



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PARTICIPACION DE LA VIA •NO-GMPc EN EL PROCESO  
DE IMPLANTACION DEL BLASTOCISTO DE RATA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS  
(BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION)

P R E S E N T A :

MEDICO CIRUJANO MARIA DEL ROCIO GOMEZ MELENDEZ



DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. GENOVEVA DURAN REYES

LOS REYES IZTACALA, MEXICO

2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Mx. del Rocío Gómez Meléndez

FECHA: 1º marzo 2007

FIRMA: [Firma]

**JURADO**

**PRESIDENTE**

DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN

**VOCAL**

DRA. MARICELA VILLAGRÁN SANTACRUZ

**SECRETARIO**

DRA. GENOVEVA DURAN REYES

**SUPLENTE**

DR. MARTIN PALOMAR MORALES

**SUPLENTE**

DRA. MARGARITA EUGENIA GUTIERREZ RODRIGUEZ

**A MI MADRE: ( IN MEMORIAM )**

**A MI PAPA : POR SU APOYO INCONDICIONAL Y PALABRAS DE ALIENTO, POR SER EL PILAR DE MI EXISTENCIA.**

**A ISELA Y NEFTALI : CON UN AMOR ESPECIAL POR EL TIEMPO, DEDICACION Y APOYO INCONDICIONAL.**

**A GUADALUPE, ANGEL Y ELVIA : POR SU PREOCUPACIÓN Y APOYO CONSTANTE CON AMOR**

**A JOSE, CLAUDIA, SAUL, ANDRES: PARTE ESCENCIAL Y FUNDAMENTAL EN MI VIDA**

**A JESUS, SARA MARIA, DAVID, RUBEN, MARTHA, SARITA: POR QUERERME Y APOYARME SIEMPRE.**

**A CLAUDIA, GABRIEL, MIGUEL ANGEL, ANDREA, MILDRED CON VERDADERO CARIÑO.**

**A GENOVEVA DURAN REYES: CON VERDADERO AGRADECIMIENTO POR SU PACIENCIA, DEDICACION Y APOYO.**

**A UNA PERSONA MUY ESPECIAL QUE LE HA DADO A MI VIDA LUZ, Y UN MOTIVO PARA LUCHAR DIARIAMENTE GRACIAS, TE QUIERO MUCHO.**

**A MIS AMIGOS POR ESTAR SIEMPRE AHÍ APOYANDO EN TODO MOMENTO MIS ACIERTOS Y DESACIERTOS.**

## CONTENIDO

|  |    |
|--|----|
| RESUMEN  | 5  |
| INTRODUCCIÓN   | 9  |
| Implantación   | 9  |
| El óxido nítrico   | 14 |
| El óxido nítrico en la gestación   | 20 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA   | 29 |
| HIPÓTESIS  | 30 |
| OBJETIVO GENERAL   | 30 |
| OBJETIVO PARTICULAR  | 31 |
| METODOLOGÍA  | 31 |
| ANÁLISIS ESTADÍSTICO   | 33 |
| RESULTADOS   | 36 |
| Efecto de la nitro-L-arginina sobre la implantación                                  | 36 |
| Efecto de la nitro-L-arginina sobre la viabilidad<br>embrionaria al día 19 de preñez | 37 |
| Efecto de la Nitro-l-arginina sobre la excreción diurética                           | 38 |
| Efecto de la Nitro-L-arginina sobre la temperatura<br>y la frecuencia cardíaca       | 39 |

|   |    |
|---|----|
| Efecto de la nitro-L-arginina sobre la concentración<br>de GMPc en el epitelio uterino  | 40 |
| Efecto de la nitro-L-arginina sobre la concentración del<br>GMPc en el estroma uterino. | 40 |
| DISCUSIÓN   | 45 |
| CONCLUSIONES  | 51 |
| REFERENCIAS   | 52 |

## RESUMEN

La implantación del embrión es un proceso clave y crucial de la gestación, ya que involucra la primera interacción importante entre el endometrio materno y el embrión. Para que esta etapa se lleve a cabo es necesario que el embrión haya alcanzado la fase de blastocisto y que en el endometrio materno se presenten los cambios morfológicos y bioquímicos que lo conducen a la fase de receptividad. Una de las manifestaciones más tempranas de la receptividad uterina es el aumento de permeabilidad vascular, propiedad que ha sido utilizada experimentalmente para demostrar las zonas del endometrio preparadas para recibir al blastocisto.

Muchas son las moléculas involucradas en la receptividad uterina y el aumento de permeabilidad, como la histamina y las prostaglandinas, sin embargo, el mecanismo por el cual estos compuestos provocan estos efectos se desconoce. Es probable que el óxido nítrico este involucrado en el aumento de permeabilidad y la subsiguiente implantación del embrión. El óxido nítrico ( $^*NO$ ) o monóxido de nitrógeno es producido enzimáticamente, junto con citrulina, a partir de la L-arginina por la mayoría de las células del organismo. La familia de enzimas que sintetizan al  $^*NO$ , óxido nítrico sintasas, se clasifica en dos grandes grupos; el de enzimas inducibles por citocinas y características de los macrófagos, y el de enzimas constitutivas típicas de los endotelios. La isoforma inducible sintetiza grandes cantidades de óxido nítrico después de un estímulo inmune, en tanto que la constitutiva produce pequeñas cantidades pero de manera constante. El  $^*NO$  sintetizado por la isoenzima inducible tiene diferente destino metabólico que el de la constitutiva, mientras que el primero reacciona y se inactiva con el anión superóxido, el segundo tiene un papel fisiológico muy importante sobre la regulación de muchas enzimas. El  $^*NO$  reacciona con el grupo *hemo* de la enzima guanilato ciclasa y produce un cambio conformacional de esta que la conduce a su activación con el aumento en la concentración de GMP cíclico y la relajación del músculo liso. La síntesis de  $^*NO$  puede inhibirse mediante análogos de la L-arginina, como la L-nitro-arginina metilester o L-NAME, que es ampliamente utilizado para determinar la participación del  $^*NO$  en los procesos fisiológicos.

Durante la preñez, el  $^*NO$  participa manteniendo el tono vasodilatado, fenómeno regulado por estrógenos. A medida que evoluciona la preñez aumenta la concentración de  $^*NO$  y poco antes de acercarse el parto su concentración declina para favorecer las contracciones uterinas. Además, la administración de los inhibidores de su síntesis provoca en animales hipertensión y signos y síntomas parecidos a los de preeclampsia.

Aunque poco se sabe acerca de la participación del  $^*NO$  en tejidos diferentes al endotelio vascular, se ha encontrado elevada la concentración de la oxido nítrico sintasa en el corazón, riñón, músculo esquelético, esófago y útero de cobayas gestantes. En el útero, el aumento de permeabilidad vascular durante la implantación, inducido por prostaglandinas o histamina, probablemente es mediado por NO, ya que en los sitios de implantación se ha encontrado mas elevada la concentración de este radical que en las zonas uterinas aledañas.

En el presente trabajo nos propusimos analizar si la síntesis de  $^*NO$  y la presencia de GMP cíclico en el tejido uterino al 5° día de preñez en la rata, están relacionadas con el aumento de permeabilidad uterina, la implantación y/o la viabilidad embrionaria. Adicionalmente, si estas alteraciones están relacionadas con algunos signos relacionados con preeclampsia, como temperatura, frecuencia cardiaca y eliminación de metabolitos en orina.

**Metodología:** Se utilizaron 60 ratas hembra de la cepa Sprague Dowley al 5° día de gestación, se dividieron en tres grupos de 20 cada uno y todas recibieron intraluminalmente en el cuerno uterino derecho los siguientes compuestos: las del grupo "1", 114 nanomoles de Nitro-L-arginina, del grupo "2", 114 nanomoles de Nitro-L-arginina + 342 nanomoles de L-arginina (sustrato específico para la síntesis de óxido nítrico) y los del grupo "3", 114 nanomoles de D-arginina (enantiómero inactivo de la L-arginina). En el cuerno izquierdo (control) de todas las ratas se administraron 114 nanomoles de D-arginina. Veinticuatro horas después de la cirugía, (6° día de gestación), la mitad de las ratas de cada grupo (10) recibió por vía intravenosa azul de tripán al 1% en solución salina fisiológica y una hora después fueron sacrificadas. Los sitios de implantación en el útero fueron reconocidos por su tinción con el colorante y se contaron los cuerpos lúteos. Los úteros fueron extraídos, limpiados de grasa y tejido conectivo, y seccionados transversalmente para separar los sitios de implantación del resto del útero (no sitios). En cada fragmento de útero, el epitelio y el estroma se separaron por el método de Fagg, (1979). Las muestras así obtenidas se homogeneizaron al 10 % en un amortiguador de TRIS pH 7.5 y el sobrenadante obtenido después de centrifugar a 18000 rpm fue utilizado para las determinaciones bioquímicas de GMP cíclico, proteínas y DNA. La determinación de GMP cíclico se realizó por radioinmunoensayo. Los parámetros de referencia, proteínas y DNA, se determinaron por el método de Lowry (1951) y el de Giles (1965) respectivamente. En las 10 ratas restantes de cada grupo, los días 7, 13 y 19 de gestación, se midieron la frecuencia cardiaca, temperatura rectal y se realizó el general de orina. El día 19, después del sacrificio, la viabilidad embrionaria se determinó por observación macroscópica, además, los nódulos de reabsorción (embriones implantados que no evolucionaron), los fetos y las placentas se contaron y pesaron.

**Resultados.** La administración intrauterina del inhibidor L-nitro-arginina no tuvo efecto sobre el aumento en la permeabilidad vascular en los sitios de implantación.

La administración del inhibidor evitó al 100% la presencia de embriones el día 19 de la gestación, pero la administración del inhibidor junto con el sustrato L-arginina restableció la presencia de embriones vivos en 84.8 %. Durante los 19 días, estos animales tuvieron aumentadas la temperatura ( $37.1 \pm 0.8^{\circ}\text{C}$  vs  $36.6 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$ ) y la frecuencia cardíaca ( $85.6 \pm 0.8$  puls./minuto vs  $82.1 \pm 0.9$  puls./minuto) en comparación con el control. El efecto Nitro-L-arginina no se manifestó al administrarlo con L-arginina.

En el epitelio uterino del sitio de implantación la concentración de GMP cíclico/mg de proteína fue significativamente menor en el cuerno tratado con Nitro-L-arginina que en el tratado con D-arginina  $1102.3 \pm 150$  vs  $1664.2 \pm 105$  picomoles GMP cíclico/mg de proteína, en cambio en el no sitio el efecto fue opuesto,  $643.4 \pm 140$  vs  $201.6 \pm 144$  picomoles GMP cíclico/mg de proteína en el control. Cuando el parámetro de referencia fue el DNA, los valores fueron menores tanto para el sitio como en el no sitio, en el cuerno uterino tratado con Nitro-L-arginina comparados con el control,  $5409 \pm 950$  vs  $7674 \pm 1600$  del sitio y  $3880 \pm 1100$  vs  $9799 \pm 890$  picomoles de GMPc/mg de DNA del no sitio.

En el estroma uterino, el sitio y no sitio de implantación respondieron de la misma manera al efecto del inhibidor Nitro-L-arginina. Para el sitio, la concentración de GMP cíclico (pmoles/mg de proteína) fue menor en el tratado que en el control:  $219.2 \pm 98$  vs  $300.8 \pm 105$  y para el no sitio:  $136.8 \pm 89$  vs  $384.6 \pm 130$ . Dividiendo entre el DNA se observó el mismo comportamiento,  $218 \pm 170$  vs  $448 \pm 190$  para el sitio y  $755 \pm 160$  vs  $1283 \pm 198$  picomoles de GMPc/mg de DNA para el no sitio.

**Discusión y conclusiones.** El inhibidor de la síntesis de óxido nítrico, Nitro-L-arginina, no suprimió la permeabilidad vascular ni la implantación, quizá debido a la poza de NO en forma de nitrosotioles. Por otro lado, el inhibidor suprimió al 100% la presencia de embriones de 19 días, manifestándose en su lugar la presencia de nódulos de reabsorción. Esto indica que el efecto fue tardío y seguramente acumulativo; la disminución en la síntesis de óxido nítrico favorece las condiciones hipóxicas con aumento de anión superóxido y peroxinitrito los cuales tienen gran poder peroxidativo sobre la mayoría de las biomoléculas, todo esto finalmente conduce a la involución del embrión formando un nódulo de reabsorción.

El tejido endometrial, (epitelio y estroma), del cuerno uterino tratado con el inhibidor tuvo menor concentración de GMP cíclico que el control, este comportamiento lo presentaron el sitio y el no sitio. El GMP cíclico es un

importante modulador de funciones celulares como la permeabilidad vascular, además de considerarse como un marcador de la presencia de NO. Se ha demostrado que la concentración de NO se encuentra aumentada en el sitio de implantación. Es probable que la disminución en la concentración de GMP cíclico también sea una de las causas de la reabsorción del embrión.

Las alteraciones en la temperatura y la frecuencia cardíaca, así como el general de orina nos indica que el efecto del inhibidor también fue sistémico. Otros autores han encontrado que la administración de L-NAME, provoca en los animales de experimentación aumento de la presión sanguínea, la temperatura, la frecuencia cardíaca y en algunos casos aborto.

En conclusión, la administración del inhibidor de la síntesis de NO en el lumen uterino durante la implantación, disminuye en el tejido uterino la concentración de GMP cíclico, suprime la presencia de embriones el día 19 de gestación, sin afectar la permeabilidad vascular uterina y la implantación. Además, las ratas presentan aumento en la excreción de metabolitos urinarios.

## INTRODUCCIÓN

### **Implantación**

La evolución de la viviparidad en los mamíferos ha sido posible gracias al desarrollo de la implantación del embrión y la placentación, las cuales inician y establecen la interacción de dos tejidos (materno y fetal) y la subsiguiente aposición de sus sistemas vasculares, con el fin de permitir intercambios fisiológicos entre los dos (Enders y Schlafke, 1974; Enders, 1976; Gil-Recasens y cols, 1978).

La implantación es una etapa de la gestación temprana de los mamíferos euterios, cuyo inicio duración y características varían dependiendo de la especie. El término implantación se refiere al establecimiento de la íntima asociación entre el blastocisto y los tejidos uterinos. Este fenómeno requiere de una perfecta sincronización entre el blastocisto y el útero para permitir la adhesión de las células del trofotodermo al epitelio endometrial. Después de la adhesión, sobreviene la penetración del endometrio uterino, cuyo grado varía dependiendo de las especies y puede ser desde la simple adhesión al epitelio hasta la penetración profunda del estroma endometrial (Enders y Schlafke, 1974 y 1977; Abrahamshon y Zorn 1993; Applin, 1996).

Durante la implantación se pueden distinguir las siguientes etapas (figura 1):

*1.- Orientación:* El blastocisto se sitúa próximo y frente a la región del endometrio en la que la implantación tomará lugar; así, en la rata, el blastocisto se dirige hacia el epitelio de la zona antimesometrial. Durante esta etapa ocurre la pérdida de la zona pelúcida (Enders, 1970; Denker, 1993).

## EL PROCESO DE LA IMPLANTACIÓN EN LA RATA

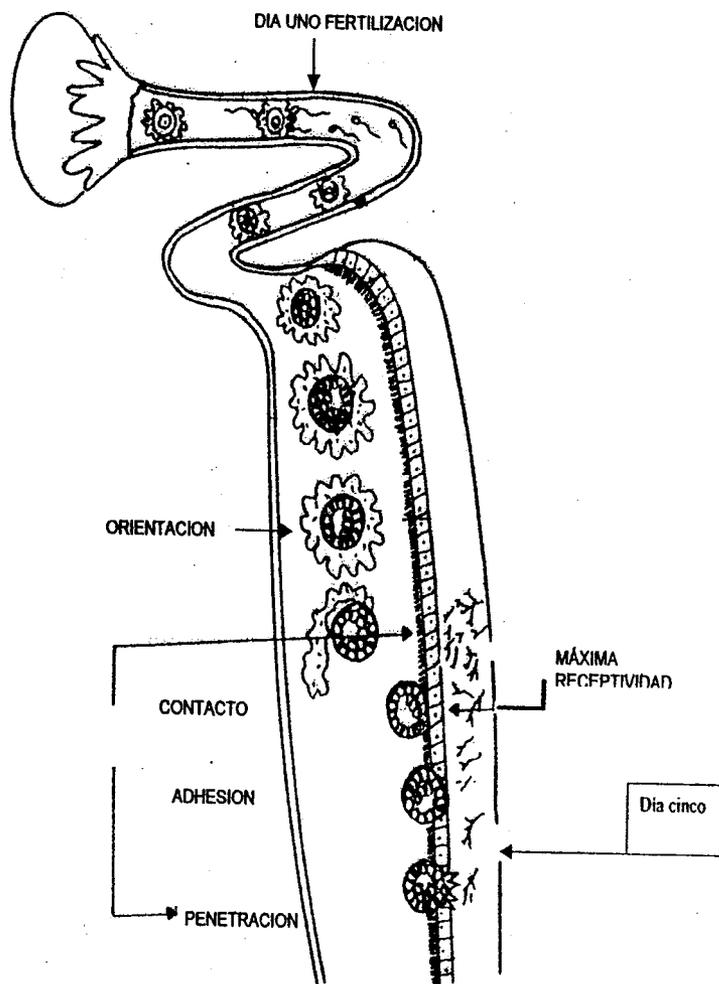


Fig. 1 Descripción de los diferentes procesos que ocurren durante la implantación embrionaria.

2.-  
**Cont**  
**acto**  
**o**  
**Apos**  
**ición**  
: Se  
refie  
re a  
la  
simp  
le  
yuxt  
apos  
ición  
entre  
el  
trofo  
blast  
o y  
el  
epite  
lio  
lumi

nal uterino y puede ocurrir por diversos mecanismos:

a) Por envolvimiento: el hinchamiento del endometrio uterino permite que éste rodee al blastocisto y se establezca el contacto del trofotodermo con el epitelio uterino, lo cual ocurre en la rata y el ratón (Enders, 1970; Psychoyos, 1973).

b) Por expansión: el blastocisto incrementa su volumen llenando la luz uterina, como en el conejo, los carnívoros y algunos monos (Enders, 1970; Psychoyos, 1973; 1976; 1986; Abrahamsohn y Zorn, 1993).

c) Por acercamiento activo del blastocisto: se establece por la aproximación del blastocisto a la mucosa uterina, tal como ocurre en el cobayo, el chimpancé y el humano (Psychoyos, 1973; 1986; Abrahamsohn y Zorn 1993).

Durante esta fase de contacto ocurre la interdigitación de las microvellosidades del trofoblasto y del epitelio luminal. Además, el endometrio aumenta su permeabilidad vascular y hay producción de edema y extravasación de proteínas séricas (Enders, 1970; 1986; Abrahamsohn y Zorn 1993).

**3.- Adhesión:** Se establece la unión trofoblasto-epitelio endometrial resistente a la ruptura física, con el establecimiento de desmosomas e interacción estrecha entre las superficies membranales (Enders, 1970). Son importantes en este proceso los cambios de carga en la membrana, la presencia de moléculas de adhesión celular, así como grupos activos (SH, COO<sup>-</sup>, NH<sub>3</sub>, etc.) y compuestos de superficie entre los que se encuentran los ácidos siálicos (Enders, 1976; Abrahamsohn y Zorn 1993).

**4.- Penetración:** El blastocisto penetra a través del epitelio uterino por diversos mecanismos: fagocitosis, desplazamiento mecánico o actividad enzimática (Enders, 1976). El grado de penetración varía en las distintas especies, y va desde la simple adhesión al epitelio, hasta la penetración de las capas profundas del endometrio, de modo que las vellosidades coriónicas, originadas por el

trofoblasto, quedan bañadas por la sangre materna (Abrahamsohn y Zorn, 1993; Applin, 1996).

Se han descrito tres tipos de penetración del trofoblasto al epitelio uterino: por desplazamiento, por fusión y por invasión. En la penetración por desplazamiento, característica de la rata y el ratón, la unión del trofoblasto a la membrana plasmática apical del epitelio uterino es seguida por la degeneración de grupos completos de células uterinas, permitiendo de esta manera el avance del trofoblasto hacia la lámina basal y al estroma uterino. En la penetración por fusión que presenta el conejo, los rumiantes y el hombre, las membranas plasmáticas apicales de ciertas partes del trofoblasto se funden con las del epitelio uterino y forman un sincicio que contiene núcleos de origen materno y embrionario. Este sincicio revela su carácter invasivo al penetrar a través de la lámina basal y por erosión comunicar a los vasos sanguíneos maternos con el trofoblasto para formar el contacto hemocorial. La penetración de tipo invasiva, que presentan los carnívoros, se caracteriza por la penetración de pequeñas prolongaciones del citoplasma del sinciciotrofoblasto entre las células del epitelio uterino (Ljungkvist y Nilson, 1974; Martell y Psychoyos, 1989; Aplin, 1996). Aunque para fines de estudio se ha hecho esta clasificación, se puede encontrar la combinación de los tres tipos en algunas especies.

Para que la implantación se lleve a cabo, los tejidos embrionario y materno deben haber presentado los cambios característicos que son el resultado de su mutua interacción (Abrahamsohn y Zorn, 1993, Applin, 1996). El embrión debe haber alcanzado la etapa de blastocisto y el útero debe haber sufrido los cambios morfológicos y bioquímicos que le permitan la implantación del embrión. Esta etapa en el útero se conoce como receptividad uterina, y en los roedores los cambios responsables para esta condición son desencadenados por estrógenos,

previa sensibilización con progesterona. Durante la preñez temprana en los roedores, el útero es receptivo o sensible a la presencia del blastocisto, únicamente durante un periodo determinado de tiempo. La transición de un endometrio refractario (no receptivo) a uno receptivo, es un fenómeno complejo que está asociado a cambios tanto del epitelio como del estroma uterino en el sitio donde se albergará el blastocisto. El epitelio uterino sufre cambio en la polaridad, en la expresión de receptores de superficie y en la expresión de moléculas de adhesión, de las cuales algunas también se expresan en tejidos neoplásicos malignos. Las integrinas, la Mel-CAM, MUC 18, S-Endo-1 (Shih, 1999) son algunas de las moléculas de adhesión caracterizadas y estudiadas recién. Durante el periodo previo y posterior a la implantación el epitelio también sintetiza moléculas anti-adhesivas, en el ratón se ha caracterizado una proteína integrada a membrana (MUC1) que tiene esta propiedad (Messenger y cols., 1998). En los roedores probablemente por efecto de citocinas, las células del epitelio endometrial, así como las del estroma, aunque a diferentes tiempos y coordinación, sufren apoptosis para facilitar el anclaje del blastocisto. Durante la remoción del epitelio y el estroma se ha demostrado y caracterizado la participación de proteasas. Tres familias de proteasas han sido involucradas en la degradación de la matriz requerida para la implantación: cisteína, serina y metaloproteinasas (Salamonsen LA, 1999). También produce enzimas y el estroma produce inhibidores. Durante esta etapa también se induce la expresión de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento insulinoide (IGF) (Porcu y cols, 2003), el factor liberador de corticotrofina; de moléculas de adhesión y de matriz extracelular por el epitelio materno y el blastocisto (Nardo y cols, 2003), también hay aumento tanto en expresión como en actividad de metaloproteinasas (Pilka R y cols, 2003) y en general aumento en la síntesis de RNA y proteínas (Beir y cols, 1991).

En respuesta a señales enviadas por el blastocisto a través de diversas moléculas, el estroma endometrial sensibilizado sufre el proceso de transformación *decidual*. Este fenómeno involucra proliferación y diferenciación celular y aumento de la permeabilidad vascular en el sitio del endometrio en el que el conceptus será alojado (sitio de implantación) (Haddad y cols, 1995). El aumento de permeabilidad vascular, una de las reacciones más tempranas del endometrio durante la implantación, ha sido de gran utilidad metodológica, ya que en especies como la rata y el ratón (Psychoyos, 1986; Gil Recasens y cols, 1978) permite la detección de zonas diferenciadas morfológica y funcionalmente, denominadas sitios de implantación. Cuando a los animales de laboratorio se les administra por vía intravenosa colorantes afines a la albúmina logran extravasarse y acumularse en los sitios de implantación (Psychoyos, 1973 y Psychoyos, 1976) y de esta manera es posible separar este tejido. Es en el día cinco de gestación en la rata, contando como día uno cuando se encuentran espermatozoides en el frotis vaginal, cuando el blastocisto se ubica frente a la superficie antimesometrial del endometrio, que el útero alcanza su estado de máxima receptividad y por lo tanto es más sensible a los estímulos del blastocisto (Denker, 1993).

Los mecanismos moleculares que inducen el aumento de permeabilidad vascular y la subsiguiente reacción decidual aun no están bien establecidos. Se sabe que las prostaglandinas juegan un papel importante, ya que la inhibición de su síntesis disminuye el número de sitios de implantación (zonas con permeabilidad vascular aumentada), además se ha encontrado que su concentración esta elevada en estos sitios. Es probable que las prostaglandinas lleven al cabo su efecto por medio de otros compuestos con más capacidad para difundir. El óxido nítrico, una molécula pequeña y de fácil difusión, puede estar implicado en el aumento de permeabilidad vascular en el sitio de implantación, ya que, por un lado se encuentra en mayor concentración en este sitio y por el otro está bien

demostrado que uno de sus principales efectos es la vasorelajación por medio de la activación de la guanilil ciclasa (Gagiotti y cols, 2000; Kennedy, 1977).

### **El óxido nítrico**

El óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ), uno de los gases tóxicos del *smog*, es un radical libre gaseoso, de vida media muy corta y se genera en la mayoría de las células del organismo (Bredt y Snyder, 1994; Nathan 1992, 1994; 1995). En 1987 El grupo de Ignarro (Ignarro, 1987; Ignarro, 1990; Ignarro 1992) descubrió que las células del endotelio vascular eran capaces de sintetizarlo a partir de L-arginina, y además, que las propiedades de este radical libre coincidían con las propiedades físicas y químicas del factor relajante derivado del endotelio (EDRF) (Palmer y cols, 1988<sup>a,b</sup>). A la fecha se ha comprobado que el EDRF y el  $\bullet\text{NO}$  son el mismo compuesto (Beckman y cols, 1990; Beckman, 1996).

En las células del endotelio, el  $\bullet\text{NO}$  se sintetiza en una reacción catalizada por la isoforma *constitutiva* de la óxido nítrico sintasa (Knowles y Moncada, 1994), desde donde difunde hacia el músculo liso vascular subyacente y en donde se puede unir a la fracción *hemo* de la guanilato ciclasa (Goretski y Hollocker, 1988; Melkova, 1997). La formación del complejo  $\bullet\text{NO}$ -guanilato ciclasa produce un cambio conformacional de la enzima que conduce a su activación, provocando así un aumento en la concentración de GMPc y una disminución en la concentración de calcio intracelular, lo que induce la relajación del músculo liso. La administración de nitro-L-arginina, un análogo de la arginina y antagonista de la síntesis del  $\bullet\text{NO}$ , provoca en la circulación útero-placentaria de fetos de cordero un aumento significativo en la presión así como disminución del flujo sanguíneo umbilical (Harald y cols, 1993).

Por otro lado, el  $\bullet\text{NO}$  sintetizado a partir de los macrófagos, se produce en mayor cantidad que el de origen endotelial y además con fines de defensa inespecífica (Wood, 1990; Choudhuri y Wood, 1991). El  $\bullet\text{NO}$  generado en estas células proviene de la reacción catalizada por la isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa (Hunt, 1995; Celtek, 1997). EL  $\bullet\text{NO}$  sintetizado de esta manera, puede estimular también a la guanilato ciclasa, pero primordialmente tiene efectos tóxicos tales como la inhibición de la respiración mitocondrial, la unión a otras enzimas con centro *hemo* y daños al DNA (Haddad y cols, 1995).

El  $\bullet\text{NO}$  difícilmente se encuentra libre, ya que reacciona rápidamente con un grupo específico de moléculas que tienen orbitales con electrones desapareados, que también son radicales libres, o con metales de transición como el fierro y el cobre (Giuseppe y cols, 1998; Halliwell y Gutterige, 1985 y Halliwell y Gutterige 1988). La vida media de este radical es de 1 a 2 segundos, ya que *in vivo* reacciona rápidamente con la oxihemoglobina para formar metahemoglobina y nitratos, metabolito estable de  $\bullet\text{NO}$  (Ignarro, 1990 ). Sin embargo, cuando el  $\bullet\text{NO}$  se produce en grandes cantidades y en presencia del anión superóxido ( $\text{O}\bullet_2^-$ ), como en los procesos inflamatorios, da lugar a la formación de peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), un anión altamente oxidante y capaz de producir estrés oxidativo (Koppenol, 1998).

El  $\bullet\text{NO}$  se sintetiza dentro de las células a partir del aminoácido L-arginina mediante una reacción catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Esta reacción requiere de la participación de varios cofactores como se muestra en la figura 2 (Moncada y cols, 1991<sup>a</sup>; Neri y cols, 1995).

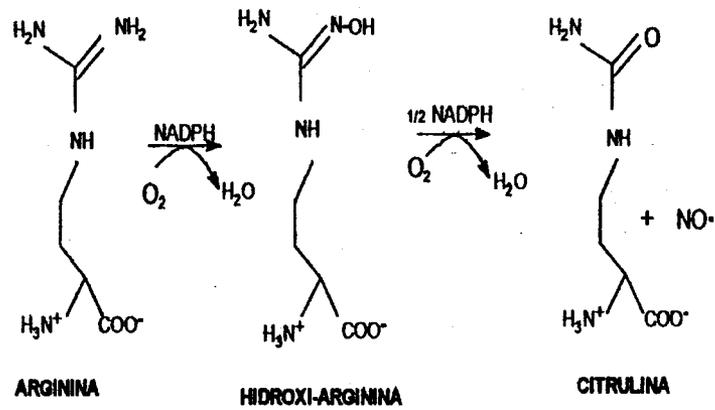


Fig. 2. Mecanismo de acción de la óxido nítrico sintasa (NOS): La NOS oxida al grupo guanidino de la L-arginina en un proceso que consume 5 electrones y resulta en la formación de •NO y de L-citrulina. Durante este proceso se forma como producto intermediario la L-hidroxarginina.

El doble papel del •NO, bueno o deletéreo, en la comunicación intercelular o en los mecanismos de defensa inespecíficos está relacionado con su origen, mientras el •NO derivado de la enzima constitutiva, típica de los endotelios, activa a la guanilato ciclasa para aumentar la vasorelajación y la oxigenación, el generado por la isoforma inducible participa en la respuesta autoinmune por medio de la destrucción de gérmenes. (Ress y cols, 1990; Richard y cols, 1994; Doyle, 1981). La enzima constitutiva es dependiente de  $Ca^{+2}$ -calmodulina y está presente en el endotelio, las plaquetas, ciertas neuronas, el miocardio y endocardio, y la inducible que es independiente de  $Ca^{2+}$  y se sintetiza principalmente en los macrófagos después de la exposición a endotoxinas bacterianas o citocinas, por lo que se induce mediante un estímulo inmunológico (Forsterman, 1988; Sessa y cols, 1992). En la tabla I se enlistan las principales diferencias entre las dos isoformas. Ambas son citosólicas y requieren NADPH como cofactor y tetrahidrobiopterina. La enzima constitutiva sintetiza cantidades pequeñas, del orden de picomoles, de •NO durante períodos breves en respuesta a elevaciones transitorias de  $Ca^{2+}$  intracelular que siguen a la activación del receptor. La enzima inducible produce cantidades más elevadas de •NO (nanomolares) durante períodos de tiempo más prolongados y su inducción es inhibida por glucocorticoides (Bredt y Snyder, 1994; García-Cerdeña y cols, 1998).

La síntesis del NO• puede inhibirse mediante análogos de la L-arginina, como la N-monometil-L-arginina (L-NMMA), la L-nitro-arginina metil ester (L-NAME) y la L-nitro-arginina (L-NA), que compiten con la L-arginina (Ghislaine y cols, 1994). Estos inhibidores tienen la propiedad de ser enantiómero-específicos (Palmer y cols, 1987<sup>a,b</sup> y 1988<sup>a,b</sup>; Ånggard, 1994). Estos inhibidores se han utilizado como herramientas experimentales para determinar la contribución del

•NO en los procesos fisiológicos y fisiopatológicos tanto en animales como en el hombre (Wink y Mitchell, 1998).

Los diferentes inhibidores de la NOS actúan no solo sobre ella, sino también sobre el acoplamiento NO•-guanilato ciclasa. Es posible también que las condiciones patológicas en las que existe una disminución en la síntesis o liberación de •NO se encuentren asociadas a un incremento en la respuesta a los nitrovasodilatadores (Stamler 1992).

Los estudios en animales han mostrado que existe una disminución en la producción de •NO o una sensibilidad reducida a su acción en la hipertensión, la diabetes, la aterosclerosis y el vasoespasmo (Moncada y cols, 1991<sup>a</sup>).

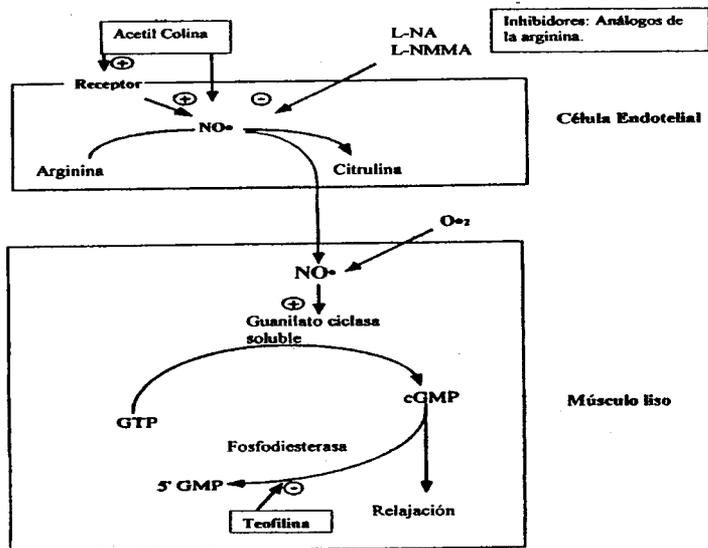


Fig. 3 Diagrama que muestra el mecanismo propuesto para la activación de guanilato ciclasa.

Fig. 3 Mecanismo de acción del  $\bullet\text{NO}$ . El estímulo recibido por el endotelio activa a la óxido nítrico sintasa (NOS) para incrementar la producción de  $\text{NO}\bullet$ , éste difunde hacia la célula del músculo liso donde estimula la producción del  $\text{GMPc}$ , dando como resultado la vasodilatación. El  $\text{GMPc}$  es hidrolizado por la enzima fosfodiesterasa tipo 5.

**Tabla I**  
**Diferencias entre la NOS inducible y la constitutiva**

| <b>Característica</b>                    | <b>NOS (constitutiva)</b>  | <b>NOS (inducible)</b>  |
|--|--|---|
| Tipo celular o tejido donde se encuentra | Célula endotelial<br>Neuronas<br>Plaquetas, miocardio, endocardio                      | Macrófagos<br>Células de Kupfer<br>Células de músculo liso  |
| Activadores                              | ADP, trombina, acetilcolina, glutamato, ionóforo de calcio, estrés, presión sanguínea. | Citocinas   |
| Inductores                               | Ejercicio  | Lipopolisacáridos (LPS)<br>Interferón $\gamma$ , Interleucinas<br>TNF $\gamma$ , lipoproteína de baja densidad y oxidadas |
| Forma de liberación                      | Pulsos continuos, constantes y de baja concentración                                   | Gran liberación durante el tiempo que dure el estímulo  |
| Blancos moleculares                      | Hemoproteínas, guanilatociclasa soluble y otras enzimas hemo, y tioles.                | Proteína Fe-S, tioles, anión superóxido, hemoglobina  |
| Función propuesta                        | Regulación metabólica y Transducción de señales.                                       | Defensa del huésped   |

*(Tomado de Ånggard, 1994).*

### **El óxido nítrico en la gestación**

El •NO ha sido involucrado en diversas enfermedades, como la artritis, la aterosclerosis, el cáncer, la diabetes, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y el infarto al miocardio; En estas enfermedades participa en las reacciones de inmunidad inespecífica; como neurotransmisor en el sistema nervioso central y periférico; en la modulación de la liberación de hormonas y en la vaso-relajación del músculo liso (Wink, 1998). El •NO es considerado como el relajante biológico más importante del músculo liso, por lo que las alteraciones en su síntesis o preservación conducen a hipertensión (Sladek, 1997; Steinhorn cols, 1995; Biondi 1990).

El •NO juega un papel importante en las señalizaciones celulares de muchos sistemas, incluyendo el reproductivo; en este el •NO participa en la maduración del ovocito, la ovulación, la fertilización y la implantación (Thaler y cols, 2003). Durante el embarazo los estrógenos regulan la generación uterina de •NO y éste a su vez juega un papel como intermediario en los efectos inducidos por estrógenos en el útero (Biswas y cols, 1998). Sugino y su grupo (1996) demostraron que en el corazón de ratas gestantes el tamoxifeno disminuyó la concentración de la NOS a los valores encontrados en animales no gestantes, por lo que dedujeron que la actividad de la NOS era regulada por estrógenos. En apoyo a lo anterior, Van Buren (1992) informó que el inhibidor de la síntesis del •NO, el L-NAME, evitó en el útero de las ovejas el aumento del flujo sanguíneo inducido por los estrógenos: de 139 ml/min lo bajo a 16 ml/min. Por otro lado, Magness (1992) observó que este mismo inhibidor suprimió el aumento en la concentración del GMPc provocado por la administración de las mismas hormonas, Por lo que se

sugiere que el •NO y el GMPc juegan un papel muy importante en la regulación del flujo sanguíneo durante el embarazo.

El •NO es un potente relajante del músculo liso del tracto gastrointestinal, el sistema respiratorio y el miometrio. Este radical es producido en el tracto genital femenino durante el embarazo, y una reducción en su síntesis puede estar involucrada con el inicio del trabajo de parto. Además, la administración de donadores de •NO puede ser útil para inhibir las contracciones uterinas durante el trabajo de parto a pretérmino (Norman, 1996).

Durante la gestación se alteran diversos procesos fisiológicos en los que participa el músculo liso tanto en el sistema gastrointestinal como del vascular; en éste último se induce resistencia al efecto presor de sustancias vasoactivas como la angiotensina II y la noradrenalina, lo que conduce a la disminución de la presión sanguínea y como consecuencia a un incremento del gasto cardíaco (Chesley, 1978). Aunque se ha demostrado que la prostaciclina interviene en estas adaptaciones hemodinámicas, recién se propuso al •NO como la sustancia que mantiene el tono vasodilatado que se observa durante el embarazo. Weiner y cols (1994), observaron en segmentos de arteria uterina de cobayas, que la concentración del óxido nítrico era mayor en hembras preñadas que en no gestantes y Moncada y cols (1991<sup>a</sup>), y Molnar y cols (1994), demostraron que la inhibición específica de la síntesis de •NO por nitro-L-arginina aumentó la presión arterial y disminuyó el flujo sanguíneo umbilical, por lo que sugirieron que el óxido nítrico era el responsable del tono vasodilatado típico de la preñez en ratas (Hwang y cols, 1995).

Otros autores (Kirk y col., 1993) encontraron en el plasma y la orina de ratas gestantes que la concentración de nitratos, metabolitos estables del óxido nítrico, se elevó de 2 µmoles al inicio de la gestación hasta un pico máximo de 6.5 µmoles

el día 15 de preñez o pseudopreñez (75% de la gestación); este pico máximo declinó hasta volver a alcanzar el valor inicial de 2  $\mu$ moles al final de la gestación. También demostraron que durante esta etapa la concentración de nitratos en la orina siempre fue paralela a la producción de GMPc, y la administración del inhibidor específico de la NOS, la L-nitro-arginina, suprimió los resultados obtenidos (Buhimschi y cols., 1995). En el útero humano se demostró que la producción de  $\bullet$ NO y GMPc aumentó después de la administración de la L-arginina (el sustrato para la síntesis de  $\bullet$ NO) o del dietil-óxido nítrico (donador del óxido nítrico), además, el inhibidor L-nitro-arginina-metilester suprimió dicha síntesis. De esta manera se confirmó que el NO $\bullet$  y no la citrulina, es el responsable del aumento en la producción del GMPc (Buhimschi y cols, 1995<sup>b</sup>) (tabla II).

El grupo de Buhimschi encontró que la administración crónica de la nitro-L-arginina metil- ester (L-NAME) en las ratas a partir del día uno de gestación hasta el último tercio de la misma, aumentó la presión sistólica materna y disminuyó el peso de los embriones, sin embargo, cuando el inhibidor se administró junto con el sustrato, L-arginina, los efectos no se manifestaron. Estos mismos autores encontraron un comportamiento similar en los cobayos (Buhimschi<sup>a</sup> y cols, 1995)

Por otro lado, Molnar y su grupo (1994) al administrar continuamente el inhibidor L-NAME a las ratas a partir del día 18 de la gestación hasta el primer día después del parto, encontraron desarrollo de hipertensión, albuminuria y disminución del peso de sus embriones sin afectar la duración de la gestación. Ellos mismos demostraron que la hipertensión provocada por el L-NAME en estas ratas declinó hasta alcanzar valores normales después del parto. Además, cuando a las ratas vírgenes o a los machos se les administró el L-NAME, éste no tuvo efecto, por lo que se sospechó que la unidad fetoplacentaria juega un papel muy importante en la

regulación de la síntesis del óxido nítrico (Baylis y cols, 1992). Estos mismos autores encontraron trombocitopenia tanto en ratas preñadas como en las no preñadas tratadas con L-NAME, seguramente debida a la agregación plaquetaria (tabla III).

Vale la pena mencionar que el trinitrato de glicerilo, un donador del •NO, ha sido ocasionalmente utilizado como relajante uterino. Este compuesto se ha aplicado en forma de parches (Deponit 10, Schwarzpharma, Germany) en mujeres gestantes a pretérmino cursando con contracciones uterinas, para controlar el trabajo de parto (Neri y col, 1995).

**TABLA II**  
**EFFECTOS DE LOS INHIBIDORES ESPECÍFICOS DE LA ÓXIDO**  
**NÍTRICO SINTASA DURANTE LA PREÑEZ**

| Efectos  | Citas bibliográficas                 |
|--|--------------------------------------|
| ↑ Presión sistólica ( rata )                     | Buhimschi y cols, 1995               |
| Albuminuria, hipertensión,                       | Molnar y cols, 1994                  |
| ↓ Peso de los embriones, trombocitopenia (rata). | Franchi y cols, 1994                 |
| ↑ Las contracciones del útero (rata y humano)    | Buhimshi y cols, 1995 <sup>a,b</sup> |

*Se muestra la concentración de L-NAME y nitro-L-arginina sobre algunos signos clínicos relacionados con la vasorelajación durante la preñez. ↑: aumento; ↓ : disminución.*

**Tabla III**

**Presencia de óxido nítrico en diversos órganos de hembras gestantes**

| ESPECIE | ÓRGANO   | PARÁMETRO                | REFERENCIA   |
|---------|--|--------------------------|--|
| Cobayo  | Corazón, riñones,<br>músculo esquelético,<br>esófago | ↑ NOS<br>↑ GMPc          | Weiner, 1994   |
| Rata    | Plasma, orina  | ↑ NO <sub>2</sub> , GMPc | Sladek, 1997   |
| Humano  | *Placenta,<br>*sinciotrofoblasto,<br>**miometrio     | ↑ NOS,<br>↑ •NO          | *Myatt y cols.,1993<br>**Buhimschi y<br>Yallampalli; <sup>a,b</sup> 1995 |
| Conejo  | Útero  | ↑ NOS                    | Stephen y cols, 1997   |

*\*NO, óxido nítrico; NOS, óxido nítrico sintasa; GMPc, guanosina monofosfato cíclico y NO<sub>2</sub>, nitritos.*

Diversas evidencias indican que al acercarse el parto en la rata, la concentración del •NO declina; Stephen y colaboradores (1997) demostraron que la actividad de la óxido nítrico sintasa disminuyó de 6 pmoles de •NO/mg de proteína, a la mitad del embarazo, hasta 1 pmol al acercarse al parto. Lo anterior se debe a que antes del nacimiento los compuestos vasodilatadores deben disminuir para permitir las contracciones que prevalecen durante este período. En apoyo a esto, Buhimshi y colaboradores (1995<sup>a,b</sup>) demostraron que en el útero humano la concentración del •NO también disminuyó al acercarse el parto.

La concentración de •NO en otros órganos también varía durante la preñez; en el corazón, riñones, músculo esquelético y esófago de cobayas, la actividad de la óxido nítrico sintasa aumenta a medida que transcurre la gestación, de tal manera que transcurrido el 75 % del embarazo la concentración de la óxido nítrico sintasa es cuatro veces mayor que al inicio de la preñez (Myatt y cols., 1993, Nathan y Xie., 1994). Además, estos aumentos fueron paralelos a cambios en la concentración del GMPc (Schmidt y Lohmann, 1993). Hasta ahora los estudios han demostrado que el embarazo esta asociado con elevación de la concentración de óxido nítrico en diversos tejidos, y que la supresión de su síntesis en las etapas tardías conlleva a alteraciones vasculares que evitan en la mayoría de los casos la gestación, sin embargo, es muy escasa la información que se tiene acerca del papel de esta molécula en el útero durante la implantación.

Se ha demostrado que la permeabilidad vascular que se presenta en el útero durante la implantación puede ser inducida por prostaglandinas o histamina (Laloraya y cols, 1989), pero se desconoce el mecanismo y los factores que regulan este fenómeno. Trabajos realizados en la década de los 80s establecieron que el •NO regula la producción de GMPc y prostaglandinas por medio de un efecto estimulador sobre el grupo hemo de las enzimas guanilil-ciclasa (Fantone y

Ward, 1982; Freilisch y Noack, 1987) y ciclooxigenasa; también se sabe que en el sitio de implantación del blastocisto la concentración de  $\bullet\text{NO}$  está aumentada con respecto al no sitio, así como la presencia de macrófagos, importantes productores de  $\bullet\text{NO}$  y anión superóxido ( $\text{O}\bullet_2^-$ ) (Hunt, 1995). En condiciones normales, la producción de estos dos radicales libres está en equilibrio, no obstante, cuando la concentración del  $\text{O}\bullet_2^-$  es excesiva, éste destruye al óxido nítrico, creando un ambiente isquémico debido a la falta del relajante muscular  $\bullet\text{NO}$ , lo que ocasiona la pérdida del embrión o el desarrollo anormal del mismo (Gerda y cols, 1992). Bajo condiciones patológicas, la unión del trofoblasto fetal con el tejido materno produce en el lecho uteroplacentario un aumento en la producción de radicales libres de oxígeno por las células linfoides deciduales; los radicales libres de oxígeno y los lipoperóxidos formados disminuyen la liberación de prostaciclina y óxido nítrico e incrementan la concentración de tromboxano  $\text{A}_2$  y endotelina, favoreciendo un medio hipóxico con la formación de más radicales libres y finalmente un medio inhóspito para el embrión (Gerda y cols, 1992; Salvemini y cols, 1993; Rubbo y cols, 1994; Szabo, 1997).

Novaro y Rettori (1996) encontraron que el L-NAME indujo disminución de la síntesis de prostaglandinas  $\text{E}_2$  y  $\text{F}_{2\alpha}$  en el tejido uterino durante el 5<sup>o</sup> día de embarazo en la rata. Dichos resultados sugieren la existencia de un sistema  $\bullet\text{NO}$ -dependiente que modula la síntesis de prostaglandina en el útero de este mamífero durante la implantación. Otros trabajos han establecido que el  $\bullet\text{NO}$  puede estimular la actividad de ciclooxigenasa, y de esta manera incrementar la síntesis de prostaglandinas (Radommsky y cols, 1987; Salvemini y cols 1993, Franchi y cols, 1994).

En contraste, Hadad y cols (1995), encontraron que la pérdida temprana de los embriones de rata se encuentra asociada con la producción local del óxido nítrico proveniente de los macrófagos, informando además que la aminoguanidina, un inhibidor con preferencia sobre la NOS inducible, inhibió en los macrófagos la producción *in vitro* de óxido nítrico y redujo significativamente la pérdida de embriones en ratones. Esto demuestra que el efecto del óxido nítrico depende del sitio donde se origine, ya que el derivado del endotelio contribuye en el establecimiento de la preñez, mientras que el sintetizado por los macrófagos participa en el rechazo del embrión, debiendo considerarse que por ser el mismo mensajero, la diferencia puede deberse a la cantidad del •NO producido así como por el sitio donde éste se origina. No obstante, en el establecimiento del embarazo es indispensable un equilibrio en la producción de las isoenzimas, constitutiva e inducible. Mientras que el •NO formado a partir de la óxido nítrico sintasa constitutiva es importante en el mantenimiento del tono vascular durante la preñez, el formado a partir de la isoenzima inducible producida por los macrófagos, participa en el rechazo del embrión (Sugino y cols, 1996).

### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Varios estudios han reportado que la inhibición de la síntesis enzimática del •NO durante el 2° o 3° trimestre de la gestación en la rata provoca signos parecidos a los de la preeclampsia: pérdida espontánea del feto, aumento de la presión arterial, elevación de la temperatura y alteraciones de la función renal. Sin embargo se desconoce en que tejido y en que momento se presenta la alteración de la síntesis del •NO.

Probablemente las alteraciones vasculares que se presentan durante la gestación se inician por una deficiencia en la producción de óxido nítrico en el sitio de

implantación, provocando un medio hipóxico desfavorable para el desarrollo del embrión. Por otro lado, el aumento inicialmente local de radicales libres se generaliza provocando en la madre alteraciones vasculares y disfunción renal.

En el presente trabajo pretendemos demostrar que la inhibición de la formación del  $\bullet\text{NO}$  en el sitio de implantación, disminuye el porcentaje de implantación, y en el tejido endometrial materno disminuye la concentración de su efector directo principal, el GMP-cíclico. Además, durante la gestación en la madre provoca alteraciones renales que se manifiestan por filtración de moléculas como glucosa (glucosuria), y proteínas (proteinuria), las cuales son consecuencia de la disfunción vascular.

### **HIPÓTESIS**

La supresión de la síntesis enzimática de  $\bullet\text{NO}$  en el útero, suprime la implantación y disminuye la concentración de GMP cíclico en el tejido del sitio de implantación.

### **OBJETIVO GENERAL**

Investigar el efecto de la supresión en el útero, de la síntesis de óxido nítrico el 5º día de gestación, sobre la implantación la viabilidad embrionaria, y la concentración de GMP cíclico en el endometrio. Además, determinar si por efecto del inhibidor la madre presenta durante la gestación aumento de la temperatura y frecuencia cardiaca, proteinuria, albuminuria y glucosuria.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el efecto del inhibidor Nitro-L-arginina, del enantiómero inactivo de la arginina D-arginina y del inhibidor más el sustrato L-arginina, administrados intraluminalmente el día 5 de preñez, sobre el número de sitios de implantación del día 6 de preñez. Además, determinar el número de embriones y nódulos de reabsorción el día 19 de la gestación.
- Investigar el efecto del inhibidor sobre la concentración de GMP cíclico en el endometrio del sitio de implantación (epitelio y estroma) y el resto del útero el día 6 de preñez.
- Investigar si la administración del inhibidor de •NO provoca en la madre durante el transcurso de la gestación: elevación de la temperatura, alteración de la frecuencia cardíaca y signos generales de función renal medida por proteinuria, albuminuria y glucosuria.

## METODOLOGÍA

**Modelo experimental.** Se utilizaron 60 ratas hembras de la cepa Sprague- Dowley, de 9-10 semanas de edad y con un peso entre 250-280 g, las cuales fueron mantenidas bajo condiciones controladas de fotoperiodo y temperatura ambiente, con agua y alimentación *ad libitum*. Se aparearon mediante el método de trío (un macho y dos hembras) con machos sanos de la misma cepa y con fertilidad comprobada. El resultado del apareamiento se verificó mediante citología vaginal (realizada entre las 8:00 y 9:00 a.m. al día posterior del apareamiento) y la presencia de espermatozoides en el frotis vaginal fue indicativa de fecundación. Ese día fue considerado el día uno de la gestación.

Las ratas se dividieron en 3 grupos de 20 animales cada uno. Al quinto día de preñez ellas fueron inyectadas por vía parenteral con droperidol (6.5 mg/Kg) y 10 minutos después con ketalar (60 mg/kg). Posteriormente se les realizó una incisión suprapúbica de aproximadamente 1.5 cm, para exponer el útero. A las ratas del primer grupo se les administró en el lumen del cuerno uterino derecho 114 nmoles de nitro-L-arginina contenidos en 50 µl de solución salina al 0.85%, a las del segundo grupo 114 nmoles de Nitro-L-arginina + 342 nmoles de L-arginina y a las del tercer grupo 114 nmoles de D-arginina, el enantiómero inactivo de la L-arginina. En el cuerno izquierdo de todas las ratas se inyectó 114 nmoles de D-arginina. D-arginina es el sustrato inactivo de la oxido nítrico sintasa y además resulta mejor control que la solución salina por ser una molécula muy parecida al inhibidor (Tabla IV).

**TABLA IV**  
**Esquema del tratamiento que recibieron las ratas**

| grupo    | cuerno<br>izquierdo | cuerno<br>derecho   |
|----------|---------------------|---------------------|
| 1 (N=20) | D-arg               | Nitro-L-arg         |
| 2 (N=20) | D-arg               | Nitro-L-arg + L-arg |
| 3 (N=20) | D-arg               | D-arg               |

Las ratas fueron suturadas y veinticuatro horas después (6° día de preñez, día de la implantación), 10 ratas de cada grupo fueron sacrificadas por dislocación cervical, previa inyección intravenosa en la vena caudal de 0.8 ml de azul de tripán al 1% en solución salina al 0.9%. Los úteros se extrajeron, se liberaron de la grasa, se

separó el cuerno derecho del izquierdo y se abrieron longitudinalmente para exponer el endometrio. Enseguida se separaron las zonas teñidas, consideradas como sitios de implantación (sitios), de las no teñidas (no sitios) y por separado fueron sometidas a la agitación con perlas de vidrio para fragmentar el epitelio del estroma (Fagg y cols, 1979). Estos tejidos fueron utilizados para realizar las determinaciones bioquímicas, previa homogeneización. En estos animales se contaron los cuerpos lúteos con la finalidad de verificar su coincidencia con el de sitios de implantación, ya que este dato nos puede dar información sobre el porcentaje de fecundidad. Además, nos ayuda a tener una selección más homogénea de las ratas.

Las ratas que no se sacrificaron se dejaron evolucionar hasta el día 19 (la gestación en esta especie dura 21 ó 22 días) y durante este tiempo se midió cada tercer día la temperatura rectal, la frecuencia cardiaca y el peso, además se les realizó los días 7, 13 y 19 gestación un examen general de orina mediante tiras reactivas (Bili-Labstix de Bayer). El día 19 de preñez estos animales se sacrificaron y se contaron el número de nódulos de reabsorción, así como el de embriones. Los embriones y sus placentas fueron pesados y analizados macroscópicamente. El número de nódulos de reabsorción mas el de embriones representa el número de embriones implantados. El número de sitios de implantación (zonas teñidas) indica cuales y cuantas zonas del endometrio estuvieron preparadas para la implantación.

**Homogeneización.** Los fragmentos de tejido uterino obtenidos el 6° día de implantación, se homogeneizaron al 20 % en un amortiguador de Tris-HCl 50 mM pH 7.5 con tubo y pistilo de vidrio utilizando un homogeneizador "Caframo" Wiarion Ont Stirrer Tipe RZRI-64. Los homogeneizados se centrifugaron a 3000

rpm 15 minutos, el sedimento se descartó y el sobrenadante se recentrifugó a 18000 rpm a 4 °C durante 30 minutos (Hicks y cols, 1994). El último sobrenadante fue empleado para las determinaciones bioquímicas. En todos los casos se utilizó una centrífuga Beckman J2-HS y rotor JA 20.1.

### **Determinaciones Bioquímicas**

*GMP c.* La determinación de GMP cíclico se realizó por medio de un radioinmunoensayo, utilizando un equipo de AMERSHAM (AMERSHAM LIFE PRODUCTS). El ensayo se basa en la competencia entre una cantidad desconocida de GMPc y una cantidad fija de GMPc marcado con  $I^{125}$  por un número limitado de sitios de unión al anticuerpo.

Para la realización de esta prueba se precipitaron 200  $\mu$ l del sobrenadante de la última centrifugación con 200  $\mu$ l de ácido tricloroacético al 10% y el sobrenadante obtenido después de centrifugar a 2000 rpm/15 minutos fue utilizado como muestra. A 100  $\mu$ l de cada una de las muestras se les dejó reaccionar durante una hora con 100  $\mu$ l de una solución 0.05 M de un anticuerpo antiGMPc, seguido de 100  $\mu$ l de una solución de GMPc 100 mM marcado con  $I^{125}$  y se dejó incubar durante 18 horas a una temperatura que osciló entre 2 – 8 °C.

Pasado ese tiempo, las muestras se hicieron reaccionar con 100  $\mu$ l de un segundo anticuerpo con una concentración de 0.05 M. El anticuerpo está unido a partículas de polímero magnetizable para evidenciar el precipitado, de manera que la cantidad de radiactividad en el precipitado es inversamente proporcional a la concentración de GMPc de los problemas; la concentración de GMPc de los problemas se determinó interpolando el valor obtenido en una curva estándar de GMPc, corrida paralelamente.

Como parámetros de referencia se determinaron proteínas por el método de Lowry (Lowry y cols, 1951) y DNA por el de Giles (Giles y Myers, 1965) en todos los extractos.

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para determinar las diferencias significativas en el número de sitios de implantación, cuerpos lúteos, fetos, nódulos de reabsorción, temperatura, frecuencia cardíaca y general de orina causados por los distintos tratamientos, se aplicó el ANOVA simple seguido por la prueba de Tukey (tablas de la V a la VIII). En cambio, para determinar diferencias en la concentración de GMPc causada por los diferentes tratamientos y entre sitio y no sitio de implantación se aplicó ANOVA de dos factores (figuras de la 5 a la 8). Para comparar entre porcentajes se convirtieron los valores por su número de sitios de implantación, cuerpos lúteos, fetos y nódulos de reabsorción son variables discretas. El nivel de significancia en todos los casos fue de 0.05.

## RESULTADOS

### **Efecto de la Nitro-L-arginina sobre la implantación.**

El cuerno uterino izquierdo de los tres grupos, siempre tratado con D-arginina, presentó valores, de todos los parámetros considerados, estadísticamente similares a los del cuerno derecho inyectado también con D-arginina (grupo control). Por esta razón, tanto el cuerno izquierdo como el derecho tratados con D-arginina representan un control adecuado para los grupos problemas.

La administración intraluminal de Nitro-L-arginina al 5° día de preñez, no tuvo efecto significativo sobre la formación de sitios de implantación, valorada por el número de zonas teñidas con el colorante de azul de tripán. El porcentaje de implantación se calculó considerando como 100% al número de sitios de implantación (zonas teñidas) del cuerno control izquierdo tratado con D-arginina. La administración de L-arginina junto con el inhibidor, tampoco tuvo efecto sobre la implantación. Como un control se contaron los cuerpos lúteos; la relación entre cuerpos lúteos y sitios de implantación fue similar en los tres casos, esto nos ayudó a descartar alguna posible interferencia debida a la ovulación (Tabla V)

**TABLA V**  
**Efecto de la nitro-L-arginina sobre la formación de sitios de implantación**  
**(permeabilidad vascular)**

|                             | Cuerno derecho |                     | Cuerno izquierdo   |
|-----------------------------|----------------|---------------------|--------------------|
|                             | Nitro-L-arg    | Nitro-L-arg + L-arg | D-arg<br>(control) |
| Cuerpos lúteos              | 6.5±1.2        | 6.3±1.4             | 6.4±2              |
| Sitios de implantación      | 3.9±1.3        | 4.2±1.3             | 4.4±1.4            |
| % de sitios de implantación | 88.6           | 95.4                | 100                |

*Los sitios de implantación se valoraron por el número de regiones del endometrio que se tiñeron con el azul de tripán. En todos los casos, la diferencia fue no significativa al comparar cualquiera de los grupos tratados con el control. N = 10 para cada grupo.*

**Efecto de la nitro-L-arginina sobre la viabilidad embrionaria al día 19 de preñez**

La administración en el lumen uterino al 5° día de preñez, de nitro-L-arginina, inhibió totalmente la presencia de embriones el día 19 de preñez (0 vs 3.3±0.7 del control). Sin embargo, cuando la nitro-L-arginina fue administrada junto con el sustrato de la óxido nítrico sintasa, L-arginina, el efecto inhibitorio no se manifestó (2.8±0.8 vs 3.3±0.7 embriones), lo mismo sucedió con el peso de estos y de sus placentas (tabla VI). Por el contrario, el número de nódulos de reabsorción fue significativamente mayor en el cuerno tratado con nitro-L-arginina que en el control (3.2±1.1 vs 1.1±0.5 respectivamente) y la L-arginina restableció la normalidad, el número de nódulos fue de 1.0 ± 0.09. El porcentaje de implantación, se determinó considerando como 100% al número de embriones implantados el día 19 (embriones + nódulos de reabsorción) en el cuerno tratado con D-arginina. Para el porcentaje de viabilidad fetal se consideró como 100% al

**TABLA VII**  
**Efecto de la nitro-L-arginina sobre la concentración de metabolitos en orina**

|                   | <b>tratamiento</b> |                          |               |
|-------------------|--------------------|--------------------------|---------------|
|                   | <b>Nitro-L-arg</b> | <b>Nitro-L-arg + arg</b> | <b>D-arg</b>  |
| Densidad          | 1.005 ± 0.005      | 1.005 ± 0.005            | 1.005 ± 0.005 |
| pH                | 7.5 ± 0.5          | 7.0 ± 0.5                | 6.5 ± 1.0     |
| Leucocitos        | 0                  | 0                        | 0             |
| Nitritos (ng/dl)  | 100 ± 50*          | 100 ± 60*                | 0             |
| Proteínas (mg/dl) | 2000 ± 200*        | 2000 ± 200*              | 300 ± 100     |
| Cetonas (mg/dl)   | 40 ± 20*           | 40 ± 30*                 | 0             |

*Las lecturas son el promedio de las tomadas los días 7, 13 y 19 de la gestación. Por ANOVA simple, \* P < 0.01 al comparar con el control (D-arginina). N = 10.*

**Efecto de la Nitro-Larginina sobre la temperatura y la frecuencia cardiaca**

El grupo de ratas tratadas con Nitro-L-arginina presentó temperatura corporal y frecuencia cardiaca elevadas, con respecto al control, y la L-arginina no logro restablecer estos signos. La temperatura y frecuencia cardiaca también son el promedio de las lecturas de los días 7, 14 y 21. Los datos están representados en la tabla VIII.

**TABLA VIII**  
**Efecto de la nitro-L-arginina sobre la temperatura y frecuencia cardiaca**

|                            | <b>Grupo</b>            |                                    |                             |
|----------------------------|-------------------------|------------------------------------|-----------------------------|
|                            | <b>Nitro-L-arginina</b> | <b>Nitro-L-arginina + arginina</b> | <b>D-arginina (control)</b> |
| <b>Temperatura</b>         | 37.1 ± 0.8              | 36.3 ± 0.5                         | 36.6 ± 0.4                  |
| <b>Frecuencia cardiaca</b> | 85.6 ± 0.8*             | 81.8 ± 1.5                         | 82.1 ± 0.9                  |

*Las lecturas son el promedio de las tomadas los días 7, 13 y 19 de la gestación. Por ANOVA simple, \* P < 0.05 al compararse con el control. N = 10 para cada grupo.*

### **Efecto de la nitro-L-arginina sobre la concentración de GMPc en el epitelio uterino**

Con respecto a la concentración de GMP cíclico, hubo diferencias significativas entre los epitelios del sitio y no sitio, así como entre sus estromas. Además, respondieron de diferente manera al efecto del inhibidor. Los resultados están representados en la figura 5.

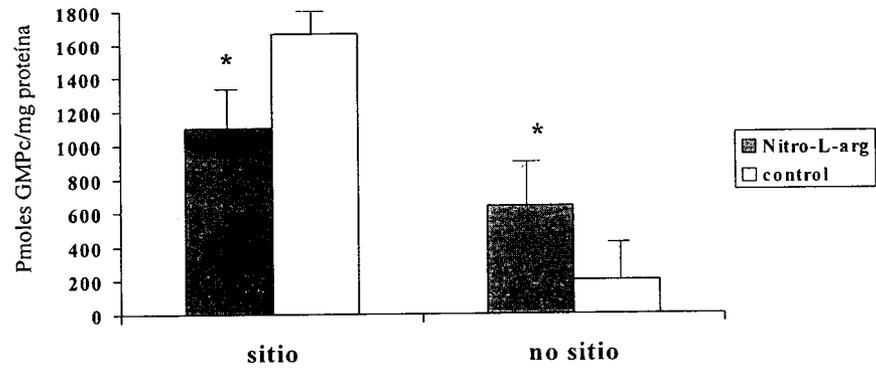
El epitelio del *sitio* de implantación del cuerno uterino tratado con Nitro-L-arginina presentó menor concentración de GMPc/mg de proteína que su control, el cuerno izquierdo tratado con D-arginina. El mismo comportamiento se apreció cuando el parámetro de referencia fue el DNA: El *no sitio* mostró un comportamiento similar en la concentración de GMPc/mg DNA, no obstante cuando se reportó por miligramo de proteína el comportamiento se invirtió, el cuerno tratado presentó una mayor concentración de GMPc. Los resultados están representados en las figuras 5 y 6.

### **Efecto de la nitro-L-arginina sobre la concentración de GMPc en el estroma uterino.**

La concentración de GMPc/mg proteína en el estroma del *sitio* de implantación del cuerno tratado con nitro-L-arginina fue significativamente menor que su control, el cuerno tratado con D-arginina. El mismo comportamiento se observó cuando el GMPc se dividió entre mg de DNA. El *no sitio* presentó un comportamiento similar al *sitio* de implantación. (Figuras 7 y 8)

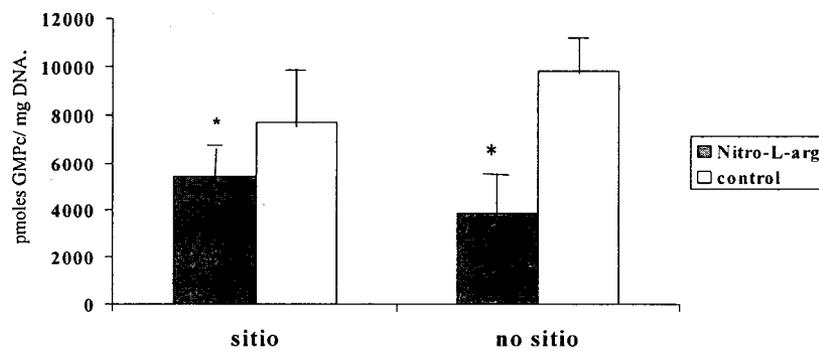
El efecto inhibitorio de la L-nitro-arginina sobre el GMP cíclico en todos los casos fue revertido por la L-arginina.

|                         | Sitio pmoles<br>GMPc/mg prot. | No sitio pmoles<br>GMPc/mg prot |
|-------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| <b>Nitro-L-arginina</b> | 1102.3 ± 150                  | 643.4 ± 140                     |
| <b>Control</b>          | 1664.2 ± 105                  | 201.6 ± 144                     |



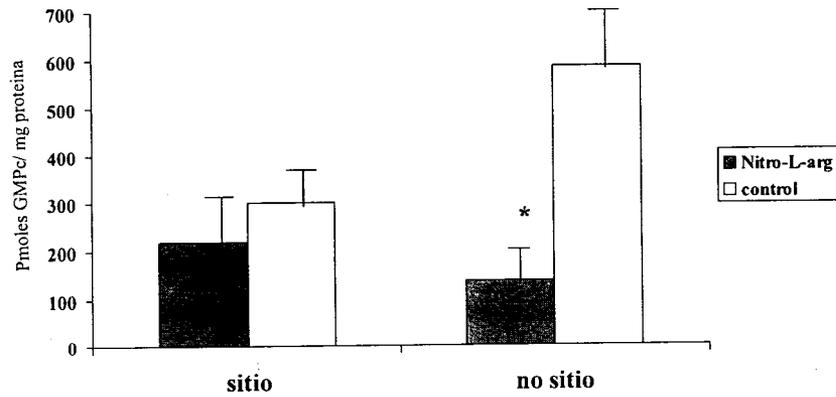
*Figura 5. Efecto de la nitro-L-arginina sobre la concentración de GMPc/mg de prot. en el epitelio uterino \* P< 0.001 entre el tratado(Nitro-L-arg) y el control.*

|             | Sitio<br>pmoles deGMPc/mg DNA | No sitio<br>pmoles GMPc/mgDNA. |
|-------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Nitro-L-arg | 5409.5 ± 950                  | 3880.7 ± 1100                  |
| Control     | 7674 ± 1600                   | 9799 ± 890                     |



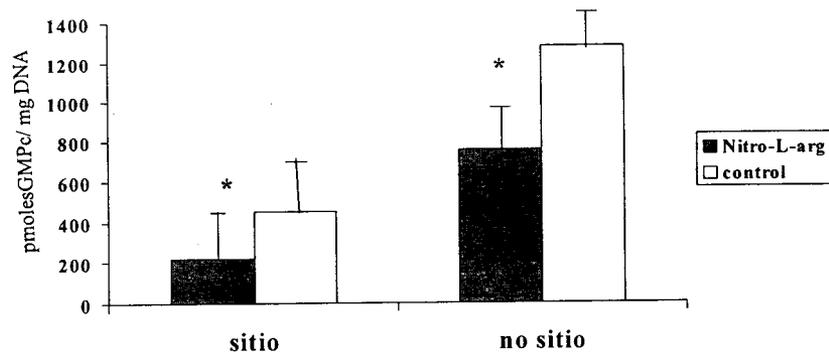
**Figura 6.** Efecto de la nitro-L-arginina sobre la concentración de GMPc/mgDNA en el epitelio uterino. \*  $P = 0.05$ , entre el tratado con nitro-L-arginina y el control.

|                    | Sitio<br>pmoles CMPC/mgprot | No sitio<br>pmolesGMPc/mgprot |
|--------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| <b>Nitro-L-arg</b> | 219.2 ± 98                  | 136.8 ± 89                    |
| <b>Control</b>     | 300.8 ± 105                 | 584.6 ± 130                   |



**Figura 7.** Efecto de la nitro-L-arginina sobre concentraciones de GMPc/mg prot. en el estroma uterino \*  $P < 0.001$  al comparar el tratado nitro-L-arginina con su control.

|                    | Sitio<br>pmolesGMPc/mgDNA | No-sitio<br>pmolesGMPc/mgDNA |
|--------------------|---------------------------|------------------------------|
| <b>Nitro-L-arg</b> | 218.3 ± 170               | 755.5 ± 160                  |
| <b>control</b>     | 448.5 ± 190               | 1283.8 ± 198                 |



**Figura 8.** Efecto de la nitro-L-arginina sobre conc de GMPc/mg DNA en el estroma uterino.  $P < 0.05$  al comparar el tratado (nitro-L-arg) con el control.

## DISCUSIÓN

La vía L-arginina-•NO está presente en todos los tipos celulares, sin embargo, aún hace falta mucho por estudiar acerca de las funciones y mecanismo de acción del •NO generado a partir de esta ruta en los diversos tipos celulares. Se ha establecido que la vaso-relajación del músculo liso dependiente del endotelio es mediada por óxido nítrico a través de la activación que este radical ejerce sobre la guanilato ciclasa. También, se ha demostrado en animales que la administración sistémica de los inhibidores específicos de la óxido nítrico sintasa provoca hipertensión y la de los donadores de este radical puede revertir el efecto (Giuseppe y cols., 1998).

El periodo de gestación en los mamíferos requiere de un estado hemodinámico diferente al de animales no preñados, tanto a nivel sistémico como en el útero, y aunque se sabe que la administración de inhibidores de la síntesis de •NO puede provocar hipertensión y síntomas similares a los de preeclampsia, el mecanismo de acción de esta inhibición, así como el tiempo y espacio de la acción del óxido nítrico no son desconocidos.

En la sangre de rata se ha demostrado que la concentración de GMPc y de •NO aumentan paralelamente a medida que evoluciona la gestación (Harald y cols, 1993; Leiber y Harbon, 1979; Diamond, 1983; Krall y Morin, 1986; Buhimschi y cols, 1995<sup>a,b</sup>). Además, se ha encontrado que la concentración de estos dos compuestos es mayor en el tejido endometrial uterino correspondiente al sitio de implantación que en el tejido adyacente (Vilar-Rojas y cols., 1982 y Novaro, 1996). En este trabajo, encontramos que la administración intraluminal uterina del inhibidor específico de la óxido nítrico sintasa, nitro-L-arginina, en el tiempo previo a la implantación del embrión de la rata, disminuyó en el epitelio y el estroma la concentración de GMP cíclico/mg de DNA. Vale la pena mencionar

que en el epitelio del no sitio, la concentración de GMP cíclico/mg de proteína fue mayor en las ratas tratadas con el inhibidor que sin éste. Este comportamiento puede deberse al parámetro de referencia, las proteínas, ya que estas durante esta etapa están en constante recambio. Nosotros decidimos discutir en base al DNA como parámetro de referencia.

Tanto el epitelio como el estroma del sitio y no sitio de implantación tratados con el inhibidor, tuvieron menor concentración de GMP cíclico que los controles, sin embargo, la permeabilidad vascular, representada por el número de zonas teñidas, y el porcentaje de implantación no se afectaron por el inhibidor. Estos resultados pueden explicarse en base a la bioquímica del  $\bullet$ NO. La reacción entre el NO y el Fe hemo de la guanilato ciclasa es una reacción directa del óxido nítrico, ya que el radical, no sus metabolitos, reacciona directamente con la enzima. La reacción directa del óxido nítrico con la guanilato ciclasa se encuentra favorecida a concentraciones fisiológicas (bajas) de  $\bullet$ NO, que son aquellas producidas por la isoforma endotelial de la óxido nítrico. De esta manera, la disminución de la concentración de GMP-cíclico es una manifestación primaria de la inhibición de la síntesis de NO que aparentemente no logra detener el curso de la implantación. Esto puede deberse por un lado a la poza de los intermediarios de la acción del  $\bullet$ NO, y por el otro, a que otros sistemas de vasorelajación, renina-angiotensina o prostaglandinas, se activan como un mecanismo compensatorio, (Yu, 2002). Novaro y cols (1996), demostraron en útero de la rata, que la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) se elevó de manera importante al día cinco de preñez, con un perfil similar al de las prostaglandinas E<sub>2</sub> y F<sub>2</sub> $\alpha$ , sugiriendo con ello la existencia de un sistema dependiente del  $\bullet$ NO, el cual regula la producción de prostaglandinas. Otros trabajos demostraron que el  $\bullet$ NO puede estimular la actividad de la ciclooxigenasa y de esta manera aumentar la síntesis de prostaglandinas en

diferentes tejidos (Salvemini y cols, 1993). Adicionalmente, se sabe que las prostaglandinas E<sub>2</sub> y F<sub>2α</sub> inducen decidualización endometrial en las ratas (Kennedy, 1977).

Parece ser consecuencia de los efectos indirectos y posteriores del •NO. La supresión de la síntesis de •NO crea con el tiempo un medio hipóxico, el cual ocasiona un desequilibrio en la relación NO/O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (anión superóxido) aumentando el estrés oxidativo y la concentración de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Esta condición activa a la óxido nítrico sintasa inducible, cuyo origen son los macrófagos y estimula los procesos inflamatorios, produciendo ahora gran cantidad de •NO. El •NO en concentraciones suprafisiológicas reacciona con el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> para formar el peroxinitrito (OONO-), o con el Fe (II) de la hemoglobina disminuyendo su capacidad del transporte de oxígeno (Andrew J, 1998). Nosotros encontramos el día 19 de gestación, supresión parcial de la presencia de embriones, y aunque si hubo implantación, las condiciones fueron inhóspitas debido seguramente al daño acumulado.

Aunque por nuestros resultados y los de otros autores, mencionados en el texto, queda de manifiesto que el •NO derivado de la L-arginina es imprescindible para la evolución de la preñez, otros autores han encontrado que la remoción del epitelio y la remodelación del estroma uterinos en el sitio de implantación requieren de la participación de radicales libres, •NO y O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, ya que se trata de una reacción inflamatoria y apoptótica acompañada de la migración de macrófagos (Laloraya, 1996; Biswas, 1998; Hunt, 1995).

La producción de •NO por el útero durante la implantación es un fenómeno finamente regulado por estrógenos a través de su estímulo selectivo sobre las isoformas de la óxido nítrico sintasa, la endotelial y la inducible (Ogando, 2004).

En trabajos futuros, sería interesante demostrar los picos en la concentración y expresión de las isoformas inducible y endotelial de la óxido nítrico sintasa durante la implantación en el útero.

Por los estudios hasta ahora realizados se puede resumir que durante la implantación se activa y estimula tanto a la óxido nítrico sintasa inducible como la constitutiva, puesto que el proceso requiere de un aumento en la fluidez de la membrana y de la migración de macrófagos al útero (Wood, 1990; Hunt, 1995) fenómenos en los cuales tanto los estrógenos como la progesterona juegan un papel importante en la formación y destino del •NO (Laloraya, 1990; Laloraya y cols, 1996). Van Buren y cols (1992) encontraron que el metil-éster nitro-L-arginina, un inhibidor de la síntesis de •NO, antagonizó en el útero de las ovejas el aumento de flujo sanguíneo producido por los estrógenos y suprimió el aumento en la concentración de GMPc provocado por la administración de las mismas hormonas (Magnez, 1992). Por su lado, Sugino y cols, (1996) reportaron que la progesterona contribuyó en el mantenimiento del •NO al inhibir la producción del anión superóxido. Estos resultados y los nuestros sugieren que el •NO y el GMPc juegan un papel muy importante en la regulación del flujo sanguíneo durante el proceso de implantación (Choudhuri y Wood, 1991; Buhimschi, 1995).

Se sabe que las prostaglandinas son indispensables en el aumento de la permeabilidad vascular y que el •NO estimula su síntesis. Durante la implantación nosotros observamos que la permeabilidad vascular no se vio afectada al tratar con el inhibidor de la NOS, la L-nitro-arginina, por lo que creemos que la ruta de acción del •NO en este momento no es a través de la activación que ejerce este radical libre sobre la ciclooxygenasa (Salvemini y cols, 1993), sino más bien sobre la guanilato ciclasa (Ignarro, 1992).

Observamos que la administración del inhibidor de la síntesis de •NO, la n-nitro-L-arginina, durante la etapa de máxima receptividad en la rata, disminuyó el porcentaje de implantación, suprimió el desarrollo embrionario y en las células endometriales disminuyó la concentración de GMPc, por lo que el •NO ejerce sus efectos activando a la guanilato ciclasa.

En conclusión, el bloqueo de la síntesis de •NO en el endometrio el día 5° de embarazo en la rata, disminuye la viabilidad fetal al día 19 y la concentración de GMPc en las células endometriales al día cinco de gestación.

En otro trabajo demostramos que la concentración de GMPc se encuentra más elevada en el sitio de implantación que en el no sitio, y que este aumento está relacionado de manera muy directa con la presencia de edema (Vilar-Rojas y Hicks, 1982).

Estudios realizados a la fecha conducen a pensar que durante la implantación se activa e induce a la óxido nítrico sintasa constitutiva e inducible, puesto que se trata de un proceso en que se requiere tanto de un aumento de fluidez de las membranas (Durán y cols, 1994) como de la migración de los macrófagos hacia el útero, y en donde los estrógenos y la progesterona juegan un papel muy importante en la formación y destino del •NO.

La disminución de la formación de embriones se puede respaldar a través de diversos mecanismos de acción del óxido nítrico, dentro de los cuales la hipótesis más reciente es su efecto sobre las proteínas de matriz extracelular. Recientemente se demostró que la administración intraluminal uterina del inhibidor de •NO, L-NAME en la rata, sobre el día 3 de preñez, disminuyó la expresión del RNAm y la actividad de las metaloproteinasas MMP-2 (gelatinasa A) y MMP-9, y el donador de •NO, nitroprusiato de sodio, revertió los efectos (Zhang X, 2004). La invasión del trofoblasto requiere de una extensiva

remodelación de la matriz extracelular del endometrio y cabe mencionar que la gelatinasa A es un componente esencial para la implantación (Novaro, 2002)

Durante el transcurso de la gestación, nosotros encontramos mayor excreción urinaria de nitritos, proteínas y cetonas en las ratas tratadas con el inhibidor L-nitro arginina que en las controles, sin embargo, esta liberación no disminuyó por el tratamiento simultaneo con L-arginina. Esto indica que la supresión de la síntesis de •NO a nivel local, uterino, y durante las etapas tempranas de la gestación, tiene efectos acumulativos y generalizados a través del tiempo. Probablemente el sustrato L-arginina no tuvo efecto porque las alteraciones a este nivel, renal de la madre, ya no son reversibles y más bien pueden ser debidas a las consecuencias irreparables de la supresión de la síntesis de óxido nítrico. También encontramos en la rata preñada tratada con el inhibidor, una tendencia, sin diferencias significativas, al tener mayor temperatura y frecuencia cardiaca que en las controles. Yu y cols (2002) estudiaron los efectos agudos inmediatos y a largo plazo de la administración sistémica del inhibidor de la óxido nítrico sintasa, N-omega Nitro-L-arginina, encontrando en ambos casos aumentó la filtración glomerular, sin embargo los mecanismos moleculares si fueron diferentes a corto y largo plazo, mientras a corto plazo la respuesta vascular a acetilcolina disminuyó y a noradrenalina aumentó, a largo plazo la respuesta a noradrenalina fue menor y el efecto presor de angiotensina II fue muy acentuado. Por lo anterior, se deduce que después de 19 días de gestación ya no solo esta alterada la ruta del •NO, sino otros mecanismos.

El establecimiento de la preñez involucra cambios dramáticos de la función vascular materna, vía un aumento de la concentración de la óxido nítrico sintasa, y un desajuste conduce a hipertensión proteinuria, edema y preeclampsia (Kenny, 2002). El inicio de estos cambios puede remontarse a la preparación del endometrio para anidar al blastocisto, ya que por un lado el •NO se encuentra

elevado en el sitio de implantación, y por el otro esta demostrado que participa en el desarrollo de la circulación útero-placentaria. Este trabajo pretendió encontrar si la carencia de •NO desde la preimplantación, altera la próxima implantación ó su efecto es más acumulativo y tardío: sobre el desarrollo embrionario y el estado de la madre.

## CONCLUSIÓN

La administración intraluminal del inhibidor específico de la síntesis de •NO, la nitro-L-arginina, suprimió el desarrollo fetal, lo que condujo a la presencia de nódulos de reabsorción el día 19, y en el tejido endometrial preimplantado disminuyó significativamente la concentración de GMP cíclico. No obstante, la permeabilidad vascular, valorada por el número de zonas teñidas, no se vio afectada. La presencia del inhibidor causó en la madre alteraciones en la eliminación de metabolitos por orina. Lo anterior nos conduce a pensar que el •NO de síntesis enzimática local, así como el GMP cíclico generado paralelamente, son indispensables en el sitio de implantación, aunque su carencia se refleja sobre el desarrollo embrionario post-implantación.

## REFERENCIAS

Abrahamsohn P.A. y Zorn T.M.T. Implantation and decidualization in rodents. *J Exp Zool* 1993;266:603-628.

Andrew J. Gow & Jonathan S. Stamler. Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. *Nature* 1998;391:169-173.

Änggard E. Nitric oxide: mediator, murderer and medicine. *Lancet* 1994;343:1199-1206.

Applin D. J. The cell biology of human implantation. *Placenta* 1996;17:269-275.

Baylis C., Mitruka B., Deng A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest* 1992;20:278-281.

Beckman J.S., Beckman W.T., Chen J., Marshall A.P. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1990;87:1620-1624.

Beckman J.S. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* 1996;271(Cell Physiol. 40):C1424-C1437.

Biswas S., Kabir N.S., Palk A. The role of nitric oxide in the process of implantation in rats. *J Reprod Fert* 1998;114:157-161.

Beir M.H., Elger W., Hegele-Hartung C., Mootz U., Beier-Hellwing K. Disociation of corpus luteum, endometrium and blastocyst in human implantation research. *J Reprod Fert* 1991;92:511-523.

Biondi M.L., Dousa T.P., Vanhoutte PM., Romero J.C. Evidences for the existence of endothelium-derived relaxing factor in the renal medulla. *Am J Hypertension* 1990;3:876-878.

Bredt S.D., Snyder H.S. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Ann Rev Biochem* 1994;63:175-195.

<sup>a</sup> Buhimschi I., Yallampalli C.H., Dong Yuan-lin., Garfield E.R. Involvement of a nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in control of human uterine contractility during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:1577-1584.

<sup>b</sup> Buhimschi I., Yallampalli C., Chwalisz C. y Gardfield R.E. Preeclampsia-like conditions induced by nitric oxide inhibition: effects L-arginine, D-arginine and steroid hormones. *Human Reprod.* 1995;10:2723-2730.

Cellek S. y Moncada S. Modulation of noradrenergic responses by nitric oxide from inducible nitric oxide synthase. *Biol Chem* 1997;1(3):204-210.

Chesley L.C. Hypertensive disorders in pregnancy. New Yor: Appeton-Century-Crofts, 1978;225-228.

Choudhuri R.M. y Wood W.G. Determination of the number and distribution of macrophages, lymphocytes and granulocytes in the mouse uterus from mating through implantation. *J Leukocyte Biol* 1991;50:252-262.

Denker W. H. Implantation: a cell biological paradox. *J Exp Zool* 1993;266:541-558.

Diamond J. Lack of correlation between cyclic GMP elevate and relaxation of nonvascular smooth muscle by nitroglycerin nitroprusside, hidroxyamine and sodium azide. *J Pharmacol Exp Ther* 1983;225:422-426.

Doyle M.P. Oxidation of nitrogen oxides by bound dioxigen in hemoproteins. *J Inorgan Biochem* 1981;14:351-358.

Durán Reyes Genoveva, Diaz-Flores Margarita, Sebastian Castillo - Juan José Hiks. Nuclear presence of two lysosomal enzymes in rat implantation sites. *Int J. Fertil* 1994;39(5):299-303.

Enders A.C. Fertilization cleavage and implantation En: *Reproduction and breeding techniques for laboratory animals*. Edit. Hafez Lea & Febiger, Filadelfia USA. 1970;137-156.

Enders A.C. and Schlafke S. Surface coats of the mouse blastocyst and uterus during the preimplantation period. *Anac Rec* 1974;180:31-46.

Enders A.C. Anatomical aspects of implantation. *J Reprod Fertil suppl*, 1976; 25:1-15.

Enders A.C. y Schlafke S. Alteration in uterine luminal surface at the implantation site. *J Cell Biol* 1977;75:70-75.

Fagg B., Martin L., Rogers B. y Clark E Quarmby V. A simple method for removing the luminal epithelium of the mouse uterus for biochemical studies. *J Reprod Fert* 1979;57:335.

Fantone J.C y Ward PA. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocytes-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol* 1982;107:397-417.

Fösterman U., Alheid U., Frölich C. y Mülsch A. Mechanisms of action of lipoxygenase and cytochrome P-450-mono-oxygenase inhibitors in blocking endothelium-dependent vasodilatation. *Br J Pharmacol* 1988;93:569-578.

Franchi A.M., Chaud M., Rettori V., Suburo A., MacCann SM. y Gimeno M. Role of nitric oxide in eicosanoid synthesis and uterine motility in estrogen-treated rat uteri. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:539-543.

Freelisch M. y Noack E.A. Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanilate cyclase. *Eur J Pharmacol* 1987;139:19-30.

Gaglioti S., Scavone C. y Bevilacqua E. Participation of the mouse implanting trophoblast in nitric oxide production during pregnancy. *Biol Reprod* 2000; 62(2):260-268.

Garcia-Cardena G., Fan R., Shah V., Sorrentino R., Cirino G., Papapetropoulos A. y Sessa C.W. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 1998;392(23):821-824.

Gerda G., Zeeman A., Gustaaf A., Dekker P., Herman Van Geijn y Kraayenbrink A. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1992;43:113-122.

Giles K.W. y Myres. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxiribonucleic acid. *Nature* 1965;206:93.

Gil-Recasens M.E., Collado M.L. y Hicks J.J. Nuevos conceptos relacionados con la implantación, características bioquímicas. Ginec Obstet Méx 1978;(266):291-508.

Giuseppe L., Squadrito. y Pryor A.W. Oxidative chemistry of nitric oxide: The roles of superoxide, peroxynitrite and carbon dioxide. Free Rad Biol Med 1998;25(4/5):392-403.

Ghislaine A., Ayres M., Chelly F. y Kilbourn R.G. Effects of N<sup>G</sup>-methyl-L-arginine and aminoguanidine on constitutive and inducible nitric oxide synthase in rat aorta. Biochem Biophys Res Com 1994;198(1):147-154.

Goretski J. y Hollocher T.C. Trapping of nitric oxide produced during denitrification by extracellular hemoglobin. J Biol Chem 1988;263:2316-2323.

Haddad E.K, Duclos A.J y Baines M.G. Early Embryo loss is associated with local production of nitric oxide decidual mononuclear cells. J Exp Med 1995;182:1143-1152.

Halliwell B. y Gutteridge J.M. Free radicals and antioxidant protection: mechanism and significance in toxicology and disease. Human Toxicol 1988;7:7-13.

Halliwell B. y Gutteridge J.M.C. Oxygen is poisonous -an introduction to oxygen toxicity and free radicals. Life Science 1985;1:1-19.

Harald H.H.W., Schmidt L. y Ulrich W. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. Biochem. Biophys Acta. 1993;1178:153-175.

Hicks J.J., Durán-Reyes G. y Díaz-Flores M. Effect of dexamethasone as an inhibitor of implantation and embrion development in rat; lysosomal role. Contraception 1994;50,581-589.

Hwang J., Roby F.K. y Pace L.J., Russell W.S., Hunt S.J. Cellular localization and hormonal regulation of inducible nitric oxide synthase in cyclic mouse uterus. J Leukocyte Biol. 1995;57:27-35.

Hunt J.S. The role of macrophages in the uterine response to pregnancy. Placenta 1995;11:467-475.

Ignarro L.J., Buga G.M, Wood K.S., Byrns R.E. y Chaudhuri G. Endothelium derived factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. Proc Natl Acad Sci USA. 1987;84(24):9265-69.

Ignarro L. J. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide, Annu Rev Pharmacol Toxicol 1990;30:535-560.

Ignarro L.J. Haem-dependent activation of cytosolic guanylate cyclase by nitric oxide; a widespread signal transduction mechanism. J Biochem Soc Trans 1992;20(2):465-469.

Kennedy T.G. Evidence for a role for prostaglandins in the initiation of blastocyst implantation in the rat. Biol Reprod 1977;16:286.

Kenny LC, Baker PN, Kendall DA, Randall MD, Dunn WR. Differential mechanism of endothelium-dependent vasodilator responses in human miometrial small arteries in normal pregnancy and preeclampsia. Clin Sci (Lond) 2002;103(1):67-73.

Kirk P., Conrad G., Harriet K. y Robert K Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats. FASEB J 1993;7:566-571.

Knowles R.G. y Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. Biochem J 1994;298:249-258.

Koppenol H.W. The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxyxynitrite. Free Radical Biol Medicin. 1998;25:385-391.

Krall J.F. y Morin A. The role of cyclic GMP in cells with the properties of smooth muscle cultured from the rat myometrium. J Cell Physiol 1986;129:250-256.

Laloraya M, Kumar G.P y Laloraya M.M. Nitric oxide in pregnancy: Biochem Biophys Res Commun 1989;161(2):762-770.

Laloraya M. Fluidity of the phospholipid bilayer of the endometrium at the time of implantation of the blastocyst a spin label study. Biochem Biophys Res Commun 1990;167(2):561-567.

Laloraya M., Jain S., Monay T., Kopergaonkar S. y Pradeep K.G. Estrogen surge: A regulatory switch for superoxide radical generation at implantation, *Biochem Mol Biol* 1996; 39(5):933-940.

Leiber D. y Harbon S. Modulation of rat myometrium guanylate cyclase activities by sodium nitroprusside and urated fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 1979;89:598-606.

Ljungkvist S. y Nilsson O. Blastocyst endometrial contact and pontamine blue reaction during normal implantation in the rat. *Endocrinology* 1974;60:142-154.

Loke YW, King A. Decidual Natural-Killer-cell interaction with trophoblast: cytotoxicity or cytokine production? *Biochem Soc Trans* 2000;28(2):196-8.

Lowry O.H, Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. Protein Measure with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;265-275.

Magnes R. Endothelium-derived-relaxing factor modulates estradiol-17 $\beta$  increased in uterine blood flow in non pregnant sheep. En: Proceeding of the thirty-ninth annual meeting of the Society for Gynecologic Investigation, San Antonio, Texas March 18-21,1992

Martel D. y Psychoyos A. Different responses of rat endometrial epithelium and estroma to induction of oestradiol binding sites by progesterone. *J Reprod Fertil* 1989;64:387-389.

Melkova Z. Bcl-2 prevents nitric oxide-mediated apoptosis and poly (ADP-ribose) polymerase cleavage. *FEBS Letter* 1997;403:273-278.

Meseguer M, Pellicer A, Simon C. MUC1 and endometrial receptivity. *Mol Human Reprod* 1998;4(12);1089-98.

Molnar M., Suto T. y Hertelendy F. Prolonged blockade of nitric oxide synthesis in gravid rats produced sustained hypertension, proteinuria, trombocytopenia and intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170:1458-1466.

<sup>a</sup>Moncada S., Palmer R.M. y Higgs E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-142.

<sup>b</sup>Moncada S.R., Rees D.D., Schulz R. y Palmer J.M.R. Development and mechanisms of a specific supersensitivity to nitrovasodilatadors after inhibition of vascular nitric oxide synthesis *in vivo*. Proc Natl Acad Sci 1991;88:2166-2170.

Moncada S., Higgs EA. y López-Jaramillo P. The L-arginine: nitric oxide pathway. J Cardiovasc Pharmacol 1991;17(suppl 3):51-59.

Morgan G. The effect of nitric oxide on apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes. Free Rad Biol Med 1998;25:748-752.

Myatt L., Brockman E.D., W.L. y Pollock S.J. Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the human placenta. Placenta 1993;14:487-495.

Nardo LG, Nikas G, Makrigianakis A. Molecules in blastocyst implantation. Role of matrix metalloproteinases, cytokines and growth factors. J Reprod Med 2003;48(3):137-47.

Nathan C. Nitric Oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J. 1992;6:3051-3064.

Nathan L., Cuevas J. y Chaudhuri G. The role of nitric oxide in the altered vascular reactivity of pregnancy in the rat. Br J Pharmacol 1995;114:955-960.

Nathan C.F. y Xie W.Q. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. Cell 1994;78:915-918.

Neri I., Di Renzo G., Caserta G., Gallinelli A. y Facchinetti F. Impact of the L-arginine/nitric oxide system in pregnancy. Obstet Ginecol. 1995;50(12):851-858.

Norman J. Nitric Oxide and the myometrium Pharmacol Ther 1996;70(2):91-100.

Novaro V. y Rettori V. Interaction between uterine PGE and PF<sub>2α</sub> production and the nitridergic system during embryonic implantation in the rat. Prostaglandins 1996;51:363-376.

Novaro V, Pustovrh C, Colman-Lerner A, Radisky D, Lo Nostro F, Paz Jawerbaum A, Gonzales E. Nitric oxide gelatinase A (matrix metalloproteinase 2) during rat embryo implantation. Fertil Steril 2002;78(6):1278-87.

Ogando D, Cella M, Ribeiro ML, Weissmann C, Aisemberg J, Franchi A. IL-10 inhibits nitric oxide synthesis in murine uterus. *Neuroimmunomodulation* 2004;11(2):127-32.

<sup>a</sup>Palmer R.M.J., Ferrige AG. y Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature (London)* 1987<sup>a</sup>;327:524-526.

<sup>b</sup>Palmer R.M. y Moncada S. Nitric oxide released accounts for the biological activity of endothelium-derived-relaxing factor. *Nature* 1987<sup>b</sup>;327(6122):524-526.

<sup>a</sup>Palmer R.M., Ashton D.S. y Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine . *Nature (London)* 1988<sup>a</sup>;333:664-666.

<sup>b</sup>Palmer R.M.J., Rees D.D., Ashton D.S. y Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 1988<sup>b</sup>;153:1251-1256.

Pilka R, Kudela M, Prochazka M. Matriz metalloproteinases, embryo implantation and tumor invasion. *Ceska Gynekol* 2003;68(3):179-85.

Porcu G, Dechaud H, Hedon B. Uterine receptivity and embryo implantation. The use of transvaginal scan and Doppler study in its evaluation in ART. *Gynecol Obstet Fertil* 2003;31(9):697-705.

Psychoyos A. Hormonal control of ovoimplantation *Vit.Horm.* 1973;31:201-256.

Psychoyos A. Hormonal control of uterine receptivity for nidation. *J Reprod Fert Suppl* 17, 1976.

Psychoyos A. Uterine receptivity for nidation *Ann N.Y. Acad Sci* 1986;476:36-42.

Radommsky M.W., Palmer R.M. y Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987;1057-1058.

Ress D.D., Palmer R.M.J. y Schulz R. Characterization of tree inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 1990;101:746-752.

Richard G., Knowles R. y Moncada S. Nitric Oxide Synthase in mammals. *Biochem J* 1994;298:249-258.

Rubbo H.R., Radi M. y Trujillo. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipoperoxidation. *J Biol Chem* 1994;269:26066-26075.

Salvemini D., Misko T.P., Masferrer J.L., Seibert K., Currie MG. y Needleman P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90:7240-7244.

Salamonsen LA. Role of proteases in implantation. *Rev Reprod* 1999;4(1):11-22.

Shang X, Wang HM, Lin HY, Liu GY, Li QL, Zhu C. Regulation of matrix metalloproteinases (MMPS) and their inhibitors (TIMPS) during mouse peri-implantation: role of nitric oxide.

Schmidt H.H. y Lohmann S.M. The Nitric Oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochem Biophys Acta* 1993;1178:153-175.

Sessa W. C., Harrison JK., Barber CM., Zeng D., Durieux ME., D'Angelo DD. *J. Biol. Chem* 1992;267:15274-15276.

Shih IM. The role of (M<sub>1</sub>-CAM) in biology and Pathology. *J Pathol* 1999;189(1):4-11.

Sladek M.S., Magness R.R. y Conrad P.K. Nitric oxide and pregnancy. *Am J Physiol* 1997;272(41):R441-R463.

Stamler S.J., Singel J.D. y Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 1992;258(18):1898-1902.

Stephen M., Sladek R., Magness R., Kirk P. y Conrad K. Nitric oxide and pregnancy. *A. P. Soc.* 1997,R441-R463.

Sugino N., Shimamura K., Tamura H., Ono M., Nakamura Y., Ogino K. y Kato H. Progesterone inhibits superoxide radical production by mononuclear phagocytes in pseudopregnant rats. *Endocrinology* 1996;137:749-754.

Steinhorn H.R., Millard L.S., Morin C.F. Persistent pulmonary hypertension of the newborn (Role of nitric oxide and endothelin in pathophysiology and treatment). *Clin Perinatol* 1995;22(2):405-428.

Szabo C. Endogenously produced peroxynitrite induces the oxidation of mitochondrial and nuclear protein in immunoestimated macrophages. *FEBS Letters* 1997;409:147-150.

Thaler CD, Epel D. Nitric oxide in oocyte maturation, ovulation, fertilization, cleavage and implantation: *Curr Pharm Des* 2003;9(5):399-409.

Van Buren. Estrogen-induced uterine vasodilatation is antagonized by L-nitroarginine methyl ester, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Am J Obstet Gynecol* 1992;167:828-33.

Vilar-Rojas C., Hicks J.J. Cyclic AMP and Cyclic GMP in the implantation site of the rat. *Int. J. Fertil* 1982;27:56-59.

Weiner C.P., Knowles R.G. y Moncada S. induction of nitric oxide synthase early in pregnancy. *Am. J. Obstet Gynecol* 1994, 171:838-43.

Wink J. y Mitchel L. Chemical biology of nitric oxide: insight into regulatory, cytotoxic and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Rad Biol Med* 1998;25(4/5):434-456.

Wood M. Influence of oestrogen and progesterone on macrofage distribution in the mouse uterus. *J Endocrinol* 1990;126:417-424.

Yu ZY, Lumbers ER, Simoneta G. The cardiovascular and renal effects of acute and chronic inhibition of nitric oxide production in fetal sheep. *Exp Physiol* 2002;87(3):343-51.

Zhang X, Wanng HM, Lin HY, Liu GY, Li QL, Zhu C. Regulation of matrix metalloproteinases (MMPS) and their inhibitors (TIMPS) during mouse peri-implantation: role of ntric oxide. *Placenta* 2004;25(4):243-52.)

## DISCUSIÓN

La vía L-arginina-•NO está presente en todos los tipos celulares, sin embargo, aún hace falta mucho por estudiar acerca de las funciones y mecanismo de acción del •NO generado a partir de esta ruta en los diversos tipos celulares. Se ha establecido que la vaso-relajación del músculo liso dependiente del endotelio es mediada por óxido nítrico a través de la activación que este radical ejerce sobre la guanilato ciclasa. También, se ha demostrado en animales que la administración sistémica de los inhibidores específicos de la óxido nítrico sintasa provoca hipertensión y la de los donadores de este radical puede revertir el efecto (Giuseppe y cols., 1998).

El periodo de gestación en los mamíferos requiere de un estado hemodinámico diferente al de animales no preñados, tanto a nivel sistémico como en el útero, y aunque se sabe que la administración de inhibidores de la síntesis de •NO puede provocar hipertensión y síntomas similares a los de preeclampsia, el mecanismo de acción de esta inhibición, así como el tiempo y espacio de la acción del óxido nítrico no son desconocidos.

En la sangre de rata se ha demostrado que la concentración de GMPc y de •NO aumentan paralelamente a medida que evoluciona la gestación (Harald y cols, 1993; Leiber y Harbon, 1979; Diamond, 1983; Krall y Morin, 1986; Buhimschi y cols, 1995<sup>a,b</sup>). Además, se ha encontrado que la concentración de estos dos compuestos es mayor en el tejido endometrial uterino correspondiente al sitio de implantación que en el tejido adyacente (Vilar-Rojas y cols., 1982 y Novaro, 1996). En este trabajo, encontramos que la administración intraluminal uterina del inhibidor específico de la óxido nítrico sintasa, nitro-L-arginina, en el tiempo previo a la implantación del embrión de la rata, disminuyó en el epitelio y el estroma la concentración de GMP cíclico/mg de DNA. Vale la pena mencionar

que en el epitelio del no sitio, la concentración de GMP cíclico/mg de proteína fue mayor en las ratas tratadas con el inhibidor que sin éste. Este comportamiento puede deberse al parámetro de referencia, las proteínas, ya que estas durante esta etapa están en constante recambio. Nosotros decidimos discutir en base al DNA como parámetro de referencia.

Tanto el epitelio como el estroma del sitio y no sitio de implantación tratados con el inhibidor, tuvieron menor concentración de GMP cíclico que los controles, sin embargo, la permeabilidad vascular, representada por el número de zonas teñidas, y el porcentaje de implantación no se afectaron por el inhibidor. Estos resultados pueden explicarse en base a la bioquímica del •NO. La reacción entre el NO y el Fe hemo de la guanilato ciclasa es una reacción directa del óxido nítrico, ya que el radical, no sus metabolitos, reacciona directamente con la enzima. La reacción directa del óxido nítrico con la guanilato ciclasa se encuentra favorecida a concentraciones fisiológicas (bajas) de •NO, que son aquellas producidas por la isoforma endotelial de la óxido nítrico. De esta manera, la disminución de la concentración de GMP-cíclico es una manifestación primaria de la inhibición de la síntesis de NO que aparentemente no logra detener el curso de la implantación. Esto puede deberse por un lado a la poza de los intermediarios de la acción del •NO, y por el otro, a que otros sistemas de vasorelajación, renina-angiotensina o prostaglandinas, se activan como un mecanismo compensatorio, (Yu, 2002). Novaro y cols (1996), demostraron en útero de la rata, que la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) se elevó de manera importante al día cinco de preñez, con un perfil similar al de las prostaglandinas E<sub>2</sub> y F<sub>2α</sub>, sugiriendo con ello la existencia de un sistema dependiente del •NO, el cual regula la producción de prostaglandinas. Otros trabajos demostraron que el •NO puede estimular la actividad de la ciclooxigenasa y de esta manera aumentar la síntesis de prostaglandinas en

diferentes tejidos (Salvemini y cols, 1993). Adicionalmente, se sabe que las prostaglandinas  $E_2$  y  $F_{2\alpha}$  inducen decidualización endometrial en las ratas (Kennedy, 1977).

Parece ser consecuencia de los efectos indirectos y posteriores del  $\bullet\text{NO}$ . La supresión de la síntesis de  $\bullet\text{NO}$  crea con el tiempo un medio hipóxico, el cual ocasiona un desequilibrio en la relación  $\text{NO}/\text{O}_2^{\bullet-}$  (anión superóxido) aumentando el estrés oxidativo y la concentración de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Esta condición activa a la óxido nítrico sintasa inducible, cuyo origen son los macrófagos y estimula los procesos inflamatorios, produciendo ahora gran cantidad de  $\bullet\text{NO}$ . El  $\bullet\text{NO}$  en concentraciones suprafisiológicas reacciona con el  $\text{O}_2^{\bullet-}$  para formar el peroxinitrito ( $\text{OONO-}$ ), o con el Fe (II) de la hemoglobina disminuyendo su capacidad del transporte de oxígeno (Andrew J, 1998). Nosotros encontramos el día 19 de gestación, supresión parcial de la presencia de embriones, y aunque si hubo implantación, las condiciones fueron inhóspitas debido seguramente al daño acumulado.

Aunque por nuestros resultados y los de otros autores, mencionados en el texto, queda de manifiesto que el  $\bullet\text{NO}$  derivado de la L-arginina es imprescindible para la evolución de la preñez, otros autores han encontrado que la remoción del epitelio y la remodelación del estroma uterinos en el sitio de implantación requieren de la participación de radicales libres,  $\bullet\text{NO}$  y  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , ya que se trata de una reacción inflamatoria y apoptótica acompañada de la migración de macrófagos (Laloraya, 1996; Biswas, 1998; Hunt, 1995).

La producción de  $\bullet\text{NO}$  por el útero durante la implantación es un fenómeno finamente regulado por estrógenos a través de su estímulo selectivo sobre las isoformas de la óxido nítrico sintasa, la endotelial y la inducible (Ogando, 2004).

En trabajos futuros, sería interesante demostrar los picos en la concentración y expresión de las isoformas inducible y endotelial de la óxido nítrico sintasa durante la implantación en el útero.

Por los estudios hasta ahora realizados se puede resumir que durante la implantación se activa y estimula tanto a la óxido nítrico sintasa inducible como la constitutiva, puesto que el proceso requiere de un aumento en la fluidez de la membrana y de la migración de macrófagos al útero (Wood, 1990; Hunt, 1995) fenómenos en los cuales tanto los estrógenos como la progesterona juegan un papel importante en la formación y destino del •NO (Laloraya, 1990; Laloraya y cols, 1996). Van Buren y cols (1992) encontraron que el metil-éster nitro-L-arginina, un inhibidor de la síntesis de •NO, antagonizó en el útero de las ovejas el aumento de flujo sanguíneo producido por los estrógenos y suprimió el aumento en la concentración de GMPc provocado por la administración de las mismas hormonas (Magnes, 1992). Por su lado, Sugino y cols, (1996) reportaron que la progesterona contribuyó en el mantenimiento del •NO al inhibir la producción del anión superóxido. Estos resultados y los nuestros sugieren que el •NO y el GMPc juegan un papel muy importante en la regulación del flujo sanguíneo durante el proceso de implantación (Choudhuri y Wood, 1991; Buhimschi, 1995).

Se sabe que las prostaglandinas son indispensables en el aumento de la permeabilidad vascular y que el •NO estimula su síntesis. Durante la implantación nosotros observamos que la permeabilidad vascular no se vio afectada al tratar con el inhibidor de la NOS, la L-nitro-arginina, por lo que creemos que la ruta de acción del •NO en este momento no es a través de la activación que ejerce este radical libre sobre la ciclooxigenasa (Salvemini y cols, 1993), sino más bien sobre la guanilato ciclasa (Ignarro, 1992).

Observamos que la administración del inhibidor de la síntesis de •NO, la n-nitro-L-arginina, durante la etapa de máxima receptividad en la rata, disminuyó el porcentaje de implantación, suprimió el desarrollo embrionario y en las células endometriales disminuyó la concentración de GMPc, por lo que el •NO ejerce sus efectos activando a la guanilato ciclasa.

En conclusión, el bloqueo de la síntesis de •NO en el endometrio el día 5° de embarazo en la rata, disminuye la viabilidad fetal al día 19 y la concentración de GMPc en las células endometriales al día cinco de gestación.

En otro trabajo demostramos que la concentración de GMPc se encuentra más elevada en el sitio de implantación que en el no sitio, y que este aumento está relacionado de manera muy directa con la presencia de edema (Vilar-Rojas y Hicks, 1982).

Estudios realizados a la fecha conducen a pensar que durante la implantación se activa e induce a la óxido nítrico sintasa constitutiva e inducible, puesto que se trata de un proceso en que se requiere tanto de un aumento de fluidez de las membranas (Durán y cols, 1994) como de la migración de los macrófagos hacia el útero, y en donde los estrógenos y la progesterona juegan un papel muy importante en la formación y destino del •NO.

La disminución de la formación de embriones se puede respaldar a través de diversos mecanismos de acción del óxido nítrico, dentro de los cuales la hipótesis mas reciente es su efecto sobre las proteínas de matriz extracelular. Recientemente se demostró que la administración intraluminal uterina del inhibidor de •NO, L-NAME en la rata, sobre el día 3 de preñez, disminuyó la expresión del RNAm y la actividad de las metaloproteinasas MMP-2 (gelatinasa A) y MMP-9, y el donador de •NO, nitroprusiato de sodio, revertió los efectos (Zhang X, 2004). La invasión del trofoblasto requiere de una extensiva

remodelación de la matriz extracelular del endometrio y cabe mencionar que la gelatinasa A es un componente esencial para la implantación (Novaro, 2002)

Durante el transcurso de la gestación, nosotros encontramos mayor excreción urinaria de nitritos, proteínas y cetonas en las ratas tratadas con el inhibidor L-nitro arginina que en las controles, sin embargo, esta liberación no disminuyó por el tratamiento simultaneo con L-arginina. Esto indica que la supresión de la síntesis de •NO a nivel local, uterino, y durante las etapas tempranas de la gestación, tiene efectos acumulativos y generalizados a través del tiempo. Probablemente el sustrato L-arginina no tuvo efecto porque las alteraciones a este nivel, renal de la madre, ya no son reversibles y más bien pueden ser debidas a las consecuencias irreparables de la supresión de la síntesis de óxido nítrico. También encontramos en la rata preñada tratada con el inhibidor, una tendencia, sin diferencias significativas, al tener mayor temperatura y frecuencia cardiaca que en las controles. Yu y cols (2002) estudiaron los efectos agudos inmediatos y a largo plazo de la administración sistémica del inhibidor de la óxido nítrico sintasa, N-omega Nitro-L-arginina, encontrando en ambos casos aumentó la filtración glomerular, sin embargo los mecanismos moleculares si fueron diferentes a corto y largo plazo, mientras a corto plazo la respuesta vascular a acetilcolina disminuyó y a noradrenalina aumentó, a largo plazo la respuesta a noradrenalina fue menor y el efecto presor de angiotensina II fue muy acentuado. Por lo anterior, se deduce que después de 19 días de gestación ya no solo esta alterada la ruta del •NO, sino otros mecanismos.

El establecimiento de la preñez involucra cambios dramáticos de la función vascular materna, vía un aumento de la concentración de la óxido nítrico sintasa, y un desajuste conduce a hipertensión proteinuria, edema y preeclampsia (Kenny, 2002). El inicio de estos cambios puede remontarse a la preparación del endometrio para anidar al blastocisto, ya que por un lado el •NO se encuentra

elevado en el sitio de implantación, y por el otro esta demostrado que participa en el desarrollo de la circulación útero-placentaria. Este trabajo pretendió encontrar si la carencia de •NO desde la preimplantación, altera la próxima implantación ó su efecto es más acumulativo y tardío: sobre el desarrollo embrionario y el estado de la madre.

## CONCLUSIÓN

La administración intraluminal del inhibidor específico de la síntesis de •NO, la nitro-L-arginina, suprimió el desarrollo fetal, lo que condujo a la presencia de nódulos de reabsorción el día 19, y en el tejido endometrial preimplantado disminuyó significativamente la concentración de GMP cíclico. No obstante, la permeabilidad vascular, valorada por el número de zonas teñidas, no se vio afectada. La presencia del inhibidor causó en la madre alteraciones en la eliminación de metabolitos por orina. Lo anterior nos conduce a pensar que el •NO de síntesis enzimática local, así como el GMP cíclico generado paralelamente, son indispensables en el sitio de implantación, aunque su carencia se refleja sobre el desarrollo embrionario post-implantación.

## REFERENCIAS

- Abrahamsohn P.A. y Zorn T.M.T. Implantation and decidualization in rodents. *J Exp Zool* 1993;266:603-628.
- Andrew J. Gow & Jonathan S. Stamler. Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. *Nature* 1998;391:169-173.
- Änggard E. Nitric oxide: mediator, murderer and medicine. *Lancet* 1994;343:1199-1206.
- Applin D. J. The cell biology of human implantation. *Placenta* 1996;17:269-275.
- Baylis C., Mitruka B., Deng A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest* 1992;20:278-281.
- Beckman J.S., Beckman W.T., Chen J., Marshall A.P. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1990;87:1620-1624.
- Beckman J.S. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* 1996;271(Cell Physiol. 40):C1424-C11437.
- Biswas S., Kabir N.S., Palk A. The role of nitric oxide in the process of implantation in rats. *J Reprod Fert* 1998;114:157-161.
- Beir M.H., Elger W., Hegele-Hartung C., Mootz U., Beier-Hellwing K. Disociation of corpus luteum, endometrium and blastocyst in human implantation research. *J Reprod Fert* 1991;92:511-523.
- Biondi M.L., Dousa T.P., Vanhoutte PM., Romero J.C. Evidences for the existence of endothelium-derived relaxing factor in the renal medulla. *Am J Hypertension* 1990;3:876-878.
- Bredt S.D., Snyder H.S. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Ann Rev Biochem* 1994;63:175-195.

<sup>a</sup> Buhimschi I., Yallampalli C.H., Dong Yuan-lin., Garfield E.R. Involvement of a nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in control of human uterine contractility during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:1577-1584.

<sup>b</sup> Buhimschi I., Yallampalli C., Chwalisz C. y Gardfield R.E. Preeclampsia-like conditions induced by nitric oxide inhibition: effects L-arginine, D-arginine and steroid hormones. *Human Reprod.* 1995;10:2723-2730.

Cellek S. y Moncada S. Modulation of noradrenergic responses by nitric oxide from inducible nitric oxide synthase. *Biol Chem* 1997;1(3):204-210.

Chesley L.C. Hypertensive disorders in pregnancy. New Yor: Appeton-Century-Crofts, 1978;225-228.

Choudhuri R.M. y Wood W.G. Determination of the number and distribution of macrophages, lymphocytes and granulocytes in the mouse uterus from mating through implantation. *J Leukocyte Biol* 1991;50:252-262.

Denker W. H. Implantation: a cell biological paradox. *J Exp Zool* 1993;266:541-558.

Diamond J. Lack of correlation between cyclic GMP elevate and relaxation of nonvascular smooth muscle by nitroglycerin nitroprusside, hidroxyamine and sodium azide. *J Pharmacol Exp Ther* 1983;225:422-426.

Doyle M.P. Oxidation of nitrogen oxides by bound dioxigen in hemoproteins. *J Inorgan Biochem* 1981;14:351-358.

Durán Reyes Genoveva, Diaz-Flores Margarita, Sebastian Castillo - Juan José Hiks. Nuclear presence of two lysosomal enzymes in rat implantation sites. *Int J. Fertil* 1994;39(5):299-303.

Enders A.C. Fertilization cleavage and implantation En: *Reproduction and breeding techniques for laboratory animals*. Edit. Hafez Lea & Febiger, Filadelfia USA. 1970;137-156.

Enders A.C. and Schlafke S. Surface coats of the mouse blastocyst and uterus during the preimplantation period. *Anac Rec* 1974;180:31-46.

Enders A.C. Anatomical aspects of implantation. *J Reprod Fertil suppl*, 1976; 25:1-15.

Enders A.C. y Schlafke S. Alteration in uterine luminal surface at the implantation site. *J Cell Biol* 1977;75:70-75.

Fagg B., Martin L., Rogers B. y Clark E Quarmby V. A simple method for removing the luminal epithelium of the mouse uterus for biochemical studies. *J Reprod Fert* 1979;57:335.

Fantone J.C y Ward PA. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocytes-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol* 1982;107:397-417.  
Fösterman U., Alheid U., Frölich C. y Mülsch A. Mechanisms of action of lipoyxygenase and cytochrome P-450-mono-oxygenase inhibitors in blocking endothelium-dependent vasodilatation. *Br J Pharmacol* 1988;93:569-578.

Franchi A.M., Chaud M., Rettori V., Suburo A., MacCann SM. y Gimeno M. Role of nitric oxide in eicosanoid synthesis and uterine motility in estrogen-treated rat uteri. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:539-543.

Freelisch M. y Noack E.A. Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanilate cyclase. *Eur J Pharmacol* 1987;139:19-30.

Gagiotti S., Scavone C. y Bevilacqua E. Participation of the mouse implanting trophoblast in nitric oxide production during pregnancy. *Biol Reprod* 2000; 62(2):260-268.

Garcia-Cardena G., Fan R., Shah V., Sorrentino R., Cirino G., Papapetropoulos A. y Sessa C.W. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 1998;392(23):821-824.

Gerda G., Zeeman A., Gustaaf A., Dekker P., Herman Van Geijn y Kraayenbrink A. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1992;43:113-122.

Giles K.W. y Myres. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxiribonucleic acid. *Nature* 1965;206:93.

Gil-Recasens M.E., Collado M.L. y Hicks J.J. Nuevos conceptos relacionados con la implantación, características bioquímicas. *Ginec Obstet Méx* 1978;(266):291-508.

Giuseppe L., Squadrito. y Pryor A.W. Oxidative chemistry of nitric oxide: The roles of superoxide, peroxyxynitrite and carbon dioxide. *Free Rad Biol Med* 1998;25(4/5):392-403.

Ghislaine A., Ayres M., Chelly F. y Kilbourn R.G. Effects of N<sup>G</sup>-methyl-L-arginine and aminoguanidine on constitutive and inducible nitric oxide synthase in rat aorta. *Biochem Biophys Res Com* 1994;198(1):147-154.

Goretski J. y Hollocher T.C. Trapping of nitric oxide produced during denitrification by extracellular hemoglobin. *J Biol Chem* 1988;263:2316-2323.

Haddad E.K, Duclos A.J y Baines M.G. Early Embryo loss is associated with local production of nitric oxide decidual mononuclear cells. *J Exp Med* 1995;182:1143-1152.

Halliwell B. y Gutteridge J.M. Free radicals and antioxidant protection: mechanism and significance in toxicology and disease. *Human Toxicol* 1988;7:7-13.

Halliwell B. y Gutteridge J.M.C. Oxygen is poisonous -an introduction to oxygen toxicity and free radicals. *Life Science* 1985;1:1-19.

Harald H.H.W., Schmidt L. y Ulrich W. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochem. Biophys Acta.* 1993;1178:153-175.

Hicks J.J., Durán-Reyes G. y Díaz-Flores M. Effect of dexamethasone as an inhibitor of implantation and embryo development in rat; lysosomal role. *Contraception* 1994;50,581-589.

Hwang J., Roby F.K. y Pace L.J., Russell W.S., Hunt S.J. Cellular localization and hormonal regulation of inducible nitric oxide synthase in cyclic mouse uterus. *J Leukocyte Biol.* 1995;57:27-35.

Hunt J.S. The role of macrophages in the uterine response to pregnancy. *Placenta* 1995;11:467-475.

Ignarro L.J., Buga G.M, Wood K.S., Byrns R.E. y Chaudhuri G. Endothelium derived factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84(24):9265-69.

Ignarro L J. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1990;30:535-560.

Ignarro L.J. Haem-dependent activation of cytosolic guanylate cyclase by nitric oxide; a widespread signal transduction mechanism. *J Biochem Soc Trans* 1992;20(2):465-469.

Kennedy T.G. Evidence for a role for prostaglandins in the initiation of blastocyst implantation in the rat. *Biol Reprod* 1977;16:286.

Kenny LC, Baker PN, Kendall DA, Randall MD, Dunn WR. Differential mechanism of endothelium-dependent vasodilator responses in human miometrial small arteries in normal pregnancy and preeclampsia. *Clin Sci (Lond)* 2002;103(1):67-73.

Kirk P., Conrad G., Harriet K. y Robert K Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats. *FASEB J* 1993;7:566-571.

Knowles R.G. y Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994;298:249-258.

Koppenol H.W. The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite. *Free Radical Biol Medicin*. 1998;25:385-391.

Krall J.F. y Morin A. The role of cyclic GMP in cells with the properties of smooth muscle cultured from the rat myometrium. *J Cell Physiol* 1986;129:250-256.

Laloraya M, Kumar G.P y Laloraya M.M. Nitric oxide in pregnancy: *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161(2):762-770.

Laloraya M. Fluidity of the phospholipid bilayer of the endometrium at the time of implantation of the blastocyst a spin label study. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;167(2):561-567.

Laloraya M., Jain S., Monay T., Kopergaonkar S. y Pradeep K.G. Estrogen surge: A regulatory switch for superoxide radical generation at implantation, *Biochem Mol Biol* 1996; 39(5):933-940.

Leiber D. y Harbon S. Modulation of rat myometrium guanylate cyclase activities by sodium nitroprusside and urated fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 1979;89:598-606.

Ljungkvist S. y Nilsson O. Blastocyst endometrial contact and pontamine blue reaction during normal implantation in the rat. *Endocrinology* 1974;60:142-154.

Loke YW, King A. Decidual Natural-Killer-cell interaction with trophoblast: cytotoxicity or cytokine production? *Biochem Soc Trans* 2000;28(2):196-8.

Lowry O.H, Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. Protein Measure with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;265-275.

Magnes R. Endothelium-derived-relaxing factor modulates estradiol-17 $\beta$  increased in uterine blood flow in non pregnant sheep. En: Proceeding of the thirty-ninth annual meeting of the Society for Gynecologic Investigation, San Antonio, Texas March 18-21,1992

Martel D. y Psychoyos A. Different responses of rat endometrial epithelium and estroma to induction of oestradiol binding sites by progesterone. *J Reprod Fertil* 1989;64:387-389.

Melkova Z. Bcl-2 prevents nitric oxide-mediated apoptosis and poly (ADP-ribose) polymerase cleavage. *FEBS Letter* 1997;403:273-278.

Meseguer M, Pellicer A, Simon C. MUC1 and endometrial receptivity. *Mol Human Reprod* 1998;4(12);1089-98.

Molnar M., Suto T. y Hertelendy F. Prolonged blockade of nitric oxide synthesis in gravid rats produced sustained hypertension, proteinuria, trombocytopenia and intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170:1458-1466.

<sup>a</sup>Moncada S., Palmer R.M. y Higgs E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-142.

<sup>b</sup>Moncada S.R., Rees D.D., Schulz R. y Palmer J.M.R. Development and mechanisms of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis *in vivo*. Proc Natl Acad Sci 1991;88:2166-2170.

Moncada S., Higgs EA. y López-Jaramillo P. The L-arginine: nitric oxide pathway. J Cardiovasc Pharmacol 1991;17(suppl 3):51-59.

Morgan G. The effect of nitric oxide on apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes. Free Rad Biol Med 1998;25:748-752.

Myatt L., Brockman E.D., W.L. y Pollock S.J. Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the human placenta. Placenta 1993;14:487-495.

Nardo LG, Nikas G, Makrigianakis A. Molecules in blastocyst implantation. Role of matrix metalloproteinases, cytokines and growth factors. J Reprod Med 2003;48(3):137-47.

Nathan C. Nitric Oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J. 1992;6:3051-3064.

Nathan L., Cuevas J. y Chaudhuri G. The role of nitric oxide in the altered vascular reactivity of pregnancy in the rat. Br J Pharmacol 1995;114:955-960.

Nathan C.F. y Xie W.Q. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. Cell 1994;78:915-918.

Neri I., Di Renzo G., Caserta G., Gallinelli A. y Facchinetti F. Impact of the L-arginine/nitric oxide system in pregnancy. Obstet Gynecol. 1995;50(12):851-858.

Norman J. Nitric Oxide and the myometrium Pharmacol Ther 1996;70(2):91-100.

Novaro V. y Rettori V. Interaction between uterine PGE and PF<sub>2α</sub> production and the nitridergic system during embryonic implantation in the rat. Prostaglandins 1996;51:363-376.

Novaro V, Pustovrh C, Colman-Lerner A, Radisky D, Lo Nostro F, Paz Jawerbaum A, Gonzales E. Nitric oxide gelatinase A (matrix metalloproteinase 2) during rat embryo implantation. Fertil Steril 2002;78(6):1278-87.

Ogando D, Cella M, Ribeiro ML, Weissmann C, Aisemberg J, Franchi A. IL-10 inhibits nitric oxide synthesis in murine uterus. *Neuroimmunomodulation* 2004;11(2):127-32.

<sup>a</sup>Palmer R.M.J., Ferrige AG. y Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature (London)* 1987<sup>a</sup>;327:524-526.

<sup>b</sup>Palmer R.M. y Moncada S. Nitric oxide released accounts for the biological activity of endothelium-derived-relaxing factor. *Nature* 1987<sup>b</sup>;327(6122):524-526.

<sup>a</sup>Palmer R.M., Ashton D.S. y Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine . *Nature (London)* 1988<sup>a</sup>;333:664-666.

<sup>b</sup>Palmer R.M.J., Rees D.D., Ashton D.S. y Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 1988<sup>b</sup>;153:1251-1256.

Pilka R, Kudela M, Prochazka M. Matriz metalloproteinases, embryo implantation and tumor invasion. *Ceska Gynekol* 2003;68(3):179-85.

Porcu G, Dechaud H, Hedon B. Uterine receptivity and embryo implantation. The use of transvaginal scan and Doppler study in its evaluation in ART. *Gynecol Obstet Fertil* 2003;31(9):697-705.

Psychoyos A. Hormonal control of ovoimplantation *Vit.Horm.* 1973;31:201-256.

Psychoyos A. Hormonal control of uterine receptivity for nidation. *J Reprod Fert Suppl* 17, 1976.

Psychoyos A. Uterine receptivity for nidation *Ann N.Y. Acad Sci* 1986;476:36-42.

Radommsky M.W., Palmer R.M. y Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987;1057-1058.

Ress D.D., Palmer R.M.J. y Schulz R. Characterization of tree inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 1990;101:746-752.

Richard G., Knowles R. y Moncada S. Nitric Oxide Synthase in mammals. *Biochem J* 1994;298:249-258.

Rubbo H.R., Radi M. y Trujillo. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipoperoxidation. *J Biol Chem* 1994;269:26066-26075.

Salvemini D., Misko T.P., Masferrer J.L., Seibert K., Currie MG. y Needleman P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90:7240-7244.

Salamonsen LA. Role of proteases in implantation. *Rev Reprod* 1999;4(1):11-22.

Shang X, Wang HM, Lin HY, Liu GY, Li QL, Zhu C. Regulation of matrix metalloproteinases (MMPS) and their inhibitors (TIMPS) during mouse peri-implantation: role of nitric oxide.

Schmidt H.H. y Lohmann S.M. The Nitric Oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochem Biophys Acta* 1993;1178:153-175.

Sessa W. C., Harrison JK., Barber CM., Zeng D., Durieux ME., D'Angelo DD. *J. Biol: Chem* 1992;267:15274-15276.

Shih IM. The role of (Mel-CAM) in biology and Patology. *J Pathol* 1999;189(1):4-11.

Sladek M.S., Magness R.R. y Conrad P.K. Nitric oxide and pregnancy. *Am J Physiol* 1997;272(41):R441-R463.

Stamler S.J., Singel J.D. y Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 1992;258(18):1898-1902.

Stephen M., Sladek R., Magness R., Kirk P. y Conrad K. Nitric oxide and pregnancy. *A. P. Soc.* 1997,R441-R463.

Sugino N., Shimamura K., Tamura H., Ono M., Nakamura Y., Ogino K. y Kato H. Progesterone inhibits superoxide radical production by mononuclear phagocytes in pseudopregnant rats. *Endocrinology* 1996;137:749-754.

Steinhorn H.R., Millard L.S., Morin C.F. Persistent pulmonary hypertension of the newborn (Role of nitric oxide and endothelin in pathophysiology and treatment). *Clin Perinatol* 1995;22(2):405-428.

Szabo C. Endogenously produced peroxynitrite induces the oxidation of mitochondrial and nuclear protein in immunoestimated macrophages. *FEBS Letters* 1997;409:147-150.

Thaler CD, Epel D. Nitric oxide in oocyte maturation, ovulation, fertilization, cleavage and implantation: *Curr Pharm Des* 2003;9(5):399-409.

Van Buren. Estrogen-induced uterine vasodilatation is antagonized by L-nitroarginine methyl ester, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Am J Obstet Gynecol* 1992;167:828-33.

Vilar-Rojas C., Hicks J.J. Cyclic AMP and Cyclic GMP in the implantation site of the rat. *Int. J. Fertil* 1982;27:56-59.

Weiner C.P., Knowles R.G. y Moncada S. induction of nitric oxide synthase early in pregnancy. *Am. J. Obstet Gynecol* 1994, 171:838-43.

Wink J. y Mitchel L. Chemical biology of nitric oxide: insight into regulatory, cytotoxic and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Rad Biol Med* 1998;25(4/5):434-456.

Wood M. Influence of oestrogen and progesterone on macrofage distribution in the mouse uterus. *J Endocrinol* 1990;126:417-424.

Yu ZY, Lumbers ER, Simoneta G. The cardiovascular and renal effects of acute and chronic inhibition of nitric oxide production in fetal sheep. *Exp Physiol* 2002;87(3):343-51.

Zhang X, Wang HM, Lin HY, Liu GY, Li QL, Zhu C. Regulation of matrix metalloproteinases (MMPS) and their inhibitors (TIMPS) during mouse peri-implantation: role of ntric oxide. *Placenta* 2004;25(4):243-52.)