

Mediadores químicos en la implantación embrionaria

Zerith Andrea González Castillo ¹
Andrés Eduardo Hinojosa Mendoza ¹
Magda Belen Chinchilla ¹
Norma Cecilia Serrano Díaz ²

Resumen

La implantación embrionaria es un proceso complejo, eficiente en menos del 30% de los casos, en el cual están influyendo múltiples factores, tales como, hormonales, anatómicos, inmunológicos y genéticos. De la adecuada interacción entre el microambiente fetal y uterino se logrará finalmente el desarrollo del embarazo.

Dentro del proceso de implantación embrionaria se han logrado diferenciar tres fases, la aposición, la adhesión y la invasión. Para cada una de las etapas se requiere de la medición de diferentes factores químicos tales como, interleucinas, glicoproteínas, metaloproteínas, moléculas de adhesión, entre otras.

Un conocimiento adecuado de las siguientes fases y de los mediadores químicos que permiten su desarrollo, permitirá la intervención para lograr en un futuro tener mejores tasas de embarazos, especialmente en los programas de reproducción asistida.

Palabras clave

Implantación embrionaria, Aposición, Adhesión e Invasión embrionaria.

INTRODUCCIÓN

Se ha estimado que la implantación clínica del embrión en los humanos es eficiente en menos del 30% de los casos. Esta baja tasa de implantación debe estar relacionada con lo complejo del proceso, en el cual intervienen múltiples factores, tanto, hormonales, como anatómicos, inmunológicos y genéticos.

¹ Estudiante, III Semestre. Facultad de Medicina Universidad Autónoma de Bucaramanga.

² MD MSc Genética Humana. Facultad de Medicina Universidad Autónoma de Bucaramanga.

Correspondencia:

Zerith González, E-mail: andrea_med@hotmail.com

La implantación humana es un proceso progresivo en el cual el preembrión debe fijarse y adherirse al endometrio materno, y posteriormente invadirlo. En este complejo escenario se destacan dos actores: el endometrio materno y el embrión; de la adecuada interacción entre estos dos organismos que son genéticamente e inmunológicamente diferentes depende el éxito de la implantación.

En la implantación embrionaria se puede distinguir tres fases que están relacionadas y son consecutivas: aposición, adhesión e invasión.

Hacia el quinto día postovulación se inicia la fase de aposición; el blastocisto en estado de implantación, una vez ha perdido la zona pelúcida, busca el área uterina materna donde finalmente se anidará. Este proceso ocurre con más frecuencia en la pared posterior uterina. Durante esta fase aún no hay contacto directo entre blastocisto y el endometrio, por lo tanto el blastocisto puede ser desalojado de la cavidad uterina con un simple lavado.

En la fase de adhesión la cual ocurre entre el día 6 a 7 postovulación, se establece ya una conexión física y funcional entre el endometrio y el blastocisto.

Finalmente en la fase de invasión, el trofoblasto penetra y remueve el epitelio endometrial, destruyendo la membrana basal e introduciéndose dentro del estroma para lograr invadir los vasos sanguíneos uterinos¹.

El objetivo de la presente revisión es analizar y discutir la función e importancia de algunos mediadores químicos involucrados en las diferentes fases de este proceso.

FASES DE LA IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA Y MEDIADORES QUÍMICOS INVOLUCRADOS

El proceso de implantación del embrión al endometrio materno es un proceso complejo de crecimiento e invasión autocontrolado, en el cual se encuentran involucrados varios mediadores químicos, tales como, interleuquinas, factores de crecimiento, glicoproteínas y moléculas de adhesión. Para cada una de las fases se ha logrado describir a través de ensayos *in vitro*, y algunos *in vivo* que mediadores están interviniendo.

Fase de Aposición

En humanos, la fase de aposición esta controlada por el desarrollo del linaje embrionario, y por el microambiente uterino. Alteraciones en esta fase tendrán como resultado el establecimiento de un embarazo ectópico.

Fase de Adhesión

En esta fase se deben poner en contacto células trofoectodérmicas del blastocisto con las del epitelio uterino, que corresponden a células polarizadas con un dominio basolateral y otro apical. El primero relacionado con la lámina basal y las células vecinas, a quienes se

adhieren por medio de uniones anclantes mediadas por integrinas. El dominio apical, en cambio, presenta microvellosidades para incrementar la superficie de contacto con el medio externo.

Los estudios sobre los mediadores de esta fase se han realizado en animales, dado las dificultades técnicas y éticas que implica hacer estos análisis en humanos. A continuación se explicaran dos de las moléculas de mayor importancia en esa fase.

Glicoproteínas. En ratones para la adecuada implantación embrionaria se requiere de la modulación a través de glicoconjugados de superficie celular, tanto en el epitelio uterino como en el trofoectodermo². En conejos se ha descrito la presencia de nuevas glicoproteínas en la superficie apical del epitelio luminal uterino, en el período de receptividad endometrial³.

Una vez establecida la presencia de glicoconjugados durante esta fase, se empezó a experimentar con diferentes oligosacáridos para ver su efecto en modelos *in vitro*. Los ensayos consistieron en analizar la fase de adhesión del blastocisto de ratón a monocapas de tejido endometrial.

Al adicionar al cultivo lacto-N-fucopentosa 1 (LNF-1), se inhibe de manera significativa la adhesión y el crecimiento⁴. Más tarde se conoció que el blastocisto de ratón expresa receptores para LNF-1^{5,6}. El LNF-1 es expresado por las células epiteliales uterinas durante los primeros 4 días de gestación, siendo ésta expresión inducida por estrógenos⁷. El LNF-1 es un pentasacárido el cual contiene un epítipo Tipo-H. Este epítipo en humanos es un antígeno sanguíneo fucosilado, pero en roedores es un antígeno de superficie. La enzima α -(1.2)-Fucosiltransferasa, es la encargada de catalizar el paso final en la formación del epítipo Tipo-H. Dado que los estrógenos y progestágenos inhiben esta enzima en el epitelio luminal uterino, se cree que esta fucosiltransferasa bajo el influjo hormonal, es un factor limitante de la adhesión del blastocisto en ratones⁸.

Es posible que no sea sólo esta glicoproteína la que está involucrada en el proceso de adhesión, pero lo que queda claro es que los carbohidratos inducidos por los estrógenos juegan un papel crucial en la adhesión del trofoblasto al epitelio endometrial en roedores⁹.

En los roedores el proceso de implantación es notoriamente dependiente de los estrógenos, pero estos no son particularmente importante en los primates¹⁰. Sin embargo oligosacáridos, y especialmente glicoaaminoglicanos, están implicados en el proceso de adhesión del blastocisto humano al endometrio¹¹.

Dentro los glicoaaminoglicanos se ha estudiado el Perlecan, el cual se expresa en la superficie del blastocisto en el momento de la adhesión. El Perlecan se puede unir a la integrina $\alpha v \beta 3$ ¹², la cual se expresa significativamente en el epitelio uterino humano, solo en el tiempo de im-

plantación¹³, este es modelo más cercano para especular que estas moléculas están implicadas en el proceso de adhesión del trofoblasto.

Citoquinas. Para el buen desarrollo de esta fase también se ha postulado como hipótesis la intervención de algunas citoquinas, tales como, el Factor Inhibidor de Leucemia (LIF), la Interleuquina 1 (IL-1), y posiblemente otros, como también sus receptores específicos distribuidos a lo largo de endometrio y el embrión. Un adecuado control endocrino dado por las hormonas, y paracrino/autocrino a través de citoquinas y factores de crecimiento, podría disparar el mutuo reconocimiento entre el blastocisto y el endometrio por activación de moléculas de adhesión que permitirían el contacto físico entre embrión y endometrio¹⁴.

Alteraciones en esta fase se asocian a infertilidad de origen desconocido, falla en la implantación posterior a la transferencia embrionaria en los casos de reproducción asistida, y pérdida temprana del embarazo antes de ocurrir la menstruación¹⁵.

Fase de invasión

La invasión del endometrio por el trofoblasto se inicia al octavo día postovulación, cuando el blastocisto rompe la lámina basal mediante un proceso enzimático autocontrolado de proteólisis. Una vez rota la estructura molecular de dicha lámina el trofoblasto puede invadir el estroma y tener a sí mismo acceso a los vasos sanguíneos maternos (Fig 1)¹⁶.



Figura 1. Implantación Embrionaria¹⁶.

Proteasas. Esta acción es mediada por proteasas secretadas por las células del trofoectodermo y citotrofoblasto, las cuales degradan la matriz extracelular^{17,18}. Se han involucrado varias proteasas en este proceso, tales como, serin-proteasas, Metaloproteinasas (MMP), catepsinas y colagenasas^{19,19}, de todas estas enzimas, quizás las mejor estudiadas han sido las metaloproteinasas.

Las MMP, son una familia de endopeptidasas dependientes de zinc, con actividad proteolítica en contra de algunos componente de la matriz extracelular²⁰. Estas enzimas son secretadas en forma inactiva como proenzimas o zimógenos, las cuales son activadas por hidrólisis parcial del propéptido. La activación de la forma inactiva de la enzima (proMMPs), a la forma activa (MMPs), se puede reproducir *in vitro* adicionando diferentes agentes, tales como las sales mercuriales. La activación de estas enzimas *in vivo* se desconoce aún, pero se ha encontrado que el plasminógeno, la MMP-3, son potentes activadores de las MMPs^{21,22}.

Las MMPs se clasifican en cuatro familias de acuerdo con el sustrato específico (Tabla 1):

Tabla 1. Propiedades Bioquímicas de las Metaloproteinasas²².

NOMBRE	SUSTRATO	LOCALIZACIÓN DEL GEN
MMP-1	Col. I, II, III, VII X, MMP-5, entactina	11q22-q23
MMP-2	Col. IV, V, VII, X gelatina, fibronectina Elastina	11q13
MMP-3	Col. II, IV, IX, X gelatina, laminina, Fibronectina, elastina, caseína	11q23
MMP-7	Caseína, fibronectina, gelatina	11q21-q22
MMP-8	Col. I, III	11q21q22
MMP-9	Col. IV, V, gelatina	20q11.2-q13.1
MMP-10	Col. II, IV, V fibronectina	11q22.3-q23
MMP-11	Col. IV	22q11.2
MMP-13	Col I	11q22.3
MMP-14	MMP-2	14q11-q12
MMP-15	MMP-2	

1. Gelatinasas: conformado por dos enzimas, la gelatinasas A y B, de 72 y 92 kDa respectivamente. También son denominadas como MMP-2 y MMP-9. Estas proteasas digieren el colágeno tipo IV.

2. Colagenasas: este grupo está conformado por tres proteasas, la colagenasa intersticial (MMP-1 o colagenasa -1), la neutrófilo colagenasa (MMP-8) y la colagenasa 3 (MMP-13). Estas enzimas digieren el colágeno tipo I, II, III, VII y X.
3. Estromelisininas: este grupo está conformado por cuatro enzimas: MMP-3,7,10 y 11, también denominadas estromelisina 1, matrilisina, estromelisina 2 y 3 respectivamente. Estas enzimas digieren el colágeno tipo IV, V y VII, como también la laminina, fibronectina, proteoglicanos y gelatinas.
4. Metaloproteinasas de Membrana (MT-MMP): incluye tres enzimas de unión a membrana (MMP-14, 15, 16). El sustrato fundamental de estas tres enzimas es el proMMP-2 para activarlo e iniciar el frente invasivo ²³.

Moléculas de Adhesión (CAM). De manera más reciente las moléculas de adhesión se ha involucrado en la capacidad que tiene el citotrofoblasto (CTB), de actuar como una célula metastásica e invadir el endometrio. Las CAM están conformadas por cuatro subfamilias de moléculas: caderinas, inmunoglobulinas, selectinas e integrinas. Las caderinas y las selectinas son glicoproteínas de membrana calcio dependientes involucradas en la unión célula a célula. Las inmunoglobulinas permiten la unión célula a célula en una vía calcio independiente, mientras que las integrinas regulan principalmente, pero no exclusivamente, la interacción sustrato célula en una vía calcio dependiente.

Integrinas. A través de estudios *in vitro*, se estableció que el trofoblasto y particularmente el citotrofoblasto expresa

integrinas durante el proceso de invasión. La integrina $\alpha 6\beta 4$ que actúa como receptor de la laminina, se expresa a manera de *cluster* en toda la membrana basal, en la medida que proliferan las células del citotrofoblasto para formar las vellosidades primarias; la integrina $\alpha 6\beta 4$ sigue expresándose, pero ya no a manera de *cluster*, probablemente permitiendo que el citotrofoblasto se torne móvil y se dispare la invasión al endometrio. El CTB localizado ya en el interior de endometrio pierde la capacidad de expresar la integrina $\alpha 6\beta 4$ y empieza a expresar la integrina $\alpha 5\beta 1$, la cual actúa como receptor para fibronectina.

El citotrofoblasto que ya ha invadido los vasos sanguíneos endometriales expresa otra integrina la $\alpha 1\beta 1$, conocida como receptor para el colágeno. Estas observaciones muestran que el citotrofoblasto invasor se adapta de manera sucesiva a los diferentes microambientes ^{24,25}. El CTB del primer trimestre expresando la subunidad de la integrina $\alpha 6$, secreta altas concentraciones de gelatinasas y bajas concentraciones de fibronectina, comparado con el CTB que expresa la subunidad de la integrina $\alpha 5$, a su vez ambos tipos de CTB secretan cantidades similares de Hormona Gonadotrofica Coriónica Humana (hCG) ²⁴.

De estas observaciones *in vitro* se puede concluir que durante la invasión del trofoblasto, el CTB extraveloso que expresa la integrina $\alpha 6\beta 4$ representa la población invasiva de este, una vez las células expresan la integrina $\alpha 5\beta 1$, el comportamiento invasivo y la secreción de gelatinasa para que las células se tornen inmóviles e inician la secreción de fibronectina. La fibronectina es depositada en la matriz extracelular y contribuye al anclaje del CTB dentro del endometrio (Fig 2) ²⁶.

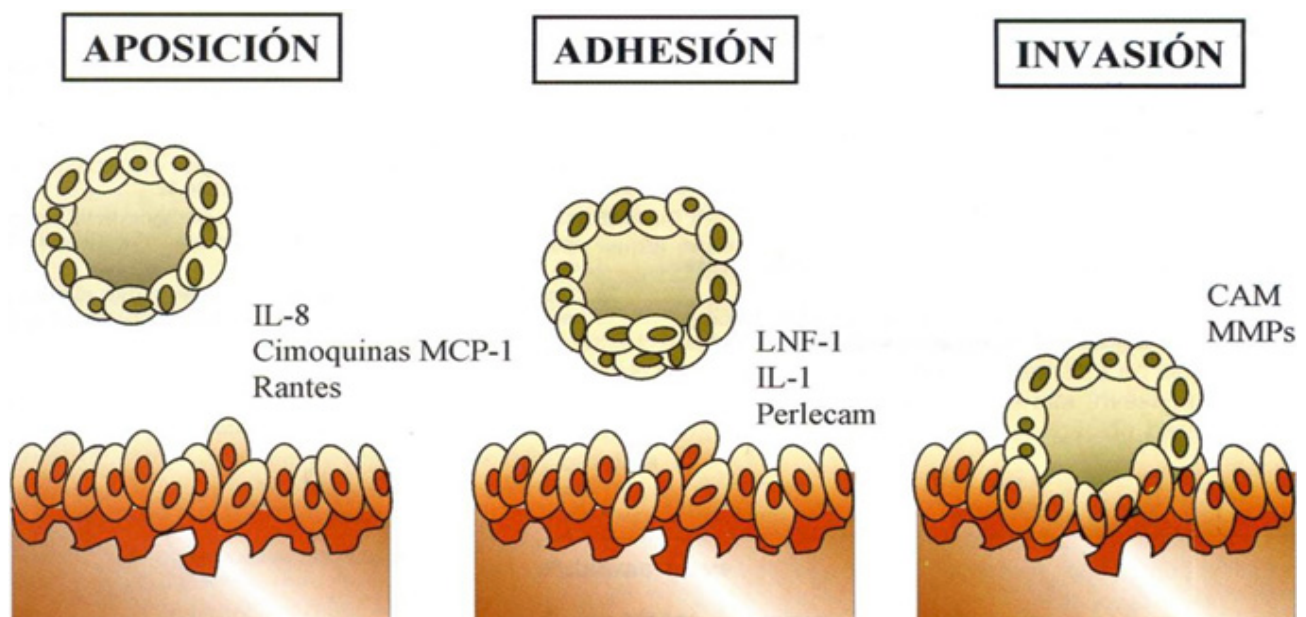


Figura 2. Principales mediadores moleculares involucrados en las diferentes fases de la implantación embrionaria ²⁶.

CONCLUSIÓN

Aunque el citotrofoblasto obra como células metastásicas, esta función es autocontrolada en espacio y tiempo. La invasión del CTB sólo se da durante el primer trimestre de la gestación y se limita al endometrio y al tercio proximal del miometrio. El control de la invasión esta dada por mediadores químicos tanto uterinos como embrionarios. Dentro de estos mediadores químicos se destaca la acción que ejercen los glicoconjugados y citoquinas durante la fase de Adhesión; las proteasas, citoquinas y moléculas de adhesión durante la fase de invasión.

Del adecuado conocimiento de estos mediadores se logrará en un futuro cercano su intervención, para mejorar las tasas de implantación particularmente en los procesos de reproducción asistida.

SUMMARY

The implantation of the embryo is a very complex process, efficient in less than 30% of cases. This process is influenced by several factors, including hormonal, anatomical, immunological and genetic. The successful development of the pregnancy depends on the interaction between the fetal and the uterine microenvironments.

Three phases of the implantation process have been described: apposition, adhesion and invasion. Each one of these steps requires the measurement of different chemical factors, such as interleukins, glycoproteins, metalloproteins and adhesion molecules, among others.

Sufficient knowledge of the different phases and of the chemical mediators which allow their development will help to achieve a better rate of pregnancies in the near future, especially in programs of assisted reproduction.

Key words: embryonic implantation, embryonic apposition, adhesion and invasion

REFERENCIAS

- Lindenberg S, Pedersen B, Hamberger L, et al. Model for human implantation derived from implantation in vitro. *Reprod Fertil Devel.* 1992; 4:653-70.
- Chavez DJ. Cell surface of the mouse blastocysts at the trophectoderm-uterine interface during the adhesive stage of implantation. *Am J Anat* 1996;176:153-58.
- Anderson TL, Olsen GE, Hoffman Lh. Stage specific alterations in the apical membrane glycoprotein of endometrial epithelial cell related to implantation in the rabbit. *Biol Reprod* 1986;34:701-20.
- Lindenberg S, Sundberg K, Kimber SJ, et al. The milk oligosaccharide, lacto-N-fucopentaose I, inhibits attachment of mouse blastocysts on endometrial monolayers. *J Reprod Fertil* 1988;83:149-58.
- Lindenberg S, Kimber SJ, Kallin E. Carbohydrate binding properties of mouse embryos. *J Reprod Fertil* 1990;89:431-39.
- Yamaga T, Tamazaki K. Implanting mouse embryo stain with a LNF-I bearing fluorescent probe at their mural trophoctodermal side. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;181:1004-09.
- Kimber SJ, Lindenbeerg S. Hormonal control of a carbohydrate epitope involved in implatation in mice. *J Reprods Fertil* 1990;89:13-21.
- White S, Kimber SJ. Changes in a (1,2)-fucosyltransferase activity in the murine endometrial epithelium during the oestrous cycle, early pregnancy, and after ovariectomy and hormone replacment. *Biol Reprod* 1994;50:73-81.
- Fenderson BA, Eddy EM, Hakomori SI. Glyconjugate expresion during embryogenesis and its biological significance. *Bioessays* 1990;12:173-80.
- Ghosh D, De P Sengupta. Luteal phase ovarian oestrogen is not essential for implantation and maintenance of pregnancy from surrogate embryo transfer in rhesus monkey. *Hum Reprod* 1994;9:629-37.
- Rohde LH, Carson DD. Heparin like glycosaminoglycons participate in binding of human trophoblastic cell line (Jar) to human uterine epithelial cell line (RL95). *J Cell Physiol* 1993;155:185-96.
- Hayashi K, Madri J, Yurchenco P. Endothelial cells interact wiyh the core protein of basement membrane perlecan through alpha 1 and beta 3 integrins: an anhesion modulated by glycosaminoglycan. *J Cell Biol* 1992;119:945-55.
- Lessey BA, Damjanovich L, Coutifaris C, et al. Integrin adhesion molecules in human endometrium. *J Clin Invest* 1992;90:188-95.
- Simón C, Gimeno MJ, Mercader A, et al. Cytokines-Adhesion Molecules-Invasive Proteinases. The missin paracrine/autocrine link in embryonic implantation? *Mol Hum Reprod* 1996;6:405-24.
- Simón C, Landeras J, Zuzuarregui J, et al. Early embryonic losses after oocyte donation. LIII Annual Meeting of the ASRM. *Fertil Steril (Suppl)* 1997;114-15.
- Dexeus JM. El nacimiento de un niño. Barcelona: SALVAT Editores; 1974:39
- Fiseher Sj, Cui T, Zhang L, et al. Adhesive and degradative properties of human placental cytotrophoblast cells in vitro. *J Cell Biol* 1989;109:891-902.
- Bischof P, Martelli M, Campana A, et al. Importance of metalloprotein-asas (MMP) in human trophoblast invasion. *Early Pregn Biol Med* 1995;1:263-69.
- Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Sciences.* 1987;238:491-97.
- Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* 1990;6:121-25.
- Murphy G, Atkinson S, Ward R, et al. The role of plaminogen activators in the reulation of connective tissue metalloproteinases. *Ann NY Acad Sci* 1992; 667:1-12.
- Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H. Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for human matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem* 1992;267:3581-84.
- Bischof P, Meisser A, Campana A. Metalloproteinases, cell adhesion and invasion molecules in human implatation and placentation. *Proceedings o the XVI World Congress on Fertility and Sterility, San Francisco, 1998* 651-59.
- Bischof P, Haenggeli L, Campana A. Gelatinase and oncofetal fibronectina secretion are dependent upon integrin expresion on human cytotrophoblasts. *Hum Reprod* 1995; 10:734-42.
- Burrows TD, King a, Loke TW. Expression of integrins by human trophoblast and differential adhesion to laminin in a fibronectin. *Hum Reprod* 1993;8:474-84.
- Simón C. Molecular mechanism implantation and assessment of uterine receptivity. *Course XVI Immunology in Reproductive Medicine, San Francisco, 1998: 102.*