se plantean como *hipótesis* de trabajo:

La actividad de la metaloproteasa 2 (gelatinasa A) se encontraría aumentada durante la implantación embrionaria, y el óxido nítrico regularía la actividad de esta gelatinasa. De esta forma, el NO y la MMP2 participarían en el proceso implantatorio facilitando la invasión del trofoblasto embrionario.

En la remodelación tisular que ocurre en tejido placentario humano a término, participaría la metaloproteasa 9 (gelatinasa B), cuya actividad estaría modulada por óxido nítrico y por radicales libres de oxígeno.

En este contexto los *objetivos* del presente trabajo serán:

- A) Evaluar la actividad de la MMP2 en los días de implantación temprana en la rata y la posible regulación de dicha actividad por NO.
- B) Determinar la actividad MMP9 en tejido placentario humano en la gesta a término, y analizar una posible acción moduladora de NO y radicales libres de oxígeno sobre dicha actividad.
- C) Estudiar la existencia de alteraciones en la actividad de la MMP9 en el tejido placentario humano como consecuencia de la patología diabética pregestacional y gestacional. Determinar los niveles de NO y el estado de estrés oxidativo tisular en placenta diabética pregestacional y gestacional, analizando una posible acción reguladora de NO y RLO sobre la actividad MMP9 en dichos tejidos.

## MATERIALES Y METODOS

En este trabajo se emplearon los siguientes materiales:

Acido 2-tiobarbitúrico

Acido etilén diamino tetraacético (EDTA)

Acido tricloroacético

Acrilamida

Azul brillante de Coomasie R-250

Azul de nitrotetrazolio (NBT<sup>2</sup>)

Dodecil sulfato de sodio (SDS)

Estandares de peso molecular 6.5-200 KDa. Rainbow.

Malonildialdehido tetraetoxipropano

N, N, N', N'-Tetrametilletilenediamina (TEMED)

N'N' Bis-metileno-acrilamida

N<sup>G</sup>-nitro-Larginina metil ester (L-NAME)

N<sup>G</sup>-mononetil-D-arginina (D-NMMA)

N<sup>G</sup>-mononetil-L-arginina (L-NMMA)

Nitroprusiato de sodio

Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Persulfato de amonio

Reactivo de Bradford

Seroalbúmina bovina (BSA)

Spermin NONOate

Superoxido dismutasa (SOD)

Trizma base

Xantina

Xantina Oxidasa (XOD)

Todos obtenidos de SIGMA, St. Louis, MO, USA.

Ketalar de Parke-Davis, Argentina.



### *Animales*

Se utilizan ratas hembras variedad Wistar, mantenidas con Purina como alimento y agua “*ad libitum*”, en un ritmo de bioterio 14:10 horas luz:oscuridad respectivamente, a temperatura de  $22 \pm 2$  °C y humedad constante.

Las hembras son apareadas durante la noche con machos Wistar. El apareo se confirma a la mañana siguiente por la presencia de espermatozoides en los extendidos vaginales, considerándose este como el día uno de gestación. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, en días 3,4,5 y 6 de gestación por la mañana excepto las preñadas de día 5 que se sacrifican por la mañana y por la tarde (cuando el embrión ya está implantándose). Rápidamente, se remueve el tejido uterino y se lo incubó en baño metabólico, medio Krebs Ringer Bicarbonato (KRB) durante 60 minutos en presencia o no de inhibidores de la enzima NOS o liberadores de NO.

### *Placentas*

A través de un convenio con el Dr. Pesaresi, Jefe de Obstetricia del Hospital Durand y el LINERH (Laboratorio de Investigaciones en Neuroendocrinología de la Reproducción Humana), se obtiene tejido placentario de mujeres sanas y diabéticas pregestacionales o gestacionales inmediatamente luego del parto. El presente trabajo fue aprobado por el Comité de Ética y el Comité de Docencia del Hospital Durand. El tejido placentario es lavado en medio KRB, seleccionando una porción de vellosidades placentarias luego de aislar de ellas la mayor parte de capilares sanguíneos. El tejido placentario se incubó en baño metabólico, medio KRB durante 60 minutos en presencia o no de inhibidores de la NOS, liberadores de NO, sistemas generadores de RLO y removedores de RLO.



#### *Localización de los sitios de implantación embrionaria*

Los sitios de implantación que pueden evidenciarse en la rata en el día 5 de preñez a partir de las 18 hs son visibles antes que cualquier otra evidencia morfológica, ya que es el primer signo de reacción decidual una vez que los blastocistos están posicionados e inmovilizados en el útero, y es la primera señal macroscópica del evento implantatorio. Para localizar estos sitios utilizamos un ensayo de exudación plasmática de un colorante que se une a las proteínas del plasma (Psychoyos, 1973). Se inyecta por vía intravenosa un grupo de ratas bajo anestesia con 0.5 ml de azul de Evans, en 0.9% de ClNa a las 18:00 horas del día 5 de preñez siendo sacrificadas 15 min. más tarde. El útero es removido y los “sitios” de implantación visualizados como áreas más intensamente teñidas. Estas corresponden a los sitios con mayor vascularización y aumento de permeabilidad vascular, y coinciden con los lugares donde los blastocistos se implantarán. Cada sitio corresponde con un embrión implantatorio. Las porciones uterinas que se encuentran entre dos sitios de implantación se denominan “intersitios” de implantación. Cabe aclarar que el colorante Azul de Evans, a la concentración presente en las porciones uterinas, no interfiere con las determinaciones subsiguientes.

#### *Determinación del contenido proteico*

En homogenatos del tejido o sobrenadante de incubación evaluamos por medio del método de Bradford (Bradford, 1976) el contenido de proteínas totales.

#### *Determinación de la actividad de las gelatinasas*

##### **Zimografía**

Se determina la actividad de las gelatinasas presentes en sobrenadante de incubación, sembrando 20 µg de proteínas por calle, en gel de SDS copolimerizado con 0.1% p/v de gelatina (Woessner y Taplin, 1988). Después de la corrida electroforética, los geles son

lavados en una solución 30% de Triton-X por 1 hora y luego incubados por 24hs. a 37 °C en 50 mM Tris Buffer, PH 7.4, conteniendo 0.15 mM NaCl y 30 mM CaCl. Luego se tiñen con Azul Brillante de Coomassie R-250. Las proteínas que presentan actividad gelatinásica, se visualizan como bandas claras de lisis sobre el fondo azul del colorante. Esta actividad es cuantificada utilizando un analizador de imágenes (Sigmagel) que mide el área y la intensidad de la banda de lisis y se expresa como unidades densitométricas relativas al control (al que se le asigna el valor de 1). Estas bandas de degradación enzimática son específicas ya que desaparecen en presencia de EDTA 0.01M en el buffer de incubación.

El peso molecular de las enzimas fue determinado sembrando en una de las calles del gel estándares pre-teñidos de peso molecular conocido.

#### *Dosaje de nitratos-nitritos*

Las concentraciones de nitratos-nitritos son dosadas mediante la reacción de Griess (Green, 1982), previa reducción de los nitratos utilizando nitrato reductasa. Los nitritos obtenidos se convierten en un azo-compuesto coloreado el cual absorbe a 595 nm. Las muestras se ubican en una placa de 96 hoyos con reactivo de Griess. El producto cromogénico se cuantifica con un lector de placas modelo BioRad.

#### *Medición de la actividad de la enzima Superóxido Dismutasa.*

Se determina la actividad SOD de acuerdo al método de Yamanaka (1979) modificado por Sun (1988). Consiste en la cuantificación de la capacidad de la enzima para inhibir la reducción de Nitroblue tetrazolium a Formazán, mediada por el anión superóxido. Las muestras se homogeneizan a 4 °C, en Tris 0.1M pH 8.1, luego se centrifugaron a la misma temperatura, 15 min. a 6000 g. Se siembran 20 µl de sobrenadante en placas de 96 hoyos y se adiciona 20 µl de enzima xantina oxidasa y 180 µl de tampón de reacción, constituido por el sistema xantina/xantina oxidasa y el indicador. Con un lector de

placas a 560 nm se mide la absorbancia a intervalos de 20 segundos durante 10 minutos, y se la refiere a la cinética colorimétrica de una curva standard de concentración conocida.

#### *Determinación de lipoperóxidos*

Se ensaya en el tejido placentario la formación de sustancias de reacción con el ácido tiobarbitúrico (malondialdehído) (Jha y col., 1985).

Las muestras se homogeneizan a 4 °C, en Tris 0.1M pH 7.6 y se centrifugaron a 15000 r.p.m. durante 20 min. Se precipitan luego las proteínas del sobrenadante con ácido Tricloroacético 40%. Se centrifuga nuevamente a 3000 r.p.m. durante 15 min. Se transfiere el sobrenadante adicionando a cada muestra 500 µl de ácido 2-tiobarbitúrico; se llevan a ebullición durante 15 min. y se colocan 200 µl de cada una de las muestras en un lector de placas, midiéndose la producción de color a 540 nm.

#### *Estadística*

Los valores mostrados representan la media y el error estándar. Las comparaciones entre grupos se realizan empleando el test t de student al comparar dos grupos de valores y análisis de varianza de un factor al comparar más de un tratamiento, evaluada con el test de Bonferroni.

En todos los casos la diferencia entre medias se considera significativa cuando el valor de p es igual o menor que 0.05.

N= número de preparados tisulares de animales o pacientes diferentes.



## RESULTADOS

### *Capítulo 1:*

#### **ACTIVIDAD DE LA METALOPROTEASA 2 DURANTE LA IMPLANTACION DEL TROFOBLASTO Y SU MODULACIÓN POR OXIDO NÍTRICO EN LA RATA.**

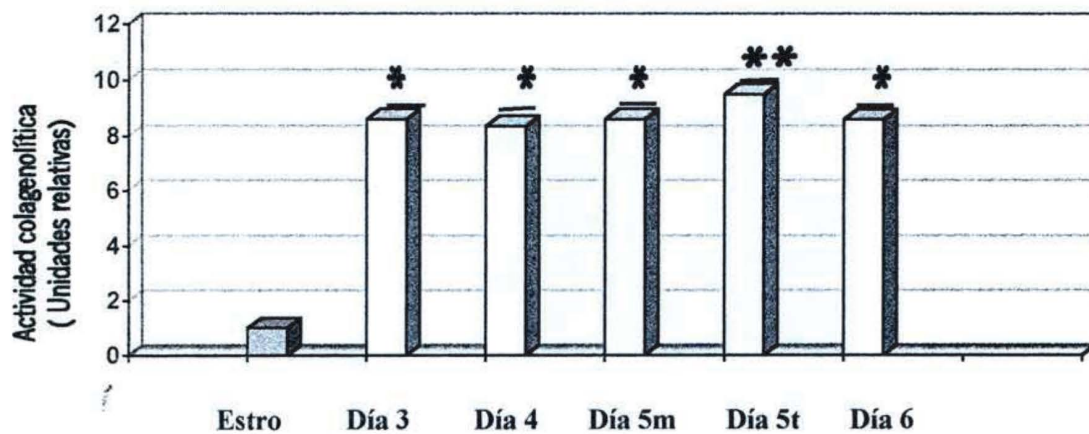
Durante la implantación las células trofoblásticas del embrión invaden el útero, penetrando la membrana basal y el sistema arterial. La conducta de invasión y adhesividad de estas células está limitada en tiempo y espacio por mecanismos poco conocidos. (Weitlauf 1994). La ruptura de la matriz extracelular por las células embrionarias involucra la acción de enzimas capaces de degradar los componentes de la matriz extracelular. Las más importantes de estas enzimas son las colagenasas (Matrisian, 1991).

Por otro lado la implantación es un proceso inflamatorio, en el cual se produce un incremento del Oxido Nítrico (Vane y col. 1994). Este agente está normalmente asociado con un aumento de la permeabilidad vascular, vasodilatación e incremento del flujo sanguíneo. En base a estas evidencias nosotros evaluamos la participación de la metaloproteasa 2 durante el proceso implantatorio del tofoblasto y la existencia de una posible regulación por NO.

#### **1.1: Actividad de la MMP2 en el tejido uterino durante la preñez temprana**

Se evalúa la actividad de MMP2 en tejido uterino a lo largo del período peri-implantatorio en la rata (días 3 a 6 de gestación). En la Figura 1 se muestra la actividad de MMP2 determinada por zimografía en homogenato uterino, observándose que dicha actividad se encuentra aumentada durante la preñez en relación al estro (control no

preñado) \*  $p < 0.01$ , esta actividad es aún mayor en la tarde de día 5 (momento de la implantación embrionaria) \*\*  $p < 0.001$ .

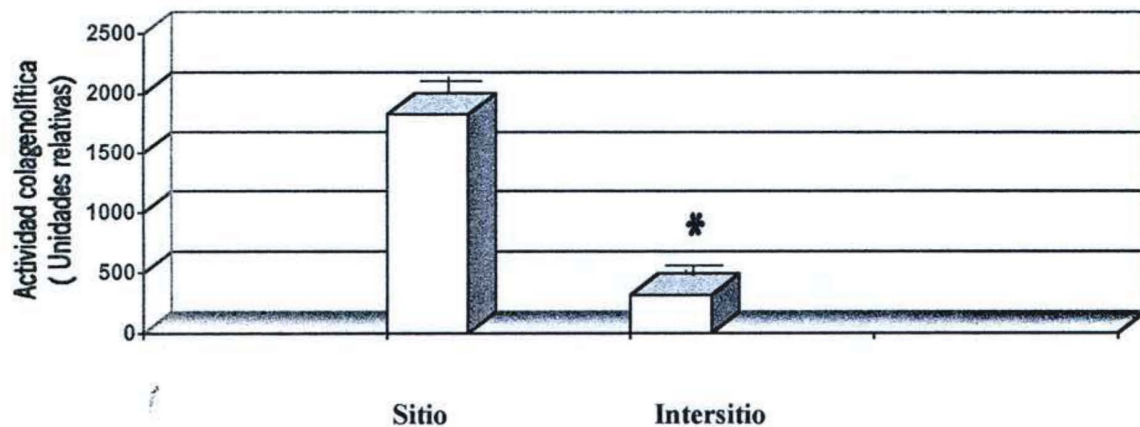


**Figura 1: Actividad de la MMP2 en los días peri-implantatorios.**

Se determina la actividad MMP2 en tejido uterino de rata en estro y en los días 3, 4, 5 por la mañana, 5 por la tarde y 6 de gestación. Los datos representan la media  $\pm$  SEM; N=6. \* $p < 0.01$  y \*\* $p < 0.001$

La actividad de la MMP2 en el útero peri-implantatorio podría estar localizada en los sitios de implantación, o alternatively, podría ser una respuesta general del tejido uterino en su totalidad. Para responder a esto medimos la actividad colagenolítica de la enzima en los sitios e intersitios de implantación, que se visualizan en la noche del día 5 de preñez.

La **Figura 2** muestra que la actividad enzimática está incrementada en los sitios de nidación con respecto al intersitio (espacio entre dos sitios de implantación),  $*p < 0.001$ .



**Figura 2:** *Actividad de la MMP2 en los sitios de implantación.*

La localización de los sitios donde se están implantando los blastocistos en el útero fue realizada por el ensayo de exudación de plasma. Los datos representan la media  $\pm$  SEM, N=4.  $*p < 0.001$  sitio vs. intersitio.

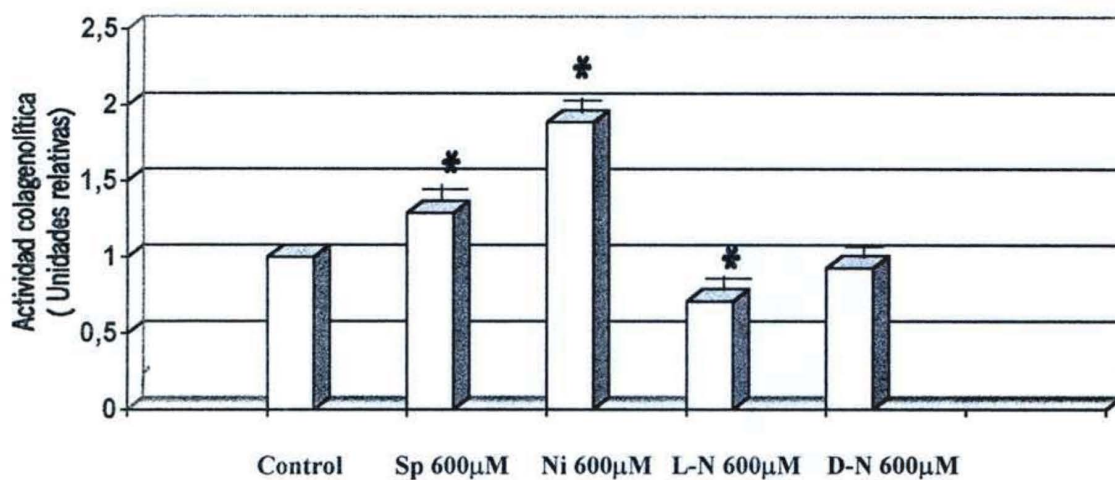
### 1.2: Regulación de la actividad de la MMP2 por Oxido Nítrico

Sabiendo que el Oxido nítrico se encuentra incrementado justo en el momento previo a la implantación, desde la mañana del día 5 de preñez (Novaro y col. 1997), analizamos su posible participación en la modulación de la actividad de la MMP2.

En la **Figura 3** se observa que la actividad colagenolítica se encuentra incrementada en presencia de dadores de NO, Spermin NONOate 600  $\mu$ M y Nitroprusiato de Sodio 600



$\mu\text{M}$  \* $p < 0.05$ . Esta actividad disminuye con inhibidores de la síntesis de la Oxido Nítrico Sintasa, L-NMMA 600  $\mu\text{M}$  \*  $p < 0.05$ . Este efecto es específico ya que no se observa en presencia de D-NMMA 600  $\mu\text{M}$ , su enantiómero inactivo.

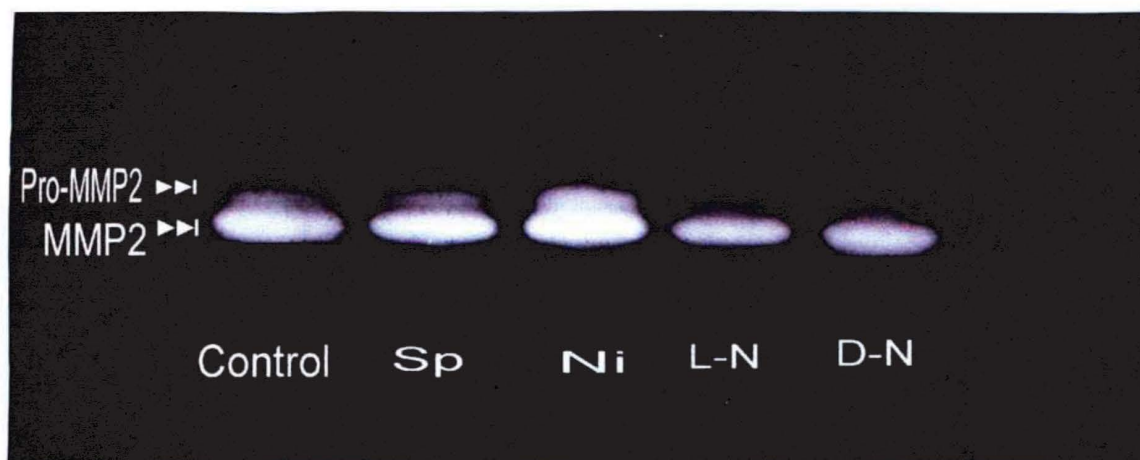


**Figura 3: Regulación de la actividad de la MMP2 por Oxido Nítrico.**

Tejido uterino (día 5 de gestación) es incubado en presencia de dadores de NO: Spermin NONOate (Sp) 600  $\mu\text{M}$  y Nitroprusiato de Sodio (Ni) 600  $\mu\text{M}$ , y de un inhibidor de la síntesis de NO: L-NMMA (L-N) 600  $\mu\text{M}$ , determinandose luego la actividad MMP2. Los datos representan la media  $\pm$  SEM, N=5.

\* $p < 0.05$ .

En la **Figura 4** se muestra un zimograma representativo en el que se evalúa la actividad de la MMP2 en función del NO. El análisis zimografico muestra la presencia de dos bandas de lisis que representan la proenzima (Pro-MMP2) de 72 KDa y su forma activa (MMP2) de 62 Kda. El tipo latente muestra su actividad producto del SDS presente en el gel.



**Figura 4:** *Zimografía de sobrenadante de incubación uterino.*

Se muestra la actividad colagenolítica de MMP2 en sobrenadante de tejido uterino (control) y en tejido uterino incubado en presencia de Spermin NONOate (Sp) 600  $\mu$ M y Nitroprusiato de Sodio (Ni) 600  $\mu$ M, dadores de NO; y de L-NMMA (L-N) 600  $\mu$ M, inhibidor de NOS y su enantiómero D-NMMA 600  $\mu$ M.

## *Capítulo 2:*

### **ACTIVIDAD DE LA METALOPROTEASA 9 EN EL TEJIDO PLACENTARIO HUMANO A TERMINO.**

Importantes cambios metabólicos y estructurales se producen en la placenta en el último trimestre de gestación, entre ellos, un drástico incremento en el flujo sanguíneo uteroplacental y fetoplacental, que involucra los procesos de angiogénesis y remodelación tisular, con participación de las metaloproteasas (Vagnoni y col. 1998). Por otro lado, durante el embarazo se incrementan los niveles de NO en el endotelio, lo cual permite una adecuada perfusión sanguínea de la placenta (Norman y Cameron, 1996).

Nuestros resultados obtenidos en tejido uterino de rata en día 5 de gestación muestran que el NO modula la acción de las metaloproteasas durante el proceso de implantación. Sabemos también que tanto las células trofoblásticas del embrión en etapa de implantación, como durante la placentación y también en la placenta madura secretan metaloproteasas.

En base a estos antecedentes y dada la posibilidad de estudiar el tejido placentario humano, se evalúa en placenta de gestante a término una posible acción moduladora del NO sobre la actividad de la MMP9, enzima que se encuentra aumentada hacia el final de la gestación.

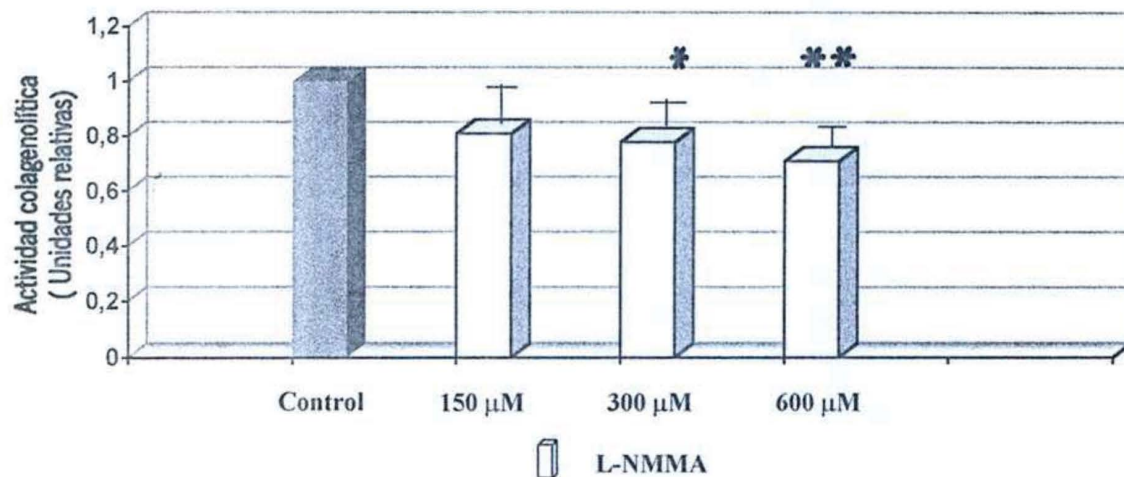
#### **2.1: Modulación de la MMP9 por Oxido Nítrico en Tejido Placentario de Gestante Sana**

Se analiza el efecto de inhibidores de la Oxido Nítrico Sintasa (L-NMMA y L-NAME) sobre la actividad de la MMP en tejido placentario de gestantes sanas a término. Al incubar vellosidades placentarias durante 60 minutos en baño metabólico en presencia



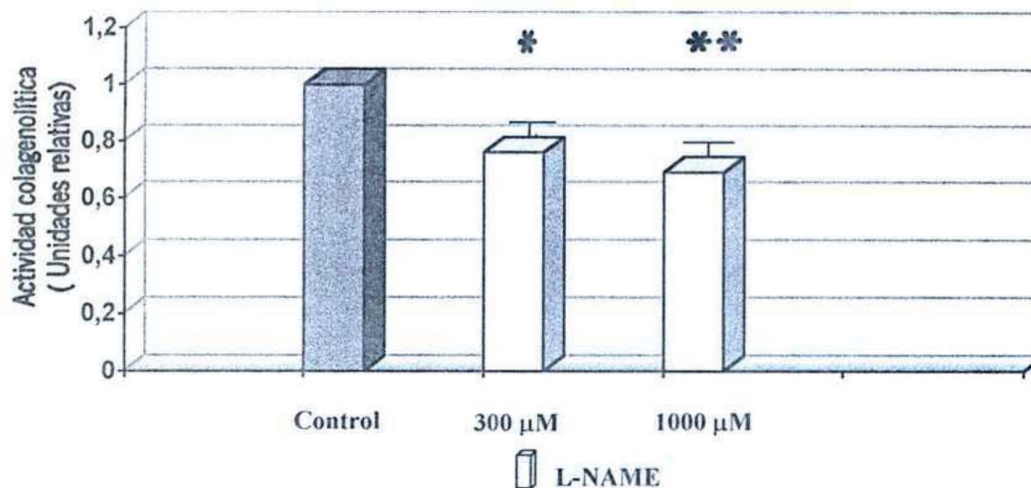
de dichos inhibidores, se evidencia una disminución de la actividad MMP9 en forma dosis dependiente.

La **Figura 5** muestra como se encuentra modificada la actividad colagenolítica en presencia de concentraciones crecientes de L-NMMA, observándose una disminución significativa en presencia de L-NMMA 300  $\mu$ M, \*  $p < 0.05$ ; y mayor descenso a mayor concentración del inhibidor, L-NMMA 600  $\mu$ M, \*\*  $p < 0.001$ .



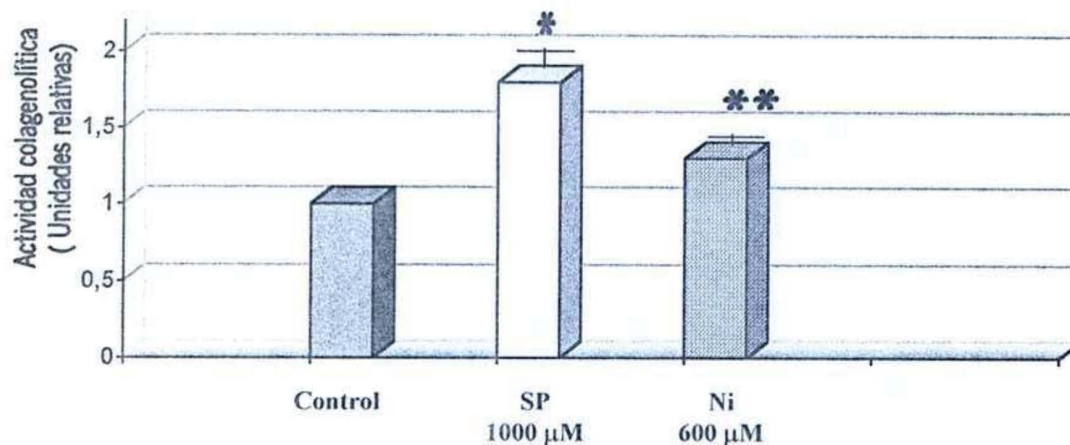
**Figura 5:** Efecto del L-NMMA sobre la actividad de la MMP9 en tejido placentario de gestante a término. Los datos representan la media  $\pm$  SEM; N=8; \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.001$  vs. el control.

Efectos similares se pueden apreciar cuando el tejido placentario es incubado con L-NAME (**Figura 6**), donde se observa una disminución significativa de la actividad de metaloproteasa a las dos concentraciones utilizadas del inhibidor.



**Figura 6:** Efecto de *L-NAME* sobre la actividad de la *MMP9* en placenta de gestante a término. Los datos representan la media  $\pm$  SEM; N=8. \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$  vs. el control.

A continuación se determinó la actividad gelatinásica luego de incubar vellosidades de placenta de gestante a término durante 60 minutos en baño metabólico, en presencia de dadores de NO: Spermin NONOate y Nitroprusiato de Sodio. Se observa en la Figura 7, que la actividad *MMP9* es estimulada, tanto por Spermin NONOate 1000 µM (\* $p < 0.05$ ), como por Nitroprusiato de Sodio 600 µM (\*\* $p < 0.005$ ).

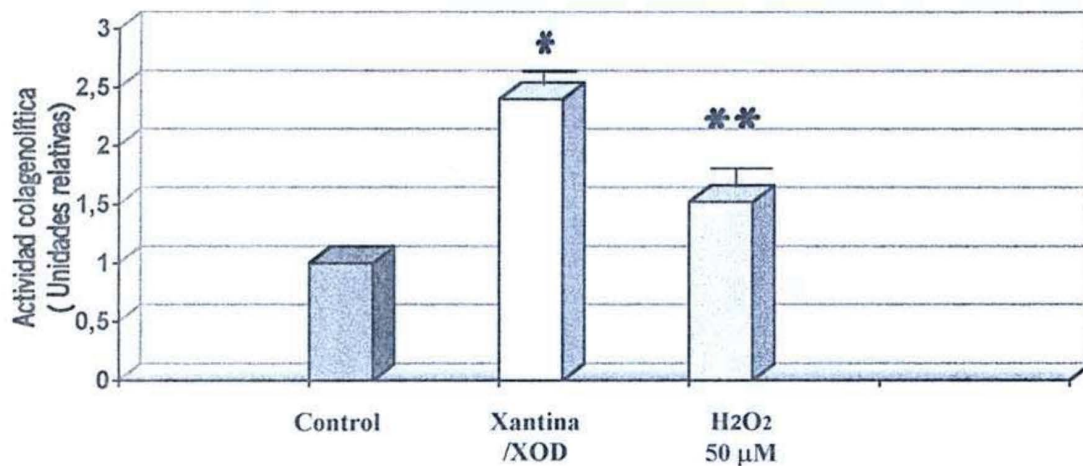


**Figura 7:** Efecto de dadores de Oxido Nítrico sobre la actividad de la MMP9 en placenta de gestante a término. Sp= Spermin NONOate, N=13, \*p<0.05 vs. Control. Ni=Nitroprusiato de Sodio, N=10; \*\*p< 0.005 vs.control. Los datos representan la media  $\pm$  SEM.

## 2.2 Control de la actividad de la MMP9 por radicales libres del oxígeno

Existen importantes evidencias de que uno de los caminos de activación de las metaloproteasas, (pasaje de la forma inactiva o proenzima a la activa), es mediado por mecanismos dependientes de la generación de radicales libres.(Shaughnessy y col. 1993, Rajagopalan y col. 1996, Okamoto y col.1997, Hiroshi y col. 1998). Con el objeto de determinar si la actividad de la MMP9 de tejido placentario humano es modulada por los niveles de radicales libres de oxígeno (RLO) se incubó el tejido placentario en presencia de xantina/xantina oxidasa (0.1mM: 30mU/ml)sistema generador de RLO. Se observa, (**Figura 8**) que la actividad de la enzima es estimulada en presencia de los RLO generados por dicho sistema,\* p<0.001. Lo mismo ocurre cuando se incubó al tejido placentario en presencia de peróxido de hidrogeno 50 µM, en el medio de incubación,\*\*p<0.05.

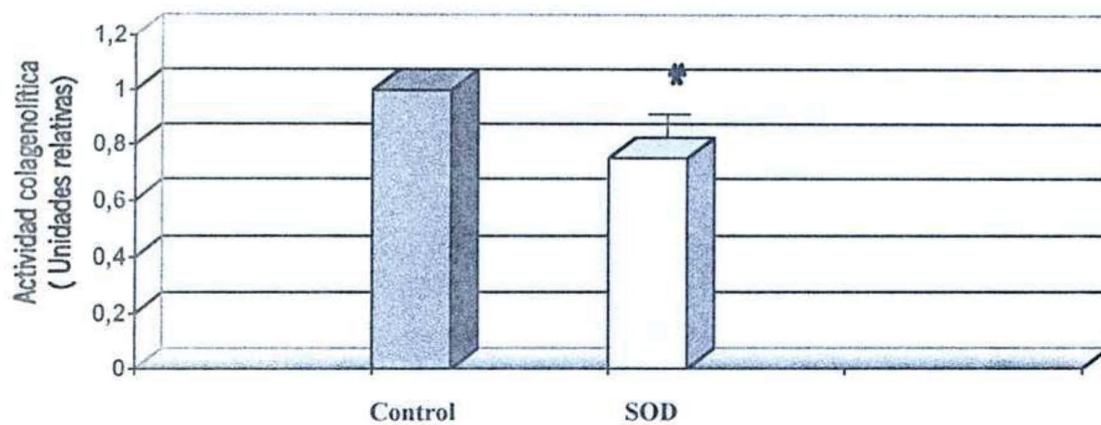




**Figura 8:** *Efecto de las especies reactivas del oxígeno sobre la actividad de la gelatinasa.*

Se determina la actividad MMP9 en tejido placentario de gestante sana incubado en presencia de Xantina/ Xantina oxidasa (0.1mM: 30mU/ml) y de peróxido de hidrogeno 50µM. Los datos representan la media  $\pm$  SEM. N=8. \*p<0.0001, \*\*p<0.05 vs. control.

A continuación se determina el efecto de un capturador de especies reactivas del oxígeno sobre la actividad MMP9 en tejido placentario de gestante a término. La adición de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD), capturador de especies reactivas del oxígeno ( $O_2^{\cdot-}$ ), al medio de incubación del tejido placentario produce (**Figura 9**) una disminución en la actividad gelatinasica,  $p<0.05$ .



**Figura 9: Efecto de SOD sobre la actividad MMP9.**

Se determina la actividad de la gelatinasa en sobrenadante de tejido placentario de gestante sana incubado en medio Krebs, 60 min. adicionado de SOD 1000 U/ml. Los valores representan la media  $\pm$  SEM, N=5.

\* $p < 0.05$ .

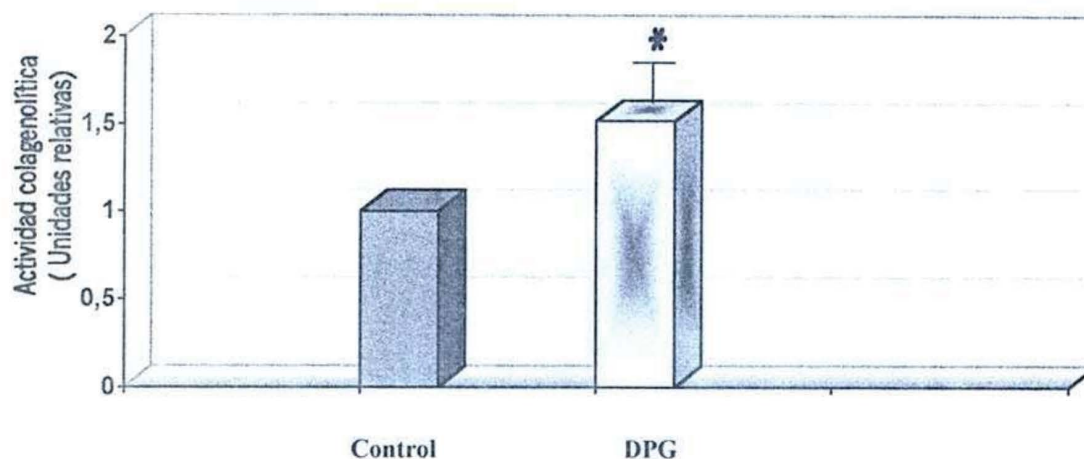
### **REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE MMP9 EN EL TEJIDO PLACENTARIO DE GESTANTES DIABÉTICAS PREGESTACIONALES.**

Dependiendo de la severidad de la patología diabética, se encuentran entre sus complicaciones reproductivas más frecuentes los abortos espontáneos, la muerte fetal intrauterina, la ocurrencia de partos a pretérmino (Eriksson y Hakan Borg, 1993) y múltiples dificultades en el trabajo de parto (Pedersen y Molsted-Perdersen, 1981), entre otras. Se señala a las metaloproteasas como participantes en cuadros obstétricos de alarma, ruptura temprana de las membranas (Vadillo-Ortega y col, 1996) y pre-eclampsia (Vettraino y col., 1996). Estas consideraciones, vinculadas al hecho de que en la patología diabética la placenta presenta importantes alteraciones estructurales y metabólicas, sugiere que probablemente exista un desbalance en el control de la actividad metaloproteasa en esta enfermedad.

#### **3.1 Caracterización de la actividad de la MMP9**

Las mujeres involucradas en este estudio son diabéticas pregestacionales, con la patología establecida en forma previa al embarazo, y son tratadas con insulina bajo criterio de mantener un estado de normoglucemia durante la gesta. La **tabla 1** muestra características de estas pacientes.



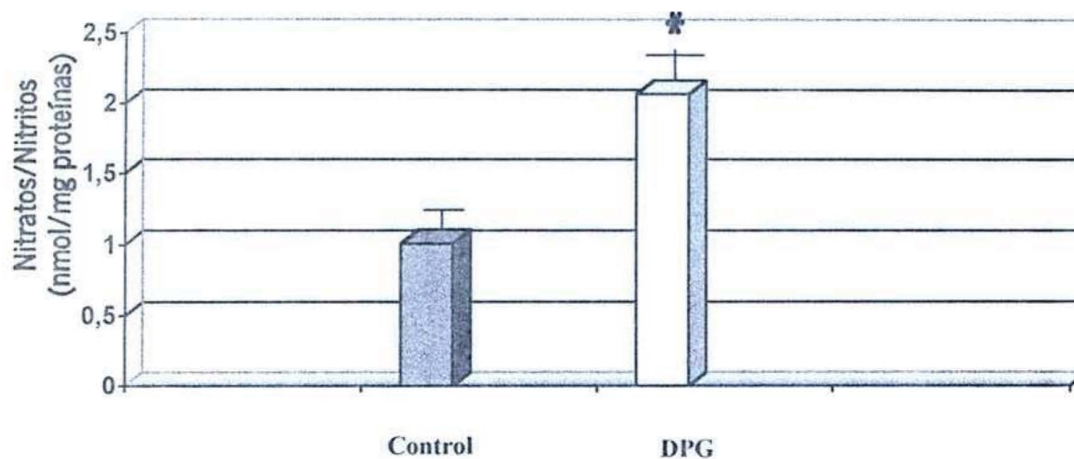


**Figura 10: Actividad de la MMP9 en DPG.**

Medidas densitométrica en sobrenadante de incubación de tejido placentario de gestantes diabéticas pregestacionales (DPG) vs control (gestantes sanas). Los datos representan la media  $\pm$  SEM. N=7. \*  $p < 0.005$ .

### 3.2: Efecto de la modulación del Oxido Nítrico sobre la actividad de la metaloproteasa

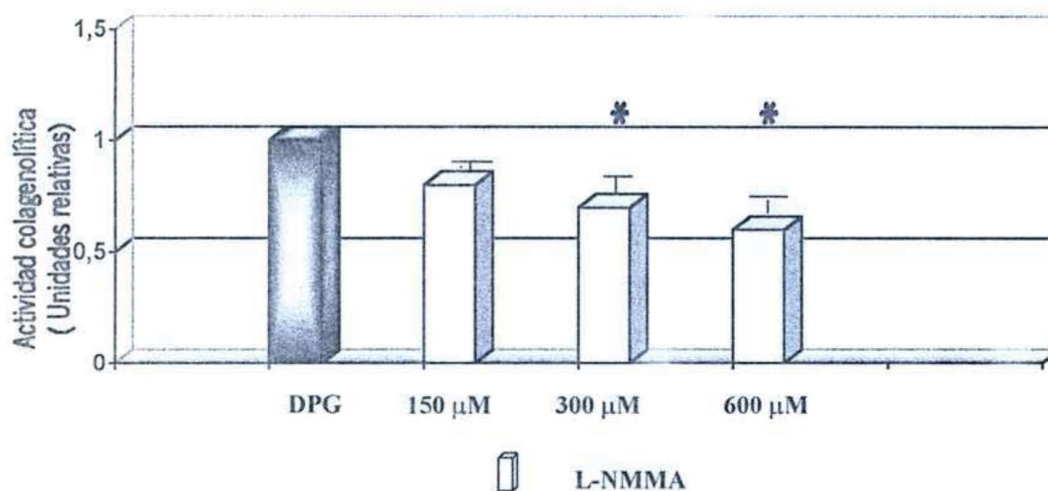
Como se ha mencionado anteriormente el NO se encuentra aumentado durante la gestación, pero, además, este agente es señalado como mediador del daño tisular provocado por diabetes mellitus. A fin de evaluar si los niveles de NO se encuentran alterados en el tejido placentario de gestantes que sufren esta patología, medimos la conversión de nitratos a nitritos como índice del valor del Oxido nítrico placentario. En la **Figura 11** se observa que los niveles de este agente están significativamente incrementados en placentas DPG en relación al control,  $p < 0.01$ .



**Figura 11:** Niveles de NO en placentas de gestantes sanas y diabéticas pregestacionales.

El NO es determinado por medio de la cuantificación de nitritos tisulares, empleando el método de Griess. DPG: tejido placentario de gestantes con diabetes pregestacional, N= 21; control: placentas de gestantes sanas, N=13. Los datos mostrados representan la media  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.01$ .

Teniendo en cuenta el incremento en la actividad enzimática de la metaloproteasa y los niveles de Oxido nítrico, evaluamos un posible efecto modulador de NO sobre la MMP9, bloqueando la actividad de NOS por medio del inhibidor enzimático L-NMMA. La **Figura 12** muestra la determinación de la actividad colagenolítica en tejido placentario de diabética pregestacional cuando el medio de incubación es adicionado con L-NMMA. Concentraciones de inhibidor 300  $\mu$ M inducen una disminución de la actividad MMP9 ( $p < 0.05$ ), siendo este descenso más marcado al aumentar la concentración del inhibidor, 600  $\mu$ M,  $p < 0.05$ .

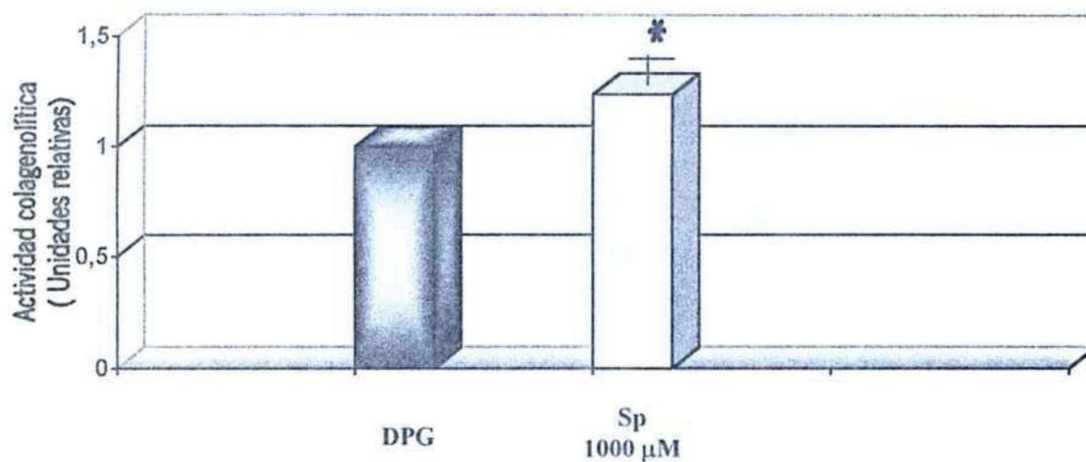


**Figura 12:** Efecto de L-NMMA sobre la actividad de MMP9.

El tejido placentario fue incubado en medio Krebs durante 60 minutos en presencia de L-NMMA 150  $\mu$ M a 600  $\mu$ M, determinándose en el sobrenadante la actividad MMP9. Los datos representan la media  $\pm$  SEM; N=5. \*  $p < 0.05$ .

Se determina a continuación el efecto de dadores de NO sobre la actividad MMP9. Cuando se ensaya la actividad colagenolítica en tejido placentario de DPG incubado durante 60 min. en medio Krebs adicionado de Spermin NONOate 1000  $\mu$ M, se observa un incremento de actividad MMP9,  $P < 0.05$  (Figura 13).

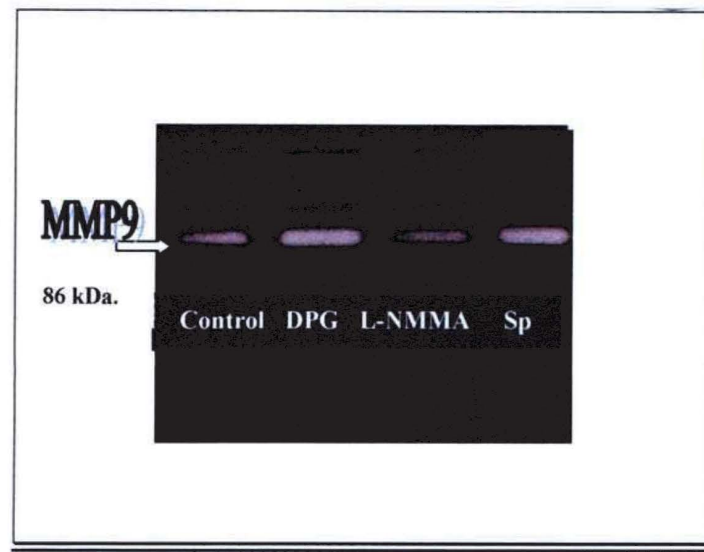




**Figura 13:** *Influencia de Spermin NONOate sobre la actividad de la MMP9.*

La actividad de la enzima se determina en sobrenadante de tejido DPG incubado en presencia de un dador de Oxido Nítrico, Spermin NONOate 1000  $\mu$ M. Los datos representan la media  $\pm$  SEM; N=5. \*p<0.05.

La Figura 14 muestra un zimograma, en el cual se observan las bandas de lisis que se producen al evaluar la actividad gelatinásica del sobrenadante del tejido placentario luego de una hora de incubación en presencia o ausencia de drogas que modifican los niveles de Oxido nítrico en el medio. En el gel se observa asimismo las diferencias en los niveles de actividad que presenta la MMP9 de placentas de mujeres sanas y las provenientes de mujeres diabéticas pregestacionales.



**Figura 14:** Zimografía de sobrenadante de incubación de tejido placentario que muestra la actividad de la MMP9 y su regulación por Oxido Nítrico.

La actividad colagenolítica de la enzima se determina en tejido placentario de mujeres sanas (control) y diabéticas pregestacionales (DPG) incubado o no con Spermin NONOate (Sp) 600  $\mu$ M y L-NMMA 600  $\mu$ M.

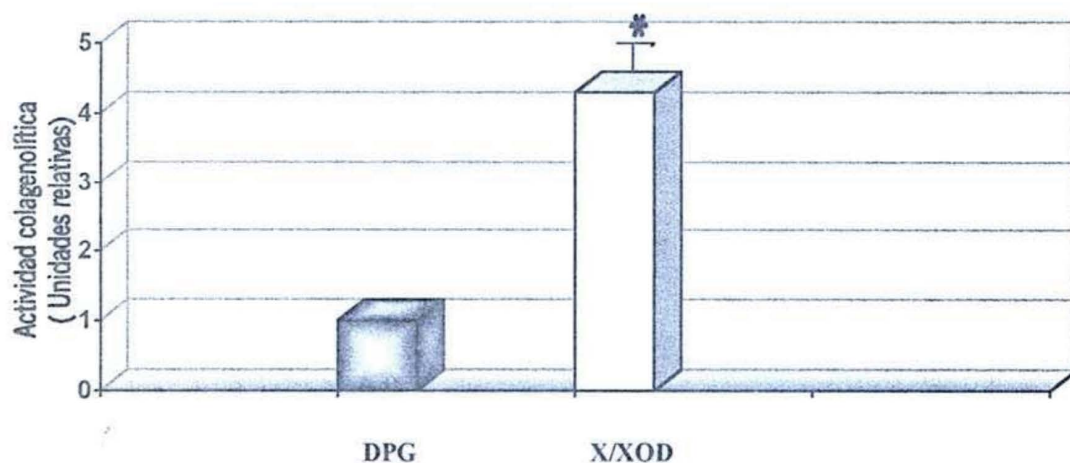
### 3.3: Acción de los radicales libres del Oxígeno sobre la actividad de la MMP9.

Un aspecto importante en la patología diabética es el estrés oxidativo ya que juega un papel central en el daño tisular asociado a esta enfermedad (Rajagopalan y col., 1996; Tesfamariam, 1994; Giugliano, 1995)

La presencia de especies reactivas del oxígeno en grandes cantidades afecta a las células y órganos, alterando profundamente sus procesos enzimáticos.

Se evalúa, entonces, la acción de los radicales libres de oxígeno sobre la actividad colagenolítica de la MMP9, incubando durante 60 min., en medio Krebs, al tejido placentario de mujeres diabéticas pregestacionales en presencia de un sistema generador

de radicales libres de oxígeno (RLO) ( Xantina/XOD en concentraciones 0.1 mM: 30mU/ml). En la **Figura 15** se observa que la actividad de la MMP9 en presencia de RLO se incrementa en relación al control,  $p < 0.01$ .

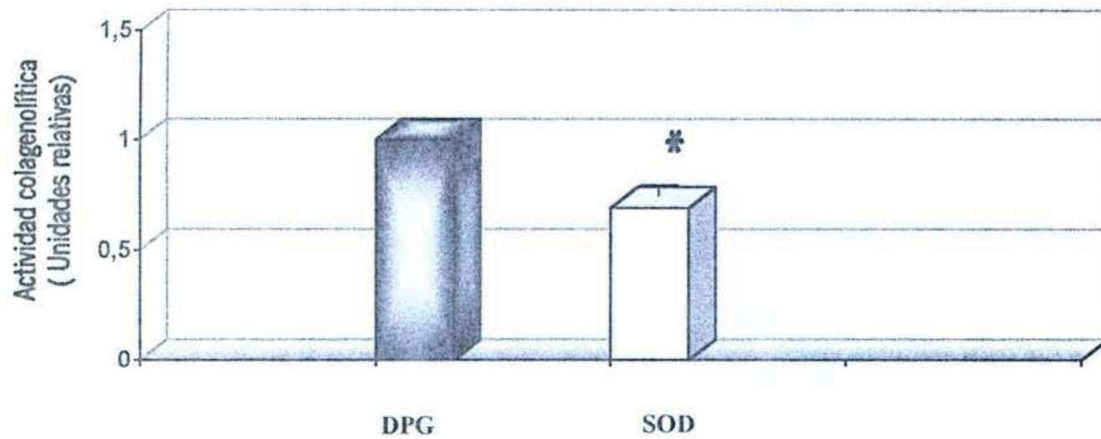


**Figura 15:** *Modulación de la actividad gelatinásica por especies reactivas del oxígeno.*

Se evalúa por zimografía la actividad colagenolítica de la MMP9 producto de la incubación de tejido placentario de mujeres diabéticas pregestacionales (DPG) con el sistema Xantina / Xantina Oxidasa (0.1 mM: 30 mU/ml). Los datos representan la media  $\pm$  SEM; N=5. \*  $p < 0.01$ .

Por otro lado, una disminución en los niveles de enzimas removedoras de RLO, como la superóxido dismutasa (SOD) en diversos tejidos de pacientes diabéticos se relaciona con el estrés oxidativo producto de esta patología (Wohaiby col.,1987). En la **Figura 16** se muestra la actividad MMP9 del tejido placentario de mujeres DPG, incubando vellosidades placentarias durante 60 min. en medio Krebs, en presencia de la enzima SOD (1000 U/ml). Observamos que la actividad colagenolítica de la metaloproteasa disminuye,  $p < 0.01$ .

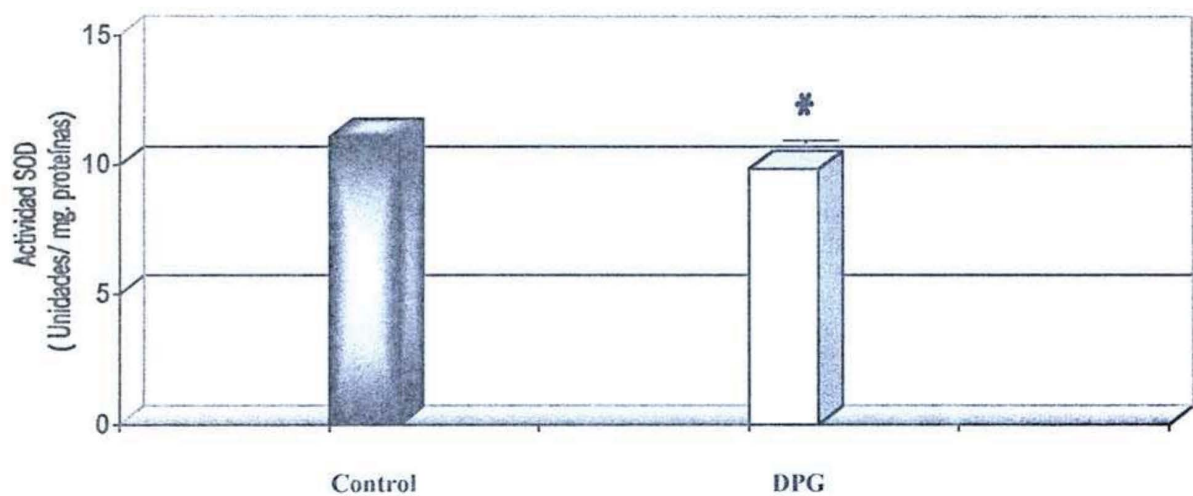




**Figura 16:** *Actividad de MMP9 por acción de la Superóxido Dismutasa.*

La actividad colagenolítica de MMP9 se evalúa en sobrenadante de incubación del tejido placentario DPG en presencia de SOD 1000 U/ml. Los datos representan la media  $\pm$  SEM; N=5, \*  $p < 0.01$ .

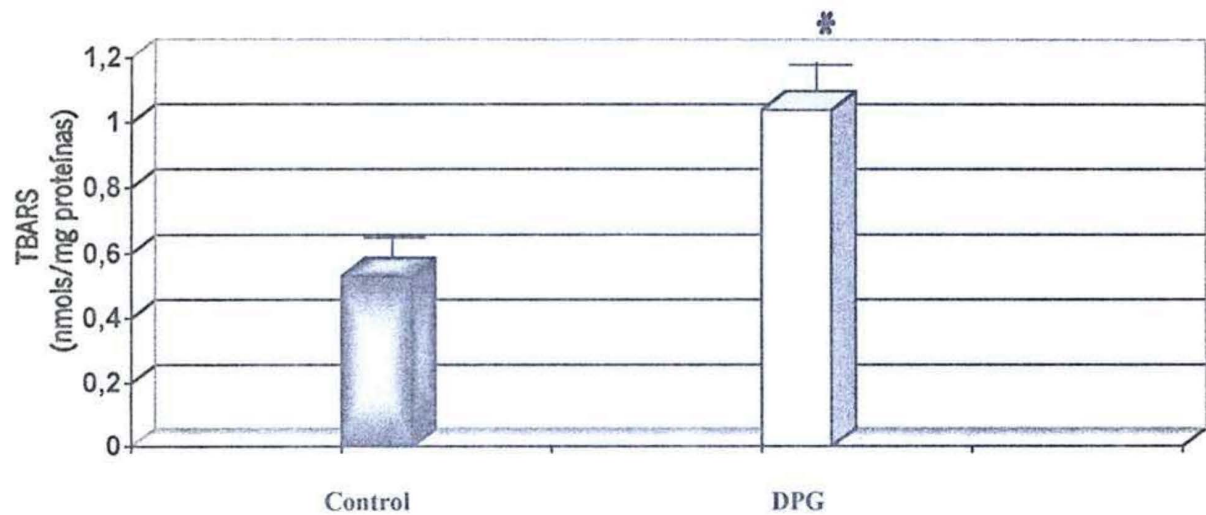
A continuación se determinada en el tejido placentario DPG la actividad de la enzima SOD, donde se observa una disminución de la misma respecto a dicha actividad en el tejido placentario de pacientes sanas. \* $p < 0.02$ .



**Figura 17: Actividad de la SOD en tejido placentario DPG.**

La actividad de la enzima Superóxido dismutasa es determinada de acuerdo al método de Yamanaka. DPG: tejido placentario de gestantes con diabetes pregestacional, N= 7; control: placentas de gestantes sanas, N=8. Los datos mostrados representan la media  $\pm$  SEM. \*  $p<0.02$ .

Por otra parte, evaluamos los niveles de lipoperoxidación en el tejido placentario DPG, como una forma de caracterizar el daño que produce el estrés oxidativo sobre las membranas celulares de los componentes de la placenta. En la **Figura 18**, se observa que la peroxidación lipídica está incrementada en tejido placentario de pacientes DPG en relación al tejido placentario de mujeres sanas, \* $p<0.05$ .



**Figura 18:** Niveles de lipoperoxidación en tejido placentario DPG.

Se ensaya en el tejido placentario la formación de sustancias de reacción con el ácido tiobarbitúrico, TBARS. DPG: tejido placentario de gestantes con diabetes pregestacional, N= 7; control: placentas de gestantes sanas, N=6. Los datos mostrados representan la media  $\pm$  SEM, \*p<0.05.



#### Capítulo 4:

### REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE MMP9 EN EL TEJIDO PLACENTARIO DE PACIENTES DIABÉTICAS GESTACIONALES.

#### 4.1 Determinación de la actividad de MMP9.

La resistencia periférica a la insulina, característica de una gesta en el 2<sup>do</sup> y 3<sup>er</sup> trimestre, implica un requerimiento mayor para la función pancreática endocrina. En un cierto número de gestantes, dicha exigencia no es adecuadamente compensada por el órgano, y se instala un estado diabético gestacional (DG), con glucemias significativamente elevadas, sin haberse detectado dicha patología en períodos anteriores al embarazo. Las pacientes que participaron en esta parte del estudio pertenecen al grupo descripto. En la **Tabla 2** se muestran sus características.

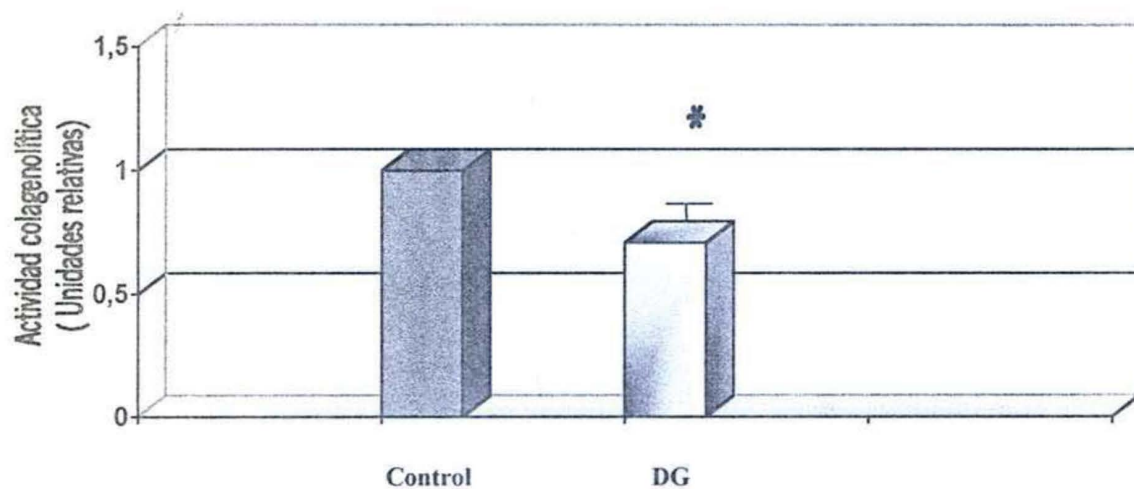
EDAD	CURVA DE GLUCEMIA	PARTO	CAPURO (semanas de gesta, según maduración neonatal)	TRATAMIENTO
32.9 ± 3.6	Basal: 87.8 ± 5.0 120': 154.8 ± 2.3	Normal: 66% Cesarea: 33%	39.7 ± 0.4	Dieta y/o Insulinoterapia

**Tabla 2:** *Características de pacientes DG.*

Valores de glucemia de la semana 37<sup>a</sup> de gestación, obtenidos por Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa: El paciente debe comer una dieta que contenga por lo menos 150 grs. de hidrato de carbono durante 2 días. Se evalúa el nivel de glucosa en sangre luego de 12 hs de ayuno (basal).

A continuación el paciente ingiere 100 grs. de solución de dextrosa por vía oral, dosándose luego los niveles séricos de glucosa. Los datos de glucemia mostrados se refiere al nivel basal (tiempo 0) y luego de 120 minutos de la ingesta de glucosa. Los datos representan la media  $\pm$  SEM. N=7

Para comenzar, se caracteriza la actividad de la MMP9 en tejido placentario a término de mujeres diabéticas gestacionales. En la **Figura 19** se observa que, a diferencia de lo observado en placenta de gestante diabética tipo I, la actividad colagenolítica en mujeres diabéticas gestacionales se encuentra disminuída en relación a la observada en placenta de mujeres sanas,  $p < 0.001$ .

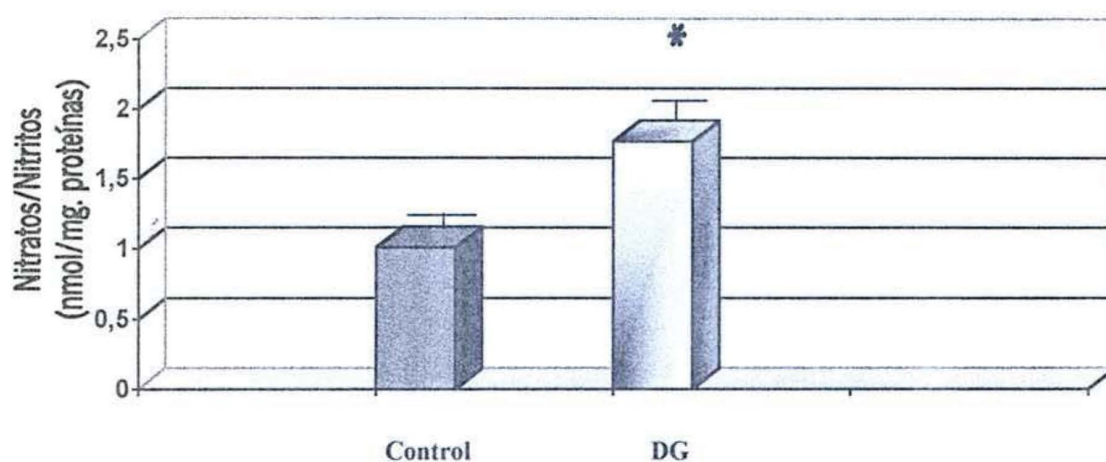


**Figura 19:** *Actividad de la MMP9 en DG.*

Actividad colagenolítica del sobrenadante de incubación de tejido placentario de mujeres diabéticas gestacionales (DG) vs. Control (gestantes sanas). Los datos representan la media  $\pm$  SEM. N=6, \* $p < 0.001$ .

#### 4.2 Modulación de la actividad de MMP9 por Oxido Nítrico.

Se determinan los niveles de óxido nítrico en tejido placentario de gestantes DG, a fin de analizar si los niveles basales de este agente están alterados en comparación a los de las gestante sanas. La **Figura 20** muestra que existe un aumento del NO en relación al control,  $p < 0.05$ .



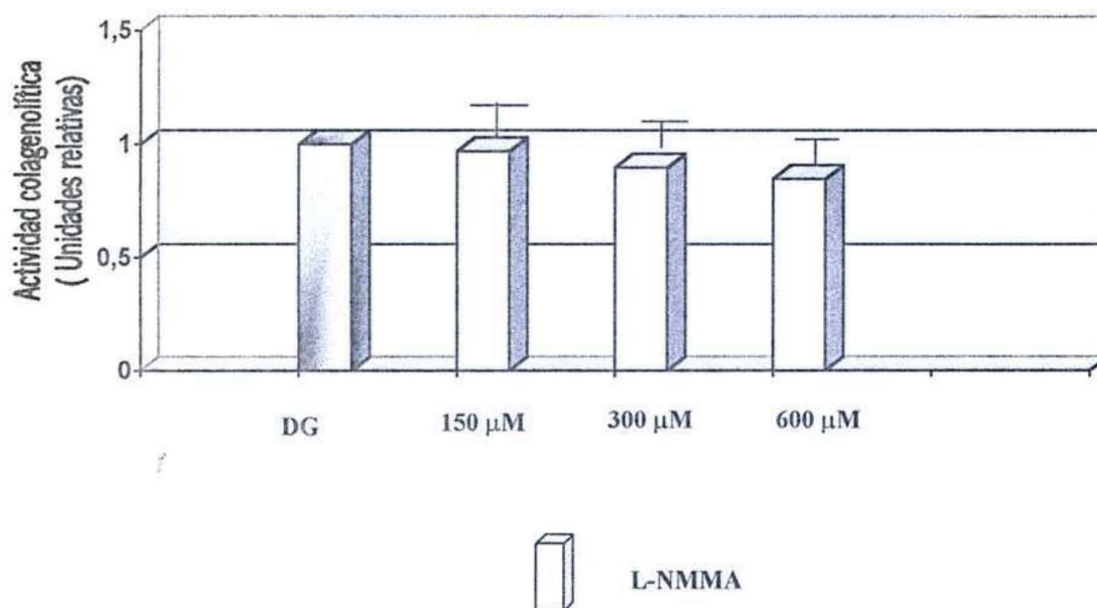
**Figura 20:** Niveles de NO en placentas de gestantes DG.

El NO es evaluado por medio de la conversión de nitratos a nitritos, y cuantificado empleado el método de Griess. DG: tejido placentario de gestantes con diabetes gestacional, N=6; control: placentas de gestantes sanas, N=13. Los datos representan la media  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ .

A continuación se determina la actividad colagenolítica de la MMP9 por efecto de la adición de inhibidores de la enzima Oxido Nítrico sintasa: L-NMMA y L-NAME, al medio de incubación de vellosidades placentarias en baño metabólico durante 60 minutos. En la **Figura 21** se observa que la actividad de la MMP9 no se ve modificada



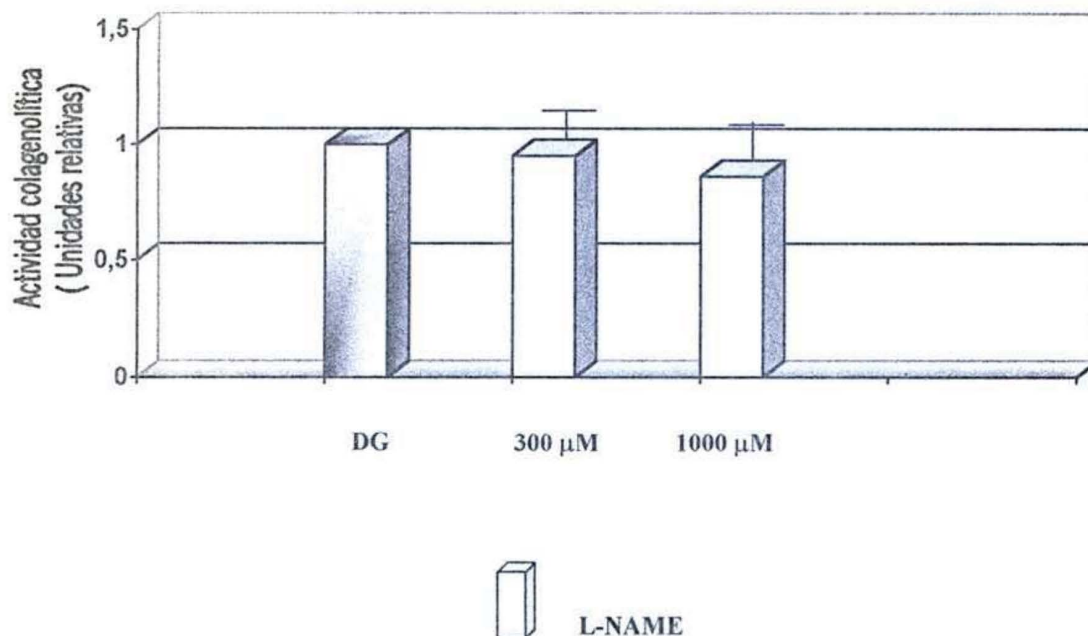
por la presencia del inhibidor L-NMMA, utilizado en las mismas concentraciones que estimulan la actividad MMP9 en tejido placentario de mujeres sanas y diabéticas tipo I .



**Figura 21:** Efecto del L-NMMA sobre la actividad de la MMP9 en tejido placentario DG.

Se determina la actividad de la gelatinasa en sobrenadante de incubación de tejido placentario de mujeres con diabetes gestacional (DG) incubado en presencia de L-NMMA 150 µM, N=5; 300 µM, N=6 y 600 µM, N=5. Los datos representan la media  $\pm$  SEM.

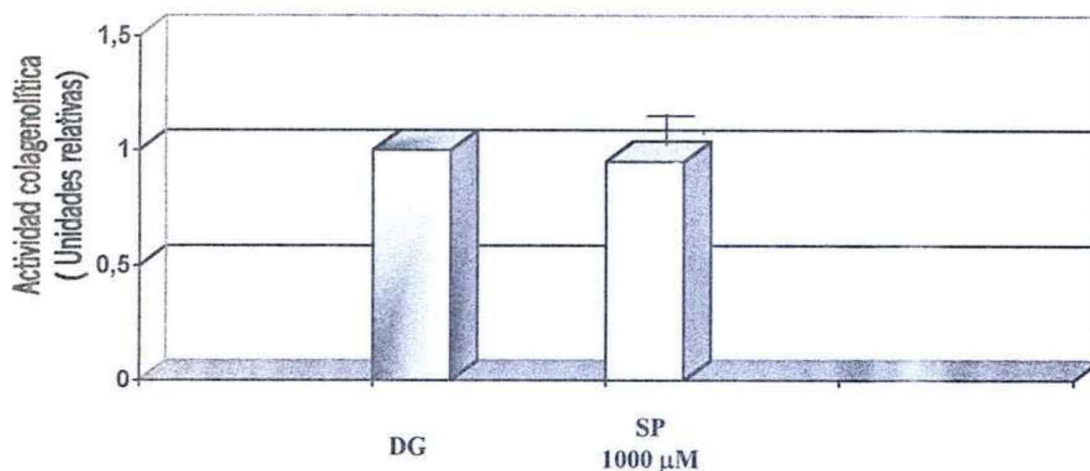
Observamos además que, efectos similares se pueden apreciar cuando el tejido placentario es incubado con L-NAME, **Figura 22**, donde la actividad de la metaloproteasa no sufre modificaciones significativas.



**Figura 22:** Efecto del inhibidor *L-NAME* sobre la actividad de la *MMP9*.

Se determina la actividad de la gelatinasa en sobrenadante de incubación de tejido placentario de gestantes DG incubado en presencia de *L-NAME* 300µM N=5 y 1000 uM N=6. Los datos representan la media  $\pm$  SEM.

A continuación se determina el efecto del dador de Oxido Nítrico Spermin Nonoate 1000 µM agregado al medio de incubación de vellosidades incubadas vellosidades placentarias de gestantes DG a término durante 60 minutos en baño metabólico, en presencia de un dador de Oxido nítrico; Spermin NONOate 1000 µM. En la **Figura 23** se observa que el dador de NO no causa efectos significativos sobre la actividad de la gelatinasa.



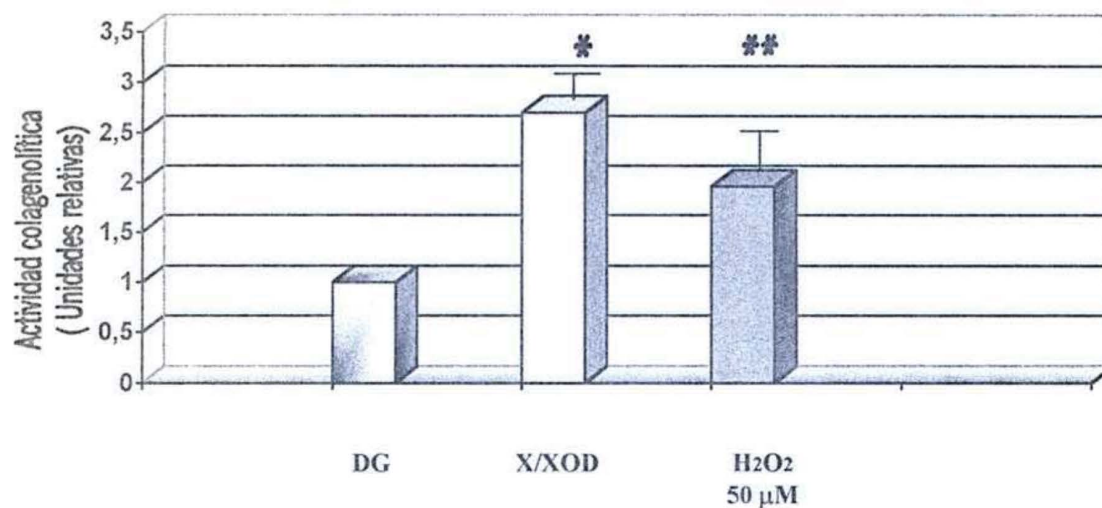
**Figura 24:** Actividad de la MMP9 por acción de Spermin NONOate.

Se determina la actividad de la gelatinasa en sobrenadante de incubación de tejido placentario de mujeres diabéticas gestacionales (DG) incubado en presencia de Spermin NONOate 1000 µM. Los datos representan la media  $\pm$  SEM. N=6.

#### 4.3 Modulación de la actividad de la MMP9 por radicales libres del oxígeno.

Con el fin de caracterizar si la actividad de la MMP de tejido placentario de gestantes DG se modula por efecto de RLO se incuban vellosidades placentarias en presencia de un sistema generador de radicales libres de oxígeno: Xantina/Xantina Oxidasa (0.1 mM: 30 mU/ml). Se observa en la **Figura 25** que la actividad colagenolítica es estimulada por los RLO generados por el sistema (\* $p < 0.01$ ). El efecto estimulador también pudo ser observado por acción de peróxido de hidrógeno presente en el medio de incubación, (\*\* $p < 0.05$ ).

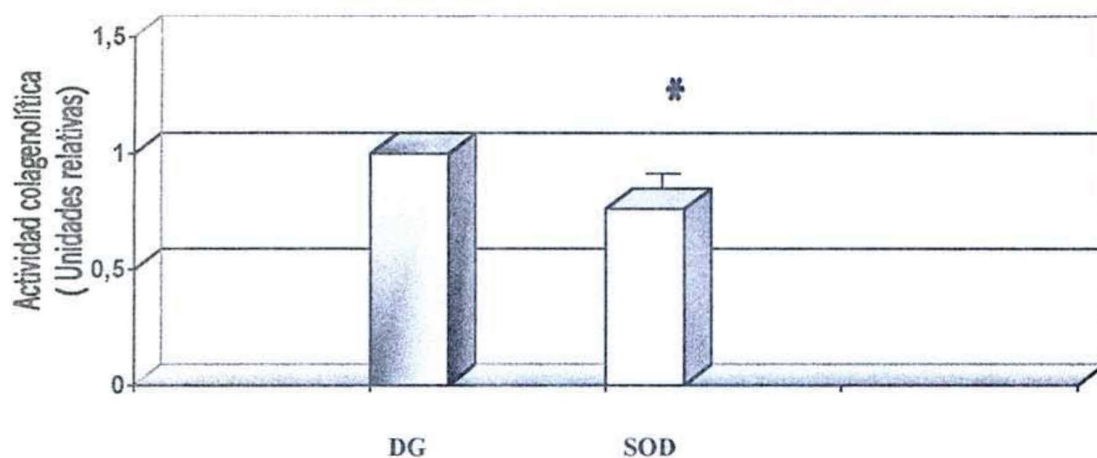




**Figura 25:** *Modulación de la actividad collagenolítica de la MMP9 por RLO.*

Medidas densitométricas en sobrenadante de vellosidades placentarias de mujeres diabéticas gestacionales (DG) incubado en presencia de Xantina /Xantina Oxidasa ( 0.1mM:30mU/ml), N=7 o peróxido de hidrógeno 50 µM, N=6. Los datos representan la media  $\pm$  SEM.  $p < 0.01$  y \*\*  $p < 0.05$  vs. DG.

También evaluamos la influencia la actividad de la enzima Super Oxido Dismutasa (SOD), removedora de radicales libres de oxígeno, sobre la actividad de la gelatinasa. La **Figura 26** muestra que en presencia de SOD la actividad de la MMP9 disminuye, \* $p < 0.001$ .

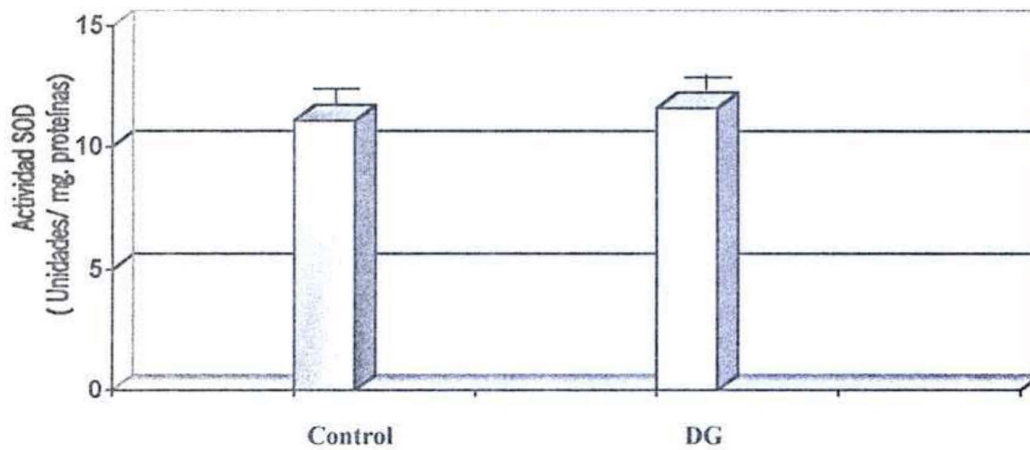


**Figura 26:** *Modulación de la actividad gelatinasica por acción de SOD, removedor de radicales libres de oxígeno.*

Se determina la actividad de MMP9 en sobrenadante de incubación de tejido placentario de mujeres con diabetes gestacional (DG) en presencia de SOD 1000 U/ml. Los valores representan la media  $\pm$  SEM.

N=5, \* $p < 0.001$ .

Por otro lado, se evalúa la actividad de la enzima SOD en tejido placentario de mujer diabética gestacional. Observamos (**Figura 27**) que dicha actividad enzimática no se encuentra modificada en la placenta DG en relación al tejido control.

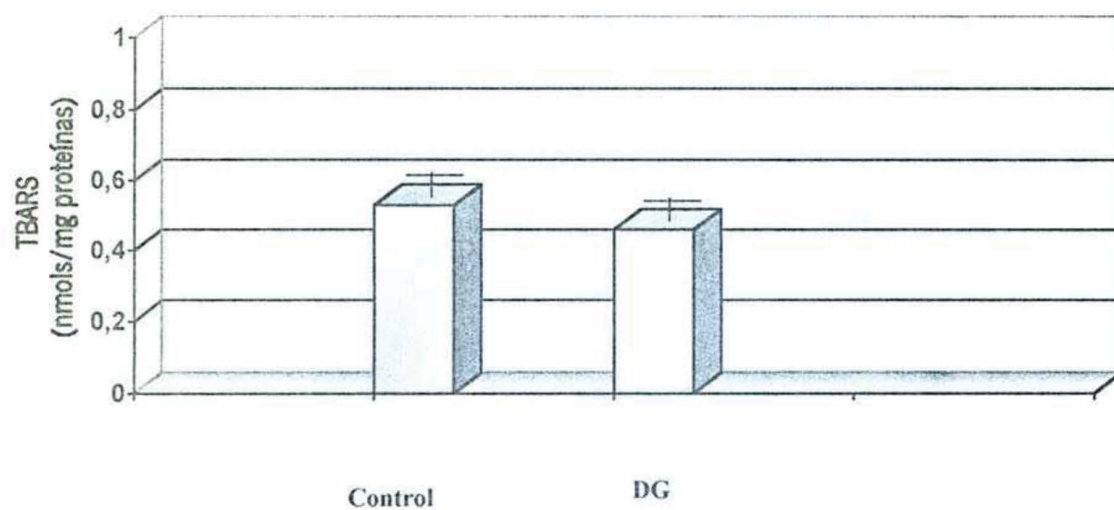


**Figura 27:** Actividad de la SOD en tejido placentario DG.

La actividad de la enzima Superoxido dismutasa se determinó de acuerdo al método de Yamanaka. DG: tejido placentario de gestantes con diabetes gestacional, N= 8; control: placentas de gestantes sanas, N=8. Los datos mostrados representan la media  $\pm$  SEM.

Se determinan los valores de peroxidación lipídica en los tejidos placentarios de pacientes DG. Se observa, **Figura 28**, que los niveles de TBARS no se encuentran modificados en comparación al tejido placentario normal.





**Figura 28: Niveles de lipoperoxidación lipídica en tejido placentario DG.**

Se ensaya en el tejido placentario la formación de sustancias de reacción con el ácido tiobarbitúrico, TBARS. DG; tejido placentario de gestantes con diabetes gestacional , N= 10; control: placentas de gestantes sanas, N=6. Los datos mostrados representan la media  $\pm$  SEM.

## DISCUSION

En varios grupos de mamíferos, tales como roedores y humanos, el proceso de nidación requiere que las células del trofoblasto embrionario entren en contacto con la membrana basal y se abran paso entre las células epiteliales del endometrio uterino.

Posteriormente, estas células degradan esta barrera, invaden el estroma endometrial, alcanzan los vasos maternos y finalmente establecen un lazo vascular con la madre (Weitlauf 1994, Soares 1996). Una variedad de mecanismos celulares y moleculares está implicado en este acontecimiento de la adherencia y de la invasión que permite el establecimiento del embarazo.

La invasión de las células embrionarias en el tejido materno es facilitada por las metaloproteasas (MMPs) expresadas por las células del trofoblasto y el endometrio, que pueden degradar una amplia gama de los componentes de la matriz extracelular (MEC) tales como colágeno, laminina y proteoglicanos.

En este trabajo, nosotros evaluamos la actividad de la MMP2, gelatinasa con preferencia por el colágeno tipo IV, durante el proceso de implantación embrionario en la rata. Esta gelatinasa es secretada tanto por el trofoblasto como por las células del tejido uterino, donde participan en el mantenimiento de la integridad tisular del endometrio y en la deciduización (Alexander y col., 1996; Sharkey y col. 1996).

Nuestros resultados muestran que durante el período peri-implantatorio se incrementa la actividad de la MMP2. En efecto, Das y col (1997), determinaron los niveles de mRNA de MMP2 durante la implantación, observando que su expresión aumenta en forma importante entre los días 3 y 5 de preñez. Asimismo, evaluamos en este trabajo que en el día de implantación, la actividad MMP2 es mayor en los sitios implantatorios en relación a los intersitios, lo cual nos indica que el fenómeno es local, y que probablemente el trofoblasto tenga participación en este evento, ya sea con su propia síntesis o modulando la actividad de la MMP2 uterina.

Por otro lado, trabajos previos han establecido un rol relevante del óxido nítrico en el proceso de implantación embrionaria en la rata (Novaro *et al.* 1996; Novaro *et al.* 1997).

En efecto, la implantación es un proceso del tipo inflamatorio, en el cual la producción de NO se incrementaría por infiltración de células (Vane *et al.* 1994). Durante el período peri-implantatorio aumenta la actividad NOS, modulando la vasodilatación y aumento de permeabilidad vascular (Novaro, 1998b). En este trabajo, y dado el incremento de la actividad MMP2 en los mismos días en que se observa la actividad NOS aumentada, se evaluó la modulación de la actividad de MMP2 por óxido nítrico. Observamos que en tejido uterino de rata en el quinto día de preñez, dadores de NO estimulan la actividad MMP2, mientras que inhibidores de la enzima NOS la disminuyen. La activación de MMPs por óxido nítrico ha sido demostrado en otros tejidos y procesos de remodelación tisular, en células de músculo liso vascular (Gorog y Kovacs, 1998; Gujar y col., 1999), neutrófilos (Saari y col., 1990) cartilago humano (Murrell y col., 1995), y en procesos de metástasis tumoral (Orucevic y col., 1999).

De esta forma, nuestros resultados muestran la participación de la MMP2 en el proceso de implantación embrionaria en la rata, y la acción moduladora positiva del óxido nítrico sobre dicha actividad, participando de este modo en los mecanismos de degradación de matriz extracelular necesarios para que ocurra la invasión trofoblástica.

Otro proceso en el cual las metaloproteasas tienen una importante participación es el desarrollo y mantenimiento de la función placentaria. En efecto, este es un tejido que se desarrolla *de novo* durante la gesta y requiere por lo tanto una activa presencia de enzimas que participan en la remodelación tisular. Se ha sugerido en particular, la importancia de MMP9 en la ocurrencia de la ruptura de membranas embrionarias, tanto en período normal como en la ruptura prematura de las mismas, encontrándose marcadamente aumentada en ambos casos. (Vadillo-Ortega, F., y col., 1996; Ortega, F., y col., 1995.). También se encuentra presente en diferentes etapas de la gestación acompañando la maduración placentaria (Vettraino y col., 1996). Y un aumento en la expresión de esta colagenasa está relacionado con la maduración y la dilatación del cervix, preparando el canal de parto. (Osmers y col., 1995). En el presente trabajo, nosotros encontramos una importante actividad MMP9 en tejido placentario de mujeres a término.



Por otro lado, sabemos que los niveles de óxido nítrico se incrementan durante la gesta, y que modulan la vasodilatación y el incremento de flujo sanguíneo placentario, permitiendo una adecuada nutrición fetal (Miller y col., 1996; Diket y col., 1994; Förstermann y col., 1994). Dados los resultados obtenidos al evaluar la implantación en la rata y los antecedentes previos, que muestran al NO como activador de las metaloproteasas en diversos procesos (Gorog y Kovacs, 1998; Gujar y col., 1999; Murrell y col., 1995), se evalúa si el óxido nítrico modula la actividad MMP9 en tejido placentario humano. Observamos que la actividad MMP9 placentaria se incrementa en presencia de dadores de NO, y se inhibe por efecto de bloqueantes de la enzima NOS. Esto nos estaría mostrando la modulación positiva que el NO ejerce sobre la MMP9 en tejido placentario de gestantes a término.

Otros factores moduladores de la actividad metaloproteasa en diferentes tejidos son los radicales libres de oxígeno. En efecto, la estimulación de los RLO ha sido demostrada en otros tejidos, músculo liso vascular (Rajagopalan y col., 1996), células endoteliales de vena de cordón umbilical (Belkhiry y col., 1998), macrófagos (Maeda y col., 1998), y neutrófilos (Okamoto y col., 1997, Saari y col. 1990), como así también en células tumorales en proceso de metástasis (Shaughnessy y col., 1993).

Se sabe asimismo que las especies reactivas del oxígeno experimentan una reacción facilitada con grupos tioles. Por tal motivo se proponen como mecanismo en común de la activación de las MMPs.

Las metaloproteasas se secretan en forma latente (zimógeno), en la cual se encuentra un predominio plegado sobre el sitio catabólico. Esta conformación del zimógeno es mantenida debido a las interacciones entre grupos tioles y residuos de cisteína. La interrupción de esta unión conduce a la activación de la enzima (Rajagopalan y col., 1996). De esta forma los RLO estarían actuando en forma directa sobre el pasaje de la proenzima a la forma enzimática activa.

En el presente estudio, nosotros observamos que la actividad MMP9 en placenta de gestante a término se incrementa en presencia de elevadas concentraciones de radicales libres de oxígeno, y que disminuye en presencia de SOD, enzima removedora de RLO. De esta forma, determinamos que tanto el óxido nítrico como los radicales libres de

oxígeno son moduladores positivos de la enzima MMP9, que participa en los eventos de remodelación necesarios para el mantenimiento tisular, permitiendo una adecuada función y maduración de la placenta a término.

Durante los últimos años, nuestro laboratorio se ha abocado a la comprensión de las anomalías reproductivas inducidas por la patología diabética. En efecto, modelos experimentales de diabetes han sido utilizados para determinar la participación del óxido nítrico y los radicales libres de oxígeno en diversos procesos reproductivos, incluyendo la maduración ovocitaria (Jawerbaum y col., 1998a), el desarrollo del embrión (Jawerbaum y col., 1998b), la función uterina (González y col., 1997) y la producción de prostanoïdes en el tejido placentario (González y col. 1998). En el presente trabajo se encaró el estudio de la actividad MMP9 en placenta a término de mujeres con patología diabética pregestacional y gestacional, y su regulación por óxido nítrico y radicales libres de oxígeno. Las pacientes participantes del estudio fueron tratadas según criterio médico con insulina a fin de obtener glucemias preprandiales de 70 hasta 100 mg/dl, tratamiento que fue efectivo en todas las mujeres evaluadas, tal como surge de sus valores de glucemia de ayunas. Los resultados obtenidos nos muestran que en la diabetes pregestacional la actividad MMP9 se encuentra elevada. En otras patologías gestacionales, tales como placenta acreta, (Vettraino y col., 1996), y parto prematuro, (Agrez, M. Y col., 1999; Athayde, N. y col., 1999; Tu, F.F. y col., 1998), también se ha encontrado elevada la actividad metaloproteasa, relacionándose dicho aumento con anomalías en el tejido placentario que afectarían al desarrollo fetal. En forma interesante, Paez Pereda y col. encontraron niveles elevados de metaloproteasas en adenomas de hipófisis y determinaron que este incremento que afecta la estructura de la MEC asimismo modifica la secreción hormonal y la proliferación celular (Paez Pereda, 2000). Si bien la actividad metaloproteasa no se ha evaluado previamente en tejido placentario diabético, estudios realizados en otros tejidos diabéticos indican que existen desbalances entre las MMPs y los TIMPs que se asocian a las complicaciones mas frecuentes de la enfermedad: la nefropatía (Baricos, 1995) y la retinopatía diabética. (Brown y col., 1994). Asimismo



hemos determinado que en tejido placentario de diabética pregestacional los niveles de nitritos/nitratos se encuentran elevados, y que el NO modula positivamente a la MMP9 placentaria, ya que inhibidores de la NOS bloquean su actividad, y dadores de NO la estimulan. De esta forma se sugiere que los niveles elevados de NO podrían estar determinando la actividad incrementada de MMP9 en este tejido.

Por otro lado, al igual que lo observado en tejido placentario de mujer sana, observamos que los RLO son moduladores positivos de la actividad MMP9 en tejido placentario de mujer diabética pregestacional, ya que dadores de RLO estimulan la actividad MMP9 y adiciones de SOD la disminuyen. En este trabajo se evaluó la peroxidación lipídica en placenta de mujeres diabéticas pregestacionales, encontrándose que dichos valores se encuentran elevados en relación a las mujeres sanas. En efecto, estudios realizados en diversos tejidos de animales y pacientes diabéticos muestran niveles elevados de lipoperóxidos (Halliwell y Gutteridge, 1999), medida del efecto de radicales libres de oxígeno sobre los lípidos tisulares.

La cuantificación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa es otra manera de evidenciar la influencia de RLO sobre el tejido. En efecto, en períodos iniciales y en respuesta a un evento de estrés oxidativo, la actividad SOD se incrementa (Gandy y col, 1982; Uchigata y col., 1982; Kakkar y col., 1997 ), mientras que si el estrés oxidativo es prolongado (como ocurre en la patología diabética), los niveles están frecuentemente disminuidos (Samuel, 1982; Wohaib, y Godin, (1987). Nosotros observamos que en el tejido placentario de mujeres diabéticas pregestacionales la actividad SOD se encuentra disminuida, otorgando una menor capacidad de respuesta ante un evento de estrés oxidativo en ese estadio de la gesta.

De esta forma, tanto los niveles elevados de óxido nítrico, como los de radicales libres de oxígeno, y una menor capacidad de remoción de dichos productos de oxidación estarían probablemente relacionados con los elevados niveles de actividad MMP9 que se observan en el tejido placentario en la diabetes pregestacional.

En la última parte del trabajo, se evaluó la actividad MMP9 en tejido placentario de mujeres diabéticas gestacionales. En este caso, la diabetes fue detectada en el último



trimestre de embarazo, y el tratamiento insulínico efectuado normalizó sus glucemias a término. Contrariamente a lo detectado en la placenta de mujer diabética pregestacional, la actividad MMP9 esta disminuida en relación al control. Tanto el aumento como la disminución de la actividad enzimática, podrían estar alterando el correcto funcionamiento del órgano placentario. En el primer caso existiría una excesiva remodelación del tejido. En el segundo, una tasa de recambio y reparación tisular demasiado baja; trabajos previos indican que en otras patologías tales como la pre-eclampsia, existe una disminución de la actividad de la MMP9, y un flujo sanguíneo uteroplacentario anómalo, que estaría relacionado con esta disminución enzimática. (Graham y col., 1996). Por otro lado, determinamos que los niveles de nitratos/nitritos también están incrementados en placentas de pacientes diabéticas gestacionales, pero a diferencia de lo que se observa en el tejido sano y de mujer diabética pregestacional, la MMP9 no es modulada por el NO (en este caso no se observan modificaciones de la actividad MMP9 ni en presencia de dadores de NO ni en presencia de inhibidores). Dado que los niveles de NO parecen participar en el mantenimiento de los niveles basales de actividad MMP9 en la placenta control, quizás la falta de modulación de dicha actividad por NO en el tejido diabético gestacional este relacionado con los bajos niveles de actividad MMP9 detectados en esta patología. En forma similar, trabajos previos realizados en nuestro laboratorio evidencian una alteración en la capacidad moduladora del NO en ovocitos de rata diabética, donde se ha observado que el NO es incapaz de modular la síntesis de PGE ovocitaria, como sí lo hace en ovocitos de rata sana (Jawerbaum, y col., 1999).

Por otro lado, observamos que los niveles de peroxidación lipídica y de SOD son normales en el tejido placentario de mujeres diabéticas pregestacionales, probablemente debido a la detección precoz de la patología y al buen control metabólico; los cuidados tempranos parecen haber evitado la existencia de eventos de estrés oxidativo prolongado. Se destaca de todas formas la capacidad de los RLO de estimular la actividad MMP9 en la placenta de mujer diabética gestacional, y por lo tanto los niveles de MMP9 tal vez resultarán diferentes en pacientes no tratadas o bajo tratamientos inefectivos.

## CONCLUSIONES

En la primera parte de este trabajo evaluamos la actividad de la MMP2 en tejido decidual de rata durante la implantación del trofoblasto.

Determinamos que la actividad de la metaloproteasa 2 se encuentra aumentada en los días que rodean el evento implantatorio. En efecto, es en los sitios de nidación donde se observa la mayor actividad MMP2.

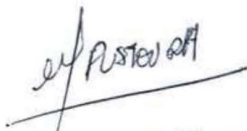
Esta actividad se vio estimulada por la acción del NO, que en el momento de la implantación se encuentra aumentado favoreciendo la permeabilidad vascular, vasodilatación e incremento del flujo sanguíneo.

Estos resultados contribuyen a la comprensión del complejo mecanismo de implantación, donde existe una perfecta sincronización entre los procesos de activación celular involucrados en el posicionamiento del embrión en el sitio de nidación y el posterior proceso invasivo, y donde luego deberán ocurrir necesariamente efectos recíprocos para producir el evento de arresto del proceso una vez que la placentación haya sido completada.


En la segunda parte de nuestro trabajo desarrollamos el estudio de la caracterización de la actividad colagenolítica del tejido placentario humano de pacientes que cursan su embarazo con diabetes. Observamos que la actividad MMP9 es muy alta en el caso de los tejidos provenientes de gestantes con diabetes pregestacional y está disminuida por debajo de los valores del control en las placentas de pacientes diabéticas gestacionales. En la placenta madura de mujer sana el óxido nítrico está presente en altos niveles regulando una adecuada perfusión sanguínea. Nosotros encontramos que el nivel de óxido nítrico placentario se encuentra aún más elevado en tejido proveniente de mujeres diabéticas pregestacionales y gestacionales. Al igual que lo expuesto en la primer parte del trabajo en relación a la actividad de la MMP2, la MMP9 estaría también regulada por acción del óxido nítrico en el tejido placentario sano y de diabética pregestacional, y probablemente este mecanismo este relacionado con los niveles de MMP9

incrementados en estas últimas. En forma diferente, se evidencia una falta de regulación de la MMP9 por óxido nítrico en tejido diabético gestacional. Tanto en el tejido sano como de mujeres con diabetes pregestacional y gestacional, los RLO son capaces de modular positivamente la actividad MMP9. Los RLO estarían incrementados y probablemente relacionados con la mayor actividad MMP9 en la placenta de mujeres diabéticas pregestacionales, mientras que esto no se evidencia en las mujeres con diabetes gestacional.

En conclusión, bajo la patología diabética el tejido placentario está sujeto a condiciones que modifican la actividad de la MMP9. Tanto el aumento como la disminución de la actividad enzimática, podrían estar alterando el correcto funcionamiento del órgano placentario, en el primer caso por una excesiva remodelación del tejido y en el segundo por una tasa de recambio y reparación tisular demasiado baja.

  
CAROLINA PUSTOVRH

  
ELIDA GONZALEZ

  
Alicia Jawerbaum



## BIBLIOGRAFIA

- \*Agrez M, Gu X, Giles W. (1999). Matrix metalloproteinase 9 activity in urine of patients at risk for premature delivery. *Am J Obstet Gynecol* 181:387-388.
- \*Alexander, C.M., Hansell, E.J., Behrendtsen, O., Flannery, M.L., Kishnani, N.S., Hawkes, S.P., Werb, Z. (1996). Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. *Development* 122:1723-1736.
- \*Athayde, N., Romero, R., Gomez, R., Maymon, E., Pacora, P., Mazor, M., Yoon, B.H., Fortunato, S., Menon, R., Ghezzi, F., Edwin, S.S. (1999). Matrix metalloproteinases-9 in preterm and term human parturition. *J. Matern. Fetal Med.* 8:213-219.
- \*Baricos, W.H. (1995). Chronic renal disease: do metalloproteinase inhibitors have a demonstrable role in extracellular matrix accumulation? *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens* 4:365-368.
- \*Baugh, M.D., Perry, M.J., Hollander, A.P., Davies, D.R., Cross, S.S., Lobo, A.J., Taylor, C.J., Evans, G.S. (1999). Matrix metalloproteinase levels are elevated in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 117:814-22.
- \*Belkhiri, A., Richards, C., Whaley, M., McQueen, S.A., Orr, F.W. (1997). Increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 by human endothelial cells after sublethal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure. *Semin Arthritis Rheum* 1998 27:392-399.
- \*Bonello, N., McKie, K., Jasper, M., Rew, L., Ross, N., Braybon, E., Brannstrom, M., and Norman, R.J. (1996). Inhibition of nitric oxide: effects on interleukin-1 beta-

enhanced ovulation rate, steroid hormones, and ovarian leukocyte distribution at ovulation in the rat. *Biol. Reprod.* 54(2), 436-445.

\*Bonfil, R.D., *Invasión y metastasis* (1998), *Bases de Oncología Molecular*. Bonfil, R.D., Scharovsky, G.O. Ed. Dunken. pp 177-196.

\*Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

\*Brinckerhoff, C.E. (1992). Regulation of metalloproteinase gene expression: implications for osteoarthritis. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 2:145-164.

\*Brinkedal-Hansen, H. (1993). Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J. Periodontol.* 64:474-484.

\*Brown, D., Hamdi, H., Bahri, S., Kenney, M.C. (1994). Characterization of an endogenous metalloproteinase in human vitreous. *Curr. Eye Res.* 13:639-647.

\*Brownlee, M., Cerami, A., Vlassara, H. (1988). Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med* 318:1315-1321.

\*Buhimschi, I., Ali M., Jain, V., Chwalisz, K., and Garfiel, R.E. (1996). Differential regulation of nitric oxide in the rat uterus and cervix during pregnancy and labour. *Human Reprod.* 11(8), 1755-1766.

\*Chaud, M., Franchi, A., Beron de Estrada, M., and Gimeno, M.A.F. (1997). Role of nitric oxide on oxytocin-evoked contractions and Prostaglandin synthesis in isolated pregnant rat uterus. *Prost. Leuk and Essential Fatty Acids* 57:323-329.

\*Cross, J.C., Werb, Z., y Fisher, S.J.(1994). Implantation and the placenta: Key pieces of the development puzzle. *Science* 266:1506-1518.

\*Das y col (Expression of matrix metalloproteinaases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the mouse uterus during the periimplantation period) Das SK, Yano S, Wang J, Edwards DR, Nagase H, Dey SK. *Dev. Genet* 21:44-54,1997.

\*Delaisse, J., Engsig, M.T., Everts, V., del Carmen Ovejero, M., Ferreras, M., Lund, L., Vu, T.H., Werb, Z., Winding, B., Lochter, A., Karsdal, M.A., Troen, T., Kirkegaard, T., Lenhard, T., Heegaard, A., Neff, L., Baron, R., Foged, N.T.(2000). Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. *Clin Chim Acta.* 15;291(2):223-234.

\*Diket, A.L., Pierce, M.R., Munshi, U.K., Volker, C.A., Eloby-Childress, S., Greenberg, S.S., Xiao- Jing Zhang, Clark, D.A., and Miller, M.J.S. (1994). Nitric oxide inhibition causes intrauterine growth retardation and hind-limb disruptions in rat. *Am. J. Obstet. Gynecol* 171(5), 1243-1250.

\*Ding, A.H., Nathan, C.F., and Stuerhr, D.J.(1988). Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J. Reprod. Fert.* 107:249-254.

\*Efendic, S., Luft, R., and Wajngot, A. (1984). Aspects of the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocrine Reviews* 5:410.

\*Erikson, U.J., Styrod, J. And Eriksson, R.S.M., (1985). Diabetes in pregnancy: Genetic and temporal relationships of maldevelopment in the offspring of diabetic rat. *En Carbohydrate metabolism in pregnancy and the newborn Cap. IV.*



- \*Eriksson, U.J., and Hakan Borg, L.A. (1993). Diabetics and embryonic malformations. Role of substrate-induced free-oxygen radical production for dysmorphogenesis in cultured rat embryos. *Diabetes* 42:411-419.
- \*Evans, C.H.(1995). Nitric oxide: what role does it play in inflammation and tissue destruction? In *inflammation: Mechanisms and Therapeutics*. N.S.e.a. Doherty, ed (Basel: Birkhauser Verlag), pp. 107-116.
- \*Förstermann, U., Closs, E.I., Pollock, J.S., Nakane, M., Schwarz, P., Gath, I., and Kleinert, H. (1994). Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 23(6) 2<sup>nd</sup> part. June, 1121-1131.
- \*Gandy, S.E., Buse M.G., Croush, R.K.(1982). Protective role of superoxide dismutase against diabetogenic drugs. *J. Clin. Invest.* 70:650.
- \*Giugliano, D., Ceriello, A. and Paolisso, G. (1995). Diabetes mellitus, hypertension, and cardiovascular disease: which role for oxidative stress? *Metab. Clin Exp.* 44:363-368.
- \*González ET, Jawerbaum A, Novaro V, Gimeno MAF.(1997).Effect of nitric oxide on uterine intermediary metabolism. *Endocrinol. Met.* 4:45-56.
- \*González, E., Jawerbaum A., Novaro, V., Sinner, D., Gimeno, M. (1998). Nitric oxide modulates placental prostanoid production from late pregnant non-insulin-dependent diabetic rat.. *Prost. Leuk & Essential Fatty Acids* 59: 299-304.
- \*González, E., Jawerbaum, A., Novaro, V., Sinner, D., Gimeno, M. (1998). Nitric oxide modulates placental prostanoid production from late pregnant non-insulin-dependent diabetic rat. *Prost. Leuk & Essential Fatty Acids* 59: 299-304.

\*Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. (1999)a. Oxygen is a toxic gas-an introduction to oxygen toxicity and reactive oxygen species. Free radicals in biology and medicine. Oxford science publications, ed.3<sup>a</sup>. pp1-35.

\*Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. (1999)b. Free radicals, other reactive species and disease. Free radicals in biology and medicine. Oxford science publications, ed.3<sup>a</sup>. pp 639-645.

\*Hewitt, K., Beer, A.E., and Grinnell, F. (1979).Disappearance of anionic sites from the surface of the rat endometrial epithelium at the time of blastocyst implantation. Biol. Reprod. 21:691-707.

\*Hodgen, G.D. and Itskovitz, J. (1988). Recognition and maintenance of pregnancy. In The Physiology of Reproduction. E. Knobil and col. ed. (New York: Raven Press, Ltd.), pp. 1995-2021.

\*Jawerbaum, A., Franchi, A.M., Gonzalez, E.T., Novaro, V., Gimeno, M.A.F. (1995). Hyperglycemia promotes elevated generation of TXA<sub>2</sub> in isolated rat uteri. Prostaglandins 50:47-56.

\*Jawerbaum, A., Gonzalez, E., Novaro, V., Faletti, A., Gimeno, M.A.F. (1998)a. Nitric oxide mediates increased prostaglandin E production by oocyte-cumulus complexes in the non-insulin-dependent diabetic rat. Rep. Fert. Dev. 10:185-190.

\*Jawerbaum, A., Gonzalez, E., Novaro, V., Sinner, D., Faletti, A., Gimeno, M.A.F. (1998)b. Increased prostaglandin E generation and enhanced nitric oxide synthase activity in the non-insulin-dependent diabetic embryo during organogenesis. Rep. Fert. Dev. 10: 191-196.

\*Kakka, R., Mantha, S.V., Radhi, J., Prasad, K., Kalra, J. (1997). Antioxidant defense system in diabetic kidney: a time course study. *Life Sci.* 60:667-679.

\*Kaley, G. And Koller, A. (1995). Prostaglandin in-Nitric oxide interactions in the microcirculation. *Adv. Prost. Throm. Leuk. Research* 23:485-490.

\*Kenneth, K.W. (1996). Inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase. In *Vascular Biology Research Center and Division of Hematology. Advances in Pharmacology*, volumen 33. The university of Texas Health Science Center at Houston, ed. (Houston, Texas 77025: Department of Internal Medicine), pp. 179-206.

\*Knowles, R.G., Salter, M., Brooks, S.L., and Moncada, S. (1990). Anti-inflammatory glucocorticoids inhibit the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the lung, liver and aorta of rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172 :1042-1048.

\*Knowles, R.G., and Moncada S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* 298:249-258.

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

\*Lee, Q. P., and Juchau, M. R. (1994). Dysmorphogenic effects of nitric oxide (NO) and NO synthase inhibition. Studies with intra amniotic injections of sodium nitropruside and N-monomethyl-L-arginine. *Teratology* 49:452-464.

\*Librach, C.L., Werb, Z., Fitzgerald, M.L., Chiu, K., Corwin, N.M., Esteves, R.A., Grobely D., Galaray, R., Damsky, C.h., Fisher, S. J. (1991) 92 KDa. Type IV Collagenase Mediates Invasion of Human Cytotrophoblasts. *The Journal of Cell Biology* 133:437-449.



\*Liotta, L.A., Steeg, P.S., and Stetler-Stevenson, W.G. (1991). Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64: 327-336.

\*Maeda, H., Okamoto, T., Akaike, T. (1998). Human Matrix Metalloprotease activation by Insults of bacterial Infection Involving Proteases and Free Radicals. *Biol. Chem.* 379:193-200.

\*Magness, R.R., Shaw, C.E., Phernetton, T.M., Zheng, J., and Bird, I.M. (1997). Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. II. Pregnancy effects on NO synthase expression. *Am. J. Physiol.* 272: H1730-H1740.

\*Mallof, B.L., and Boyd, B.K. (1986). Physiologic and cellular insulin action in a glucose-intolerant model of type 2 (no-insulin-dependent) diabetes in rats. *Diabetologia* 29:295-300.

\*Matrisian, L. (1990). Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet.* 6:121-125.

\*Matrisian, L.M. (1992) The matrix-degradating metalloproteinases. *BioEssays* 14:455-463.

\*Metzger, B. (1991). Summary and recommendations of the third international workshop conference on gestacional diabetes mellitus. *Diabetes* 40:201.

\*Miller, M.J.S., Voelker, C.A., Olister, S., Thompson, J.H., Zhang, X.J., Rivera, D., Eloby-Chidress, S., Liu, X., Clark, D.A., and Pierce, M.R. (1996). Fetal growth retardation in rats may result from apoptosis: role of peroxynitrite. *Free Rad. Biol. Med.* 21 (5), 619-629.

\*Misko, T.P., Moore, W.M., Kasten, T.P., Nickols, G.A., Corbett, J.A., Tilton, R.G., McDaniel, M.L., Williamson, J.R., and Currie, M.G. (1993). Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *EJP* 233:119-125.

\*Morton, R.L.(1998). Loss of lung mitochondrial aconitase activity due to hyperoxia in bronchopulmonary dysplasia in primates. *Am.J.Physiol.* 274:L127.

\*Murrell, G.A.C., Jang, D., Williams, R.J. (1995). Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage. *Bioch. and Bioph. Research Com.* 206:15-21.

\*National Diabetes Data Group (1979). Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 28 December.

\*Natuzy, E.S. Ursell, P.C., Harrison, M., Buscher, C., and Riemer, R.K. (1993). Nitric Oxide synthase activity in the pregnant uterus decreases at parturition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194 (1) July, 1-8.

\*Norman, J.E. and Cameron, I.T.(1996). Nitric oxide in the human uterus. *Reviews of Reproduction* 1:61-68.

\*Novaro V., González E., Jawerbaum A., Rettori V., Canteros G., Gimeno M.F. (1997). *Rep. Fert. Dev.* 9:557-564. Nitric oxide synthase regulation during embryonic implantation.

\*Novaro V., González E., Jawerbaum A., Rettori V., Canteros G., Gimeno M.F.(1997). Nitric oxide synthase regulation during embryonic implantation. *Rep. Fert. Dev.* 9:557-564.

- \*Novaro, V., Jawerbaum, A., Faletti, A., Gimeno, M.A.F. and González, E. (1998). Uterine nitric oxide and prostaglandin E during embryo implantation in non-insulin-dependent diabetic rats. *Rep. Fert. and Dev.* 10:217-223.
- \*Novaro, V., Rettori, V., Gonzalez, E., Jawernaum, A., Faletti, A., Canteros, G., Gimeno, M. A.F. (1996). Interaction between uterine PGE and PGF<sub>2α</sub> production and the nitridergic system during embryonic implantation in the rat. *Prostaglandins* 51:363-376.
- \*Novaro, V. (1998)b. Influencia de agentes vasoactivos en el proceso implantatorio embrionario. Alteraciones en la diabetes mellitus. Tesis de Doctorado. FCEN. UBA.
- \*Okamoto, T., Akaike, T., Nagano, T., Miyajima, S., Suga, M., Ando, M., Ichimori, K., and Maeda, H. (1997). Activation of human neutrophil procollagenase by nitrogen dioxide and peroxynitrite: A novel mechanism for procollagenasa activation involving nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 342:261-274.
- \*Ortega, F., Gonzalez- Avila, G., Furth, E.E., Lei, H., Muschel, W.G., Stetler-Stevenson and Strauss, J.F.(1995). 92 Kda Type IV Collagenase (Matrx Metalloproteinase-9) Activity in Human Amniochorion Increases with Labor. *Am. J. Pathol.* 146:148-156.
- \*Orucevic, A., Bechberger, J., Green, A.M., Shapiro, R.A., Billiar, T.R., Lala, P.K. (1999). Nitric-oxide production by murine mammary adenocarcinoma cells promotes tumor-cell invasiveness. *Int J Cancer* 11;81(6):889-96.
- \*Osmers, R.G., Adelman-Grill, B.C., Rath, W., Stuhatz, H.W., Tschesche, H. and Kuhn, W. (1995). Biochemical events in cervical ripening dilatation during pregnancy and parturition. *J. Obstet. Gynaecol.* 21:185-194.



\*Paez Pereda, M., Ledda, M.F., Goldberg, V., Chervin, A., Carrizo, G., Molina, H., Muller, A., Renner, U., Podhajcer, O., Arzt, E., Stalla, G.K. (2000). High levels of matrix metalloproteinases regulate proliferation and hormone secretion in pituitary cells. *J Clin Endocrinol Metab* 85:263-269.

\*Pedersen, J.F., and Molsted-Perdersen L.(1981). Early growth delay detected by ultrasound marks increased risk for congenital malformation in diabetic pregnancy. *Br.Med. J.* 283:269-271.

\*Petraglia, F., Santuz, M., Florio, P., Simoncini, T., Luisi, S., Plaino, L., Genazzani, A. D., Volpe, A. (1998). Paracrine regulation of human placenta: control of hormonogenesis. *J. Reprod. Immunol.* 39: 221-233.

\*Powers, R. E., Chambers, C., and Larsen, W. (1996). Diabetes-mediated decreases in ovarian superoxide dismutase activity are related to blood-follicle barrier and ovulatory defects. *Endocrinology* 137, 3101-10.

\*Psychoyos, A.(1973). Endocrine control of egg implantation. In *Hy Book of Physiology*. R.O. Greep, E.G. Astwood, and S.R. Geiger, eds. (Washington: American Physiological Society), pp.187.

\*Qin, X., Chua, P.K., Ohira, R.H., Bryant-Greenwood, G.D. (1997). An autocrine/paracrine role of human decidua relaxin. II. Stromelysin-1 (MMP-3) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1). *Biol Reprod Apr*;56(4):812-820.

\*Rajagopalan, S., Ping Meng, X., Ramasamy, S., Harrison, D.G., and Galis, Z.S. (1996) Reactive Oxygen Species Produced by Macrophage-derived Foam Cells Regulate the Activity of Vascular Matrix Metalloproteinases In Vitro. *J.Clin. Invest.* 98.2572-2579.

\*Rechberger, T. And Woessner, J.F. (1993). Collagenase, its inhibitors, and decorin in the lower uterine segment in pregnant women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 168:1598-1603.

\*Saari, H., Suomalainen, K., Lindy, O., Kronttinen, Y.T., and Sorsa, T. (1990). Activation of latent human neutrophil collagenase by reactive oxygen species and serine proteases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171:979-987.

\*Salamonsen, L.A. (1999). Role of proteases in implantation. *Reviews of Reproduction* 4:1122.

\*Samuel, E., Gandy, Buse, M.G., Crouch, R.K. (1982). Protective role of superoxide dismutase against diabetogenic drug. *J Clin Invest* 70: 650-658.

\*Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yakamoto, E., and Seiki, M., (1994). A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 370:61-65.

\*Schonfelder, G., John, M., Hopp, H., Fuhr, N., Van der Giet, M., and Paul, M. (1996). Expression of inducible nitric oxide synthase in placenta of women with gestational diabetes. *FASEB J.* 10:777-784.

\*Sharkey, M.E., Adler, R.R., Nieder, G.L., Brenner, C.A. (1996). Matrix metalloproteinase expression during mouse peri-implantation development. *Am J Reprod Immunol* 36:72-80.

\*Shaughnessy, S.G., Whaley, M., Lafrenie, R.M., and Orr, F.W. (1993). Walker 256 tumor cell degradation of extracellular matrices involves a latent gelatinase activated by reactive oxygen species. *Archives of Biochemistry and biophysics.* 304:314-321.

\*Shukovski, L. and Tsafiriri, A. (1994). The involvement of nitric oxide in the ovulatory process in the rat. *Endocrinology* 135 (5),2287-2290.

\*Sladek, S.M., Magness, R.R., and Conrad, K.P. (1997). Nitric oxide and pregnancy. *Am. J. Physiol.* 272:R441-R463.

\*Soares, M.J., Chapman, B.M., Rasmussen, C.A., Kameit, D.G. and Orwing, K.E. (1996). Differentiation of Trophoblast Endocrine Cells. *Placenta* 17:277-289.

\*Stetler-Stevenson, W. G., aznavoorian, S., Liotta, L.A.(1993). Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 9:541-573.

\*Strauss, J.F., and Gurside, E. (1992). The endometrium: regulation and dysfunction. In *Reproductive Endocrinology*. pp. 309-356.

\*Sun, Y., Oberley, L.W., Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 34: 497-500.

\*Talhok, R.S., Werb, Z., Biell, M.J.(1992). Functional interplay between extracellular matrix-degrading proteinases in the mammary gland: a coordinate system for regulating mammary epithelial function. In Fleming T.P., ED. *Epithelial Organization and Development*. London, Chapman & Hall, pp 329-352.

\*Tasikiran, D., Stefanovic-Racic, M., Georgescu, H., and Evans, C. (1994). Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200:142-148.

\*Tesfamariam, B.(1994). Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radical Biol. Med.* 16:383-391.



\*Tu FF, Goldenberg RL, Tamura T, Drews M, Zucker SJ, Voss HF (1998). Prenatal plasma matrix metalloproteinase-9 levels to predict spontaneous preterm birth. *Obstet Gynecol* 92:446-449.

\*Twining, S.S. (1994). Regulation of proteolytic activity in tissues. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 29:315-383.

\*Uchigata, Y., Hiroshi, Y., Akinori, K., Hiroshi, O. (1982). Protection by superoxide dismutase, catalase and Poly (ADP-RIBOSE) synthetase inhibitors against alloxan- and streptozotocin-induced islet DNA strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis. *J. Biol. Chem.* 252 (11):6084-6088.

\*Vadillo-Ortega, F., Hernandez, A., Gonzalez-Avila, G., Bremejo, L., Iwata, K., and Strauss J., (1996). Increased matrix metalloproteinase activity and reduced tissue inhibitor of metalloproteinases-1 levels in amniotic fluids from pregnancies complicated by premature rupture of membranes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 174:1371-1376.

\*Vagnoni, K.E., Zheng, J., Magness R.R. (1998). *Placenta* 19: 447-455.

\*Vane, J.R., Mitchell, J.A., Appleton, I., Tomlinson, A., Bishop-Bailey, D., Croxall, J., and Willoughby, D.A. (1994). Inducible isoforms of cyclooxygenase and NO synthase in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2046-2050.

\*Vercheval, M., De Hertogh, R., Pampfer, S., Verheryden, I., Michiels, B., De Bernardi, P., and De Meyer, R. (1990). Experimental diabetes impairs rat embryo development during the preimplantation period. *Diabetologia* 33:207-213.

\*Vettraino, I.M., Roby, J., Tolley, T., and Parks, W.C. (1996). Collagenase-1, stromelysin-1, and matrilysin are expressed within the placenta during multiple stages of human pregnancy. *Placenta* 17:557-563.

\*Weitlauf, H.M. (1994). Biology of Implantation. In *The Physiology of Reproduction* Second Edition. E. Knobil and J.D. Neill, eds. (New York: Raven Press, Ltd.), pp. 391-440.

\*Wentzel, P., Jansson, L., and Eriksson, U.J. (1995). Diabetes in pregnancy: uterine blood flow and embryonic development in the rat. *Pediatric Research* 38:598-606.

\*Wetzka, B., Charnock-Jones, D.S., Viville, B., Cooper, J.C., Nüsing, R., Zahradnik, H.P. and Smith, S.K. (1996). Expression of prostacyclin and thromboxane synthases in placenta bed after pre-eclamptic pregnancies. *Placenta* 17:573-581.

\*Williamson, J.R., Chang, K., Frangos, M., Hasan, K.S., Ido, Y., Kawamura, T., Nyengaard, J.R., Van den Enden, M., Kilo, C., and Tilton, R.G., (1993). Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes* 42:801-813.

\*Woessner, J.F. and Taplin, C. (1988). Purification and properties of a small latent matrix metalloproteinase of the rat uterus. *J. Biol. Chem.* 263:16918-16925

\*Woessner, J.F. Jr. (1991). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodelling. *FASEB* 5:2145-2153.

\*Wohaib, S.A., Godin, D.V. (1987). Alterations in free radical tissue-defense mechanisms in streptozotocin-induced diabetes in rat. *Diabetes* 36, 1014-8; Jain, S.K., McVie, J., Duett, J., and Herbst, J. (1989). Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes* 38:1539-43.

\*Yallampalli, C., Garfield, R.E., and Byam-Smith, M.(1993). Nitric oxide inhibits uterine contractility during pregnancy but not during delivery. *Endocrinology* 133(4), 1899-1902.

\*Yamanaka, N., Nishida, K., Ota, R. (1979). Increase of superoxide dismutase activity in various human leukemia cells. *Physiol Chem Phys* 11: 253-256.

\*Yu, A.E., Murphy, A.N., Stetler-Stevenson, W.G. (1998). 72-Kda Gelatinase (Gelatinase A): Structure, Activation, Regulation, and Substrate Specificity. *Matryx Metalloproteinases*. Ed. Parks, W.C. and Mecham R.P., Academic Press. pp 85-113.

