

Artículo original

Actividad de las enzimas de la matriz extracelular 2 y 9 en leche humana, un estudio exploratorio

Villa-Soto A.(1), Sampieri-Ramírez C.L.(2), Arrazate-García M.C.(3), Sandoval-Lozano V.H.(4), Cocotle-Ronzón Y.(5), Soto-Ojeda G.A.(6), Zamora-Bello I.(7).

(1) Licenciada en Químico Farmacéutico Biólogo, Instituto de Salud Pública, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México (ISPUV); (2) Doctora en Ciencias Biomédicas, Consultora Internacional de Lactancia Materna certificada por el Consejo Internacional de Certificación de Consultores en Lactancia (IBCLC). ISPUV; (3) Médica Cirujana, Maestra en Salud Pública, DIF Municipal Xalapa, Xalapa, Veracruz, México, IBCLC; (4) Maestro en Ciencias de la Salud, Instituto de Ciencias de la Salud e ISPUV; (5) Doctora en Ciencias Alimentarias, Facultad de Química Farmacéutica Biológica y Facultad de Ciencias Químicas, universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México (U.V.); (6) Maestro en Ciencias, Facultad de Química Farmacéutica Biológica, U.V.; (7) Doctor en Investigaciones Cerebrales, Facultad de Química Farmacéutica Biológica, U.V.

Resumen

Objetivo: comparar mediante zimografía en gelatina la actividad enzimática de MMP-2 y MMP-9 en muestras de leche humana provenientes de madres con bebés menores a seis meses de edad y bebés iguales o mayores a seis meses de edad. **Material y métodos:** estudio observacional exploratorio no aleatorizado que incluyó la firma de un consentimiento informado. Se emplearon geles de acrilamida copolimerizados con gelatina 1 mg/mL incubados con CaCl₂ para determinar la actividad enzimática y geles de acrilamida al 8.5% para verificar la integridad de las muestras. Geles copolimerizados con gelatina 1 mg/mL incubados con EDTA fueron empleados como control negativo de la actividad enzimática. Imágenes fueron tomadas mediante un fotodocumentador. Se efectuó un análisis visual de la actividad enzimática y se cuantificó la extensión de la actividad enzimática mediante el programa ImageJ v1.4r. **Resultados:** se detectó actividad enzimática de MMP-2 (72 KDa) y MMP-9 (225 KDa, 130 KDa y 92 KDa) en las muestras de leche humana. No existieron diferencias entre la actividad enzimática de MMP-2 y MMP-9 entre los grupos de madres con bebés menores a seis meses de edad en comparación con el grupo de mamás con bebés iguales o mayores a seis meses de edad. **Conclusiones:** la técnica de zimografía en gelatina es de utilidad para detectar actividad gelatinasa de MMP-2 y MMP-9 en muestras de leche humana. Este estudio es pionero en demostrar actividad enzimática de MMP-2 y MMP-9 en muestras de leche humana de madres con bebés iguales o mayores a seis meses de edad.

Palabras clave: lactancia materna; zimografía; metaloproteasas.

Abstract

Objective: to compare by gelatin zymography the enzymatic activity of MMP-2 and MMP-9 in human milk samples from mothers with infants less than six months of age and infants equal to or greater than six months of age. **Material and methods:** non-randomized exploratory observational study that included the signing of an informed consent. Acrylamide gels copolymerized with 1 mg/mL gelatin incubated with CaCl₂ were used to determine enzymatic activity and 8.5% acrylamide gels to verify the integrity of the samples. Copolymerized gels with 1 mg/mL gelatin incubated with EDTA were used as negative control for enzymatic activity. Images were taken using a photodocumentator. Visual analysis of enzyme activity was performed, and the extent of enzyme activity was quantified using Image J v1.4r software. **Results:** enzymatic activity of MMP-2 (72 KDa) and MMP-9 (225 KDa, 130 KDa and 92 KDa) was detected in human milk samples. There were no differences between the enzymatic activity of MMP-2 and MMP-9 between the groups of mothers with babies less than six months of age compared to the group of mothers with babies equal to or greater than six months of age. **Conclusions:** the gelatin zymography technique is useful for detecting gelatinase activity of MMP-2 and MMP-9 in human milk samples. This study is a pioneer in demonstrating enzymatic activity of MMP-2 and MMP-9 in samples of human milk from mothers with babies equal to or greater than six months of age.

Keywords: breastfeeding; zymography; metalloproteinases.

Introducción

Las metaloproteasas de la matriz extracelular (MMPs) son endopeptidasas dependientes de calcio y zinc implicadas en la remodelación de la matriz extracelular.¹⁻³ En el ser humano se han descrito 23 miembros de la familia de las MMPs, los cuales han sido clasificados en colagenasas (MMP-1, MMP-8, MMP-13), gelatinasas (MMP-2, MMP-9); estromelisininas (MMP-3, MMP-10); matrilisininas (MMP-7, MMP-26, MMP-11); MMPs asociadas a la membranas celulares (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25) y otras MMPs (MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-23, MMP-27, MMP-28).⁴ Las MMPs participan en procesos fisiológicos, como la organogénesis, la cicatrización de tejidos y la involución uterina, así como procesos patológicos, incluyendo la inflamación y la carcinogénesis.¹⁻³ Las MMPs también participan en el procesamiento de moléculas bioactivas tales como factores de crecimiento, citoquinas y quimiocinas.²¹ De manera natural la acción de las MMPs está regulada por los cuatro miembros de la familia de los inhibidores tisulares (TIMPs).⁵

Las gelatinasas degradan el colágeno desnaturalizado (gelatina), en especial MMP-2 tiene mayor afinidad por el colágeno tipo I, II y III, y MMP-9 por colágeno tipo IV, V, VII, fibronectina y laminina.⁴ MMP-2 es expresada en condiciones normales por las células del estroma de la mayoría de los tejidos en el ser humano,⁶ en cambio, MMP-9 está casi ausente en tejidos normales y su expresión se encuentra limitada a monocitos y macrófagos.⁵ La acción degradativa de las gelatinasas puede ser detectada mediante zimografía en gelatina.⁷ La zimografía en gelatina es una técnica electroforética simple, confiable y sensible que permite detectar la actividad de degradación de la gelatina de MMPs en diversas muestras biológicas, incluyendo fluidos.⁸

La MMP-2 es secretada en forma latente con un peso de 72 KDa y en su forma activa posee un peso molecular entre 59 a 62 KDa.⁹ La MMP-9 es secretada en forma latente con un peso molecular de 92 KDa y se convierte a 82 y 68 KDa en su forma activa,⁹ además puede formar homodímeros de 225 KDa y heterodímeros de 130 KDa asociada a la proteína lipocalina producida por los neutrófilos.¹⁰

La leche humana contiene una gran cantidad de células que son capaces de liberar o expresar diversas MMPs y TIMPs.¹¹ Estudios han reportado que la acción de ciertas enzimas en la leche humana produce un efecto protector contra diversas enfermedades en el infante, incluyendo la enterocolitis necrotizante.¹² Sin embargo, el repertorio

total de las enzimas y sus funciones biológicas en la leche humana se desconoce.^{13,14} En nuestro conocimiento sólo existen tres estudios que describen la presencia de MMPs y TIMPs en leche humana.^{5,13,15} Estos trabajos han determinado los niveles de estas enzimas y sus inhibidores mediante la técnica de ELISA, Western Blot o la actividad por la técnica de zimografía en gelatina en muestras provenientes de madres con infantes menores a seis meses.^{5,13,15} Este trabajo tuvo como objetivo comparar la actividad de MMP-2 y MMP-9 en muestras de leche materna de madres con bebés menores a seis meses de edad y madres con bebés iguales o mayores a seis meses de edad, utilizando la técnica de zimografía en gelatina.

Metodología

Diseño del estudio

Estudio observacional exploratorio no aleatorizado.

Participantes

Se incluyó a binomios madre-hijo que solicitaron servicios de consejería en lactancia materna o de salud en tres sedes: “Taller de extracción y manejo de leche materna para madres trabajadoras y estudiantes” del Instituto de Salud Pública de la Universidad Veracruzana en Xalapa, Veracruz; Centro de crianza Bee Mom en Xalapa de Enríquez, Veracruz y Clínica Peques Coatepec en Coatepec, Veracruz. Se invitaron a participar en el estudio a 18 binomios madre-hijo, todas las madres aceptaron. Seis de los bebés tuvieron una edad menor a seis meses, el resto (n=12) tenían o eran mayores de seis meses.

Tamaño de la muestra

Muestreo a conveniencia (n=18) efectuado durante el periodo de febrero 2020 a abril 2021.

Instrumentos y método de recopilación de datos

Como parte de una tesis de licenciatura del programa de Química Farmacéutica Biológica de la Universidad Veracruzana, se invitó a participar en el estudio a los binomios madre-hijo que acudieron a las tres sedes. A las madres que aceptaron participar se les preguntó si tuvieron diagnóstico de diabetes gestacional, la edad de su bebé y el tipo de lactancia que practicaban; se consideró lactancia exclusiva o mixta para los bebés menores de seis meses y lactancia complementaria para los bebés con seis meses o más de edad. Posteriormente, a las madres se les solicitó una muestra de leche extraída en sus hogares mediante la técnica de su elección y congelada inmediatamente después de la extracción en el refrigerador de sus hogares. Las muestras de leche humana, de al menos 20 mililitros,

fueron transportadas al Laboratorio de Investigación Biomédica en Salud Pública del Instituto de Salud Pública en cadena de frío y almacenadas a -80°C hasta su uso.

Técnica de zimografía

Se prepararon geles de acrilamida al 8.5% copolimerizados con gelatina 1 mg/mL y geles de acrilamida al 8.5%. Las muestras fueron separadas en alícuotas que se centrifugaron a 5500 rpm durante 10 minutos a 4°C , el sobrenadante se resuspendió usando una solución estándar de carga. Se usó sangre venosa y albúmina humana como controles.¹⁶ Las muestras fueron separadas mediante electroforesis usando una solución estándar de Tris-glicina SDS. Los geles fueron lavados toda la noche en agitación a temperatura ambiente en solución de lavado [50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 5 mmol/L CaCl_2 and 2.5% (v/v) Triton X-100], e incubados en 50 mmol/L Tris-HCl pH7.5, 5 mmol/L CaCl_2 por 18 h. Geles paralelos fueron incubados con 10 mmol/L EDTA para inhibir la actividad gelatinasa. Los geles fueron teñidos con solución estándar de Azul de Coomassie. La actividad gelatinasa de las MMPs fue detectada como zonas blancas en un fondo azul en los geles de acrilamida copolimerizados con gelatina. Las imágenes fueron tomadas usando el mismo acercamiento en un fotodocumentador 70-8170 Molecular Imager Gel Doc XR System (Bio-Rad). Los geles se analizaron visualmente clasificando las zonas de actividad en detectada y no detectada. También se efectuó un análisis de los geles mediante el programa ImageJ v1.4r utilizando las imágenes en escala de grises para determinar la extensión de la actividad enzimática en milímetros cuadrados.¹⁷

Métodos estadísticos

Con la información recopilada en el cuestionario aplicado se elaboró una base de datos utilizando el software Microsoft Office Excel 2016, obteniendo frecuencias, promedios y porcentajes de las edades de las madres participantes y la información acerca de la alimentación de los bebés, a partir de ello se generaron dos grupos, el grupo de las madres con bebés menores a seis meses de edad y el grupo de madres con bebés de seis meses o más de edad.

Con el análisis visual de los geles obtenidos se determinaron las frecuencias de la actividad enzimática detectada y se realizó una prueba de chi cuadrada entre los grupos. Mediante el programa ImageJ 1.4r se determinó la extensión de cada zona de actividad enzimática al menos tres veces hasta obtener un coeficiente de variación igual o menor al 10%. Posteriormente, los promedios entre los

grupos de la extensión de la actividad enzimática fueron comparados utilizando la prueba U de Mann-Whitney.

Consideraciones éticas

El estudio se aprobó por el Consejo Técnico de la Facultad de Química Farmacéutica Biológica de la Universidad Veracruzana (noviembre 2019). Todas las participantes firmaron un consentimiento informado.

Resultados

No se encontraron diferencias en la edad de las madres ($p < 0.05$) entre los grupos que tenían bebés menores a seis meses (32.62 ± 3.93), en comparación con las que tenían bebés con edad de seis meses o mayores (34.08 ± 4.29). Todos los bebés fueron alimentados con leche humana desde el nacimiento; la totalidad de los bebés iguales o mayores a seis meses practicaban la lactancia complementaria. Seis de los bebés menores a seis meses (33%) gozaba de los beneficios de la lactancia materna exclusiva y doce eran (67%) alimentados mediante lactancia materna complementaria. Ninguna madre refirió haber tenido diagnóstico de diabetes gestacional.

Análisis visual de la actividad enzimática de muestras de leche humana determinada por Zimografía en gelatina. En la totalidad de las muestras ($n=18$) no se observó actividad enzimática en la zona de 225 KDa (MMP-9) y se detectó actividad en la zona de 130 KDa (MMP-9). Entre los grupos, en diferentes porcentajes que variaron entre el 25% y el 50% se detectó actividad en la zona de 92 KDa (MMP-9), no encontrándose diferencias entre los grupos. En general, la mayoría ($\geq 89\%$) presentó actividad en la zona de 72 kDa (MMP-2), no encontrándose diferencias entre los grupos (Tabla 1).

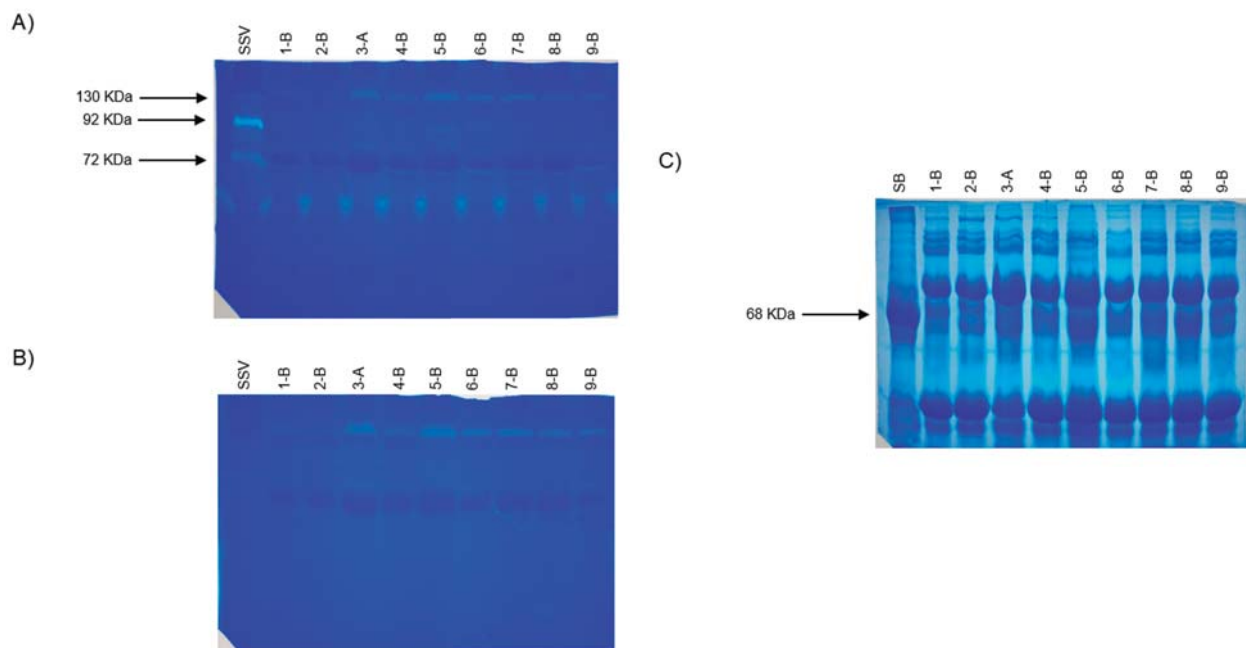
Resultados representativos de la actividad enzimática detectada se muestran en la Figura 1. Se observó inhibición de la actividad enzimática en los geles paralelos usados como control negativo principalmente en la zona de 92 KDa (MMP-9) y 72 KDa (MMP-2), y en menor proporción en la zona de 130 KDa (MMP-9). En los geles de acrilamida la banda presente en la zona de 68 KDa (albúmina) se observó íntegra por lo que se asumió las muestras fueron transportadas y almacenadas de forma tal que se evitó la degradación. Únicamente la muestra 18B tuvo un patrón sugerente de degradación (datos no mostrados); sin embargo, se detectó actividad enzimática en zonas bien definidas (datos no mostrados).

Tabla 1.
Actividad enzimática de MMP-2 y MMP-9 detectada visualmente en muestras de leche humana analizadas mediante zimografía en gelatina.

Zona analizada (KDa)	General n=18	Muestras de leche madres con bebés < 6 meses n=6	Muestras de leche madres con bebés ≥ 6 meses n=12	Valor de p
225 KDa (MMP-9), n (%)				
Presente	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	No aplica
Ausente	18 (100%)	6 (100%)	12 (100%)	
130 KDa (MMP-9), n (%)				
Presente	18 (100%)	6 (100%)	12 (100%)	No aplica
Ausente	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
92 KDa (MMP-9), n (%)				
Presente	6 (33%)	3 (50%)	3 (25%)	0.5959
Ausente	12 (67%)	3 (50%)	9 (75%)	
72 KDa (MMP-2), n (%)				
Presente	16 (89%)	5 (83%)	11 (92%)	0.7909
Ausente	2 (11%)	1 (17%)	1 (8%)	

Figura 1.

Análisis mediante zimografía en gelatina de muestras de leche humana



A) Gel de acrilamida al 8.5% copolimerizado con 1 mg/mL de gelatina incubado con solución CaCl₂, B) Gel de acrilamida al 8.5% copolimerizado con 1 mg/mL de gelatina incubado con solución EDTA, C) Gel de acrilamida al 8.5%. Sangre venosa (SSV) y albúmina (Alb). Muestras son indicadas con números y letra. Muestras de leche humana de madres con bebés menores a seis meses de edad (A) y muestras de leche humana de madres con bebés con edad igual o mayor a seis meses de edad (B).

Cuantificación por ImageJ v1.4r de la actividad enzimática de muestras de leche humana determinada por Zimografía en gelatina

Los resultados indican que en la totalidad de las muestras (n=18) no se detectó actividad enzimática en la zona de 225 KDa (MMP-9). En la zona de zona de 130 KDa (MMP-9) se detectó actividad en 4 muestras del grupo con bebés menor a seis meses de edad y 10 muestras del grupo con

bebés con edad igual o mayor a seis meses, no existiendo diferencias entre los grupos (Tabla 2). En la zona de zona de 92 KDa (MMP-9) se detectó actividad únicamente en una muestra. En la zona de 72 KDa se detectó actividad en 3 y 9 muestras de los grupos con bebés menores a seis meses de edad y con o mayores a seis meses, respectivamente, no existiendo diferencias entre los grupos. Al comparar la sumatoria de las actividades enzimáticas de MMPs por grupos el valor de p resultó marginal (Tabla 2).

Tabla 2.
Cuantificación de la actividad enzimática por ImageJ v1.4r de muestras de leche humana analizada por zimografía en gelatina

Símbolos representan el número de muestras en que se determinó la actividad midiendo el área en pixeles. *3; **4; ***7; +9; ++10; &1 con promedio± DE 42,343 (220.13); #1 con promedio± DE 46,309 (830.17).

Zona analizada (KDa)	Muestras de leche madres con bebés < 6 meses n=6	Muestras de leche madres con bebés ≥ 6 meses n=12	Valor de p
225KDa (MMP-9)	No detectado	No detectado	No aplica
130 KDa, mediana MMP-9 (P25, P75)	*0 (0;0)	***0 (0; 43,911)	0.200
92 KDa, mediana MMP-9 (P25, P75)	&No calculado	#No calculado	No aplica
72 KDa, mediana MMP-2 (P25, P75)	*0 (0; 0)	+15,113.50 (0; 40,198)	0.070
MMP total, mediana (P25, P75)	**0 (0; 0)	++35, 096 (0; 81,620)	0.059

Discusión

En nuestro conocimiento este es el primer estudio que reporta actividad gelatinasa en muestras de leche humana provenientes de madres que han practicado la lactancia por seis meses o más; se encontró que no existen diferencias entre la sumatoria de las zonas de actividad gelatinasa de MMP-2 y MMP-9 entre los grupos con lactancia menor a seis meses, en comparación con lactancia de seis meses o más, aunque el valor de p fue marginal. Son necesarios estudios con un número mayor de muestras y así como una mayor caracterización de las familias de las MMPs mediante Western Blot, ELISA y secuenciación.

Nuestros resultados son complejos de comparar dado que solo existen tres reportes de caracterización de MMP-2 y

MMP-9 en leche humana; en estos estudios el promedio de edad de los infantes, y por lo tanto de la práctica de la lactancia, es diferente al nuestro. En un estudio con la misma cantidad de participantes que el nuestro (n=18) se analizó leche de madres que tuvieron parto pretérmino y parto a término.⁵ Los resultados indicaron que no existieron diferencias en la actividad enzimática detectada de MMP-2 y MMP-9 mediante zimografía en un periodo comprendido entre las 72 horas a dos semanas postparto.⁵ En otro estudio, la actividad de MMP-2 (64 KDa y 72 KDa) en leche humana detectada por zimografía de 12 mujeres que tuvieron parto a término fue mayor en el primer día postparto decreciendo exponencialmente al día 30 posparto.¹³ En el tercer estudio se determinaron los niveles del complejo MMP-9/NGAL (lipocalina),

en 35 muestras de leche humana (13 con madres con diabetes gestacional y parto prematuro, y 22 sin diabetes gestacional y parto a término), mediante un ensayo de ELISA comercial no validado para este tipo de muestras.¹⁵ Los resultados indicaron que en el calostro de ambos grupos se detectó el complejo MMP-9/NGAL cuya concentración tiende a disminuir al día 3 postparto.¹⁵ En nuestro estudio ninguna participante refirió haber tenido un diagnóstico de diabetes gestacional, pero en el 72% de las muestras analizadas se detectó la actividad en la zona de 130KDa (MMP-9/NGAL), esto es importante ya que Metallinou y colaboradores sostienen que NGAL puede actuar como agente bacteriostático y participar en la curación de la mucosa en el tracto gastrointestinal, por lo que la lactancia temprana de los recién nacidos es una recomendación lógica.¹⁵

Las limitaciones de estudio fueron el no controlar el método de extracción de las muestras, ya que se ha sugerido que podría influir en los niveles de MMP-2 y MMP-9;⁵ una fortaleza fue controlar el volumen a analizar en al menos 20 ml, emplear estricta cadena de frío y una técnica estandarizada adecuadamente. Nuestro estudio es novedoso al reportar por primera vez la presencia de actividad enzimática de MMP-2 y MMP-

9 en muestras de leche humana de madres con lactancia de seis meses o más. Son necesarios mayores estudios para conocer las implicaciones de estos hallazgos en la práctica clínica de la lactancia.

Conclusión

El empleo de la técnica de zimografía en gelatina es de utilidad para detectar actividad gelatinasa de MMP-2 y MMP-9 en muestras clínicas de leche humana. No se encontraron diferencias en la actividad de MMP-2 y MMP-9 entre ambos grupos de estudio. Se recomienda realizar mayores estudios para determinar las funciones de estas enzimas en la leche humana.

Agradecimientos

Madres participantes de este estudio por la donación de las muestras. A la MSP Edit Rodríguez Romero y la Dra. Alethia Coral Pérez Paredes por las facilidades y el apoyo brindado para la realización de este estudio.

Contacto: Dra. Clara Luz Sampieri Ramírez.

Instituto de Salud Pública, Universidad Veracruzana. Av. Luis Castelazo Ayala s/n, Col. Industrial Ánimas, CP 91190, Xalapa, Veracruz, México. Teléfono 2288418900, extensión 13327. Representante de ACCLAM en Veracruz. csampieri@uv.mx.

Referencias bibliográficas

1. Brew K, Dinakarpanian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: Evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol.* 2000;1477(1-2):267-83.
2. Ganea E, Trifan M, Laslo AC, Putina G, Cristescu C. Matrix metalloproteinases: Useful and deleterious. *Biochem Soc Trans.* 2007;35(4):689-91.
3. Woessner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 1991;5(8):2145-54.
4. González-Ávila G, González A, Delgado J, Gutiérrez-González LH. Participación de las metaloproteasas de matriz en la progresión del cáncer. *Rev del Instituto Nac Enfermedades Respir.* 2010;22(4):328-36.
5. Lubetzky R, Mandel D, Mimouni FB, Herman L, Reich R, Reif S. MMP-2 and MMP-9 and their tissue inhibitor in preterm human milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010;51(2):210-2.
6. Coronato S, Laguens G, Di Girolamo V. Rol de las metaloproteinasas y sus inhibidores en patología tumoral. *Med.* 2012;72(6):495-502.
7. Leber TM, Balkwill FR. Zymography: A single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Anal Biochem.* 1997;249(1):24-8.
8. Toth M, Fridman R. Gelatin Zymography. *Definitions.* 2020;57:163-74.
9. Mora J, Manzur AJ, Ramírez T, Silva D. Papel de las Metaloproteasas de la Matriz en la Degradación del Tejido Pulpar. 2005;Vol. 1.
10. Urbina, Alvaro M. COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD GELATINÁSICA A Y B (MMP-2 Y MMP-9) EN EL LÍQUIDO SINOVIAL PROVENIENTE DE LA ARTICULACIÓN METACARPOFALÁNGICA EQUINA NORMAL Y ALTERADA. *Bosque.* 2005;
11. Chirico G, Marzollo R, Cortinovic S, Fonte C, Gasparoni A. Antiinfective properties of human milk. *J Nutr.* 2008;138(9):1801-6.
12. Castillo Belén JR, Rams Veranes A, Castillo Belén A, Rizo Rodríguez R, Cádiz Lahens A. Lactancia materna e inmunidad: impacto social. *Medisan.* 2009;13(1):0-0.

13. Cheung PY, Sawicki G, Gross S, Van Aerde J, Radomski M. Differential expression of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitor in human milk. *Proc West Pharmacol Soc.* 2001;44(May 2014):97-8.
14. Schanler R. Human milk for preterm infants: nutritional and immune factors - PubMed [Internet]. 1989 [cited 2021 Feb 20]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2662415/>
15. Metallinou D, Lykeridou K, Karampas G, Liosis GT, Skevaki C, Rizou M, et al. Postpartum human breast milk levels of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)/NGAL complex in normal and pregnancies complicated with insulin-dependent gestational diabetes mellitus. A prospective pilot ca. *J Obstet Gynaecol (Lahore)* [Internet]. 2020;40(4):461-7. Available from: <https://doi.org/10.1080/01443615.2019.1628191>
16. Makowski GS, Ramsby ML. Calibrating gelatin zymograms with human gelatinase standards. *Anal Biochem.* 1996;236(2):353-6.
17. Sandoval V. Actividad de las enzimas de la matriz extracelular 2 y 9 en muestras clínicas de orina determinada por zimografía en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 con y sin enfermedad renal crónica. 2018;1-60. Available from: <https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/46427/QuirozCortesMCarmen.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
18. Schulz CG, Sawicki G, Lemke RP, Roeten BM, Schulz R, Cheung PY. MMP-2 and MMP-9 and Their Tissue Inhibitors in the Plasma of Preterm and Term Neonates. *Pediatr Res.* 2004;55(5):794-801.
19. Dallas DC, Murray NM, Gan J. Proteolytic Systems in Milk: Perspectives on the Evolutionary Function within the Mammary Gland and the Infant. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2015;20(3-4):133-47.

