
EL IGF-II ESTIMULA LA ACTIVIDAD DE MMP-9 Y MMP-2 EN UN MODELO DE TROFOBLASTO HUMANO

IGF-II Stimulates MMP-9 and MMP-2 Activity in a Human Trophoblast Model

SANDRA SUSANA NOVOA-HERRÁN¹, Química, Estudiante de
Maestría; MYRIAM SÁNCHEZ-GÓMEZ¹, M.Sc., Profesora Titular.

¹ Grupo de Investigación en Hormonas, Departamento de Química,
Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
Carrera 30 # 45-03, edificio 451, oficina 464.
mysanchezd@unal.edu.co

Presentado 25 de agosto de 2010, aceptado 14 de enero de 2011, correcciones 2 de febrero de 2011.

RESUMEN

La invasión del útero por el trofoblasto extraveloso de placenta de primer trimestre (EVCT) depende de la secreción de metaloproteasas de matriz (MMPs) que degradan la matriz extracelular y dentro de las cuales las gelatinasas MMP-9 y MMP-2 juegan un papel muy importante. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de los ligandos del sistema de factores de crecimiento similares a la insulina (IGF) en la actividad de gelatinasas en una línea celular establecida de trofoblasto extraveloso invasivo, HTR8/SVneo. Mediante ensayos de zimografía se encontró que el tratamiento con IGF-II 10 nM estimula la actividad de proMMP-9 y proMMP-2 con un máximo a las 24 horas. Dosis mayores de IGF-II mostraron un efecto inhibitorio en la actividad proteasa. Adicionalmente, el IGF-II 10 nM estimuló la actividad de otras dos gelatinasas no identificadas de peso molecular 52 kDa tras tratamiento por 24 horas. Ni la insulina ni el IGF-I en concentraciones 10 nM mostraron un efecto estimulador en la actividad de las gelatinasas. Estos resultados muestran el papel potencial del sistema IGF en la regulación de la invasión celular y ayudan a comprender el desarrollo del crecimiento maligno.

Palabras clave: trofoblasto, invasión, IGF, MMP, actividad.

ABSTRACT

Invasion of the uterus by first trimester placental extravillous trophoblast (EVT) cells depends on matrix metalloproteinase (MMPs) secretion to degrade the extracellular matrix; among these, MMP-2 and MMP-9 gelatinases play a pivotal role. The aim of this work was to determine the effect of ligands of the insulin-like growth factor system (IGF) on gelatinase activity in HTR8/Svneo cells, a well-established invasive extravillous trophoblast cell line. By zymography assay, we found that treatment with 10 nM IGF-II stimulates proMMP-9 and proMMP-2 activity with a peak at 24 hours, whereas higher IGF-II doses showed an inhibitory effect on the protease activity. Additionally, IGF-II

stimulation resulted in the activation of two other gelatinases, with MW around 52 kDa, which remain to be identified. Neither insulin nor IGF-I were able to stimulate the activity of gelatinases at the time and doses utilized in this study. These results support the potential role of the IGF system in the regulation of cell invasion and malignant growth.

Key words: trophoblast, invasion, IGF, MMP, activity.

INTRODUCCIÓN

Durante el primer trimestre de embarazo, el trofoblasto se establece y diferencia. Un conjunto especializado de células trofoblásticas, denominado citotrofoblasto extraveloso (EVCT) rompe múltiples membranas basales (incluyendo el endometrio epitelial y glandular, vasos sanguíneos y células deciduales) y degrada la matriz extracelular intersticial del endometrio, hasta producir la invasión del estroma uterino y del primer tercio del miometrio, junto con la modificación de las arterias espirales (Ferretti *et al.*, 2007). Una invasión adecuada por parte del trofoblasto extraveloso es vital para el establecimiento correcto del embarazo.

El proceso invasivo del trofoblasto comparte muchas características con tumores metastásicos; sin embargo éste se encuentra regulado espacial y temporalmente (Ferretti *et al.*, 2007). La comparación de células trofoblásticas con tumores y células cancerosas invasivas ofrece un modelo atractivo para comprender el origen y desarrollo del crecimiento maligno. Para que se lleve a cabo el proceso de invasión es necesario que se den cambios en el acoplamiento físico de las células a su microambiente, es decir alteración en el fenotipo de adhesión molecular, activación de proteasas extracelulares, y subsecuente migración de la célula gracias a cambios en el citoesqueleto (Graham y Lala, 1992).

Dentro de las proteasas se encuentran las metaloproteasas de matriz (MMPs), endopeptidasas dependientes de zinc que van a degradar la matriz extracelular (MEC) y cuya acción se encuentra regulada por la unión a diversos inhibidores, incluidos los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs). De esta familia, las gelatinasas MMP-9 y -2 han sido las más caracterizadas en casos de cáncer, jugando la MMP-9 un rol relevante en procesos invasivos; esta última degrada colágeno tipo IV, principal constituyente de la MEC y su inhibición se da por la unión al TIMP tipo 1 (van den Steen *et al.*, 2002). Tanto MMP-9 como MMP-2 son secretadas durante el primer trimestre de embarazo por el trofoblasto y participan en los procesos invasivos de éste, siendo requeridas la síntesis y activación de la MMP-2 y MMP-9 para la invasión trofoblástica (Staun-Ram *et al.*, 2004).

El sistema de factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs) juega un papel fundamental en el desarrollo de diferentes tejidos como regulador de proliferación, diferenciación celular, invasión y apoptosis; la desregulación de este sistema conduce a estimulación del crecimiento tumoral y canceroso (Denley *et al.*, 2005). Diversos estudios han implicado a los IGFs en el control de la interface feto-placentar durante el embarazo humano (Fowden, 2003). Se ha visto que tanto IGF-II como IGF-I en menor grado, incrementan el número celular y los niveles (actividad gelatinasa) de MMP-2 y MMP-9 en células de trofoblasto veloso de primer trimestre (VCT); mientras que en células de VCT a término el número celular y los niveles de MMP-2 y MMP-9 no se ven

afectados por los IGFs, sugiriendo una regulación temporal de la invasión y expresión de MMPs por los IGFs en estas células (Hills *et al.*, 2004).

Suficiente evidencia sugiere que IGF-II juega un rol importante en la regulación del crecimiento fetoplacental mediante estimulación de la migración/invasión del trofoblasto extraveloso de una forma autocrina/paracrina (Irving y Lala, 1995); en cultivos primarios de trofoblasto extraveloso se ha visto que el efecto de IGF-II sobre la invasión del trofoblasto se da por estimulación de la migración y no tiene influencia sobre la expresión ni secreción de gelatinasas (Hamilton *et al.*, 1998; Lala *et al.*, 1998). Adicionalmente en líneas celulares de EVCT (HTR8/SVneo) se ha visto que IGF-II estimula la migración del trofoblasto por señalización a través del receptor IGF-IIR de forma independiente del IGF-IR, involucrando proteínas G inhibitorias y la activación de la vía MAPK (McKinnon *et al.*, 2001).

Debido a que el proceso invasivo que permite el desarrollo del embarazo es desarrollado por células de trofoblasto extraveloso de primer trimestre (EVCT), es de gran interés estudiar el efecto de IGFs sobre esa subpoblación específicamente. Sin embargo, existe divergencia entre el efecto de IGF-II sobre la invasión del VCT y del EVCT, y dadas las observaciones anteriores se hace necesario confirmar el efecto que podría tener el IGF-II sobre la expresión y actividad de MMP-9, al ser ésta un parámetro de invasión en trofoblasto y diversos tumores (Staun-Ram *et al.*, 2004), para de esta forma ampliar el panorama que permita comparar la regulación existente en el proceso invasivo del trofoblasto con respecto a cáncer.

MATERIALES Y MÉTODOS

LÍNEA CELULAR Y CONDICIONES DE CULTIVO

La línea celular de citotrofoblasto extraveloso HTR8/SVneo fue donada por la Dra. Ángela Cadavid, Universidad de Antioquia, Colombia. Esta línea celular fue desarrollada de un cultivo de explante de placenta humana de primer trimestre e inmortalizada por transfección con un ADNc que codifica el antígeno T 40 grande del virus de simio (Graham *et al.*, 1993). Estas células exhiben un índice de proliferación alto y comparten varias similitudes fenotípicas con las células parentales de HTR8, incluyendo habilidades invasivas *in vitro*. Las células se trabajaron del pase 15 al 20 y se cultivaron a 37 °C en atmósfera húmeda con CO₂ al 5% en medio RPMI (Sigma Chemical Co.) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco, Invitrogen™), 1% de L-glutamina (Gibco, Invitrogen™) y 1% de PEST (100 U/ml de penicilina/estreptomicina; Gibco, Invitrogen™). Las células fueron plaqueadas a platos de cultivo de 60 mm, incubadas por dos días en medio suplementado y deprivadas toda la noche en medio libre de proteína, tras lo cual se colocaron los estímulos en la dosis y por el tiempo señalado.

ESTÍMULOS

Los estímulos que se utilizaron fueron: Insulina (GroPep, grado receptor), IGF-I (GroPep, grado receptor) o IGF-II (GroPep, grado receptor) en concentración de 10 nM y por tiempos de 0, 6, 12, 24 o 36 horas. Adicionalmente se empleó IGF-II en concentraciones de 1, 2, 5, 10 o 20 nM y por tiempos de 18, 21, 24, 27 o 30 horas.

ANÁLISIS POR ZIMOGRAFÍA

La actividad de MMP-9 y MMP-2 en el medio condicionado fue determinada mediante zimografía. 30 μ l de medio fueron incubados con 10 μ l de buffer carga [200 mM Tris base, 8% SDS (dodecil sulfato de sodio), 0,04% azul de bromo fenol y 40% glicerol] y separados mediante electroforesis en geles de zimografía Novex (Invitrogen™, gel Tris-glicina 10% con 0,1% de gelatina como sustrato). El gel fue lavado [Tritón X-100 2,5% (v/v) por 1 h, y cuatro lavados con agua por 5 minutos] para remover el SDS, e incubado (18 h, 37 °C) en buffer renaturalizante (5 mM Tris base, 4 mM HCl, 20 mM NaCl, 0,5 mM CaCl₂). Como marcador de peso molecular se usó el estándar proteico BenchMark™ preteñido (Invitrogen™). Los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250 (a 0,1% en 3:6:1 MeOH : H₂O : ácido acético) y enjuagados con agua destilada. La actividad proteolítica fue detectada como una banda clara en un fondo azul. Las imágenes fueron digitalizadas y analizadas mediante el *software* Quantity One 4.6 (Bio-Rad®). Los resultados se expresan como densidad relativa. La densidad fue medida por triplicado y los resultados se expresan como densidad relativa promedio \pm S.E.M.

RESULTADOS

EFFECTO DEL IGF-II SOBRE LA ACTIVIDAD DE GELATINASAS MMPS

Se observó una actividad basal de proMMP-9 y MMP-2 en el medio condicionado de HTR8/SVneo, la cual no es evidente en algunos geles, pero sí es detectable en el análisis densitométrico, como se muestra en la figura 1, y se observa en otros geles a tiempo cero, como el gel de la figura 4.

El cultivo de células trofoblásticas en presencia de IGF-II (10 nM) genera un aumento notorio en la actividad de proMMP-9 (92 kDa) a las 24 h, después de lo cual disminuye la actividad en el tiempo, hasta niveles basales. Debido a la gran actividad que presenta la proMMP9, muchas veces enmascara la banda que corresponde a su forma madura MMP-9 (82 kDa); es posible diferenciar estas dos bandas en algunos geles, observando una banda de menor intensidad debajo de la zona de gran actividad proteolítica. No obstante, ésta no se ilustra debido a las dificultades en la obtención de la imagen digital y se trabajaron las dos formas en general bajo el nombre de MMP-9.

En contraste, la actividad de MMP-2 no se ve afectada significativamente por este tratamiento, pero sí la correspondiente a la forma proMMP-2 (72 kDa), que se muestra activa tras tratamiento durante 24 horas con IGF-II 10 nM; esta actividad se observa arriba de la banda que corresponde a MMP-2, en el carril 24 h de la figura 1. Llama la atención el hecho de que a tiempos y dosis diferentes de estímulo se observa una banda azul, indicativa de proteína, por encima de la zona de actividad de MMP-2, como se observa en las figuras 2, 3 y 4; esta banda podría corresponder a la proteína proMMP-2 inactiva. Adicionalmente, el tratamiento con IGF-II 10 nM induce a las 24 horas la actividad de dos gelatinasas adicionales de peso molecular menor a MMP-2, la más pesada con mayor actividad que la otra y denominadas 1 y 2 respectivamente (Fig. 1). También se evaluó el efecto del IGF-II 10 nM con diferencias de tiempo más pequeñas y cercanas a 24 horas, encontrándose el mismo comportamiento, con una actividad máxima a las 24 horas y un descenso en la actividad a partir de las 27 horas (Fig. 2). Para evaluar si la actividad de proMMP-9 es dosis dependiente se llevaron a cabo ensayos con diferentes

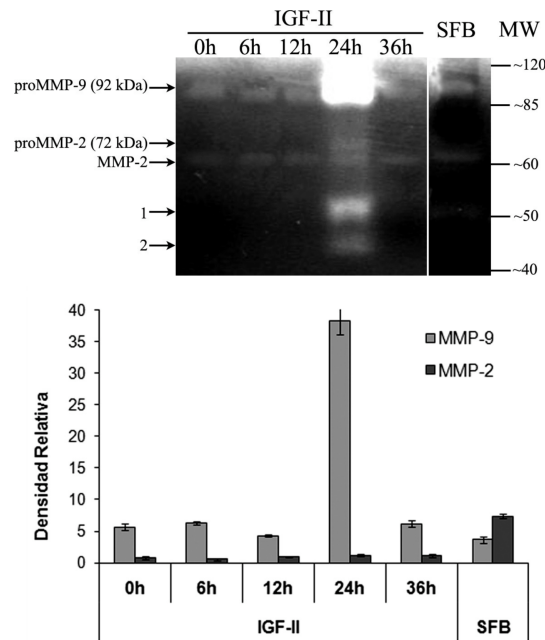


Figura 1. Efecto de IGF-II 10 nM sobre la actividad de las gelatinasas MMP-9 y MMP-2, a diferentes tiempos (0, 6, 12, 24 y 36h); control positivo: SFB. Panel superior: zimografía representativa de proMMP-9 y proMMP2. Panel inferior: representación gráfica de la actividad relativa de MMPs. Todos los datos son densidad relativa promedio \pm S.E.M. (n=3).

concentraciones de IGF-II durante 24 horas (Fig. 3), encontrando un incremento en la actividad únicamente a 10 nM, pero que disminuye con la dosis 20 nM.

EFFECTO DE IGF-I E INSULINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE MMPS GELATINOLÍTICAS

El tratamiento con IGF-I 10 nM a diferentes tiempos no mostró ningún cambio significativo a través del tiempo de la actividad de las gelatinasas expresadas de forma basal por células trofoblásticas (Fig. 4). Resultados similares se encontraron al estimular los cultivos con insulina 10 nM (Fig. 5).

DISCUSIÓN

Las metaloproteasas son activadas a partir del truncamiento de su forma zimógena o proenzima, la cual en condiciones normales es inactiva debido a que el dominio propéptido “cierra” el “switch” de cisteína que controla la actividad enzimática. No obstante, el detergente SDS usado en la zimografía abre el “switch” de cisteína, pero inmediatamente inhibe el “switch” enzimático abierto y bloquea el truncamiento auto lítico normalmente asociado con la activación. La banda de la pro-enzima puede entonces migrar a su peso molecular esperado, pero desarrolla actividad proteolítica ya que el “switch” es incapaz de “cerrarse” nuevamente después de la remoción del SDS con Tritón X-100 (Birkedal-Hansen *et al.*, 2002), observando de esta forma bandas de pro-MMPs activas en los geles obtenidos.

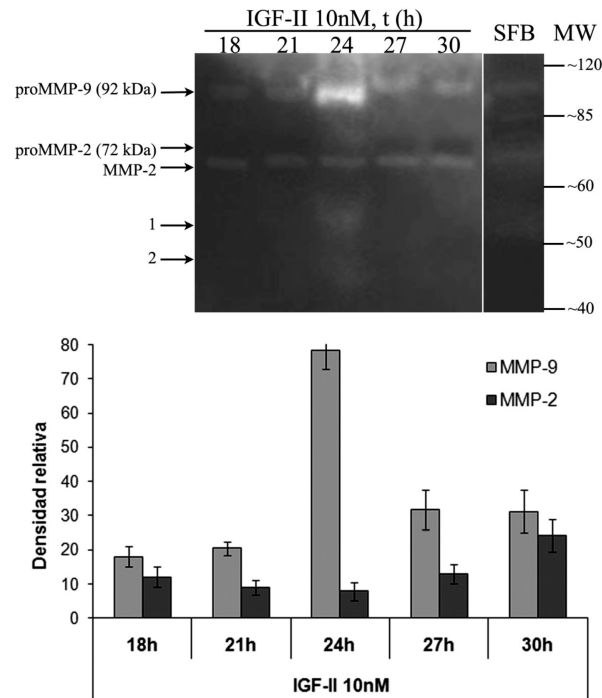


Figura 2. Efecto de IGF-II 10 nM sobre la actividad de gelatinasa MMP-9, a diferentes tiempos (18, 21, 24, 27 y 30h); control positivo: SFB. Panel superior: zimografía representativa de proMMP-9. Panel inferior: representación gráfica de la actividad relativa de MMP-9. Todos los datos son densidad relativa promedio \pm S.E.M. (n=3).

La actividad existente de MMP-9 y MMP-2 en el medio condicionado de células libres de estímulo, conduce a pensar en una expresión y actividad basal de estas gelatinasas por parte del trofoblasto. Esto va de la mano con otros reportes que muestran expresión y secreción endógena de IGF-II por parte del trofoblasto y de la línea celular HTR8/SVneo (Irving y Lala, 1995). Por lo tanto, la actividad de MMP-9 y MMP-2 podría ser estimulada de forma autocrina en esta línea celular, la cual sintetiza y secreta IGF-II (Graham *et al.*, 1993).

A diferencia de lo reportado por Hamilton *et al.* y Lala *et al.* (Hamilton *et al.*, 1998; Lala *et al.*, 1998), en este trabajo se observó un efecto estimulante de IGF-II sobre los niveles de MMP-9 y MMP-2 en la línea celular de trofoblasto extravelloso, HTR8/SVneo, similar a lo encontrado por Hills *et al.* en cultivos primarios de trofoblasto veloso (Hills *et al.*, 2004). A pesar de que MMP-2 y MMP-9 tienen especificidad similar de sustrato, existen diferencias en la regulación de su actividad en respuesta a IGF-II; esto es consistente con reportes en otras líneas celulares, estimuladas con factores de crecimiento diversos (van den Steen *et al.*, 2002; Pinzón, 2009). El efecto que ejerce IGF-II sobre la actividad de gelatinasas es similar al generado por EGF (factor de crecimiento epidermal), estimulando solo la actividad de proMMP-9, con un máximo a las 24 horas de aplicado el tratamiento (Qiu *et al.*, 2004). No obstante, se observa la activación de la forma proMMP-2 únicamente tras 24 horas de tratamiento con IGF-II 10 nM, lo cual sugiere que esta gelatinasa está siendo

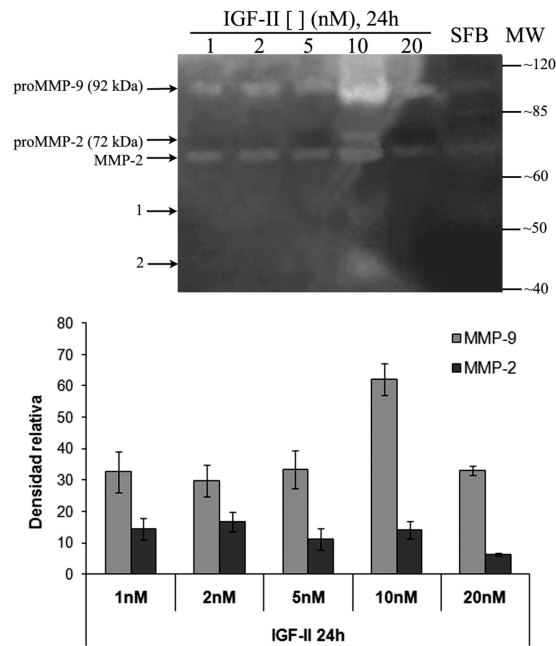


Figura 3. Efecto de la concentración de IGF-II (1, 2, 5, 10 y 20 nM) sobre la actividad de las gelatinasas MMP-9 y MMP-2, a las 24 horas; control positivo: SFB. Panel superior: zimografía representativa de proMMP-9 y proMMP2. Panel inferior: representación gráfica de la actividad relativa de MMPs. Todos los datos son densidad relativa promedio \pm S.E.M. (n=3).

activada por IGF-II mediante un circuito de señalización diferente al que desemboca en la secreción y activación de MMP-9; es entonces necesario dilucidar de qué forma o mediante qué mecanismos moleculares está siendo activada esta gelatinasa.

El tiempo de estímulo con IGF-II para la actividad máxima de MMP-9, esto es 24 horas, coincide a su vez con el tiempo al que se logra el índice de invasión máximo estimulado con IGF-II en la línea de coriocarcinoma JEG-3, forma cancerosa del tejido trofoblástico (Díaz *et al.*, 2007; Vallejo *et al.*, 2008). Esta coincidencia en el tiempo es un indicio del papel de MMP-9 durante el proceso de invasión por parte del trofoblasto, concordante con otros resultados que muestran la importancia de MMP-9 durante la invasión (Librach *et al.*, 1991; Bischof *et al.*, 1995; Isaka *et al.*, 2003; Staun-Ram *et al.*, 2004).

Recientemente en nuestro grupo de investigación se ha demostrado que los receptores IGF-IR e IR regulan la invasión celular al menos en parte a través de la activación de MMP-9; ambos receptores son reguladores importantes del crecimiento trofoblástico e invasión, y pueden estar implicados en un comportamiento atípico de las células en el caso de la enfermedad trofoblástica gestacional (Vallejo *et al.*, 2008). Dado lo anterior, se vislumbra que la vía de señalización que está conduciendo al aumento de la actividad de MMP-9 es mediada a través de receptores IR e IGF-IR, y refuerzan aún más el importante papel que juega MMP-9 en procesos invasivos tanto fisiológicos como patológicos.

Por otro lado, IGF-II estimula la actividad de otras dos gelatinasas de identidad aún desconocida, pero en una primera instancia se puede pensar hipotéticamente que

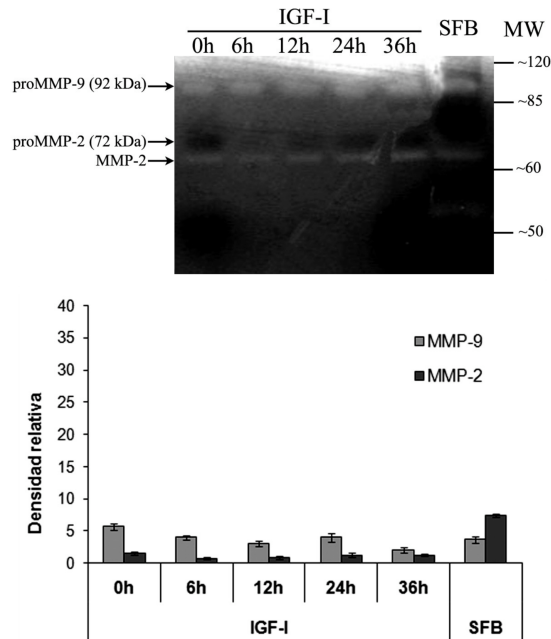


Figura 4. Efecto de IGF-I 10 nM sobre la actividad de las gelatinasas MMP-9 y MMP-2, a diferentes tiempos (0, 6, 12, 24 y 36h); control positivo: SFB. Panel superior: zimografía representativa de pro MMP-9 y proMMP2. Panel inferior: representación gráfica de la actividad relativa de MMPs. Todos los datos son densidad relativa promedio \pm S.E.M. (n=3).

corresponden a MMP-1/8 con un peso de 52 kDa, o a desechos lisosomáticos con actividad conservada.

El descenso marcado en actividad de proMMP-9 estimulada por IGF-II, bien a dosis mayores a 10 nM o un tiempo igual o mayor a 27 horas, corresponde al comportamiento típico de una proteína inducible. Su regulación negativa se puede explicar por degradación de la enzima por acción de otras proteasas o disminución en su secreción. Aunque se ha descrito el papel de inhibidores de metaloproteasas, TIMPs, y más específicamente del TIMP1 en la regulación de MMP-9, en este caso la disminución en la actividad de MMP-9 no se debe a una inhibición de la misma por parte de TIMP1, ya que durante el ensayo de zimografía el complejo MMP-9/TIMP1 se disocia debido a la acción del detergente SDS y la banda observada corresponde entonces a gelatinasa total, tanto la que se encontraba libre como la que se presentaba inhibida por unión con el TIMP1. A pesar de esto, es necesario estudiar el cambio en la concentración de los TIMPs en el medio condicionado y la vía de señalización involucrada en la transmisión del estímulo para poder caracterizar completamente este sistema. La disminución en la actividad de MMP-9 (dado el papel tan importante que juega ésta durante el proceso de invasión), se convierte en un indicio de la regulación existente en el proceso de invasión del trofoblasto; regulación que posiblemente se encuentra alterada en células tumorales y cancerosas invasivas. En conclusión, se demostró que IGF-II tiene un efecto estimulador de la actividad proteolítica de MMP-9 secretada por células de trofoblasto en una forma dependiente

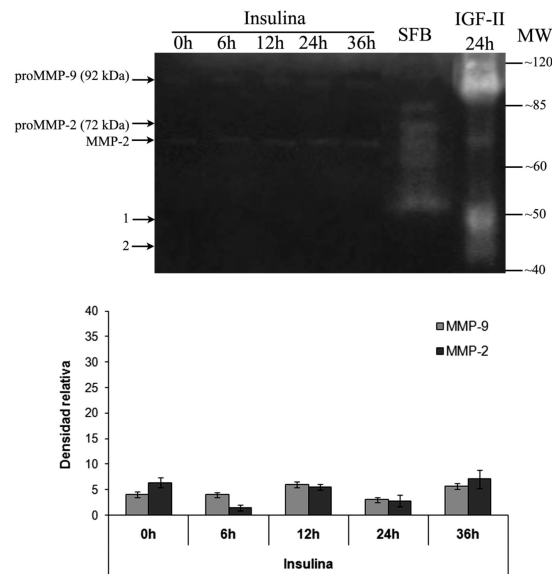


Figura 5. Efecto de insulina 10 nM sobre la actividad de las gelatinasas MMP-9 y MMP-2, a diferentes tiempos (0, 6, 12, 24 y 36h); control positivo: SFB. Panel superior: zimografía representativa de proMMP-9 y proMMP2. Panel inferior: Representación gráfica de la actividad relativa de MMPs. Todos los datos son densidad relativa promedio \pm S.E.M. (n=3).

de la dosis y del tiempo, con un máximo de actividad a las 24 horas y empleando una dosis de IGF-II 10 nM. Adicionalmente, IGF-II 10 nM tras 24 horas de tratamiento estimula la actividad de otras dos gelatinasas de identidad desconocida, con un peso molecular menor al de MMP-2. El IGF-II parece no tener efecto sobre la actividad de MMP-2, pero podría tener un papel en la conversión de la forma inactiva de proMMP-2 hacia una forma activa. IGF-I e insulina no regulan la actividad de estas gelatinasas en la dosis y tiempos empleados. La regulación de la actividad proteolítica por IGF-II ofrece un punto importante a considerar para el diseño de estrategias de control de las propiedades metastásicas de células cancerosas.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ángela Cadavid, Universidad de Antioquia, por la línea celular HTR8/SVneo. A Andrés F. Vallejo, miembro del Grupo de Investigación en Hormonas, por la orientación inicial brindada para el planteamiento de esta investigación. A Colciencias, proyecto 110145221052 y a Dirección de Investigación de Bogotá (DIB), Universidad Nacional de Colombia, proyecto 10901 por la financiación otorgada a esta investigación.

BIBLIOGRAFÍA

BIRKEDAL-HANSEN H, YAMADA S, WINDSOR J, POLLARD AH, LYONS G, STETLER-STEVENSON W, *et al.* Matrix Metalloproteinases. En: Morgan K, Bonifacino J S, Dasso M, Harford J B, Lippincott-Schwartz J and Yamada K M, editors. Current Protocols in Cell Biology. John Wiley & Sons, Inc. 2002;13:10.8.01-10.8.23.

BISCHOF P, MARTELLI M, CAMPANA A, ITOH Y, OGATA Y, NAGASE H. Importance of matrix metalloproteinases in human trophoblast invasion. Early pregnancy: biology and medicine: The official journal of the Society for the Investigation of Early Pregnancy. 1995;1(4):263.

DENLEY A, COSGROVE LJ, BOOKER GW, WALLACE JC, FORBES BE. Molecular interactions of the IGF system. Cytokine Growth F R. 2005;16(4-5):421-439.

DIAZ LE, CHUAN YC, LEWITT M, FERNANDEZ-PEREZ L, CARRASCO-RODRIGUEZ S, SANCHEZ-GOMEZ M, *et al.* IGF-II regulates metastatic properties of choriocarcinoma cells through the activation of the insulin receptor. Mol Hum Reprod. 2007;13(8):567-576.

FERRETTI C, BRUNI L, DANGLES-MARIE V, PECKING AP, BELLET D. Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts. Hum Reprod Update. 2007;13(2):121-141.

FOWDEN AL. The Insulin-like Growth Factors and feto-placental Growth. Placenta. 2003;24(8-9):803-812.

GRAHAM CH, LALA PK. Mechanisms of placental invasion of the uterus and their control. Biochem Cell Biol. 1992;70(10-11):867-874.

GRAHAM CH, HAWLEY TS, HAWLEY RC, MACDOUGALL JR, KERBEL RS, KHOO N, *et al.* Establishment and Characterization of First Trimester Human Trophoblast Cells with Extended Lifespan. Exp Cell Res. 1993;206(2):204-211.

HAMILTON GS, LYSIAKJJ, HAN VKM, LALA PK. Autocrine-Paracrine Regulation of Human Trophoblast Invasiveness by Insulin-like Growth Factor (IGF)-II and IGF-Binding Protein (IGFBP)-1. Exp Cell Res. 1998;244(1):147-156.

HILLS FA, ELDER MG, CHARD T, SULLIVAN MHF. Regulation of human villous trophoblast by insulin-like growth factors and insulin-like growth factor-binding protein-1. J Endocrinol. 2004;183(3):487-496.

IRVING JA, LALA PK. Functional Role of Cell Surface Integrins on Human Trophoblast Cell Migration: Regulation by TGF-[beta], IGF-II, and IGFBP-1. Exp Cell Res. 1995;217(2):419-427.

ISAKA K, USUDA S, ITO H, SAGAWA Y, NAKAMURA H, NISHI H, SUZUKI Y, *et al.* Expression and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in human trophoblasts. Placenta. 2003;24(1):53-64.

LALA PK, HAMILTON GS, ATHANASSIADES A. Role of growth factors and other placental signals in extravillous trophoblast cell function: A review. Placenta. 1998;19:327-339.

LIBRACH CL, WERB Z, FITZGERALD ML, CHIU K, CORWIN NM, ESTEVES RA, *et al.* 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. J Cell Biol. 1991;113(2):437.

MCKINNON T, CHAKRABORTY C, GLEESON LM, CHIDIAC P, LALA PK. Stimulation of Human Extravillous Trophoblast Migration by IGF-II Is Mediated by IGF Type 2 Receptor Involving Inhibitory G Protein(s) and Phosphorylation of MAPK. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(8):3665-3674.

PINZÓN ML, DÍAZ LE, ORTÍZ BL, UMAÑA-PÉREZ A, CARRASCO DE RODRIGUEZ S, SÁNCHEZ-GÓMEZ M. La activación de la vía de señalización PI3K/AKT por el factor de crecimiento similar a la insulina tipo II estimula la expresión del ARNm de la metaloproteínasa 9 en células de coriocarcinoma. *Revista Colombiana de Química.* 2009;38(3):341-362.

QIU Q, YANG M, TSANG B K, GRUSLIN A. EGF-induced trophoblast secretion of MMP-9 and TIMP-1 involves activation of both PI3K and MAPK signalling pathways. *Reproduction.* 2004;128(3):355-363.

STAUN-RAM E, GOLDMAN S, GABARIN D, SHALEV E. Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reprod Biol Endocrinol.* 2004;2(1):59.

STAUN-RAM E, GOLDMAN S, GABARIN D, SHALEV E. Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reprod Biol Endocrinol.* 2004;2(1):59.

VAN DEN STEEN PE, DUBOIS B, NELISSEN I, RUDD PM, DWEK RA, OPDENAKKER G. Biochemistry and Molecular Biology of Gelatinase B or Matrix - Metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2002;37(6):375-536. *Crit Rev Biochem Mol Biol*

VALLEJO AF, UMAÑA-PÉREZ A, SÁNCHEZ-GÓMEZ M, FLORES-MORALES A. Insulin and IGF-I receptors play a role in invasion of human trophoblast through MMP-9 activation. *Growth Horm IGF Res.* 2008;18(S1):S58-S58.