

**El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma  
Metropolitana esta incluido en el Padrón de Posgrados de  
Excelencia del CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo  
Consejo a través del convenio PFR-20-93**

---

Jurado designado por las divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

**M. en C. Genoveva Durán Reyes**

Noviembre del 2000

**Comité Tutorial**

Tutor: **Dr. Juan José Hicks Gómez**



Asesor: **Dr. Efraín Mercado Pichardo**



Asesor: **Dra. Gabriela Morali de la Brena**



Sinodal: **Dr. Luis Arturo Baiza Gutman**



Sinodal: **Dra. Ana María Rosales Torres**



# **COMITÉ TUTORIAL**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. JUAN JOSÉ HICKS GÓMEZ**

**Investigador titular "C" del Hospital Juárez de México**

**Sistema de Investigadores de la Secretaría de Salud**

**Investigador Nacional Nivel III del Sistema Nacional de Investigadores**

**ASESOR**

**DR. EFRAÍN MERCADO PICHARDO**

**Profesor titular "C" de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa**

**Investigador de la Universidad Autónoma Metropolitana.**

**ASESOR**

**DRA. GABRIELA MORALÍ DE LA BRENA**

**Prof. Titular TP del Depto. de Biología de la Reproducción de la Universidad Autónoma**

**Metropolitana-Iztapalapa**

**Investigador Titular "A" de la Unidad de Investigación Médica en Farmacología. Centro**

**Médico Nacional Siglo XXI.**

**Investigador Nacional Nivel II del Sistema Nacional de Investigadores**

---

**SINODAL**

**DRA. ANA MARÍA ROSALES TORRES**

**Prof. Titular Investigador "C"**

**Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción de la Universidad Autónoma  
Metropolitana Xochimilco.**

**Investigador Nacional Nivel I del Sistema Nacional de Investigadores**

**SINODAL**

**DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN**

**Prof. Titular "C" Laboratorio de Morfología.**

**ENEP. IZTACALA, UNAM**

**Investigador Nacional Nivel I del Sistema Nacional de Investigadores**

---

Este trabajo fue apoyado por el Instituto Mexicano del Seguro Social y el Fondo para el Fomento a la Investigación con el número FP0038/351 y forma parte del trabajo de Doctorado con beca de Conacyt de la M. en C. Genoveva Durán Reyes realizado en la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

Una vez más....., por todo su apoyo y confianza.

Gracias

**Dr. Juan José Hicks G.**

---

## **Agradecimientos**

A los miembros del Comité Tutorial, por su apoyo y el aporte de conocimientos y experiencia para la realización del trabajo

**Dr. Efraín Mercado Pichardo**

**Dra. Gabriela Morali de la Brena**

**Dr. Luis Arturo Baiza Gutman**

**Dra. Ana María Rosales Torres**

---

A mis compañeros del laboratorio, quienes siempre me han apoyado y alentado a seguir adelante.

**Cecy, Rafa, Margarita Díaz, Martín, Chelo, Clarita, Adelita, Rebeca, José Luis, Margarita Gutiérrez, Soco, Olguita, Miguel, Carlos, Elsit**  
**y Oswaldo.**

---



A Ponchito a Cristy Loza y a Rosy Bello.

10



**Con todo mi amor a Rodolfo mi esposo y a mis hijos**

**Rodolfo e Iliana.**

*[Faint handwritten signature or scribble]*



**A mis padres Manuel y Nieves,**

**A mis hermanos: José Manuel, Antonio, Paty, Ale y Martín**

*[Handwritten signature]*



## INDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	3
INTRODUCCIÓN	5
Características bioquímicas del *NO	5
Efectos directos del *NO	10
Efectos indirectos del *NO	15
Aspectos fisiológicos del *NO	22
Participación del *NO en los procesos patológicos	31
El •NO y la preñez	33
Efecto de los inhibidores de la síntesis de *NO en ratas preñadas	35
Regulación de la producción de *NO	38
La implantación del embrión	41
JUSTIFICACIÓN	47
HIPÓTESIS	48
OBJETIVO GENERAL	48
OBJETIVOS PARTICULARES	48

---

MATERIAL Y METODOS	49
Material biológico	49
Homogeneización	51
Determinaciones bioquímicas	51
RESULTADOS	56
Efecto de la L-nitro-arginina sobre la implantación y la mortalidad de embriones	56
Efecto de la L-nitro-arginina+nitroso glutatión sobre la implantación y la mortalidad de embriones	57
Efecto de la L-nitro-arginina +L-arginina sobre la Implantación y la mortalidad de embriones	57
Efecto de la D-arginina sobre la implantación y la mortalidad de embriones	58
Efecto de la L-nitro-arginina sobre la concentración de GMPc en el sitio de implantación.	63
Efecto de la L-nitr-arginina sobre la concentración de GMPc en el no-sitio de implantación	65
Efecto de la L-nitro-arginina sobre la peroxidación de proteínas En el sitio de implantación	70
Efecto de la L-nitro-arginina sobre la peroxidación de proteínas en el no-sitio de implantación	72
Efecto de la L-nitro-arginina sobre la lipoperoxidación en el sitio de implantación	75

---

Efecto de la L-nitro-arginina sobre la lipoperoxidación en el no-sitio de implantación	77
---	----

DISCUSIÓN	80
-----------	----

CONCLUSIÓN	86
------------	----

BIBLIOGRAFÍA	88
--------------	----

ARTÍCULOS PUBLICADOS	
----------------------	--

---

# EFFECTOS DE LA INHIBICION DE LA SÍNTESIS DEL ÓXIDO NÍTRICO SOBRE LA IMPLANTACION, LA CONCENTRACIÓN DE GMPc Y LA PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS Y DE PROTEÍNAS

M. en C. Genoveva Durán Reyes

## RESUMEN

Recientemente, el óxido nítrico ( $\text{*NO}$ ) ha adquirido gran interés clínico debido a su efecto como relajante del músculo liso. Dicha información cubre las principales áreas de las complicaciones de la preñez, principalmente nacimientos prematuros, preclampsia, retardo del crecimiento intrauterino y las de la implantación.

El  $\text{*NO}$  es una molécula sin carga que posee siete electrones del nitrógeno y ocho del oxígeno. Ya que los orbitales contienen un máximo de 2 electrones, el último orbital contiene un electrón desapareado.

El  $\text{*NO}$  se produce *in vivo* durante la conversión de L-arginina a citrulina por una reacción catalizada por la óxido nítrico sintasa (NOS). De esta enzima han sido clasificadas dos isoformas en base a su mecanismo de regulación. La NOS constitutiva (NOSc), presente en las células endoteliales y neuronales y regulada por  $\text{Ca}^{2+}$  y la inducible (NOSi) detectada principalmente en los macrófagos y los neutrófilos, es  $\text{Ca}^{2+}$  independiente y es regulada a nivel transcripcional. Las NOS pueden ser inhibidas selectivamente por análogos de la L-arginina. Compuestos como la L-nitro-arginina ((L-NA), L-nitro-monometil-L-arginina (L-NMMA) y L-arginina metil-éster (L-NAME) inhiben competitivamente a la NOS. La acción de estos análogos puede ser competitivamente revertida por la adición de altas concentraciones de L-arginina y donadores del  $\text{*NO}$ .

La bioquímica del óxido nítrico ha sido definida como la química de este radical libre que involucra a sus blancos biológicos y sus efectos han sido clasificados en directos e indirectos. Los efectos directos son el resultado de la reacción entre el  $\text{*NO}$  y biomoléculas específicas. Los indirectos son aquellos que resultan de las reacciones de especies reactivas del  $\text{*NO}$  (RNOS) (derivadas de la autoxidación del óxido nítrico) con varios blancos biológicos.

Las reacciones directas (efectos directos) con centros metálicos son cruciales para el comportamiento del óxido nítrico como molécula de señalización intracelular. Por ejemplo la reacción entre el  $\text{*NO}$  y los cofactores hemo dentro de las proteínas es importante en la regulación de la actividad de la guanilil ciclasa. El  $\text{*NO}$  de esta forma estimula la conversión de GTP a GMPc.

Los efectos indirectos son el resultado de las reacciones entre el  $\text{*NO}$  y el oxígeno ( $\text{O}_2$ ) o el anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) para formar óxidos de nitrógeno ( $\text{NO}_x$ ) o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). El peroxinitrito es un potente oxidante que reacciona con la mayoría de las

biomoléculas. Ya que el  $\text{NO}$  es una molécula con una vida media muy corta, es probable que su acción se efectúe a través del efecto oxidante de sus metabolitos, como el ONOO $^-$ .

El  $\text{NO}$  ha sido implicado en procesos fisiológicos y patológicos; ya que puede actuar como molécula de señalización, agente anti-infeccioso o antioxidante. La primera acción descrita del  $\text{NO}$  esta relacionada con su efecto sobre la circulación y la presión sanguínea; la reacción del óxido nítrico con la guanilil ciclasa aumenta la concentración de GMPc y provoca vasorelajación. Por este mecanismo, el óxido nítrico inhibe la agregación plaquetaria, participa en la erección peniana y en el sistema nervioso, regula la liberación de neurotransmisores.

La implantación del embrión, un evento que en la rata inicia en la noche del 5 $^{\circ}$  día, es precedida por la diferenciación de un endometrio no receptivo a uno receptivo. Esta transformación implica un incremento en la permeabilidad vascular, la formación de edema y la subsecuente formación del tejido decidual en el sitio donde el blastocisto se implantará.

Aunque se ha demostrado que el aumento en la permeabilidad vascular que se presenta en el útero durante la implantación puede ser inducida por prostaglandinas o histamina, no se conocen los factores que regulan este fenómeno. Estudios recientes han establecido que el  $\text{NO}$  regula la producción de GMPc y prostaglandinas por medio de su efecto estimulador sobre la guanilil ciclasa y la ciclooxigenasa.

Nosotros proponemos que el  $\text{NO}$  es indispensable en el sitio de implantación del embrión, contribuyendo por medio del GMPc con el aumento de la fluidez de la membrana y la permeabilidad vascular necesarias para la formación del edema. Además, por medio de sus efectos indirectos, aportando el nivel de peroxidación de biomoléculas adecuado para la implantación.

En nuestro modelo experimental utilizamos 4 grupos de 10 ratas cada uno: A, B, C y D. A las ratas del grupo "A" se les administró en el cuerno uterino derecho 114 nmoles de L-nitro-arginina, a las del grupo "B", la misma concentración de L-nitroarginina + 228 nmoles de nitroso glutatión, a las del grupo "C" igual concentración de L-nitroarginina + 342 moles de L-arginina y al grupo "D" 114 nmomoles de D-arginina. Como control, a todas las ratas se les administraron 114 nmoles de D-arginina en el cuerno uterino izquierdo. Cinco ratas de cada grupo fueron sacrificadas al 6 $^{\circ}$  día de preñez con la finalidad de evaluar el número de sitios y no sitios de implantación y obtener el tejido para las determinaciones de GMPc, carbonilos y peroxidación de lípidos. Las otras 5 ratas se dejaron evolucionar hasta el día 19 de la preñez con la finalidad de observar si los embriones pueden llegar vivos hasta esta etapa.

Con este trabajo encontramos que la inhibición de la síntesis del  $\text{NO}$  en el útero de la rata suprime la implantación, disminuye la concentración de GMPC y disminuye la peroxidación de proteínas y aumenta la lipoperoxidación, por lo que suponemos que durante esta etapa el óxido nítrico participa por medio de sus efectos directos, activando a la guanilil ciclasa, e indirectos, por medio del peroxinitrito, aumentando el nivel de peroxidación de biomoléculas.



## SUMMARY

The nitric oxide ( $\text{NO}$ ) recently becomes of clinical interest because of its relaxant effects on smooth muscle. The potential clinical interest of such information covers the main areas of pregnancy complications, namely preterm delivery, preeclampsia, intrauterine growth retardation and implantation.

Nitric oxide is an uncharged molecule composed of seven electrons from nitrogen and eight from oxygen. Due to each orbital can contain a maximum of two electrons, the highest occupied orbital in nitric oxide must contain an unpaired electron

*In vivo* nitric oxide is produced *in vivo* during the conversion of L-arginine to L-citrulline by a reaction catalyzed by nitric oxide synthases enzymes (NOS). Two classes of NOS have been identified based on its mechanism of regulation. The constitutive NOS (cNOS), present in the endothelial and neuronal cells, is regulated by  $[\text{Ca}^{2+}]$ , whereas the inducible NOS (iNOS) is mainly detectable in macrophages, and neutrophils and is regulated at transcriptional level. Nitric oxide synthase can be selectively inhibited by L-arginine analogs. Analogues of L-arginine such as L-nitro-arginine (L-NA), L-nitro-monomethyl-L-arginine and L-nitro-arginine methyl ester (L-NAME) inhibit the synthesis of  $\text{NO}$ . They act by competing with L-arginine at the NOS active site. The action of these analogues can be competitively reversed by the addition of higher concentrations of L-arginine and  $\text{NO}$  donors.

The chemical biology of  $\text{NO}$  has been defined as the specific chemistry of  $\text{NO}$  involving biological targets and this has been categorized into direct and indirect effects. Direct effects results from reactions between  $\text{NO}$  and specific biological molecules. Indirect effects are defined as those resulting from the reactions of reactive nitrogen oxide species (RNOS: which are derived from  $\text{NO}$  autoxidation) with various biological targets.

Direct reactions (direct effects) with metal centers are crucial to understanding the bioregulatory behavior of  $\text{NO}$  and why this molecule can serve as a signaling agent. For instance, the reaction between  $\text{NO}$  and heme cofactors within the protein is important in the regulation of guanylate cyclase activity. Nitric oxide has been shown to bind to the heme moiety of this thereby stimulating the conversion of GTP to cGMP. Indirect effects are caused as resulting from reactions between  $\text{NO}$  and oxygen ( $\text{O}_2$ ) or superoxide ( $\text{O}_2^{\bullet -}$ ) to form nitrogen oxides ( $\text{NO}_x$ ) or peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ). Peroxynitrite reacts relatively slowly with most biological molecules, making peroxynitrite a potent oxidant. Nonetheless, since  $\text{NO}$  is a molecule with a very short half-life, it is probable that its mechanism of action also takes place through the oxidative effect of its metabolites, as peroxynitrite ( $-\text{ONOO}$ ), on certain macromolecules.

Embryo implantation, an event that in the rat starts on the evening of the fifth day of pregnancy, is preceded by the differentiation of a non-receptive endometrium into a receptive one. This transformation implies an increase in vascular permeability, the presence of edema and the subsequent of decidual tissue formation at the site where

the blastocyst will be implanted. In addition, in this same specie, blastocyst adhesion to the maternal epithelium implies the displacement of this tissue through its planned cellular death or apoptosis.

Although it has been demonstrated that the increase in vascular permeability seen in the uterus during implantation can be induced by prostaglandins or histamine, it is unknown what factors regulate this phenomenon. Recent studies have established that  $\text{NO}$  regulates the production of cGMP and prostaglandins by means of this free radical's stimulating effect on the enzymes guanylyl cyclase and cyclooxygenase. We propose that the presence of  $\text{NO}$  and cGMP are required at the embryo implantation site during the stage of maximum receptivity in order to increase the membrane fluidity and vascular permeability necessary for the formation of edema. In addition, the synthesis of cGMP is regulated by  $\text{NO}$ .

The effect of L-nitro-arginine on embryonic implantation and cGMP, protein peroxidation and lipid peroxidation was assessed in the implantation site. The intraluminal administration of 114 nmoles of L-nitro-arginine inhibited implantation in 34 % and embryo survival (100%), while in addition, decreasing cGMP concentration both at the site as well non implantation site. Carbonyl groups concentration was considerably less at the implantation site treated with L-nitro-arginine than in the control. Level lipid peroxidation was higher at the uterine corn treated with L-nitro-arginine than in the control

In the present study, we demonstrated that the inhibition of  $\text{NO}$  synthesis in the rat endometrium suppresses implantation, decreases tisular cGMP concentration and alters the levels of protein peroxidation and lipoperoxidation.

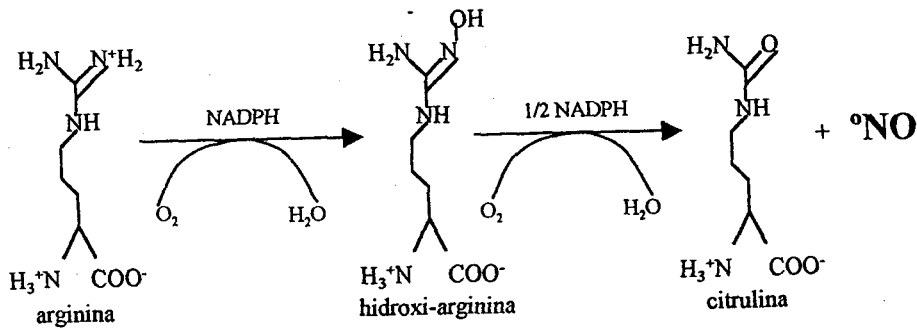
## INTRODUCCIÓN

### Características bioquímicas del óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ )

El óxido nítrico, cuya fórmula es  $\cdot\text{N}=\text{O}$  y se representa habitualmente como  $\cdot\text{NO}$ , es un gas cuya molécula es muy reactiva por tener un electrón no apareado. La molécula posee 7 electrones del nitrógeno y 8 del oxígeno; ya que cada orbital solo puede contener un máximo de dos electrones, el último orbital del nitrógeno contiene un electrón desapareado (falta un electrón con spin contrario para formar el par del orbital), por lo que se le considera como un radical libre. No obstante, a pesar de ser esta molécula un radical libre, no reacciona tan fácilmente con las biomoléculas debido a que la mayoría de éstas contiene enlaces estables con dos electrones, lo cual las hace poco reactivas con el  $\cdot\text{NO}$  (Moncada y cols, 1991 y Beckman y Koppenol, 1996).

El  $\cdot\text{NO}$  se forma enzimáticamente en la mayoría de las células de los eucariontes por la familia de enzimas denominada óxido-nítrico-sintasas (NOS) (L-arginina, NADPH oxidoreductasa: EC.1.14.13.39). Estas oxidan al grupo guanidino de la L-arginina en un proceso que consume 5 electrones y requiere de la presencia de NADPH, calmodulina (algunas isoformas) y tetrahidrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ) para dar origen al  $\cdot\text{NO}$  y a la citrulina en cantidades equimolares (figura 1). El mecanismo de la reacción enzimática puede ser dividida en dos pasos principales: la hidroxilación inicial de la L-arginina a hidroxil-L-arginina (L-HA) y su subsecuente oxigenación de L-HA para formar  $\cdot\text{NO}$  y citrulina (Leone y cols, 1991). Bajo condiciones anaerobias estrictas el  $\cdot\text{NO}$  es estable, pero en presencia de oxígeno presenta una vida media de fracción

de segundo; ya que es rápidamente oxidado para formar nitritos y nitratos ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ )



**Figura 1: Secuencia de la reacción catalizada por la óxido nítrico sintasa**

La familia de las óxido nítrico sintasas consiste de tres isoformas: la neuronal constitutiva, la endotelial constitutiva y la inducible. Aunque la neuronal y la endotelial pueden ser inducidas bajo circunstancias especiales (Dawson y Snyder, 1994) y ser también controladas transcripcionalmente, la connotación "inducible", que implica que la enzima debe ser sintetizada de *novo* (Hicks, en prensa), es utilizada para referirse a la isoforma sintetizada por los macrófagos e inducida por citocinas. Las isoformas constitutivas son estrictamente dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que la inducible no, aunque la calmodulina es necesaria para la actividad de las tres isoformas. En cuanto a su localización intracelular, aunque hay evidencias de que la endotelial

puede asociarse a la membrana, en general se les considera citosólicas (Nathan y Xie, 1994).

El estudio de las características íntimas de la síntesis del  $\text{NO}$  se ha facilitado con la utilización de inhibidores de la enzima. La inhibición de la síntesis de  $\text{NO}$  se puede efectuar a diferentes niveles: de manera competitiva utilizando análogos del sustrato, con compuestos que compiten con el cofactor NADPH o con la calmodulina, con inhibidores de la síntesis de tetrahidrobiopterina y con el mismo  $\text{NO}$ , aunque esta última ésta poco estudiada. De estos los más ampliamente utilizados son los análogos de la L-arginina por ser muy específicos (enantiómero-específicos). Entre estos compuestos se encuentran la *Nw-L-nitro-monometil-arginina* (L-NMMA), *Nw-L-nitro-arginina* (L-NNA) y la *L-nitro-arginina metil-ester* (L-NAME). Su acción puede ser revertida competitivamente al añadir altas cantidades de L-arginina (Palmer y cols, 1988; Knowles y Moncada, 1994) (Tabla I). En sistemas experimentales el  $\text{NO}$  puede también ser inhibido por la adición de oxihemoglobina o los efectos del  $\text{NO}$  sobre la guanilil ciclasa pueden ser bloqueados por el azul de metileno.

Los análogos de la arginina inducen vasoconstricción en anillos de aorta de conejo e inhiben la relajación dependiente del endotelio inducida por acetilcolina en la arteria pulmonar del cobayo, arterias cerebrales de perros y arterias y venas de humanos. Todos estos efectos son enantiómero-específicos y revertidos por la L-arginina pero no por la D-arginina. *In vivo*, la administración intravenosa del L-NMMA pero no del D-NMMA, induce un incremento en la presión sanguínea que puede ser revertido por L-arginina pero no por D-arginina, y que se asocia con disminución en la liberación

de  $\text{NO}$  desde segmentos aórticos obtenidos de los animales tratados. Lo cual es revertido por la infusión de L-arginina a través del segmento aórtico. De esta manera, la liberación basal de  $\text{NO}$  derivado de la L-arginina juega un papel importante en la regulación de la presión sanguínea.

**TABLA I**

**Diferentes tipos de inhibidores de la NOs**

<b>Tipo de inhibidor</b>	<b>Tipo de inhibición</b>	<b>Comentarios</b>
Análogos de la arginina (ej. L-NMMA L-NAME y L-NNA)	Competitiva con arginina	Selectivo
Difenileneidonium	Competitiva con NADPH	También inhibe otras enzimas dependientes de NADPH
Antagonistas de calmodulina (ej. trifluoperazina)	Competitiva con calmodulina	Solo inhibe algunas NOs, también inhibe otras enzimas dependientes de calmodulina
Inhibidores de la síntesis de tetrahidrobiopterina (BH4)	Indirecta	
$\text{NO}$ , CO	No se conoce	Probablemente inhiben por interactuar con el grupo hemo de la NOs

Tomado de Knowles y Moncada. *Biochem J.* 1994;298:249-258.

La biología del  $\text{NO}$  ha sido sujeto de numerosas investigaciones. Esta molécula diatómica, previamente asociada con sus efectos tóxicos, se forma endógenamente y participa en numerosas funciones en el organismo, por lo que cabe la pregunta, "el  $\text{NO}$  es bueno o malo". La bioquímica del  $\text{NO}$  se ha definido como la química

específica involucrada en la interacción del  $\cdot\text{NO}$  con sus blancos biológicos y sus efectos se han categorizado en primarios (directos) y secundarios (indirectos). Los primeros implica aquellas reacciones en las cuales el  $\cdot\text{NO}$  interactúa directamente con las biomoléculas. Este tipo de reacciones ocurren con pequeñas concentraciones de  $\cdot\text{NO}$ . En contraste, los efectos indirectos son los derivados de las reacciones del  $\cdot\text{NO}$  con otras moléculas, como el anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) o el oxígeno ( $\text{O}_2$ ). Posteriormente en una siguiente reacción se forma el reactante que afecta a las biomoléculas (peroxinitrito). Las reacciones indirectas requieren de gran formación de  $\cdot\text{NO}$ , el que posteriormente da origen a otros radicales libres o especies reactivas del nitrógeno (RNOS) (figura 2) (Wink y Mitchell, 1998).

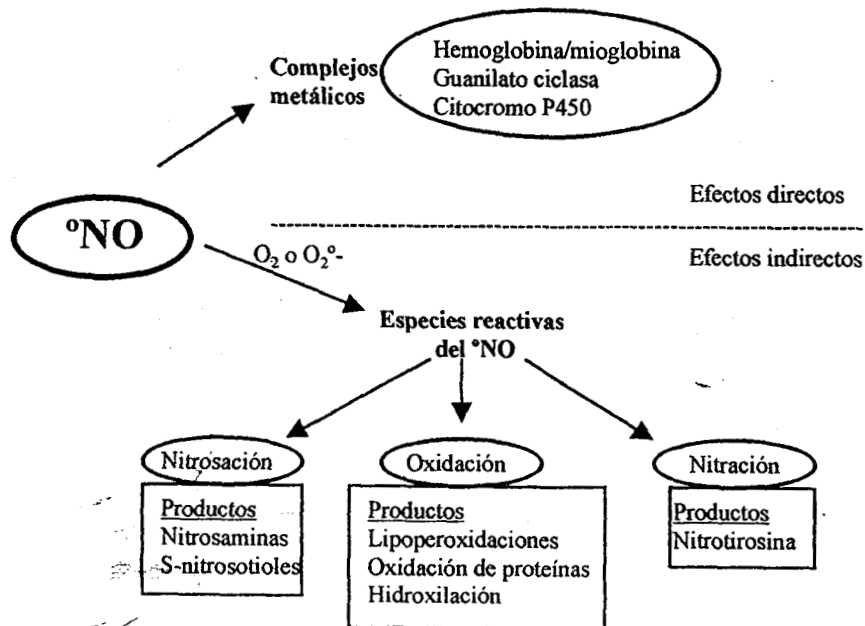
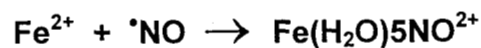


Figura 2.- Efectos directos e indirectos del  $\cdot\text{NO}$

## Efectos directos del $\cdot\text{NO}$

Las reacciones directas del  $\cdot\text{NO}$  mas relevantes, desde el punto de vista fisiológico, son aquellas en las que este radical libre interacciona directamente con centros metálicos; ya que por medio de este mecanismo, el radical funciona como agente de señalamiento intracelular. La reacción del  $\cdot\text{NO}$  con algunos complejos que contienen metales de transición, resulta en la formación de *complejos metal-nitrosilo*. Por ejemplo, la reacción entre el ion ferroso y el  $\cdot\text{NO}$  para formar un ion Fe-nitrosil (ecuación 1).



### *Ecuación 1*

En general, los complejos con ligandos porfirínicos tienen gran afinidad por el  $\cdot\text{NO}$ , por lo que las hemo-*proteínas* son importantes en la biología del  $\cdot\text{NO}$ . En ellas se lleva a cabo la reacción entre el  $\cdot\text{NO}$  con metales en los sistemas biológicos, incluyendo proteínas hemo como la guanilil ciclasa, la citocromo P450 y la óxido nítrico sintasa.

La reacción entre el  $\cdot\text{NO}$  y la guanilil ciclasa produce un *complejo Fe-nitrosil* capaz de activar a la enzima con la producción y el aumento en la concentración del GMPc, un segundo mensajero que regula numerosas funciones. La concentración de  $\cdot\text{NO}$  requerida para activar a la guanilato ciclasa es relativamente baja, 100nM

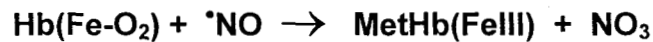


(Forsterman, 1996), Lo anterior es un ejemplo de un importante efecto directo que puede ser causado por el  $\cdot\text{NO}$  derivado de la óxido nítrico sintasa constitutiva. La influencia del  $\cdot\text{NO}$  sobre la guanilil ciclasa soluble tiene profundos efectos sobre el tono vascular, la función plaquetaria, la neurotransmisión y otras interacciones intercelulares.

Otra importante reacción directa del  $\cdot\text{NO}$  es su interacción con el citocromo P450. Este último está constituido por un complejo integrado por varias enzimas que están involucrada en la síntesis y el catabolismo de numerosas biomoléculas tales como ácidos grasos, esteroides, prostaglandinas, leucotrienos y diversos xenobióticos. Algunos estudios (Wink y cols, 1996) han demostrado que el  $\cdot\text{NO}$  inhibe al citocromo P450 de mamíferos. El mecanismo propuesto para ello parece ser la formación de un complejo Fe-NO, el cual impide la unión del oxígeno de manera similar al mecanismo de inhibición por CO (Wink y cols, 1993). Además, esta inhibición es 100 veces más potente que la provocada por el monóxido de carbono. La inhibición del citocromo P450 puede ejercer importantes consecuencias fisiopatológicas. Durante la infección crónica o choque séptico, el  $\cdot\text{NO}$  puede ser producido en cantidades importantes, debido a la activación de los leucocitos para que produzcan durante el estallido respiratorio tanto radicales libres de oxígeno como óxido nítrico. La inhibición del citocromo P450 hepático, por lo tanto puede suprimir el metabolismo de los fármacos utilizados para tratar la infección y en consecuencia disminuir la detoxificación (Wink y cols, 1993). Por otro lado, en contraste, otros autores han demostrado que el  $\cdot\text{NO}$  también tiene un papel protector durante los procesos infecciosos. Este activa a la

hemooxigenasa en hepatocitos, una enzima que sirve como un mecanismo protector contra una variedad de condiciones fisiopatológicas (Wink y cols, 1998).

El mecanismo principal de control de la concentración del  $\cdot\text{NO}$  *in vivo* es la reacción directa del  $\cdot\text{NO}$  con metaloproteínas. El  $\cdot\text{NO}$  reacciona con la oxihemoglobina ( $\text{HbO}_2$ ) o la oximioglobina para formar metahemoglobina (MetHb) o metamioglobina (Doyle y Hoekstra, 1981 y Freilisch 1991). Esta reacción ha sido propuesta como un tipo de mecanismo de control del  $\cdot\text{NO}$  *in vivo* (ecuación 2).

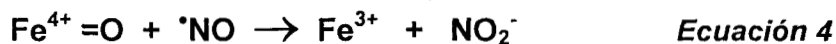
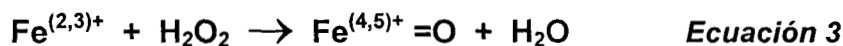


*Ecuación 2*

La hemoproteína óxido-nítrico-sintasa, responsable de la formación endógena de  $\cdot\text{NO}$ , también puede ser inhibida por éste, de manera similar al citocromo P450, (Griscavage y cols, 1994; Abu-Soud y cols, 1995; Hurshman y Marletta, 1995 y Griscavage y cols, 1995), ejerciendo de esta forma una retroalimentación negativa para su propia síntesis. La isoforma constitutiva de esta enzima es más susceptible a la inhibición por  $\cdot\text{NO}$ . Con respecto a esta línea de trabajo aun hay poca información y muchas interrogantes por resolver.

Otra de las reacciones directas del  $\cdot\text{NO}$  con los metales en sistemas biológicos, es la reacción del  $\cdot\text{NO}$  con complejos metálicos polivalentes derivados de  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  ó  $\text{Al}^{3+}$ ). Estas especies oxo-metálicas se forman de la oxidación de compuestos metálicos o complejos meta-oxígeno por agentes como el peróxido de hidrógeno

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y son oxidantes potentes que pueden producir daño celular como lipoperoxidación (Puppo y Halliwell, 1988). El <sup>•</sup>NO rápidamente reacciona muy eficientemente con estos complejos para abatir su capacidad oxidativa (Wink y cols, 1994; Kanner y cols, 1991 y Gorbunov y cols, 1995) (ecuacione 4). Este es un importante mecanismo por el cual el <sup>•</sup>NO protege o repara al organismo del daño causado por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Es importante recordar que el peróxido de hidrógeno en presencia del par (Fe<sup>2+</sup>-Fe<sup>3+</sup>) puede llevar al cabo la reacción de Fenton produciendo el radical hidroxilo (<sup>•</sup>OH), que es la especie más reactiva del oxígeno para inducir peroxidación de biomoléculas.



Otro ejemplo muy interesante de la reacción directa del óxido nítrico, es su interacción del Fe(III)-hemo de la catalasa, impidiendo con esto la ruptura del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por la enzima. Esto es de particular interés; ya que la catalasa transforma al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub> con la finalidad de evitar efectos deletéreos ocasionados por el peróxido de hidrógeno, como ya se mencionó en el párrafo anterior (Burdon, 1995 y Wink y Mitchell, 1998)

Otro más de los efectos directos del  $\cdot\text{NO}$  y no menos importante, es su reacción con otros radicales libres. Los radicales alcoxilo o peroxilo, productos secuenciales de la lipoperoxidación, reaccionan con el  $\cdot\text{NO}$ , lo cual evita la propagación del daño peroxidativo (ecuación 5) (Padmaja y Huie, 1993).

La lipoperoxidación es probablemente el daño inducido por los radicales libres en las biomoléculas más ampliamente estudiado. La abundancia de fosfolípidos y particularmente de ácidos grasos insaturados en las membranas celulares, hace de estas estructuras, blancos muy susceptibles al ataque por radicales libres, principalmente especies reactivas de oxígeno (ROS) (Zentella y Saldaña, 1996 y Loeckie y cols, 1999)



*Ecuación 5*

*Lipoperóxido*

*termina la peroxidación*

La habilidad del  $\cdot\text{NO}$  para limitar la lipoperoxidación, afecta en parte la biosíntesis de algunos derivados lipídicos tal como la formación de autacoides como prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos. El ácido araquidónico liberado de los fosfolípidos debido a la acción catalítica de la fosfolipasa A1, es metabolizado por dos rutas que conducen a la formación de leucotrienos o de prostaglandinas. Mientras que la ciclooxigenasa conduce al ácido araquidónico a la formación de prostaglandinas, tromboxano o prostaciclina, la lipooxigenasa lo conduce a

leucotrienos (Vilar-Rojas, 1982b). Estos compuestos regulan importantes procesos fisiológicos y patológicos. Aunque, se ha demostrado que el  $\cdot\text{NO}$  inhibe a la lipoxigenasa al reaccionar con el *Fe-nohemo* que contiene esta enzima, estudios recientes indican que la inhibición se debe principalmente a la reacción entre los hidroperóxidos y el  $\cdot\text{NO}$ , con los que tiene una mayor afinidad (Doudlas, 1995).

### Efectos indirectos o secundarios del $\cdot\text{NO}$

A diferencia de los efectos directos, los indirectos son mediados por especies reactivas del óxido nítrico (RNOS) derivadas de su reacción con el  $\text{O}_2$  o con el anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) (figura 3)

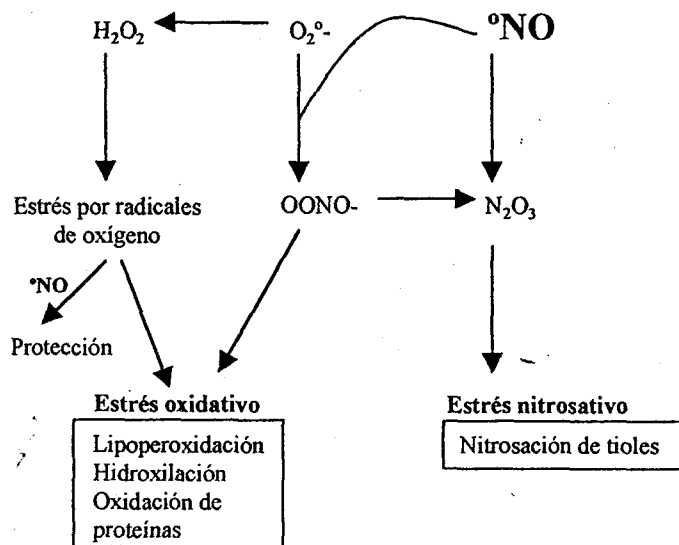
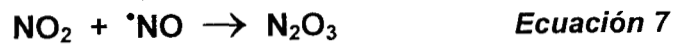
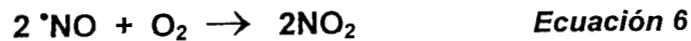


Figura 3: Reacción del  $\cdot\text{NO}$  con el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y con el  $\text{O}_2$

La reacción del  $\cdot\text{NO}$  con el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  ( $\cdot\text{NO}/\text{O}_2^{\cdot-}$ ), llamada también autoxidación, es de importancia en la atmósfera. El  $\cdot\text{NO}$  es inestable en un medio aeróbico y al reaccionar fácilmente con el  $\text{O}_2$  formar RNOS (especies reactivas de óxido nítrico), tales como el dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2$ ) y el trióxido de dinitrógeno ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), los cuales son perjudiciales para los tejidos biológicos (ecuaciones 6 y 7) (Wink y Mitchell, 1998).



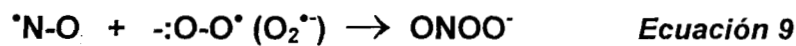
Tanto en solución acuosa como en gas se forma  $\text{N}_2\text{O}_3$ , pero en agua este último se hidroliza para formar nitrito (ecuación 8).



En los sistemas biológicos, la autoxidación del  $\cdot\text{NO}$  es mayor en la capas lipídicas (hidrofóbicas) que en la fase acuosa, debido a que el  $\cdot\text{NO}$  y el  $\text{O}_2$  son aproximadamente 20 veces más solubles en la fracción lipídica de la célula. Por lo tanto, en los tejidos se forma predominantemente  $\text{N}_2\text{O}_3$  (Freelich, 1991). Las reacciones de autoxidación del  $\cdot\text{NO}$  son de segundo orden con respecto a éste, lo

que significa que debe existir una alta concentración de esta molécula para que se realicen. El  $\cdot\text{NO}$  generado en bajas concentraciones (por la isoforma constitutiva), es captado predominantemente por los centros metálicos (Wink y cols, 1997). En sistemas biológicos, la reacción primaria del  $\text{N}_2\text{O}_3$  es la nitración; este proceso resulta en la formación de nitrosaminas, mientras que la nitración de tioles conduce a la de S-nitrosotioles. Esta última, en las proteínas tiene diferentes consecuencias, desde inhibir actividades enzimáticas hasta formar complejos S-nitrosotioles que regulan la transducción de señales (Lander, 1995; Lander y cols, 1996).

Otro de los efectos indirectos del  $\cdot\text{NO}$  es el originado por su reacción con el radical  $\text{O}_2\cdot^-$  ( $\cdot\text{NO}/\text{O}_2\cdot^-$ ) dando como resultado la formación del peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (Ecuación 9) (Laval y cols, 1996).



Se ha especulado que la formación del  $\text{ONOO}^-$  es el primer paso del metabolismo del  $\cdot\text{NO}$ . Esta reacción depende de la concentración de  $\cdot\text{NO}$  y  $\text{O}_2\cdot^-$  y de la reacción de estos radicales con otros componentes biológicos, los cuales limitan la formación del peroxinitrito. Bajo condiciones fisiológicas, sin estrés oxidativo, la concentración de superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) es ínfima, debido a que la superóxido dismutasa (SOD) lo descompone en peróxido de hidrógeno y oxígeno, de tal manera que la concentración de  $\text{ONOO}^-$  depende de la disponibilidad de  $\text{O}_2\cdot^-$  (Beckman y Smith, 1993 y Pryor y Squadrito, 1996).

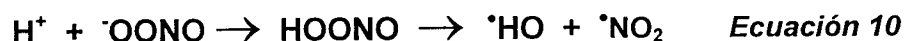
La segunda limitante sobre la formación de ONOO<sup>-</sup> son en conjunto la dismutación reacciones del O<sub>2</sub><sup>•-</sup> por la superóxido dismutasa y la reacción del •NO con la oxihemoglobina. Así como la SOD reduce la disponibilidad de superóxido al dismutarlo y formar peróxido de hidrógeno, la reacción del •NO con proteínas-hemo reduce las concentraciones de •NO libres. La reacción del óxido nítrico con la hemoglobina es uno de los principales mecanismos de consumo de este radical, por lo que limita las reacciones de •NO/O<sub>2</sub> y •NO/O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Otro importante determinante de la concentración de •NO es su difusión desde el sitio de generación, así que su reacción con el superóxido solo ocurre en áreas localizadas (Wink y Mitchell, 1998).

Se considera que el principal mecanismo del daño asociado con la producción de •NO *in vivo* es a través del ONOO<sup>-</sup>. Lo que hace particularmente tóxico al peroxinitrito es su gran estabilidad como un anión a pH alcalino. Esta estabilidad le da la oportunidad de difundir a través de la célula hasta encontrar a su blanco. A pH 7.4 (fisiológico), aproximadamente el 20% del peroxinitrito se protona para formar el ácido peroxinitroso (HONOO). El que es capaz de oxidar a una variedad de moléculas biológicas, cualquiera que pueda actuar como un nucleófilo, o ser un donador de uno o dos electrones. Entre estas moléculas se incluyen aminas, tioles, algunas de las bases del DNA, ascorbato y otros agentes reductores (Wink y Mitchell, 1998).

Dos mecanismos se han sugerido, por los cuales actúa el peroxinitrito, uno involucra la formación de los radicales hidroxilo (•OH) y dióxido de nitrógeno (•NO<sub>2</sub>) (ecuación



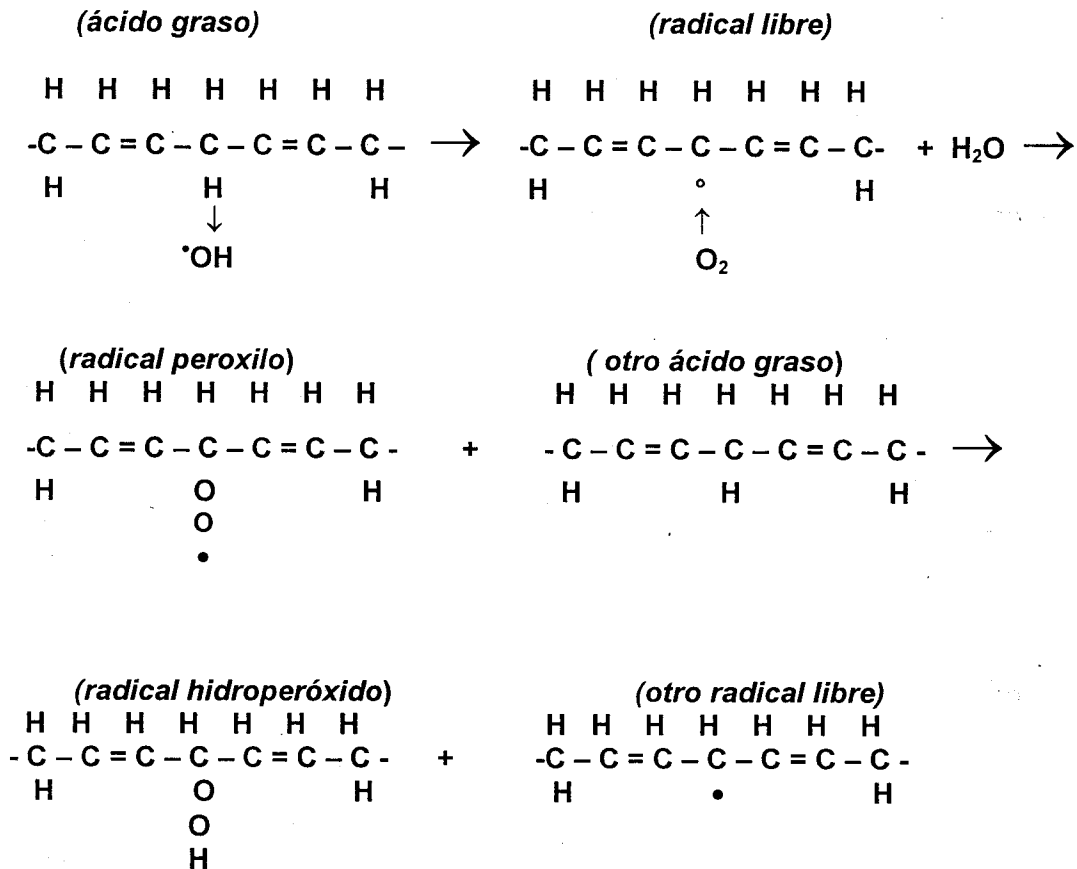
10) y el otro la conversión del HOONO a una forma transitoria activada que actúa como radical  $\cdot\text{OH}$  (Pryor y Squadrito 1996).



Los radicales libres, como el  $\cdot\text{OH}$ , tienen la capacidad de causar daño oxidativo en las proteínas, vía la conversión de grupos amino de cadenas laterales a los correspondientes derivados carbonilos. Un incremento en el contenido de carbonilos en las proteínas generalmente se asocia con desordenes patológicos como artritis reumatoide, enfermedad de Alzheimer, síndrome de Parkinson y arteriosclerosis (Szabo y cols, 1997).

Los radicales libres,  $\cdot\text{OH}$  y  $\cdot\text{NO}_2$ , también son capaces de producir peroxidación en los ácidos grasos polinsaturados. Esta inicia cuando alguno de estos radicales libres sustrae un hidrógeno de un grupo metileno de un ácido graso polinsaturado. La formación de las especies iniciadoras se acompaña por el rearrreglo en los enlaces que resulta en la estabilización por dienos conjugados. El radical lipídico entonces captura oxígeno para formar el radical peroxilo (Figura 4). La propagación de la reacción permite la formación de lípido-hidroperóxidos. Esta fase de propagación puede repetirse por mucho tiempo mientras haya ácidos grasos polinsaturados y oxígeno disponible. Además, la acumulación de hidroperóxidos y su subsecuente de radicales peroxilo puede acelerar la reacción en cadena de la

peroxidación de los ácidos grasos polinsaturados, con el posterior daño de las membranas celulares (Loeckie y cols, 1999).

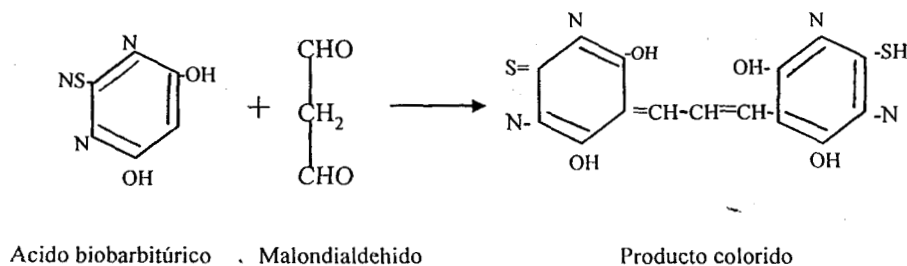


**Figura 4: Mecanismo bioquímico de la lipoperoxidación**

La peroxidación de los lípidos de las membranas, disminuye su fluidez, altera la permeabilidad, afecta a las enzimas asociadas a su estructura, libera materiales de componentes subcelulares y altera el transporte a través de ésta (Hicks, en prensa).

La cuantificación de la lipoperoxidación puede determinarse por diferentes métodos; aquellos que miden los productos primarios del proceso como es el caso de los hidroperóxidos y aquellos que miden los productos secundarios originados del rompimiento de los hidroperóxidos tales como el malondialdehido, 4-hidroxinonanal e hidrocarburos volátiles como etano y pentano (Kneepkens y cols, 1994; Riely, 1974 y Frank y cols, 1980).

El malondialdehido (MDA) es el aldehido más abundante que se produce de la peroxidación de lípidos y su determinación, por medio del producto colorido formado después de su reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBA), es el ensayo más común para medir lipoperoxidación. En la reacción del TBA, una molécula de MDA reacciona con dos de TBA con la producción de un pigmento colorido, cuya absorción máxima es a 532-535 nm (Sinnhuber 1958) (figura 5)



**Figura 5: Reacción del ácido tiobarbitúrico con el malondialdehido**

Por todo lo anterior se demuestra que el  $\cdot\text{NO}$  puede tener efectos protectores o dañinos según su concentración y su origen, sin embargo, aun faltan muchos estudios para determinar "en donde, cuando y como", este radical libre es "bueno o malo".

### **Aspectos fisiológicas del $\cdot\text{NO}$**

El óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ) que es uno de los gases tóxicos de la atmósfera, ha sido implicado tanto en procesos fisiológicos como patológicos (Moncada S. 1991. And Lancaster J.R. 1992).

Desde 1987/88 se descubrió que las células del endotelio vascular eran capaces de sintetizar  $\cdot\text{NO}$  a partir de la L-arginina como una señal transcelular, además, se demostró que las propiedades de este radical libre coincidían con aquellas que presentaba el conocido como factor relajante derivado del endotelio (Ignarro y cols, 1987). Desde esta fecha, el número de trabajos sobre el papel fisiológico del  $\cdot\text{NO}$  en las alteraciones vasculares de distintos síndromes descritos en la medicina ha aumentado considerablemente ( Moncada y cols, 1991; Buhimmschi y cols, 1995; Beckman y Koppenol, 1996; Durán-Reyes y cols, 1998 y Hicks y cols, en prensa), no obstante, el papel y el comportamiento bioquímico de esta molécula presenta aun un campo fértil para el aporte de nueva información debido a la gran versatilidad de este radical libre (Moncada y cols, 1991).

El  $\cdot\text{NO}$  es una molécula que participa en funciones muy diversas, de manera directa o por medio de sus metabolitos, como agente de señalamiento, anti-infeccioso o

antioxidante. El metabolismo del  $\text{NO}$  produce una serie de compuestos denominados especies reactivas del óxido nítrico, las cuales poseen sus propias características y funciones (Fantone y Ward, 1982).

El papel del  $\text{NO}$  en los mecanismos de señalamiento es por medio de la activación que éste ejerce sobre la guanilil ciclasa, cuyo producto el GMPc, regula diversas funciones. La activación de la guanilil ciclasa debida a la unión del  $\text{NO}$  con su  $\text{Fe}^{2+}$ -hemo, es un ejemplo particular del principio por el cual el  $\text{NO}$  produce la vasorelajación y la inhibición de la agregación plaquetaria (Freelisch y Noack, 1987 y Radommsky y cols, 1987)

El  $\text{NO}$  también regula numerosas funciones por medio de sus metabolitos. Se ha reportado que el anión peroxinitrito ( $-\text{ONOO}$ ) actua como agente inductor de daño celular y apoptosis en una variedad de tipos celulares tales como timocitos, células corticales y células HL-60 de leucemia, aunque el mecanismo de acción es desconocido (Pryor y Squadrito, 1996). Diversas de condiciones patológicas que tienen un componente inflamatorio, progresan a través de la apoptosis provocada por el  $-\text{ONOO}$  (Szabó y cols, 1997).

La primera acción descrita del oxido nítrico está relacionada con su efecto sobre el circulación y la presión sanguínea. La reacción del  $\text{NO}$  con el grupo hemo de la guanilil ciclasa soluble en las células del músculo liso vascular incrementa la concentración de GMP cíclico y provoca vasorelajación (Ress y cols, 1995 y Vanhoute y cols, 1986). Esta relajación es más intensa en las arterias que en las

venas, pero en las arterias coronarias ateroscleróticas al igual que en las de los pacientes con hipertensión esencial y diabetes esta disminuida, lo que sugiere que una inapropiada generación y/o inactivación del  $\text{NO}$  pudiera tener importancia en los padecimientos que cursan con hipertensión. Se ha podido comprobar que la inhalación de óxido nítrico revierte la hipertensión arterial pulmonar relajando la vasculatura de áreas específicas, lo que facilita la ventilación. Bajas concentraciones de  $\text{NO}$ , entre 18 y 36 ppm (partes por millón), se han utilizado con buenos resultados en la eliminación de algunos síntomas del llamado "síndrome de angustia respiratoria del adulto".

El  $\text{NO}$  inhibe la agregación plaquetaria por un mecanismo que también es claramente dependiente de GMP cíclico; las plaquetas por si mismas generan óxido nítrico, lo que podría tener relación con su mecanismo de activación. No parece haber duda del papel que juega el óxido nítrico como neurotransmisor tanto en el sistema nervioso central como en el periférico. En el cerebro se han podido localizar grupos neuronales discretos que contienen óxido nítrico sintasas, pero no se ha determinado con certeza su función. Neuronas positivas a la óxido nítrico sintasa (NOS) pueden ser localizadas en el plexo mioentérico y a través de todo el tracto gastrointestinal. La despolarización de las neuronas del plexo mioentérico provoca la relajación del músculo liso asociada a la peristalsis. El bloqueo de esta acción con inhibidores de la óxido nítrico sintasa indica que el óxido nítrico es el neurotransmisor en el intestino. En el proceso de la erección peniana el óxido nítrico actúa como neurotransmisor y también como un potente vasorelajador. Los nervios

del plexo pélvico sintetizan y liberan \*NO dentro del *corpus cavernosum*. En respuesta, el músculo liso se relaja, lo que permite que en la *corpora* se acumule sangre, se hinche y se produzca la erección. El \*NO es sin duda el neurotransmisor de las terminaciones nerviosas que regulan la erección del pene. En el sistema nervioso central el \*NO regula el flujo sanguíneo que llega al cerebro, a través de su liberación, tanto por células endoteliales de los vasos del sistema hematoencefálico como por los nervios autónomos dentro de la adventicia. El \*NO aparentemente también regula la liberación de otros neurotransmisores, fenómeno que involucra la fosforilación de las proteínas de las vesículas sinápticas

En algunos ganglios sensoriales embrionarios de la rata, prácticamente todas las neuronas son positivas a la óxido nítrico sintasa. Después del nacimiento esta condición baja hasta menos del 1 % . Esta evidencia y la expresión y actividad aumentadas de la actividad de la NOS en zonas específicas del cerebro en desarrollo han llevado a la hipótesis de que el óxido nítrico podría tener una participación importante en la morfogénesis del sistema nervioso. Sin embargo es indispensable mas investigación en este aspecto.

La óxido nítrico sintasa de los macrófagos puede producir una cantidad elevada de óxido nítrico. Este es capaz de matar o de inhibir el crecimiento de varios agentes patógenos, así como células tumorales y aun linfocitos. Existe evidencia de la posible participación del óxido nítrico en el proceso inflamatorio agudo y crónico. El tratamiento con inhibidores de la NOS reduce la inflamación aguda en animales de experimentación, mientras que la L-arginina agudiza el proceso inflamatorio.

También se han detectado concentraciones altas de nitritos en el plasma y el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide y osteoartritis.

En los últimos años, se ha descubierto, *in vivo*, la participación de tres moléculas inhibitoras de la actividad de la (NOS), las cuales han sido conocidas por mucho tiempo como parte integral de la estructura primaria de diversas proteínas y son metil derivados de la L-arginina como la L-N<sup>0</sup>- metilarginina (monometil- L-arginina, MMA), la N<sup>0</sup>-dimetilarginina ( arginina dimetilada asimétrica ,ADMA ) y L-N<sup>0</sup>-N<sup>01</sup>- dimetil arginina simétrica (SDMA) (figura 6). Estos derivados han sido también encontrados como aminoácidos libres en varios tejidos y fluidos biológicos de mamíferos (Hicks, en prensa) .

Aumento en las concentraciones de MMA y ADMA, libre en plasma y orina, han sido reportadas en varios desordenes clínicos, como son la distrofia muscular, falla renal, hipercolesterolemia, y esquizofrenia. Ha sido demostrado que los derivados metilados de la L-arginina, MMA y ADMA, pero no SMDA, son inhibidores reversibles de las oxido nítrico sintasas en mamíferos. Tomando en consideración esta capacidad inhibitoria, se ha sugerido (Moncada y cols, 1991) que pudieran funcionar como reguladores endógenos de las oxido nítrico sintasas en los mamíferos. A partir de la demostración de que el MMA inhibe la formación de \*NO en las células endoteliales, el potencial farmacológico de la MMA y de la ADMA como inhibidores de NOS fue reconocido. La presión arterial de perros con choque séptico causado por endotoxinas, fue restablecida por la administración intravenosa de MMA. En ratas, la administración intravenosa de ADMA, incrementó la presión arterial, pero la



disminuyó cuando la administración fue por vía intraventricular en el cerebro (Hicks, en prensa).

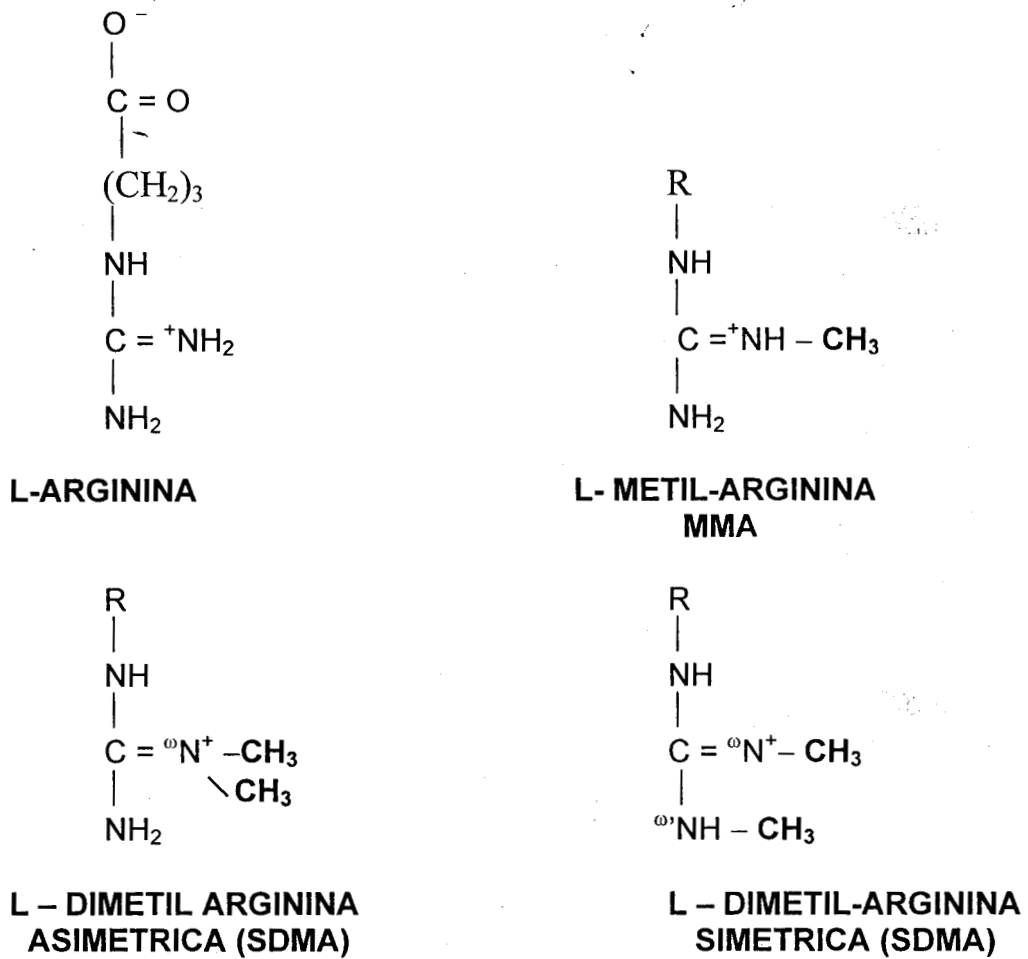


Figura 6 (tomado de Hicks, en prensa)

En los últimos años se han utilizado otros inhibidores de las NOS, estos compuestos han sido sintetizados con base a los hallazgos demostrados con los derivados

metilados de L-arginina. En la actualidad se utilizan nitro-metil-esteres de L-arginina como inhibidores de las NO; precisamente utilizando L-nitro-arginina metil ester, se logro aportar un importante hallazgo en ratas preñadas; ya que la inhibición de las NOS indujo un aumento en la presión arterial y características muy similares a la preclampsia humana, sirviendo como un excelente modelo experimental (Yallampalli y Garfield, 1993). La preclampsia en la mujer se caracteriza entre otros signos y síntomas, con una hipertensión sostenida que se presenta generalmente en el tercer trimestre del embarazo. Este incremento en la presión arterial es refractario a la mayor parte de los vasorelajadores, por lo que se ha utilizado con relativa eficiencia y por corto tiempo por su toxicidad (liberación de cianuro, y posible generación de radicales  $\cdot\text{OH}$ ), el nitroprusiato de sodio<sup>1</sup>, que es un donador de  $\cdot\text{NO}$  con una relativa potencia hipotensora.

Hace varios años que fue purificada a partir del riñón la enzima L- $\text{N}^{\omega}$ ,  $\text{N}^{\omega}$ -dimetil arginina dimetil-aminohidrolasa (también llamada dimetilarginasa. E.C. 3.5.3.18). Esta enzima monomérica (masa molecular  $\cong$  31 kDa) esta involucrada en la regulación de las concentraciones de MMA (monometil-arginina) y ADMA (arginina dimetilada asimétrica) libres en el organismo. La dimetilarginasa hidroliza MMA y ADMA, formando L- citrulina y dietilamina, mientras otros análogos de la L-arginina, no pueden servir como sustratos (figura 7).

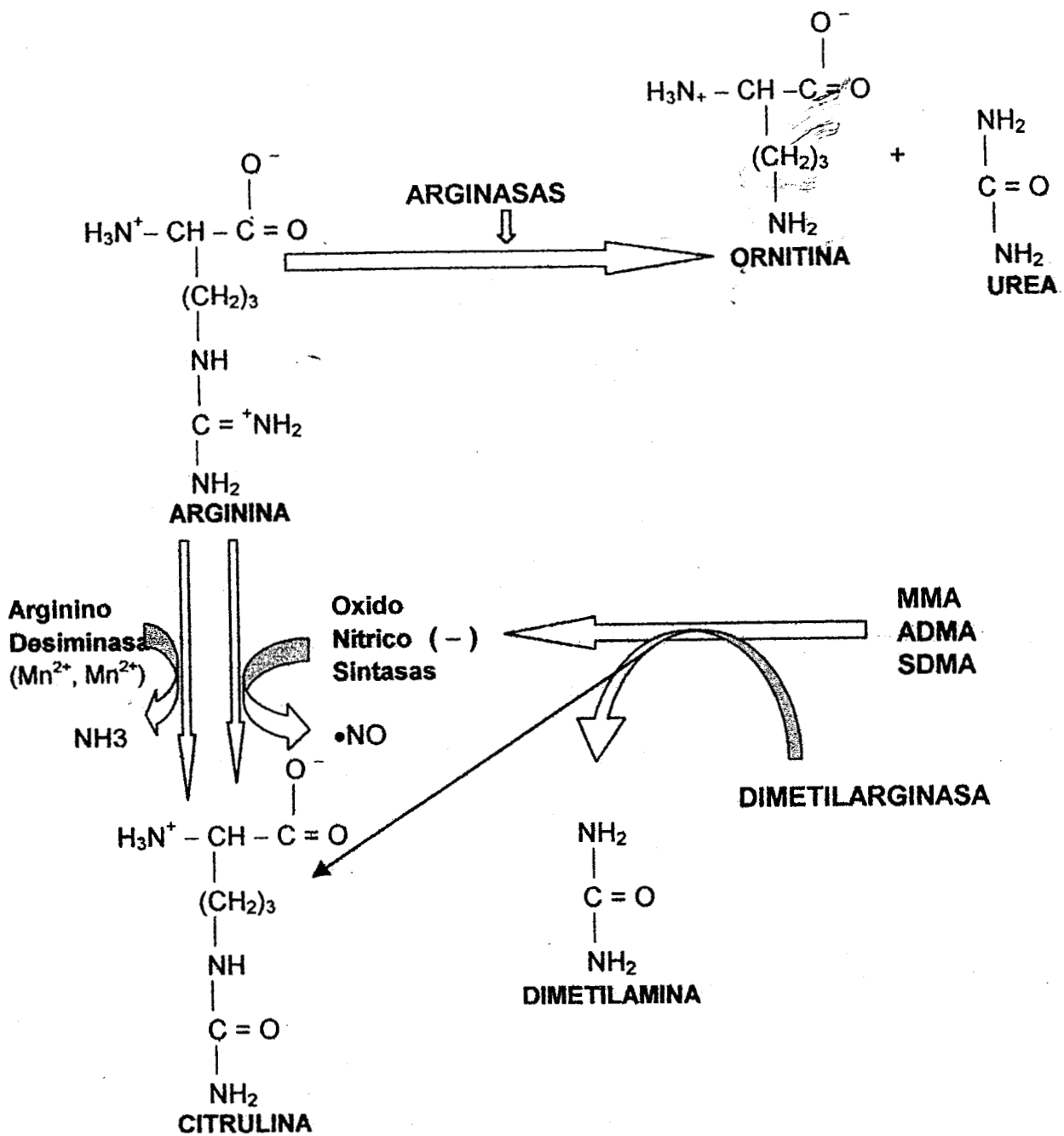


Figura 7 (tomado de Hicks, en prensa)

Recientemente, fue aislada en bovinos una dimetilarginasa, la cual fue sometida a técnicas inmunológicas, cinéticas y de espectroscopía con el fin de lograr una adecuada caracterización. Técnicas de "Western blot" revelaron que la enzima está libremente distribuida en el bovino, pero presenta una concentración relativamente alta en el cerebro y el riñón. La enzima es una proteína monomérica globular (masa molecular  $\cong 31.2\text{kDa}$ ), conteniendo un ión de  $\text{Zn}^{2+}$  débilmente unido, que funciona solo para mantener la estructura sin participar en la función catalítica, es decir, la dimetilarginasa no es una hidrolasa dependiente de Zn.

Dos enzimas metal-ion-dependientes involucradas en catálisis similar a la dimetilarginasa, son conocidas. Una de ellas es la arginina desiminasa (EC 3.5.3.6), que convierte L-arginina en L-citrulina y  $\text{NH}_3$  (Fig. 3-6). La enzima es activada por  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ , y es fuertemente inhibida por  $\text{Zn}^{2+}$ . El segundo grupo de enzimas son arginasas (EC 3.5.3.1), que utilizan  $\text{Mn}^{2+}$  como cofactor, e hidrolizan L-arginina a L-ornitina y Urea. Esta reacción representa la primera etapa en el ciclo de la urea.

Esta bien establecido que ocurren anomalías en el metabolismo del Zinc durante las enfermedades de Alzheimer y Parkinson. En estos padecimientos incrementan los niveles cerebrales de Zinc. En consecuencia, una inhibición de la dimetilarginasa por Zinc, puede afectar el funcionamiento de las NOS bajo estas condiciones. Sin embargo, se considera que se requieren más estudios estructurales, para entender la participación fisiológica de esta enzima (Hicks, en prensa).

## Participación del óxido nítrico en procesos patológicos

Los efectos fisiopatológicos relacionados con el óxido nítrico se asocian a las reacciones que se verifican entre esta molécula y los constituyentes bioquímicos de la célula. La enorme afinidad del  $\cdot\text{NO}$  con el hierro deriva en varias reacciones con moléculas que contienen  $\text{Fe}^+$  hemo, como en el caso del grupo prostético de la guanilil ciclasa y la enzima ciclo-oxigenasa. Destacan también las reacciones con moléculas que contienen grupos  $\text{Fe}^+-\text{S}$  y que intervienen en varios puntos críticos de las rutas metabólicas principales, como son las enzimas cis-aconitasa y succinato-NADH-oxidoreductasa que participan en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la enzima NADH-ubiquinona que participa en la fosforilación oxidativa. Se considera que a través de un proceso de ribosilación de la enzima gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa el  $\cdot\text{NO}$  pudiera también interferir con la glicólisis. La influencia del  $\cdot\text{NO}$  con otras enzimas podría verificarse a través su reacción directa con el glutatión ( que puede ser nitrado por el óxido nítrico), en cuyo caso su concentración intracelular disminuye sensiblemente; pudiendo contribuir al establecimiento del estrés oxidativo (Hicks, en prensa). Otra consecuencia de la disminución del glutatión es la activación de la vía de las pentosas. Del mismo modo, esta modificación podría tener influencia en enzimas glutatión-dependientes, como la glutatión peroxidasa. Otro blanco importante de la acción del  $\cdot\text{NO}$  es la liberación de hierro cuando el óxido nítrico interacciona con la proteína almacenadora ferritina. El  $\cdot\text{NO}$  puede también inhibir la síntesis de DNA a través de la reacción con la enzima ribonucleotido reductasa.

La influencia que el óxido nítrico puede tener en los procesos biológicos más críticos podría ser de control y regulación. Sin embargo, se deben tener presentes otras reacciones abiertamente nocivas del óxido nítrico, como lo es la desaminación y rompimiento de las cadenas de DNA.

Dada la gran dependencia de calcio por parte de las óxido nítrico sintasas (NOS), se ha propuesto que el  $\text{NO}$  podría estar relacionado con la neurotoxicidad del N-metil-D-aspartato (NMDA) (neurotoxicidad por exceso de glutamato). Algunos inhibidores de la NOS pueden revertir el daño. También actúan como inhibidores de la neurotoxicidad del glutamato los antagonistas de calmodulina y aun la hemoglobina reducida, un conocido capturador de óxido nítrico. Se supone que el efecto nocivo finalmente debe ser atribuido a la formación de peroxinitrito. La superóxido dismutasa también atenúa el daño neurotóxico por glutamato. La sobreproducción de óxido nítrico puede jugar un papel de gran importancia en los procesos inflamatorios del sistema nervioso central, incluyendo aquellos derivados de traumatismos. El  $\text{NO}$  pudiera ser el responsable directo de la toxicidad de los oligodendrocitos, las células productoras de mielina en el cerebro. Un exceso de producción de óxido nítrico podría tener relación con las secuelas de la meningitis, así como en la generación del fenómeno doloroso en la migraña.

En adición a las interacciones moleculares del óxido nítrico con otras moléculas que han sido previamente señaladas, se ha propuesto un mecanismo de daño celular específico para explicar la secuencia de eventos que llevan a la muerte celular. El proceso inicia con la activación de la NOS por un influjo repentino de calcio. La

formación de  $\cdot\text{NO}$  se acompaña entonces de la presencia de otras especies reactivas del oxígeno como el anión superóxido generado posiblemente por la transformación de la xantina-deshidrogenasa en xantina oxidasa, radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) y peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) entre otros. Aun persiste la duda de cuales son los mecanismos por medio de los cuales el oxido nítrico es catabolizado "in vivo", por lo que se debe estudiar la existencia y la significancia de las vías propuestas (Hicks, en prensa).

### **El $\cdot\text{NO}$ y la preñez**

El embarazo se caracteriza normalmente por la disminución de la presión sanguínea, reducción de la resistencia vascular periférica e incremento del débito cardiaco. Se acompaña además de resistencia al efecto presor de sustancias vasoactivas como la angiotensina II y la noradrenalina. Aunque se ha aceptado que estas alteraciones se deben a una prevalencia de prostaciclina sobre los troboxanos, recientemente se ha propuesto que el  $\cdot\text{NO}$  es la sustancia que mantiene el estado vasodilatado típico de la gestación (Molnar y cols, 1994).

Desde 1989, Weiner y cols. observaron en segmentos de arteria uterina de cobayas gestantes, que la concentración del  $\cdot\text{NO}$  era mayor que en las no embarazadas. Otros autores (Kirk , 1993) encontraron en el plasma y orina de ratas grávidas, que la concentración de nitratos, metabolitos estables del  $\cdot\text{NO}$ , se elevó de 2 micromoles hasta 6.5 al día 15 de la preñez, la cual declinó hasta los valores iniciales al final de la gestación. Los mismos autores demostraron durante esta etapa, que la

concentración de nitratos siempre fue paralela a la producción de GMPc y la administración del inhibidor específico de la óxido nítrico sintasa, la L-nitroarginina, suprimió esta elevación (Kirk y Conrad, 1993). En el útero humano se demostró que la síntesis tanto del  $\text{NO}$  como del GMPc aumentó después de la administración de la L-arginina (el sustrato para la síntesis de óxido nítrico) o el dietil/ $\text{NO}$  (donador de  $\text{NO}$ ) y disminuyó con el inhibidor L-nitroarginina-metilester. De esta manera se confirmó que el  $\text{NO}$  es el responsable del aumento del GMPc y no la citrulina (Buhimschi, 1995a,b).

Diversas evidencias indican que al acercarse el parto en la rata, la concentración de  $\text{NO}$  declina para dar lugar a las contracciones que prevalecen en ese periodo. Stephen y col (1993). demostraron que la actividad de la óxido nítrico sintasa disminuyó de 6 pmoles/mg de proteína/min a 1pmole al acercarse el parto. Se sugiere que esta disminución de los compuestos vasodilatadores durante el nacimiento permite la contracción que domina durante este periodo. En apoyo a lo anterior, Buhimshi y col. encontraron en el útero humano que la concentración de  $\text{NO}$  disminuyó al acercarse el parto (Buhimmschi y cols, 1995b y Sladek y cols, 1993).

En otros órganos como el corazón, el riñón, el músculo esquelético y el esófago la actividad de la óxido nítrico sintasa aumentó a medida que la preñez evolucionó (Weiner y cols, 1994). Estos aumentos fueron paralelos a la concentración de GMPc (Weiner y cols, 1994) (tabla II). Los mismos autores demostraron que en el corazón pero no en otros órganos el tamoxifeno disminuyó la concentración de la óxido nítrico



sintasa a los valores de animales no preñadas, por lo que se supone que la actividad de la óxido nítrico sintasa puede estar regulada por estrógenos (Weiner y cols, 1994).

**TABLA II**  
**\*NO en órganos de ratas preñadas**

Especie	Organo	Parámetro	Cita
Cobayo	Corazón, riñon, músculo esquelético y-esófago	NOs y GMPc ↑	Weiner C.P. Am.J.Ginecol 1994;171:838-43
Rata	Plasma, orina	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> y GMPc ↑	Conrad K.P. Am.J. Physiol 1989;257:R847-R853.
humano	Placenta, trofoblasto y miometrio	NOs y *NO ↑	Myatt.L. Am. J. Obstet.Ginecol 1992;166:224-230 Yallampalli C. Am J. Obstet Ginecol 1995;172:1577-84.
conejo	útero	NOs ↑	Stephen M.Am. J. Obstet Ginecol 1993;169::1285-91

NOS: óxido nítrico sintasa, GMPc: guanosil-monofosfato-cíclico, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> : nitritos, ↑. Estos aumentos son comparados con no preñadas.

### Efecto de los inhibidores de la síntesis de \*NO en ratas preñadas

Estudios realizados en ratas y cobayos demostraron que la administración crónica del inhibidor de la síntesis de \*NO (L-nitroarginina-metilester: L-NAME) a partir del día 1 de la gestación hasta el último tercio de la misma, aumentó la presión sistólica y

disminuyó el peso de los embriones. La administración simultánea del inhibidor y del sustrato revirtió ambos efectos (Laloraya y Kumar, 1989).

En pacientes hipertensos (voluntarios), la administración de L-arginina disminuyó la presión sistólica y diastólica con aumento en los niveles plasmáticos de citrulina y GMPc (Neri y cols, 1995). Vale la pena mencionar que el trinitro glicerol (nitroglicerina), un donador de  $\text{NO}$ , ha sido utilizado ocasionalmente como relajante uterino. Este compuesto se usó en forma de parches (Deponit 10, Schwarzpharma, Germany) en mujeres con contracciones a pretérmino (Greenspoon, 1991 y Vanderford y cols, 1994).

La asociación entre la síntesis de  $\text{NO}$  y la presión sanguínea, ha conducido a varios investigadores a postular que la preclampsia se debe a una producción deficiente de  $\text{NO}$  (Molnar, 1984). Yallampalli y cols. (1993) demostraron que las ratas tratadas con L-NAME desarrollaron presión sistólica elevada, disminución del peso de sus embriones e incremento de la mortalidad de los mismos, todo de manera dependiente de la dosis. Además, Molnar y col (1984). encontraron que la administración del inhibidor L-NAME en ratas preñadas les provocó albuminuria, hipertensión y disminución del peso de sus embriones, sin afectar la duración de la gestación. Estos mismos autores demostraron que el efecto hipertensivo del L-NAME no se presentó después del parto, en ratas vírgenes o en ratas macho, por lo que se sospechó que la unidad fetoplacentaria tiene un papel muy importante en la síntesis del óxido nítrico (Molnár y cols, 1994).

Recientemente Novaro y colaboradores (1996) encontraron que el L-NAME provocó la disminución de la síntesis de prostaglandinas E y  $F_{2\alpha}$  en el tejido uterino durante el 5° día del embarazo en la rata, por lo que sospecharon que un sistema dependiente de  $\bullet$ NO modula la síntesis de prostaglandinas durante esta etapa. Otros trabajos han establecido que el  $\bullet$ NO puede estimular la actividad de la cicloxigenasa, y de esta manera aumentar la síntesis de prostaglandinas (Salvemini y cols, 1993). Es probable que el  $\bullet$ NO regule la decidualización endometrial por medio de su estímulo sobre la síntesis de prostaglandinas; ya que se ha demostrado que durante la decidualización en la rata se elevan en forma simultánea los niveles de prostaglandinas (E y  $F_{2\alpha}$ ) y de  $\bullet$ NO (Kennedy y Lukash, 1982).

En contraste, Haddad y cols. (1995) encontraron que la pérdida temprana de los embriones de la rata estaba asociada con la producción de  $\bullet$ NO proveniente de los macrófagos. Además, que la aminoguanidina, un inhibidor de la óxido nítrico sintasa inducible, inhibió la producción de  $\bullet$ NO y redujo significativamente la pérdida de embriones. Lo anterior apoya que el efecto del  $\bullet$ NO depende del tipo celular del que proviene; mientras el derivado del endotelio contribuye con el establecimiento de la preñez, el sintetizado por los macrófagos participa en el rechazo del embrión.

Uno de los mecanismos responsables de la preclampsia es la pérdida de la eficiencia de la vía L-arginina-óxido nítrico, dando como consecuencia la disminución plasmática del GMPc encontrada durante este padecimiento (Kirk, 1993).

## Regulación de la producción de $\text{NO}$ .

La regulación de las dos principales isoformas de la óxido nítrico sintasa, la inducible y la constitutiva, es completamente diferente, mientras la primera es inducida por citocinas o factores de crecimiento, la segunda es estimulada por hormonas (Moncada y cols, 1991). Liao y cols. (1996) encontraron que la progesterona, pero no el estradiol, revirtió el aumento de presión sistólica provocado en las ratas preñadas después de la administración del inhibidor L-NAME. Además, la administración simultánea (con progesterona) del antiprogestageno RU486 (mifepristona) evitó el efecto de la hormona. Lo anterior sugiere que el efecto del  $\text{NO}$  sobre la circulación y la presión sanguínea es por medio de los receptores de progesterona (Liao y cols, 1996).

Por su parte, Sugino y cols. (1996) descubrieron que la progesterona inhibió la producción de  $\text{NO}$  generado por los fagocitos mononucleares del cuerpo lúteo de la rata. Es posible que el efecto de la progesterona sobre la vasodilatación del embarazo se realice indirectamente; disminuyendo la producción de  $\text{NO}$  generado por los macrófagos y permitiendo de esta manera que predomine la síntesis de  $\text{NO}$  generado por las células del endotelio (Sugino y cols, 1996). Aún no está claro si el  $\text{NO}$  ejerce su acción por medio de la progesterona, o la progesterona estimula la síntesis de óxido nítrico, en lo personal pienso que se llevan a cabo los dos eventos y que como se trata de dos isoenzimas (básicamente) el proceso resulta muy complicado. Es necesario que primero se lleven a cabo estudios que determinen con

exactitud cuando y en donde la progesterona estimula a la isoforma constitutiva e inhibe a la inducible.

En el cobayo (Weiner y cols, 1994) y la rata (Yalampalli y cols, 1994) preñadas se encontró que los niveles séricos de  $17\beta$ -estradiol aumentaron paralelamente con la actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial y que el gene que codifica para esta enzima, tiene afinidad por el receptor de estrógenos. Además, el tratamiento de las células endoteliales con  $17\beta$ -estradiol aumento los niveles del RNAmensajero de la óxido nítrico sintasa endotelial y el tamoxifeno (antiestrógeno) provocó el efecto opuesto. Por lo anterior se sospecha que la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial es regulada por estrógenos (Arnal y cols, 1996).

En contraste, Arnal y cols. (Arnal y cols, 1996) reportaron que los estrógenos aumentaron la producción biológica del  $\cdot\text{NO}$  al disminuir la síntesis de superóxido-dismutasa. Es evidente que aun faltan estudios para poder definir con más exactitud el mecanismo por el cual los estrógenos y la progesterona regulan la síntesis de  $\cdot\text{NO}$ .

Geller y col (1993) encontraron que los lipopolisacáridos, la Interleucina-1, el factor de necrosis tumoral y el interferón gama aumentaron significativamente la concentración del RNAm de la óxido nítrico sintasa inducible de hepatocitos y la dexametasona la disminuyó. La dexametasona es un glucocorticoide que tiene la propiedad de impedir la labilización natural de las membranas (fluidez), de tal manera, que aquellos procesos que requieran de la movilización de moléculas pueden ser suprimidos (Hicks y cols, 1994; Durán-Reyes y cols, 1994).

Aunque el papel del  $\cdot\text{NO}$  en la vasodilatación durante la preñez está demostrado (Laloraya y Kumar, 1989; Stephen y cols, 1993; Weiner y cols, 1994 y Buhimmschi y cols, 1995) su mecanismo de acción, origen tisular, efecto de sus metabolitos y cuando se sintetiza aún no han sido completamente dilucidados. Se ha considerado que las alteraciones vasculares de la preñez se relacionan con una disminución de la concentración de  $\cdot\text{NO}$  en el endometrio, ocasionada por el aumento del anión superóxido el cual se combina con el  $\cdot\text{NO}$  inactivándolo (Gerda y cols, 1992). Nosotros pensamos (Durán-Reyes y cols, 1998) que más bien se deben a un desequilibrio en la producción de estos radicales libres, los cuales conducen a una disminución en la relación óxido nítrico/peroxinitrito en la zona.

En la actualidad se ha demostrado que el mecanismo de acción del  $\cdot\text{NO}$  es por medio del efecto de este radical sobre el grupo hemo de las enzimas guanilil ciclasa (Buhimmschi y cols, 1995 y Yalampalli y cols, 1994) u oxigenasa (Salvemini y cols, 1993 y Frenchi y cols, 1994), no obstante, debido a que el  $\cdot\text{NO}$  es una molécula con una vida media muy corta, es probable que el mecanismo de acción de este radical también se lleve a cabo por medio del efecto oxidante del peroxinitrito ( $-\text{ONOO}$ ) sobre algunas macromoléculas. Los trabajos de Szabó y cols. (1997) demostraron que el inhibidor de la óxido nítrico sintasa,  $\text{N}^{\text{G}}$ -methyl-L-arginina, disminuyó la oxidación de gran número de proteínas provocada por el peroxinitrito generado endógenamente en cultivo de tejidos (Szabó y cols, 1997). Por otro lado, también se demostró que el peroxinitrito provoca una variedad de reacciones oxidativas en las proteínas, como son la formación de grupos carbonilos (Szabó y cols, 1992), además

de apoptosis en cultivos de tejidos (Melkova y cols, 1997). Es probable que la formación de productos de peroxidación de macromoléculas sea un proceso normal e incluso indispensables en el proceso apoptótico que se lleva a cabo durante la implantación en el útero (Parr, 1987).

Trabajos realizados de manera independiente han demostrado que las concentraciones del  $\cdot\text{NO}$ , anión superóxido y los productos de peroxidación de lípidos se elevan en el endometrio de la rata durante **la implantación del embrión** (Laloraya y cols, 1996 y Durán-Reyes y cols, 1998) pero se desconoce la relación que tienen estos productos entre si y sobre la peroxidación de proteínas.

### **La implantación del embrión**

La reproducción vivípara en los mamíferos demanda la coordinación entre la fisiología materna y el desarrollo embrionario. Esto incluye la sincronización entre el embrión preimplantado y el epitelio preparado para la implantación, el desarrollo coordinado de las células maternas y fetales para la formación de la placenta, los requerimientos del parto y el desarrollo de la glándula mamaria para la lactancia. Paradójicamente, en el ratón, la preparación uterina para la implantación, el desarrollo del embrión preimplantado y el proceso de decidualización pueden proceder independientemente uno de otro. Así, ovocitos fertilizados pueden ser cultivados al estado de blastocistos en un medio definido y más tarde ser transferidos a recipientes pseudopreñadas para completar el desarrollo en ellas. Similarmente, ratonas ovariectomizadas no preñadas pueden pseudopreñarse por la administración

de regímenes hormonales apropiados y ser inducidos a presentar decidualización por un estímulo inerte tal como aceite aplicado en el lumen uterino. En los roedores, para que la implantación tenga lugar, es esencial que haya una sincronía entre el desarrollo del embrión y la preparación uterina. Este tiempo denominado "ventana de la receptividad uterina" es relativamente corto (Glasser y cols, 1991).

Recientemente, el término implantación ha sido aplicado a una serie de eventos que ocurren desde el inicio de la interacción del blastocisto con el endometrio hasta la penetración del blastocisto en él. Durante una serie de pasos exquisitamente controlados, el blastocisto se implanta gradualmente en el estroma. La formación de la placenta completa al proceso de implantación y establece un medio de soporte del embrión hasta el término de la preñez (Abrahamsohn y Zorn, 1993).

Ya que la implantación es un proceso largo y complejo, algunos autores la han dividido en tres fases: en la fase 1, el blastocisto se encuentra libre dentro de la cavidad endometrial y no ha interactuado con la superficie epitelial. En la fase 2 el blastocisto se adhiere y penetra en la superficie del epitelio y subsecuentemente en el estroma. Se sugiere que la fase 1 de la implantación se inicia inmediatamente después de la entrada del embrión a la cavidad uterina y antes de la penetración activa del endometrio por el blastocisto. Durante esta etapa, el blastocisto madura y pierde la zona pelúcida (cubierta externa). La fase 2, incluye la unión del blastocisto a la superficie del epitelio (fase de aposición) seguida por la penetración o el desplazamiento del epitelio (fase de penetración).

El contacto inicial se hace entre la membrana del trofoectodermo y la superficie apical del epitelio. Las membranas plasmáticas de esas células se acomodan



paralelas una de otra y quedan separadas por una distancia de aproximadamente 20nm. Esta fase de interacción trofoblasto-endometrio, la cual es también llamada fase de aposición es seguida por la penetración del epitelio. El trofoblasto en las diferentes especies usa uno de los siguientes modos de invasión del endometrio: (i) penetración por desplazamiento, observada en el ratón y la rata, en la cual las células de la superficie epitelial degeneran y son fagocitadas por el trofoblasto; (ii) penetración por fusión: este tipo de invasión endometrial se ve en el conejo, e involucra células binucleadas en los rumiantes. El trofoblasto se funde con las células epiteliales y forma un sincicio que penetra la membrana basal del epitelio; (iii) penetración por intrusión: este modo de invasión endometrial es típica de los carnívoros, en ellas el trofoblasto penetra a través del epitelio y la membrana basal del epitelio. La fase III es la última fase de la implantación, durante esta etapa empieza la formación de la placenta (Denker, 1993; y Abrahamsohn y Zorn, 1993).

La preparación uterina para la implantación está bajo la regulación estricta de progesterona y estrógenos. Los estrógenos ováricos sintetizados de una manera cíclica causan proliferación celular uterina la cual se restringe al epitelio en sus regiones luminal y glandular. En el ratón, si ocurre la copulación, los cuerpos lúteos son mantenidos, crecen y sintetizan progesterona. La progesterona suprime la proliferación epitelial y prepara a las células estromales para responder al estrógeno nidatorio entre los días 3 y 4 de preñez. El estrógeno nidatorio es absolutamente requerido para la implantación y la subsecuente proliferación de las células estromales. Hay un periodo receptivo relativamente corto durante el cual el blastocisto puede atacar al epitelio uterino e implantarse (Psychoyos, 1986). Durante

la implantación, las células epiteliales mueren por apoptosis y hay una transformación de las células estromales a deciduales. La decidualización, la cual es estrictamente dependiente de la presencia de progesterona, incluye una marcada respuesta proliferativa y de diferenciación de las células estromales uterinas para dar lugar a la decidua que va a rodear al blastocisto (Psychoyos, 1960; 1973 y 1976 y Abrahamsohn y Zorn, 1993).

La implantación del embrión de la rata, un evento que se inicia en la noche del 6° día de preñez (día 1, aquel en el que se encuentran espermatozoides en el frotis vaginal en estro), es precedida por la diferenciación del endometrio materno no receptivo a uno receptivo. Esta transformación implica un incremento en la permeabilidad vascular, presencia de edema y la adquisición de la capacidad de decidualizarse (Kennedy, 1977 y Hicks, 1983). En respuesta a los estímulos embrionarios, hay un aumento local en la permeabilidad vascular en los sitios donde se implantará el blastocisto, este permite que se presente la extravasación de albúmina, fenómeno que ha sido utilizado para localizar macroscópicamente las zonas del endometrio en las que se implantará el embrión, llamadas sitios de implantación (SI); ya que si se administra por vía endovenosa un colorante al animal embarazado, es factible observar en el útero zonas coloridas que corresponden a los sitios de implantación. El estímulo y los factores esenciales que se requieren para inducir este incremento en la permeabilidad vascular no han sido dilucidados perfectamente. Este cambio y la decidualización pueden ser inducidos por diversos mediadores proinflamatorios tales como las prostaglandinas, los leucotrienos y el factor activador de las plaquetas generados por el útero y/o los tejidos embrionarios (Hicks, 1983). La producción de

estas sustancias es parcialmente dependiente de la actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub>, una enzima involucrada en la movilización de ácidos grasos (Hicks, 1983; Johnson y Dey, 1980 y Vilar-Rojas y Hicks, 1982a).

Diversos trabajos han establecido que el \*NO puede estimular la actividad de la ciclooxigenasa y de esta manera incrementar la síntesis de prostaglandinas en diferentes tejidos. Por otro lado, se conoce que las prostaglandinas E y F<sub>2α</sub> inducen decidualización endometrial (Vilar-Rojas y Hicks, 1982b).

La presencia de óxido nítrico sintasas en el tejido uterino fue descubierta por Suburo y Chaud (1995). En el útero, hay al menos dos isoenzimas de ésta; una constitutiva dependiente de calcio presente en el endotelio y en el sistema nervioso y la otra, citocina-inducible, calcio-independiente y encontrada en una variedad de tejidos y células, incluyendo las células endoteliales y los macrófagos (Suburo y Chaud, 1995).

Aunque la participación de \*NO ha sido demostrada en algunos eventos reproductivos, la ovulación y el parto, su papel en la implantación embrionaria aun es desconocido (Shukovski y Tsafirri, 1994 y Yalampalli y Garfield, 1993).

Trabajos recientes han establecido que el \*NO regula la producción de cGMP y prostaglandinas por medio del efecto estimulador de este radical libre sobre el grupo hemo de las enzimas guanilil ciclasa (Ignarro, 1992) y la ciclooxigenasa (Salvemini y cols, 1993). Considerando estas evidencias, proponemos que las presencias y por supuesto la participación del \*NO y el GMPc son imprescindibles en el sitio de implantación del embrión durante la etapa de máxima receptividad contribuyendo en el aumento de la fluidez de la membrana (Laloraya, 1990), así como en el aumento

de la permeabilidad vascular necesarias para la formación del edema (Naoki y cols, 1997). La síntesis de cGMP es regulada por el  $\text{*NO}$ . En estudios realizados en el endometrio de la rata, Vilar y Hicks (1982a) demostraron que la concentración de GMPc así como la hidratación se encuentran más elevados en el sitio de implantación del embrión que en el tejido adyacente (no sitio). El aumento de la hidratación es una consecuencia del aumento de la fluidez de las membranas. Es probable que la fluidez sea una de las consecuencias provocada por la peroxidación de biomoléculas dependiente de  $\text{*NO}$ .

En el presente trabajo se pretende investigar si la inhibición de la síntesis del  $\text{*NO}$  en el endometrio de la rata afecta la eficiencia de la implantación por medio de una disminución en la concentración de GMPc concomitante con alteraciones en la peroxidación de lípidos y la oxidación de proteínas.

---

## JUSTIFICACIÓN

La mayoría de las alteraciones vasculares descritas durante la preñez se han asociado con una disminución de la producción del relajante natural  $\text{NO}$  en los endotelios. Esta disfunción ocasiona un desequilibrio en las concentraciones del  $\text{NO}$  y  $\text{O}_2^{\cdot-}$  a favor del último. Por ello disminuye la concentración de  $\text{NO}$  y desfavorece su unión con el grupo hemo de enzimas como la guanilil ciclasa, en cambio, favorece la reacción entre el  $\text{NO}$  y el  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Bajo estas circunstancias, el anión superóxido reacciona de manera preferente con el  $\text{NO}$ . La unión de estos dos radicales da como resultado la formación de otras especies reactivas tanto del oxígeno como del  $\text{NO}$ , como es el caso del peroxinitrito, que tienen la habilidad de provocar peroxidaciones en las diversas biomoléculas (Bolli, 1991).

La participación del  $\text{NO}$  en aquellos procesos que involucran al GMPc ha sido demostrada en diversos órganos, así como la participación de uno de sus metabolitos, el peroxinitrito, en algunos de los procesos de muerte celular por apoptosis. Durante la preñez, pocos son los trabajos que se han realizado acerca de la participación de óxido nítrico y sus metabolitos y menos aún durante la implantación.

Durante la implantación del embrión, que es un proceso muy complejo en el cual el útero debe aumentar su permeabilidad vascular para permitir la nutrición adecuada del embrión, está demostrado que la participación de los radicales libres del oxígeno es necesaria para que se modifique tanto la fluidez de las membranas la aumento de la permeabilidad vascular en el útero durante la fase de aposición de la implantación.

Por otro lado, es probable que otro radical libre como es el  $\cdot\text{NO}$ , participe en el proceso de implantación por medio de sus efectos directos, como es la activación de la guanilil ciclasa, e indirectos, como la peroxidación de biomoléculas.

### **HIPÓTESIS**

El  $\cdot\text{NO}$  (derivado de la arginina) y sus efectos indirectos o secundarios son indispensables en el útero para la implantación.

### **OBJETIVO GENERAL**

Investigar el efecto del inhibidor específico de la óxido nítrico sintasa, la L-nitro-arginina, sobre la implantación del embrión y en el tejido uterino sobre la concentración de GMPc (efecto directo) y el grado de peroxidación de lípidos y de proteínas (efecto indirecto).

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Analizar el efecto de la L-nitroarginina sobre la concentración del GMP cíclico en el tejido endometrial del sitio (SI) y no sitio de implantación (NS) del cuerno tratado y compararlo con el control.
- Analizar el efecto de la L-nitro-arginina sobre el grado de peroxidación de lípidos y proteínas en el mismo tejido.

- Analizar el efecto de un donador de  $^*NO$ , nitroso-glutación y el de un exceso del sustrato L-arginina sobre los parámetros mencionados.
- Evaluar macroscópicamente en el día 6 de preñez, el número de sitios de implantación.
- Al día 19 de preñez evaluar el % de mortalidad de embriones.

## MATERIAL Y METODOS

### Material biológico

Se utilizaron 40 ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley, de 9-10 semanas de edad, con un peso aproximado de 250g, mantenidas bajo condiciones controladas de luz y temperatura y con alimentación y agua *ad libitum*. Estas se aparearon por el método de trío (un macho y 2 hembras) con machos de fertilidad comprobada y el resultado del apareo fue confirmado a la mañana siguiente por la presencia de espermatozoides en el frotis vaginal; ese día se consideró como día 1 de preñez (Reinius, 1967).

Las ratas se distribuyeron al azar en 4 grupos de 10 ratas cada uno: "A", "B", "C" y "D". A cada rata (grupo "A") del 5º día de preñez se le administró (a las 12.00 h.) en el lumen del cuerno uterino derecho (tratado), 114 nmoles de Nw-nitro-L-arginina (Kirk, 1993 y Buhimschi, 1995). (SIGMA CHEMICAL CO.) contenidos en 50µl de solución salina al 0.85%. Los tratamientos fueron aplicados previa anestesia con dehidrobenzoperidol (6.5mg/Kg de peso) y ketamina (60mg/Kg de peso) y laparotomía ventral media. En el cuerno izquierdo (control) se administró

la misma concentración pero de D-arginina. De la misma manera, otros dos grupos más se trataron con las siguientes variantes solo en el cuerno derecho: grupo "B", se les administró 114 nmoles de Nw-nitro-L-arginina más 228 nmoles de nitroso-glutación (donador de °NO); grupo "C" fueron tratadas además del inhibidor, con 342 nmoles del sustrato L-arginina. Para valorar el efecto de la manipulación experimental, un cuarto grupo ("D") fue tratado en ambos cuernos con 114 nmoles de D-arginina (tabla III).

**Tabla III**

**Tratamiento administrado a cada grupo el día 5 de preñez**

grupo	cuerno izquierdo	cuerno derecho
A	D-arginina	L-nitro-arginina
B	D-arginina	L-nitro-arginina+nitroso-glutación
C	D-arginina	L-nitro-arginina+L-arginina
D	D-arginina	D-arginina

Después de la administración intraluminal todas las ratas fueron suturadas.

A las 24 horas de la cirugía (6º día de preñez; día de la aposición del embrión) (Abrahamsohn, 1993) cinco ratas de cada grupo fueron sacrificadas, previa inyección intravenosa de 0.8ml del colorante de azul de tripán al 1% en agua. Los úteros se extrajeron, el cuerno derecho (tratado) se separó del izquierdo (control), ambos se liberaron de la grasa y los sitios de implantación (SI) teñidos con el



colorante se separaron de los no teñidos o sitios de no implantación (NS). Estos fragmentos se utilizaron para las determinaciones bioquímicas previa homogeneización del tejido. Las 5 ratas restantes se dejaron evolucionar hasta el día 19 de preñez, tiempo en el cual se sacrificaron para observar el número de reabsorciones y embriones implantados.

### Homogeneización

Los fragmentos correspondientes al SI y NS se homogeneizaron por separado al 20% en un amortiguador de fosfato de sodio 20mM pH 7.4 con tubo y pistilo de vidrio utilizando un homogeneizador "Caframo" Wiarion Ont Stirrer Tipo RZRI-64. Los homogeneizados se centrifugaron a 10000 rpm x 15 min y en los sobrenadantes se realizaron las determinaciones bioquímicas. En todos los casos se utilizó una centrífuga Beckman J2-HS y rotor JA 20.1 (Durán-Reyes y col, 1994).

### Determinaciones bioquímicas

*GMPc*. La medición de *GMPc*cíclico se realizó con una técnica de radioinmunoensayo, utilizando un equipo de reactivos (AMERSHAM LIFE PRODUCTS) de AMERSHAM. El equipo contiene un estándar de *GMPc*cíclico, un trazador del mismo marcado con  $I^{125}$  y dos anticuerpos contra él, uno de los cuales contiene una partícula magnetizable que permite la separación del conjugado antígeno-anticuerpo. El ensayo se basa en la competencia entre una cantidad desconocida de *GMPc* sin marca y una cantidad fija de *GMPc* marcado por un número limitado de sitios de unión en el anticuerpo específico para *GMPc*.

Se utilizaron 200 $\mu$ l de cada uno de los sobrenadantes, estos se precipitaron con un volumen igual de ácido tricloroacético al 10% p/v y el sobrenadante obtenido después de centrifugar a 2000 g/15 min fue el que se utilizó en el sistema de reacción.

El equipo para la determinación de GMPc contiene: 1) un amortiguador de acetato de sodio 0.05M pH 5.8, 2) un estándar que contiene 128 fmoles de GMPc/100 $\mu$ l de amortiguador de acetato de sodio 0.05M pH 5.8 al cual se le realizan una serie de 6 diluciones 1:2 con el fin de tener 5 estándares de 64, 32, 16, 8, 4 y 2 f moles/100  $\mu$ l para la curva estándar 3) un trazador que consiste de guanosina 3', 5' ácido fosfórico cíclico 2'-0-succinil 3-(<sup>125</sup>I) iodotirosina metil-éster, 41KBq, 1  $\mu$ Ci liofilizado el cual se reconstituye en amortiguador de acetato de sodio 0.05 M 4) un antisuero de conejo *anti-GMPcíclico*. Este se reconstituye en amortiguador de acetato de sodio y 5) un segundo anticuerpo *Amerlex-M* que viene listo para usarse.

En el sistema de reacción se incluyen un tubo para cuentas totales, un estándar cero (Bo), siete tubos para la curva estándar y un tubo para cada una de las muestras problema. El sistema de reacción es como se representa en la tabla IV.

**Tabla IV**

**Sistema de reacción para GMP cíclico**

	Cuentas totales	Estándar 0(Bo)	Estándares μl	Problemas
Amortiguador	-	100	-	-
Estándar	-	-	100	-
Problema	-	-	-	100
1° anticuerpo	-	100	100	100
Incubar 30°C/1 H.				
Trazador	100	100	100	100
Incubar 8°C/18 H.				
2° anticuerpo	-	500	500	500

Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm. Se decantó el sobrenadante y en el sedimento se contó la radioactividad en cuentas por minuto (cpm).

Para calcular los resultados de problemas y estándares y construir la curva de calibración se determina el % cpmBo/cpmTC con la siguiente fórmula:

$$\%Bo/TC = \text{cpm de Bo} / \text{cpmTC} \times 100$$

En donde:

Bo = cuentas por minuto (cpm) del blanco y

TC = cpm totales (del compuesto radioactivo)

También se determina el % de B(cpm del problema o estándar)/Bo(cpm del blanco) con la siguiente fórmula:

$$\%B/Bo = \text{cpm del estándar o muestra/cpm Bo} \times 100$$

La curva estándar se construye colocando el %B/Bo en el eje de las "Y" y la concentración de GMPc o el logaritmo de dicha concentración, para hacer la función lineal, en el eje de las "X". La concentración de los problemas se lee directamente interpolando en la curva.

*Grupos carbonilos (para medir peroxidación de proteínas): por medio de la técnica con 2,4-dinitrofenilhidracina (DNFI) (Shacter y col, 1996).* De cada uno de los sobrenadantes obtenidos, se tomaron dos alícuotas de 600µl (0.7-1.0 mg de proteína). Ambas muestras fueron precipitadas con 200µl de ácido tricloroacético al 10% y centrifugadas a 3000 g/10 min. Uno de los sedimentos obtenidos fue tratado con 300µl de HCl 2 N y el otro con igual volumen de DNFI al 0.2% p/v en HCl 2N. Las dos muestras se incubaron a 25°C durante 60 min en un baño con agitación y en seguida a cada una se les agregaron 400µl de una mezcla de etanol y acetato de etilo 1:1(w/v). Posteriormente se centrifugaron a 3000 g/10 min y los precipitados así obtenidos se lavaron 6 veces más con etanol-acetato de etilo. Los sedimentos se secaron cuidadosamente y se disolvieron en 600 µl de guanidina 6 M HCl disuelta en fosfato de sodio 20 mM pH de 6.5. Los restos insolubles se eliminaron por centrifugación a 3000g/10 min. La concentración de hidrazonas alifáticas formadas por la reacción de la DNFI con los grupos carbonilos de las proteínas se determinó corriendo un espectro de 200 a 800 nm a las muestras extraídas con guanidina. La diferencia de absorbencia en el pico máximo (376nm)

entre la muestra tratada con DNFI y la control tratada con HCl se determinó y el resultado fue expresado como nmoles de DNFI incorporados/mg de proteínas. Los cálculos se basaron en un coeficiente de extinción de  $21.0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para la mayoría de las hidrazonas alifáticas (Shacter y cols, 1996).

*Malondialdehido (producto de lipoperoxidación).* A una alícuota de 200  $\mu\text{l}$  de cada uno de los sobrenadantes se le agregaron 360  $\mu\text{l}$  de una mezcla de reacción que contenía 200  $\mu\text{l}$  de SDS al 7%, 2ml de HCl 0.1M, 300  $\mu\text{l}$  de ácido fosfotúngstico al 10%, 1ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.67% y para prevenir la propagación de la lipoperoxidación durante el ensayo, se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de hidroxitolueno 0.2 mM. Hecha la mezcla se dejaron hervir los tubos por 30 minutos en un baño de agua, se enfriaron y el del TBA aducto se extrajo con 500ul de butanol. Para la curva, estándares de malondialdehido, este se obtuvo por la hidrólisis ácida de 1,1,3,3, tetraetoxipropano durante toda la noche en presencia de HCl 0.1M (Sinnhuber,1958).

Como parámetro de referencia se midieron proteínas por el método de Lowry (1951).

*Estadística.* Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar. El análisis estadístico utilizado para comparar entre grupos fue la prueba de ANOVA y la prueba HSD de Tukey. Para comparar los porcentajes se utilizó la prueba de ARCOSENO. La  $P \leq 0.05$  fue considerada significativa en todos los casos.

## RESULTADOS

### Efecto de la L-nitro-arginina sobre la implantación y la mortalidad embrionaria ("A")

El número de sitios de implantación se consideró como el de zonas del útero que al 6º día de preñez (día de la implantación) se tiñeron con el colorante de azul de tripán, el número de embriones implantados correspondió a la suma de embriones al día 19 más los nódulos de reabsorción, el por ciento de implantación para cada grupo se calculó tomando como 100% de implantación al número de sus sitios de implantación y calculando que porcentaje tiene el número de embriones implantados. Como en la tabla se reportó como inhibición de la implantación, el valor encontrado se le resta a 100. Por lo anterior se aplican las siguientes fórmulas.

**Embriones implantados = embriones al día 19 + nódulos de reabsorción.**

$$\% \text{ de inhibición de la implantación} = 100 - \left[ \frac{\text{embriones implantados} \times 100}{\text{sitios de implantación}} \right]$$

La mortalidad embrionaria se determinó considerando como 100% al número de embriones implantados y calculando el porcentaje para los embriones al día 19.

De aquí se aplica la siguiente fórmula

$$\% \text{ de mortalidad embrionaria} = 100 - \left[ \frac{(\text{embriones al día 19}) \times 100}{\text{embriones implantados}} \right]$$

El número de sitios de implantación en el cuerno uterino tratado con L-nitro-arginina fue de  $4.9 \pm 1.3$ , no presentó diferencias significativas al compararse con el control ( $5.1 \pm 0.8$ ). Al día 19 de preñez en el mismo cuerno hubo cero embriones,  $3.2 \pm 2.1$  nódulos de reabsorción, 3.2 embriones implantados, la implantación se inhibió en un 34.7% y la mortalidad embrionaria fue del 100%; estos valores fueron significativamente diferentes a los del control (tabla V).

#### Efecto de la L-nitro-arginina + nitrosoglutatión (grupo "B") sobre la implantación y la mortalidad embrionaria

Entre el cuerno tratado con nitroso-glutatión y el control no hubo diferencias significativas:  $5.5 \pm 0.9$  sitios de implantación del derecho contra  $5.1 \pm 0.8$  del control;  $2.9 \pm 0.4$  embriones viables y  $1.2 \pm 0.7$  nódulos de reabsorción en el cuerno derecho y en el control  $3.2 \pm 0.5$  y  $1.1 \pm 0.7$  respectivamente; 4.1 embriones implantados en el derecho y 4.3 en el control; 18% inhibida la implantación en el derecho y en el control 15.7, finalmente el por ciento de la mortalidad de embriones en el cuerno derecho fue del 29.3% y del 25.6% en el control (tabla V).

#### Efecto de la nitro-L-arginina + L-arginina (grupo "C") sobre la implantación y la mortalidad embrionaria

Entre el cuerno uterino tratado con nitro-L-arginina + L-arginina y el control tampoco hubo diferencias. Para el cuerno derecho  $4.8 \pm 0.9$  sitios de implantación y para el control  $5.1 \pm 0.8$ ,  $3.1 \pm 0.8$  embriones al día 19 y  $1.3 \pm 0.9$  nódulos de reabsorción para el derecho y  $3.2 \pm 0.5$  y  $1.1 \pm 0$  para el control, 4.4 embriones

implantados en el derecho y 4.3 en el control, 8.4% inhibida la implantación en el derecho y 15.7% en el control y finalmente del 29.5 % fue la mortalidad de embriones en el tratado y 25.6% en el control. El propósito de este grupo es determinar si el sustrato, L-arginina, es capaz de revertir el efecto del inhibidor (tabla V).

#### Efecto de la D-Arginina (grupo "D") sobre la implantación y la mortalidad embrionaria

Para valorar el efecto de la cirugía y la contaminación posible del cuerno control (izquierdo) con los compuestos administrados en el derecho se diseñó este grupo. No se encontraron diferencias entre el cuerno izquierdo y el derecho tratados con D-arginina.

Como el cuerno control izquierdo y el derecho respondieron de manera similar al tratamiento con el análogo inactivo D-arginina, los resultados anteriores se pudieron resumir en una sola tabla (tabla V)



**Tabla V**

tratamiento	sitios de implantación	embriones al día 19	nódulos de reabsorción	embriones implantados	% de inhibición de implantación	% de mortalidad embrionaria
D-arginina (control: grupo "D")	5.1±0.8	3.2±0.5	1.1±0.7	4.3±0.6	15.7±5.1	25.6±5.5
L-nitro-arg. (grupo "A")	4.9±1.3	*0	*3.2±1.1	*3.2±1	*34.7±9.3	*100±0
L-nitro-arg +nitroso-glutación (grupo "B")	5.5±0.9	2.9±0.4	1.2±0.7	4.1±0.5	18.0±8.3	29.3±6.2
L-nitro-arg. +L-arg (grupo "C")	4.8±0.9	3.1±0.9	1.3±0.9	4.4±0.9	8.4±5.4	29.5±7.3

*En todos los casos N=10. X±DE. \*Con ANOVA y prueba HSD de Tukey diferente con respecto al control con p<0.001. Para el % de inhibición de la implantación y el % de mortalidad embrionaria por ARCOSENO hay diferencias entre el grupo "A" y el "D" con una p<0.01, entre los otros grupos la p>0.05 (no hay diferencias).*

### Concentración de GMPcíclico

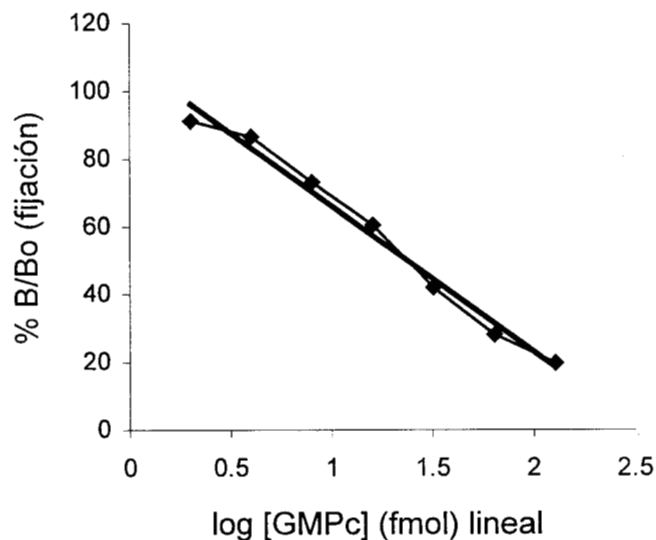
Los resultados de los problemas se calcularon en base a la curva de calibración de GMPc. La tabla VI muestra los resultados de las cuentas por minuto y los de las relaciones de %B/C y %B/Bo, con estos se montó la curva estándar como se indicó en la metodología. La figura 8 representa la curva de calibración de GMPc

**Tabla VI**

**Reporte de la radioactividad en cuentas por minuto (cpm) para la curva de  
GMPc**

Tubo	cpm	%B/TC	%B/Bo
Total de cuentas(TC)	14111	-	-
Fijación inespecífica	279	1.9	-
Estándar 0 (Bo)	6112	43.3	100
2 fmoles	5530	-	90.4
4 fmoles	5240	-	85.7
8 fmoles	4305	-	70.4
16 fmoles	3640	-	59.5
32 fmoles	2470	-	40.4
64 fmoles	1680	-	27.4
128 fmoles	1140	-	18.6
homogeneizado	5150	-	84.2

*Datos del ensayo de GMPcíclico para obtener la curva de calibración*



**Figura 8**

***Curva estándar de GMPcíclico***

Para determinar la concentración de cada problema, a las cpm se les determinó la relación %B/Bo. Por ejemplo, para una alícuota de homogeneizado que contuvo 3.04 mg de proteína y con una lectura en cpm de 5150 le correspondió una relación de %B/Bo de 84.2, que al interpolarse en la curva da un valor de 3.8 fmoles y al interpolarse en la recta da un valor de 3.77 (después de sacar el antilogaritmo). Este resultado al reportarse por mg de proteína dio 1.23 fmoles de GMPc/mgr de proteína.

En los sitios de implantación, la concentración de GMPc fue significativamente menor ( $p < 0.01$ ) en el cuerno derecho tratado con con nitro-L-arginina ( $1.243 \pm 0.30$  fmoles GMPc/mg de proteína) que en el control izquierdo con D-arginina ( $1.703 \pm 0.41$  fmoles GMPc/mg de proteína). En los sitios de implantación de las ratas tratadas con Nitro-L-Arginina + nitroso-glutación, la concentración de GMPc no varió significativamente con respecto a su control, D-Arg,  $1.601 \pm 0.32$  vs  $1.599 \pm 0.29$  fmoles GMPc/mg de proteína, lo mismo sucedió con el grupo de ratas tratadas con nitro-L-arginina + L-arginina:  $1.741 \pm 0.43$  contra  $1.70 \pm 0.72$ . En el grupo de ratas tratadas en ambos cuernos con D-arginina, tampoco hubo diferencias significativas:  $1.686 \pm 0.31$  en el izquierdo y  $1.711$  fmoles GMPC/mg de proteína en el derecho (figura 9).

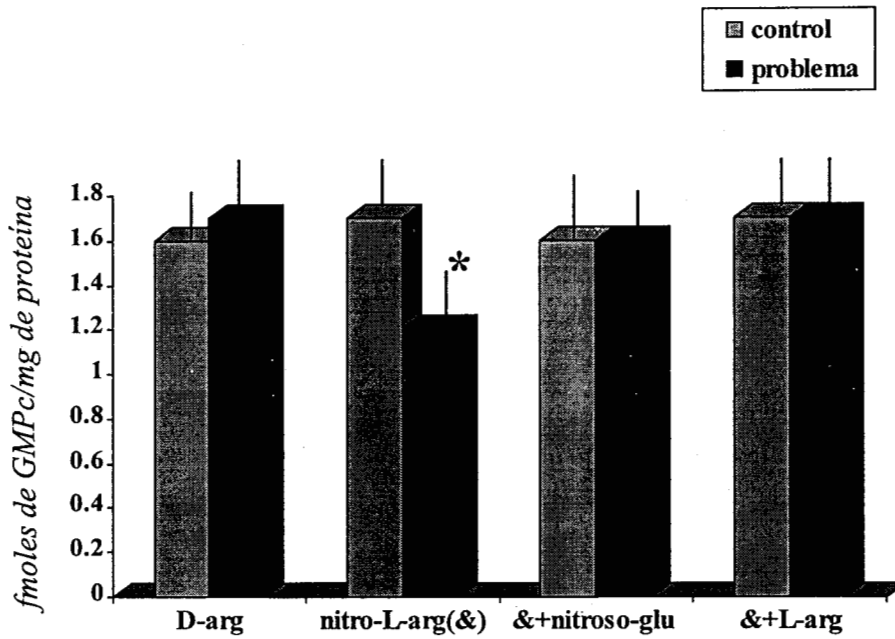
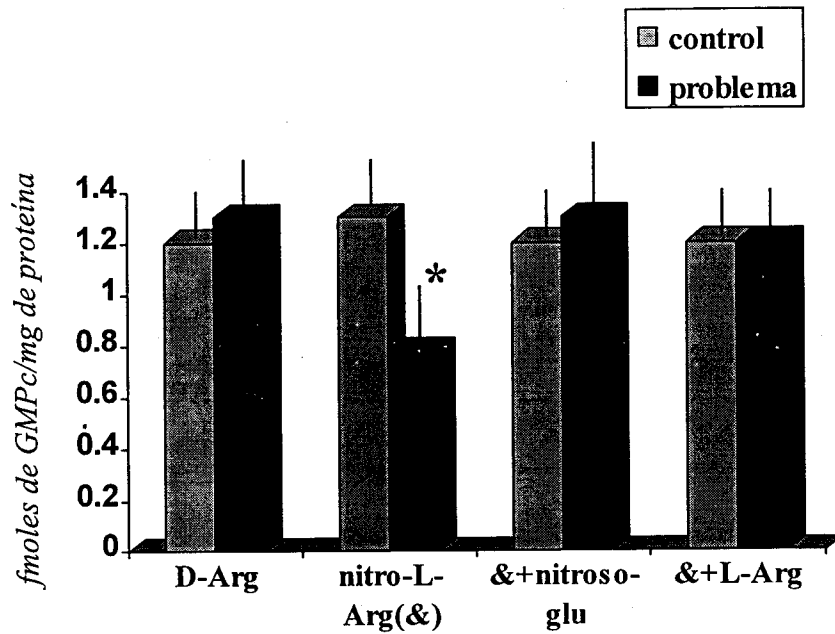


Figura 9

Efecto de la L-nitro-arginina (&) sobre la concentración de GMPc en el tejido uterino del sitio de implantación. D-arg:D-arginina, nitroso-glu:nitrosoglutación. Control:cuerno izquierdo tratado con D-arginina. Problema:cuerno derecho tratado con los compuestos indicados. \* diferencias significativas,  $p < 0.01$  por ANOVA y prueba HSD de Tukey.

En el no-sitio, el comportamiento fue similar, el cuerno tratado con L-nitro-arginina, tuvo menor concentración de GMPc que su control D-arginina:  $0.780 \pm 0.23$  y  $1.302 \pm 0.31$  respectivamente. Los cuernos tratados con L-nitro-arginina + nitroso glutatión, nitro-L-arg + L-arg y D-arg no tuvieron diferencias significativas con respecto a su control:  $1.331 \pm 0.4$  vs  $1.296 \pm 0.5$ ,  $1.250 \pm 0.31$  vs  $1.208 \pm 0.4$  y  $1.355 \pm 0.55$  vs  $1.299 \pm 0.6$  fmoles GMPc/mg de proteína (figura 10).



**Figura 10**

Efecto de la L-nitro-arginina (&) sobre la concentración de GMPC en el tejido uterino del no-sitio de implantación. D-arg:D-arginina, nitroso-glu:nitrosoglutación. Control:cuerno izquierdo tratado con D-arginina. Problema:cuerno derecho tratado con los compuestos indicados. \* diferencias significativas,  $p < 0.01$  al comparar con su control por ANOVA y prueba de HSD de Tukey.

Al comparar la concentración de GMPc entre el sitio y el no-sitio encontramos que en todos los casos el sitio fue mayor significativamente con  $p < 0.05$  (tabla VII y figura 11).

**TABLA VII**

**GMPc:datos comparativos entre el sitio y el no-sitio**

	D-arg	L-nitro-arg(&)	&+nitroso-glu	&+L-arg
sitio	1.70±0.6*	1.24±0.4*	1.60±0.5	1.74±0.7*
no-sitio	1.30±0.3	0.78±0.2	1.33±0.4	1.25±0.5

*X±DE. Diferencias significativas al comparar con el no-sitio. \* $p < 0.05$ . N=10 por ANOVA y prueba HSD de Tukey.*

#### Peroxidación de proteínas

Para determinar la peroxidación de proteínas se corrieron en cada experimento dos espectros multiples, uno para el cuerno uterino tratado con el inhibidor y otro para el control tratado con D-arginina. Las fenilhidrazonas que se forman cuando los grupos carbonílos reaccionan con la dinitrofenilhidracina (DNFH) absorben a 375 nm. Para cada problema se metió un blanco de su tejido, el que después se restó, pero que no contiene DNFH, además, se corrió un espectro de DNFH (tabla VIII y figura 11).



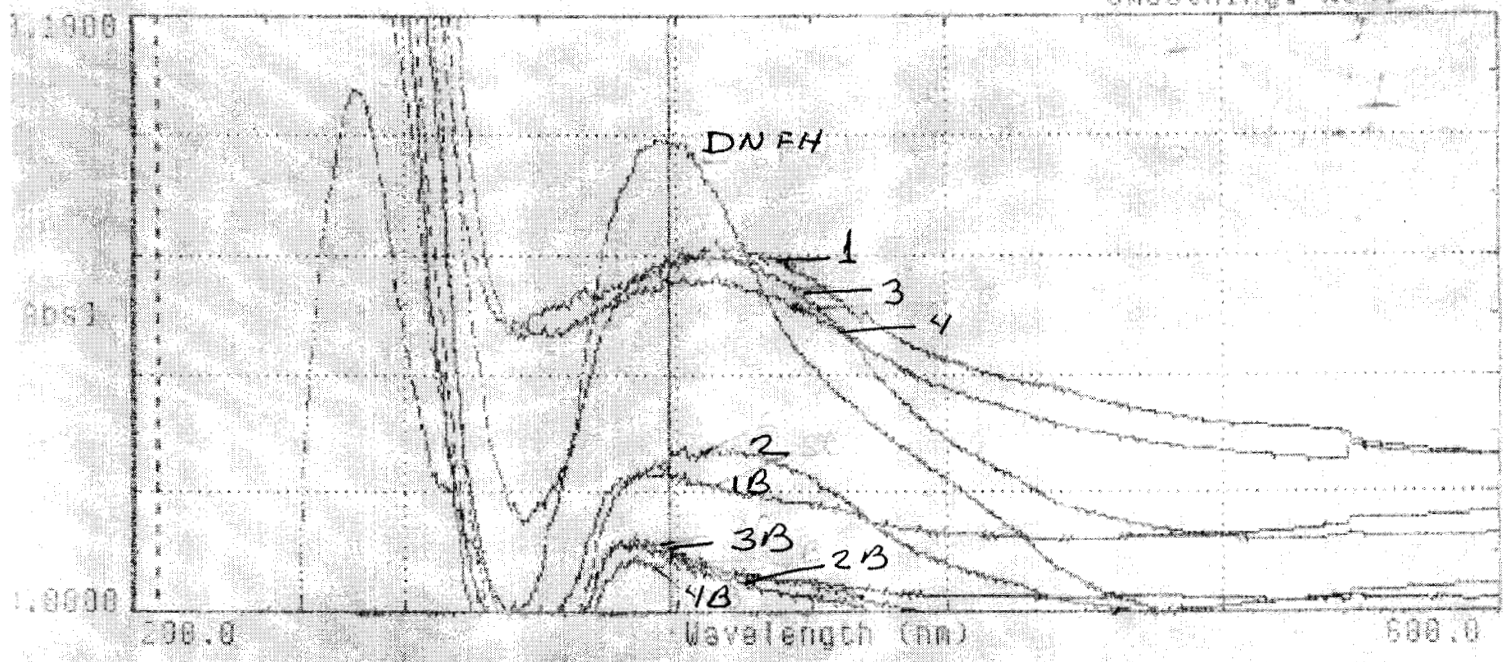
**TABLA VIII**

No	muestra	absorbencia del problema (P)	absorbencia del Blanco (B)	absorbencia real
1	cuerno L-nitro-arg.-sitio	0.05852	0.02325	.03527
2	cuerno L-nitro-arg.-no sitio	0.02579	0.00957	0.01622
3	cuerno-D-arg.-sitio	0.05797	0.01079	0.04718
4	Cuerno D-arg.-no sitio	0.05429	0.00761	0.04668
5	DNFH	0.07901	-	0.07901

*Absorción a 376 nm. de cada uno de los problemas y sus blancos respectivos (figura 11)*

Scan directory: VI	Function: Scan	Wavelength: 350.0	FAULT	
Start wl: 200 nm			MISCANS	
End wl: 800 nm			one	
Overlay scans: [Ye			m/min	
A:\WORK_001 (1200)	A:\WORK_001	0.02325	A:\WORK_007	0.00761
A:\WORK_005 (1200)	A:\WORK_002	0.05852	A:\WORK_008	0.05429
A:\WORK_009 (1200)	A:\WORK_003	0.00957	A:\WORK_009	0.07901
	A:\WORK_004	0.02579		
	A:\WORK_005	0.01079		
	A:\WORK_006	0.05297		

Functions: Scan Smoothing: None

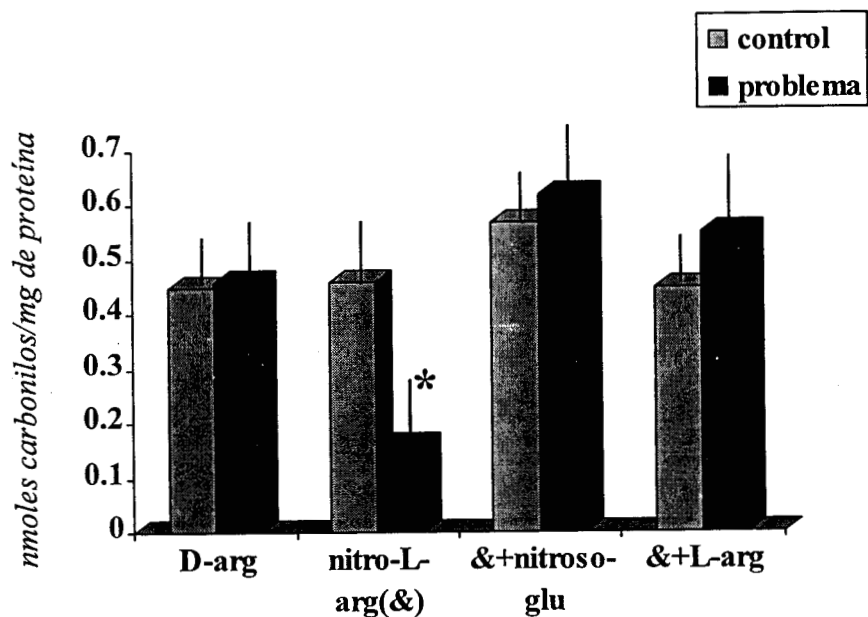


LANK [VIS ON] RediScan DEVICES 800.0 nm TIME DATE TEMP DEL  
 ATCH OFF [UV ON] RediRead PntScrn =0.0490 Abs 10:48 07/05/98 N/A 1

Figura 11

Espectro de nitrofenilhidrazonas

En el sitio de implantación; la concentración de carbonilos en el cuerno tratado con nitro-L-arginina fue considerablemente menor que su control,  $0.161 \pm 0.04$  y  $0.467 \pm 0.14$  nmoles de carbonilos/mg de proteína. En el mismo tejido, los otros grupos no presentaron diferencias significativas al compararse con su cuerno control:  $0.62 \pm 0.24$  y  $0.57 \pm 0.25$  para nitro-L-arginina + nitroso-glutación,  $0.55 \pm 0.14$  y  $0.45 \pm 0.16$  para nitro-L-arginina + L-arginina y para D-arginina  $0.46 \pm 0.17$  y  $0.45 \pm 0.12$  nmoles de carbonilos/mg de proteína (figura 12).



**Figura 12**

Efecto de la L-nitro-arginina (&) sobre la peroxidación de proteínas en el tejido uterino del sitio de implantación. D-arg:D-arginina, nitroso-glu:nitrosoglutatión. Control: cuerno izquierdo tratado con D-arginina. Problema: cuerno derecho tratado con los compuestos indicados \*diferencia por ANOVA y prueba HSD de Tukey al comparar con su control,  $p < 0.001$ .

En el tejido del no-sitio no hubo cambios significativos al comparar los cuernos tratados con sus respectivos controles. nitro-L-arginina:  $0.12 \pm 0.06$  y  $0.16 \pm 0.07$ , nitro-L-arginina + nitroso-glutación:  $0.14 \pm 0.04$  y  $0.16 \pm 0.05$ , nitro-L-arginina + L-arginina:  $0.19 \pm 0.04$  y  $0.15 \pm 0.03$  y para D-arginina  $0.16 \pm 0.04$  y  $0.15 \pm 0.03$  (figura 13).

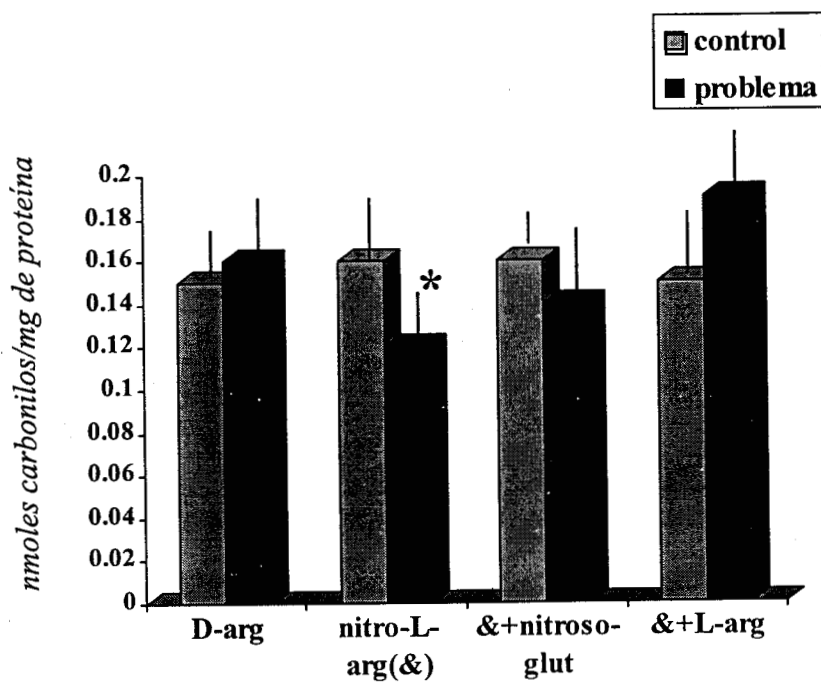


Figura 13

Efecto de la L-nitro-arginina (&) sobre la peroxidación de proteínas en el tejido uterino del no-sitio de implantación. D-arg:D-arginina, nitroso-glu:nitrosoglutación. Control:cuerno izquierdo tratado con D-arginina. Problema:cuerno derecho tratado con los compuestos indicados.

\*diferencias con respecto a su control,  $p < 0.01$  por ANOVA y HSD de Tukey.

Al comparar la peroxidación de proteínas entre sitio y no sitio las diferencias en todos los casos fueron significativas con una  $p < 0.001$  como se indica en la tabla IXI.

**Tabla IX**

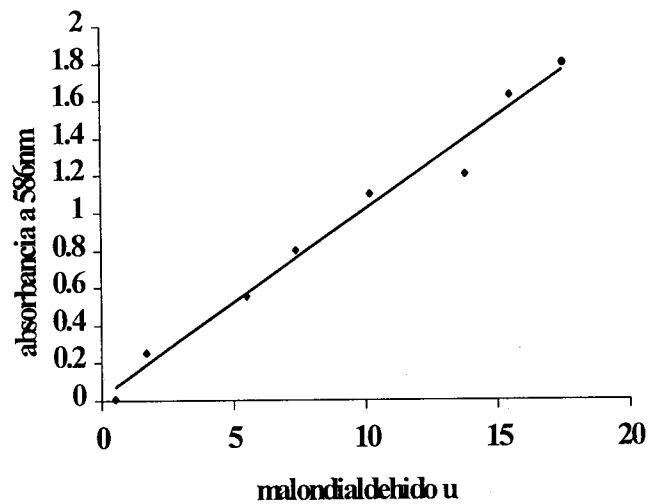
**Peroxidación de proteínas: datos comparativos entre el sitio y el no-sitio**

	D-arg	L-nitro-arg(&)	&+nitroso-glu	&+L-nitro-arg
sitio	*0.46±0.18	0.160±0.06	*0.62±0.22	*0.55±0.16
no-sitio	0.15±0.07	0.12±0.05	0.14±0.04	0.19±0.06

*X±DE. Diferencias significativas al comparar con el no-sitio. \* $p < 0.01$ . por ANOVA y HSD de Tukey. N=10 para todos los grupos.*

Peroxidación de lípidos.

Para determinar la concentración de malondialdehído, como una medida del grado de lipoperoxidación, se montó una curva estándar de 1,1,3,3,3 tetrametoxipropano, cuyos resultados aparecen en la figura 14



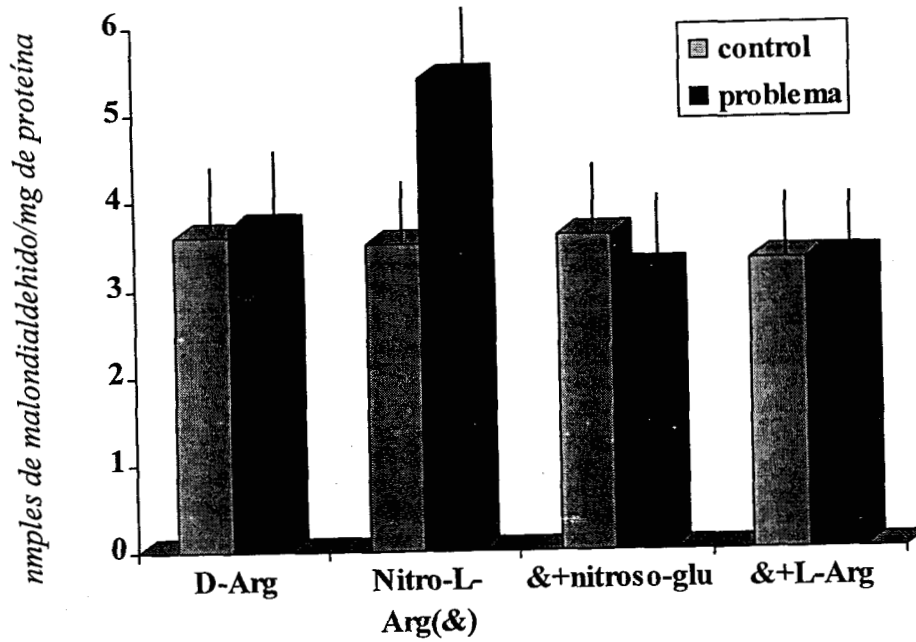
**Figura 14**

**Curva estandar de malondialdehído**

Los resultados de los problemas se determinan interpolando las absorbancias de los problemas en la curva y multiplicando por la dilución de la muestra.

En el sitio de implantación, el nivel de peroxidación de lípidos fue significativamente mayor ( $5.42 \pm 1.14$  nmoles malondialdehído/mg de proteína) en el cuerno uterino tratado con nitro-L-arginina que en su control ( $3.59 \pm 0.71$ ). Los otros grupos no presentaron diferencias al comparar los cuernos problemas con sus controles: nitro-L-arginina + nitroso-glutación:  $3.24 \pm 0.91$  y  $3.65 \pm 1.03$ ; nitro-L-arginina + L-arginina:  $3.36 \pm 0.71$  y  $3.09 \pm 0.85$  y D-arginina:  $3.77 \pm 1.42$  y  $3.65 \pm 1.52$  (figura 15)





**Figura 15**

Efecto de la L-nitro-arginina (&) sobre la lipoperoxidación en el tejido uterino del sitio de implantación. D-arg:D-arginina, nitroso-glu:nitrosoglutatión. Control:cuerno izquierdo tratado con D-arginina. Problema:cuerno derecho tratado con los compuestos indicados \*diferencias al comparar con su control por ANOVA y HSD de Tukey  $p < 0.01$

En el no-sitio de implantación, no hubo diferencias significativas. nitro-L-arginina:  $4.264 \pm 1.43$  en el cuerno problema contra  $3.590 \pm 1.24$  nmoles de malondialdehído/mg de proteína del control; nitro-L-arginina + nitroso-glutación:  $3.131 \pm 0.99$  contra  $3.54 \pm 0.89$ ; nitro-L-arginina + L-arginina:  $3.24 \pm 1.4$  y  $3.48 \pm 0.61$  y D-arginina:  $3.388 \pm 0.89$  contra  $3.44 \pm 0.55$  (figura 16).

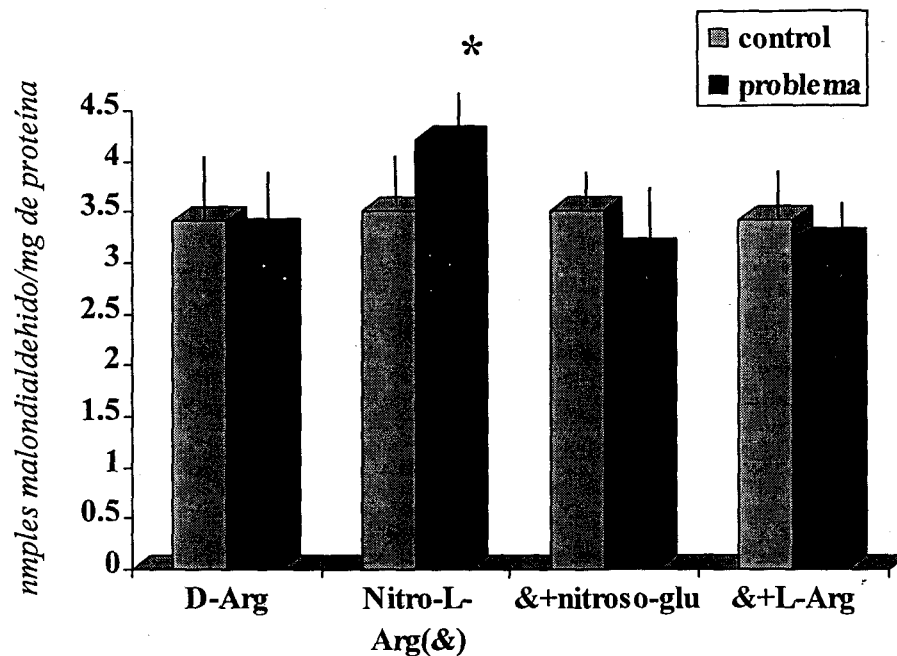


Figura 16

Efecto de la L-nitro-arginina (&) sobre lipoperoxidación en el tejido uterino del no-sitio de implantación. D-arg:D-arginina, nitroso-glu:nitrosoglutación. Control:cuerno izquierdo tratado con D-arginina. Problema:cuerno derecho tratado con los compuestos indicados. \*diferencias con respecto al control, por ANOVA y HSD de Tukey  $p < 0.01$ .

Al comparar el nivel de lipoperoxidación entre el sitio y el no sitio solo se encontraron diferencias en el tratado con L-nitro-arginina, como lo muestra la tabla X.

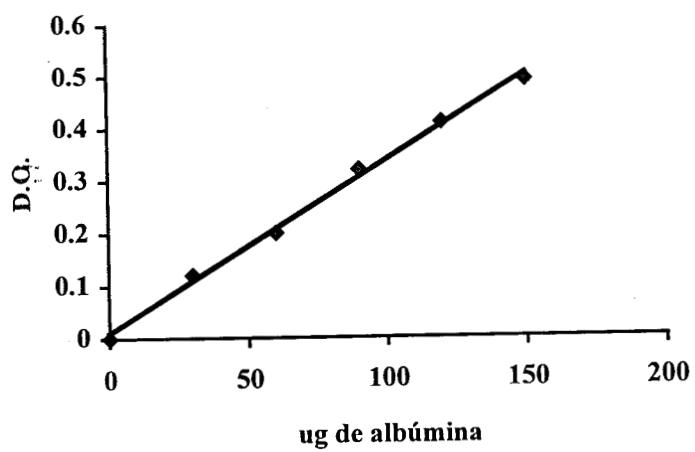
**TABLA X**

**Lipoperoxidación: datos comparativos entre el sitio y el no sitio**

	D-arg	L-nitro-arg(%)	&+nitroso-glu	&+L-arg
sitio	3.7±1.1	5.42±1.8	3.24±1.2	3.36±1.5
No-sitio	3.4±1.1	4.26±1.7	3.13±1.2	3.80±1.1

*X±DE. No hay diferencias por ANOVA y HSD Tukey al comparar con el no-sitio con  $p < 0.05$ . N=10.*

Todas las determinaciones fueron reportadas por 1mg de proteína. La determinación de proteínas para cada homogeneizado se realizó interpolando la densidad óptica de cada problema en una curva estándar de albúmina bovina con las concentraciones que se muestran en la figura 17.



**Figura 17**

**Curva estándar de proteínas**

## DISCUSIÓN

En la actualidad se sabe que el \*NO, vía GMPc, es uno de los relajantes biológicos más importantes, hay evidencias que sugieren que el tono vasorelajado de la preñez se debe al \*NO; ya que éste se encuentra elevado durante el embarazo y los inhibidores de su síntesis producen hipertensión y rechazo del embrión. La mayoría de estos trabajos se han limitado a las determinaciones plasmáticas de \*NO y GMPc y son escasos los que han hecho las determinaciones *in situ* y en una etapa definida de la preñez (Laloraya y Kumar, 1989 y Nathan, 1992).

La implantación del embrión es un fenómeno clave en el establecimiento adecuado de la preñez, ya que significa la primera interacción entre el endometrio materno y el blastocisto y cualquier alteración durante esta etapa resulta en un desarrollo anormal de la gestación o incluso el rechazo del feto (Gerda y cols, 1992).

La implantación del embrión en la rata, un evento regulado por estrógenos y progesterona, ocurre al 6º día de preñez y es precedido por un incremento en la permeabilidad vascular y la formación de edema. Estos procesos son esenciales para la subsecuente formación del tejido decidual en los sitios donde los blastocistos se implantaran (Tabibzadeh y Babaknia, 1995).

El incremento local en la permeabilidad vascular (sitios de implantación) puede ser inducido por una diversidad de mediadores proinflamatorios que son producidos y liberados bajo la influencia de un estímulo embrionario, tales como prostaglandinas, angiotensina, histamina, bradicinina y el factor activador de plaquetas generados por el útero y los tejidos embrionarios. Se ha demostrado que esas sustancias inducen o

modulan la generación de  $\text{NO}$  (Moncada y cols, 1991), por lo que se propone que el  $\text{NO}$  vía GMPc tiene un papel importante en la transformación de un endometrio refractario a uno receptivo. En otro trabajo realizado por nuestro grupo, se demostró que la concentración de GMPc se encontró más elevada en el sitio de implantación que en el no sitio, y que el aumento del GMPc se ha relacionado con la presencia del edema (Vilar-Rojas y Hicks, 1982).

Nosotros encontramos que la administración intraluminal del inhibidor específico de la óxido nítrico sintasa, Nw-nitro-L-arginina, al 5o día de preñez en la tarde, disminuyó la implantación en un 34.7% y provocó la mortandad en el 100% de los embriones al día 19 de preñez, no obstante, la permeabilidad vascular determinada por el número de zonas teñidas, no se vio afectada.

Cuando el inhibidor, L-nitro-arginina, fue administrado junto con el donador de  $\text{NO}$ , el nitroso-glutación, los efectos fueron revertidos, con lo que se demostró que el  $\text{NO}$  es necesario durante la implantación y no la citrulina. Cuando se administró el sustrato L-arginina junto con la L-nitro-arginina los resultados también fueron semejantes a los del control (cuerno uterino izquierdo tratado con D-arginina), lo que confirma que el  $\text{NO}$  proviene de la arginina.

Aunque la permeabilidad vascular no se vio afectada, si disminuyó la implantación y suprimió el desarrollo embrionario. La concentración de GMPc en el tejido uterino también disminuyó, por lo que nosotros pensamos que la presencia de la vía arginina- $\text{NO}$ -GMPc juega un papel importante en el útero durante la implantación.

Nuestros resultados parecen indicar que la implantación y el desarrollo embrionario temprano del embrión necesitan no solo de una producción mayor de GMPcíclico en el útero, sino también de un estado muy especial que requiere de un aumento de radicales libres. Encontramos que el nivel de peroxidación de proteínas en el sitio de implantación se disminuyó al inhibir la síntesis de  $\text{NO}$ , lo que nos hace pensar que el  $\text{NO}$  participa no solo por sus efectos directos sobre la guanilil ciclasa, sino que también una parte del óxido nítrico es indispensable para la formación de especies reactivas del  $\text{NO}$  que finalmente también son importantes en el proceso.

Con respecto a los lípidos, encontramos que el nivel de peroxidación se incrementó al inhibir la síntesis del  $\text{NO}$ . Esto indica que el  $\text{NO}$  puede estar regulando la peroxidación lipídica vía anión superóxido (Hubel y cols, 1989). Laloraya y cols (1989) demostraron en el útero de ratón al 5° día de preñez se encuentra aumentada la producción de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y disminuida la de superóxido dismutasa con respecto a los días anteriores y posteriores. Estos mismos autores encontraron una correlación positiva entre los niveles de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y el estado de fluidez de la membrana y la polaridad de las células endometriales (Laloraya, 1990 y Laloraya y cols, 1996).

Novaro y cols. (1996) demostraron en el tejido uterino de la rata, que la actividad de la óxido nítrico sintasa se eleva significativamente al día 5 de preñez con un perfil similar al de las prostaglandinas E y  $\text{F}_{2\alpha}$  por lo que ellos sugieren la existencia de un sistema dependiente del óxido nítrico el cual regula la producción de prostaglandinas. Se ha demostrado que las prostaglandinas  $\text{E}_2$  y  $\text{F}_{2\alpha}$  son mediadores del efecto de los estrógenos sobre el aumento de permeabilidad vascular que debe prevalecer en el



sitio de implantación y que un desequilibrio en la relación de PGs  $E_2/F_{2\alpha}$  suprime la respuesta vascular y la implantación (Kennedy, 1977). Aquí se observó que la permeabilidad vascular no se vio afectada al tratar con el inhibidor de la óxido nítrico sintasa (Nw-nitro-L-arginina), por lo que pensamos que durante la implantación, el óxido nítrico presenta al menos dos rutas de acción finamente sincronizadas en el tiempo, una a través de la activación que ejerce este radical libre sobre la ciclooxigenasa (Salvemini y cols, 1993), y la otra sobre la guanilil ciclasa (Ignarro, 1992 y Traylor, 1992). Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con el inhibidor, disminuye significativamente la concentración de GMPc en el tejido uterino al día 6 de preñez.

Es importante destacar, que la concentración de GMPc aumentada en el sitio de implantación con respecto a los no sitios, lo que hace pensar en la participación de dos isoformas de la óxido nítrico sintasa, que por un lado, pudieran inhibirse con la Nw-nitro-L-arginina en diferente grado y por el otro tener diferente regulación hormonal. Van Buren y cols (1992) trabajando con ovejas, encontraron que la Nw-nitro-L-arginina-metil-éster, un inhibidor de la síntesis de  $^*NO$ , antagoniza en el útero el aumento del flujo sanguíneo producido por los estrógenos, además, Magnes y col (1992) encontraron que este mismo inhibidor impide el aumento en la concentración de GMPc provocado por la administración de las mismas hormonas. Por otro lado, los estudios realizados hasta la fecha conducen a pensar que durante la implantación se activa e induce la óxido nítrico constitutiva e inducible respectivamente; ya que se trata de un proceso que requiere del aumento de fluidez de las membranas y la

migración de macrófagos al útero (Wood, 1990) y en donde los estrógenos y la progesterona juegan un papel muy importante en la formación y destino del  $\text{NO}$ . Con respecto a lo último, Sugino y cols (Sugino, 1996) reportaron que la progesterona contribuye en el mantenimiento del  $\text{NO}$  al inhibir la producción del anión superóxido. Estos resultados y los nuestros sugieren que el  $\text{NO}$  y el GMPc tienen un papel muy importante en la regulación del flujo sanguíneo durante la implantación (Palmer y cols, 1987; Ignarro y cols, 1987; Marletta y cols, 1988 y Garthwaite y cols, 1988). Recientemente Purcell y cols. (1999) demostraron por inmunohistoquímica que en el sitio de implantación del ratón se encontraron más elevadas tanto la isoforma inducible como las constitutivas (endotelial y neuronal) que en el intersitio, por lo que se supone que el  $\text{NO}$  participa en diversas funciones, como son regulación de la inmunosupresión y vasoregulación

El sitio de implantación presentó mayor índice de peroxidación de proteínas que el tejido adyacente (aproximadamente el triple), el no sitio, esta diferencia puede deberse a que durante la etapa de implantación la membrana del endometrio se fluidifica con el fin de que se liberen y espongan ciertos grupos que normalmente están ocultos (Hicks y cols, 1994 y Durán-Reyes y cols, 1994), o bien, que algunos de los productos de la peroxidación de las proteínas sean indispensables para la formación de la decidua o la implantación del embrión. Otros autores (Laloraya, 1990; Laloraya y cols, 1996 y Sudhir y cols, 1993) descubrieron que la peroxidación de lípidos se encuentra considerablemente más elevada al 5º día de implantación en la rata (día de la implantación), y ellos suponen que la fluidez que presenta la

membrana del endometrio durante esta etapa es una consecuencia de sus resultados.

La menor peroxidación de proteínas en el cuerno uterino tratado con Nw-nitro-L-arginina nos conduce a suponer que disminuye la formación de peroxinitrito (HOO-) al no haber suficiente  $\cdot\text{NO}$  y en consecuencia no se pueden producir con tanta eficiencia radicales  $\cdot\text{OH}$ , que son los más reactivos. El anión superóxido producido por los leucocitos induce una oxidación de proteínas pobre o de otra manera requeriría que la superóxido dismutasa (SOD) (Laloraya, 1989) produjera peróxido de hidrógeno y este por medio de la reacción de Fenton, radicales  $\cdot\text{OH}$ , lo cual es poco probable por la presencia de catalasa y peroxidasa en el útero durante la etapa de máxima receptividad (Singh y cols, 1996 y Baiza y cols, 2000) .

Csaba y col (1992 y 1997) demostraron que la  $\text{N}^{\text{G}}$ -methyl-L-arginine disminuye la oxidación de proteínas inducida por lipolisacáridos en macrófagos por un mecanismo dependiente de peroxinitrito y el grupo de Melkova y cols. (1997) encontraron que la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible estimula la apoptosis en cultivo de tejidos. Por otro lado, se demostró que el óxido nítrico y el peroxinitrito juegan un papel muy importante en la remoción de neutrófilos al estimular el proceso apoptótico en estas células (Morgan y cols, 1998). Es probable que el peroxinitrito y los productos de peroxidación participen en el proceso apoptótico que se efectúa no solo en el epitelio sino también en los neutrófilos presentes en el endometrio durante la implantación (Parr, 1987).

En conclusión, la administración del inhibidor de la síntesis de óxido nítrico, la Nw-nitro-L-arginina, durante la etapa de máxima receptividad en la rata, disminuye el porcentaje de implantación, suprime el desarrollo embrionario y en las células endometriales disminuye las concentraciones de cGMP y grupos carbonilos presentes en las proteínas, por lo que suponemos que el  $^*NO$  ejerce sus efectos por un lado activando a la guanilato y por el otro combinandose con el anión superóxido.

### CONCLUSIÓN

La administración intraluminal del inhibidor competitivo de la óxido nítrico sintasa, la L-nitro-arginina, disminuye en un 35% la implantación en la rata sin alterar la permeabilidad vascular y en aquellos embriones que se implantaron evita su desarrollo. Además, en el tejido endometrial el inhibidor disminuye la concentración de GMPcíclico, aumenta el nivel de peroxidación de lípidos y disminuye la peroxidación de proteínas. El efecto del inhibidor específico de la óxido nítrico sintasa se manifiesta de manera creciente: la permeabilidad vascular no se ve afectada, la implantación es parcialmente suprimida y finalmente el embrión se reabsorbe. En el sitio donde el embrión será implantado se requiere de un estado vasodilatado apropiado para permitir la nutrición y protección del mismo. Esta demostrado que el óxido nítrico es el responsable es el responsable de esta condición. En el sitio de implantación se requiere de una producción balanceada de óxido nítrico y anión superóxido ( $O_2^{*-}$ ), si ésta se pierde por la disminución del primero predomina la formación del segundo. Cuando la relación  $^*NO/O_2^{*-}$  disminuye, predominan los

efectos indirectos o secundarios del  $\cdot\text{NO}$  y de esta manera la peroxidación de biomoléculas. Por otro lado, el efecto directo del  $\cdot\text{NO}$  sobre la relajación del músculo liso disminuye. Bajo estas circunstancias las condiciones de hipoxia se van incrementando de tal manera que después de un tiempo el embrión, aunque ya este implantado, no cuenta con las condiciones de oxigenación y nutrición adecuadas que le permitan continuar con su desarrollo.

En resumen y apoyando la hipótesis, es indispensable la presencia del  $\cdot\text{NO}$  en el tejido uterino durante la etapa de implantación y se requieren de sus efectos directos e indirectos; la peroxidación de proteínas dependiente del peroxinitrito parece ser un evento necesario.

El papel que juega el  $\cdot\text{NO}$  durante la implantación aún no está bien establecido. Por ejemplo sería interesante demostrar que tanto esta contribuyendo del blastocisto en la síntesis de este radical y también hacer un seguimiento de la síntesis de  $\cdot\text{NO}$  en el útero después de la implantación para poder determinar en que momento empieza la reabsorción de los embriones.

## BIBLIOGRAFIA

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

Abu-Soud H.M., Wang J., Rousseau D.L., Fukuto J.M. y Ignarro L.J. Neuronal nitric oxide synthase self-inactivates by forming a ferrous-nitrosyl complex during aerobic catalysis. *J. Biol Chem* 1995;270:22997-23006.

Arnal J.F., Clamens S., Pechet C., Negre-Salvayre A. y Allera C. Ethinylestradiol does not enhance the expression of nitric oxide synthase in bovine endothelial cells but increases the release of bioactive nitric oxide by inhibiting superoxide anion production. *Proct. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996;93:4108-4113.

Baiza-Gutman L.A., Flores-Sánchez M.M., Díaz-Frores M. y Hicks J.J. Presence of uterine peroxidase activity in rat early pregnancy. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2000;32:255-262

Beckman J.S. y Smith C.M. SOD, and peroxynitrite. *Nature* 1993;364:584.

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

Bolli R. Oxygen-derived free radicals and myocardial reperfusion injury: an overview. *Cardiovasc Drugs Ther* 1991;5:249-68.

Buhimmschi Irina, Yalampalli C. y Dong Y-L. Involvement of a nitric oxide-guanosine monophosphate pathway in control human uterine contractility during pregnancy. *Am. Obstet Gynecol* 1995a;172:1577-84.

Buhimmschi Irina, Yalampalli Chandrasekhar, Chawliz Kristof y Garfiel Robert. Pre-eclampsia-like conditions produced by nitric oxide inhibition: effects of L-arginine, D-arginine and steroid hormones. *Human Reprod* 1995b;10(10)2773-2730.

Burdon HR. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radical Biol. Med*;1995;18(4):775-794-1995.

Conrad K.P. y Vernier K.A. Plasma level urinary excretion and metabolic production of cyclic GMP during gestation in rats. *Am. J. Physiol* 1989;16(4):1065-72.

Dawson T.M. y Snyder S.H. Gases as biological mensegers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J. Neurosci* 1994;14:5147-5159.

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

Doudlas W.E. Pharmacokinetics: The dynamics of drug absorption, distribution, and elimination. En The Pharmacological Basis of Therapeutics. New York: Macmillian Publishing Co.: 1995:603-647.

Doyle M.P. y Hoekstra J.W. J. Oxidation of nitrogen oxides by bound dioxygen in hemoproteins. Inorgan Biochem 1981;14:351-356.

Durán-Reyes G., Díaz-Flores M., Castillo S y Hicks JJ: Nuclear presence of two lysosomal enzymes in rat implantation sites. Int. J. Fertil 1994; 39(5):299-303, 1994.

Durán-Reyes G., Gómez-Meléndez M.R. y Hicks J.J. Importancia de los radicales libres durante el ciclo reproductor. Ginec. Obstet. Mex. 1998;66:371-376.

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

Forsterman U. Y Ishii K. Measurement of cyclic GMP as an indicator of nitric oxide production . En Feelish, M.; Stamler, J., eds. Methods in nitric oxide research. New York: Wiley; 1996:555-566.

Frank H., Hintze T., Bimboes D. y Remmer H. Monitoring lipid peroxidation by breath analysis: Endogenous hydrocarbons and their metabolic elimination. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1980;56:337-344.



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

Freeslich M. The biochemical pathways of nitric oxide formation from nitrovasodilators: appropriate choice of exogenous \*NO donors and aspects of preparations and handling of aqueous \*NO solutions. *J. Cardiovasc. Pharmacol* 1991;17:S25-S33.

Frenchi A.M., Chaud M., Rettori V., Suburo A., Mc. Cann S.M. y Gimeno M. Role of nitric oxide in eicosanoid synthesis in estrogen-treated rat uteri. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994;91:539-543.

Garthwaite J., Charles S.L. y Chess-Williams R. Endothelium derived relaxing factor on activation of NMDA receptors suggest role as intercellular messenger in the brain. *Nature (London)*;1988:336-388.

Geller D.A., Nussler A.K., Di Silvio M., Lowenstein C.J. Shapiro R.A., Wang S.C., Simmons R.L. y Biliar R.T. Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993;90:522-526.

Gerda G., Zeeman G., Dekker G., Herman P. y Kraayenbrink. Endothelial function in normal and pre-eclamptic pregnancy: a hypothesis. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 1992;43:113-122.

Glasser S.R., Mulholland S.K., Mani J., Julian M.I., Munir S., Lampelo, y Soares M.J. Blastocyst-endometrial relationships: Reciprocal interactions between uterine epithelial and stromal cells and blastocyst. 1991; *Troph. Res.*, 5:229-280

Gorbunov N. V. Osipov A.N., Day B.W., Zayas-Rivera B. y Kagan V.E. Reduction of ferrylmyoglobin and ferrylhemoglobin by nitric oxide: a protective mechanism against ferryl hemoprotein-induced oxidations. *Biochemistry* 1995;34:6689-6699.

Greenspoon J.S. y Kovacic A. Breech extraction facilitated by trinitrate sublingual spray. *Lancet* 1991;338:124-129

Griscavage J.M., Fukuto J.M. y Ignarro L.J. Nitric oxide inhibits neuronal nitric oxide synthase by interacting with the heme prosthetic group. Role of tetrahydrobiopterin in modulating the inhibitory action of nitric oxide. *J. Biol. Chem* 1994;269:21644-21649.

Griscavage J.M., Hobbs A.J. y Ignarro L.M. Negative modulation of nitric oxide synthase by nitric oxide and nitroso compounds. *Adv. Pharmacol* 1995;34:215-234.

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.

Hicks JJ. Regulación endócrina de la implantación del cigoto de mamíferos. *Gaceta Méd Méx* 1983; 117:510.

Hicks JJ., Durán-Reyes G. y Diaz-Flores M.: Effect of dexamethasone as an inhibitor of implantation and embryo development in rat; lysosomal role. *Contraception* 1994;50(6):581-589.

Hicks J.J. En prensa. *Bioquímica*. Interamericana Mc. Graw Hill. México

Hubel CA., Roberts JM., Taylor RN., Musci TJ., Rodgers GM. y, McLaughlin MK. Lipid peroxidation in pregnancy:: new perspectives on pre-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 1989;161:1025-1034.

Hurshman A.R. y Marletta M.A. Nitric oxide complexes of inducible nitric oxide synthase:spectral characterization and effect on catalytic activity. *Biochemistry* 1995;34:5627-5634.

Ignarro L.J. Buga G.M., Wood K.S., Byrnes R.E. y Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987;84:9265-9269.

Ignarro I.J. Heme-dependent activation of cytosolic guanylate cyclase by nitric oxide: a widespread signal transduction mechanism. Biochem. Soc. Trans 1992;20:465-469.

Johnson DC. y Dey SK. Role of histamine in implantation: Dexametasone inhibits estradiol-induced implantation in the rat. Biol Reprod 1980; 22:1136.

Kanner J., Harel S. y Granit R. Nitric oxide as an antioxidant. Arch. Biochem Biophys 1991;289:130-136.

Kennedy, T. G.. Evidence for a role for prostaglandins in the initiation of blastocyst implantation in the rat. Biol. Reprod. 1977;16:286-291.

Kennedy T.G. y Lukash L.A. Induction of desidualization in rats by the intrauterine administration of prostaglandins. Biol. Reprod 1982;27(1):253-60.

Kik P. Conrad, Gary M., Joffe Harriet K. y Robet K. Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats. FASEB J. 1993;7:566-571.

Kneepkens C.M., Lepage G. y Roy C.C. The potential of the hydrocarbon breath test as a measure of lipid peroxidation of rat liver microsomal lipids. *Free Radic. Biol. Med.* 1994;17:127-160.

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

Laloraya M. y Kumar G.P., 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., Sudhir J., Monzy T., Swati K y Pradeep Kumar P. Estrogen surge: a regulatory switch for superoxide radical generation at implantation. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1996;39(5):933-940.

Lancaster J.R. Langrehr J.M. Bergonia H.A. Murase N., Simons R.L. y Hoffman R.A. EPR detection of heme and nonheme iron-containing protein nitrosylation by nitric oxide during rejection of heart allograft. *J. Biol. Chem.* 1992;267:10994-10998.

Lander H.M. y Ogiste J.S.. Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange. J. Biol.Chem 1995;270:7017-7020.

Lander H.M., Milbank A.J., Kraemer R.T., Ajar D.P. y Hempstead B.L. Redox regulation of cell signalling. Nature 1996;381:380-381.

Laval F. y Wink D.A., Laval J. Adiscussion of mechanism of \*NO genotoxicity. Implication of DNA repair proteins. Rev. Physiol. Biochem Pharmacol 1996;131:175-191.

Leone A.M., Palmer K.R., Francis P.L., Knowles R.G., Asthon D.S. y Moncada S. Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citruline. J. Biol: Chem. 1991;266:23790-23795.

Liao Q-P., Buhimmschi I., Saade G., Chdwalisz K. y Garfield R. Regulation of vascular adaptation and steroid hormones.Human Reprod 1996;11(12):2777-2784.

Loeckie L., Meerman J.H.N., Commandeur J.M.N. y Vermeulen N.P. Biomarkers of free radicals damage applications in experimental animals and in humans. Free Radicals Biol. Med. 1999;26(1/2):202-226.

Lowry O.H., Rosembrough N.J. y Farr A.L. Protein measure with the folin-phenol reagent. J.Biol. Chem. 1951;193:265-275.

Magness RR, Roy T, Rosenfeld CR: Endothelium-derived relaxing factor (EDFR) modulates estradiol-17 $\beta$  increases in uterine blood flow (UBF) in nonpregnant sheep (abstract 567). En: Proceeding of the thirty-ninth annual meeting of the Society for Gynecologic investigation, San Antonio, Texas, March 18-21, 1992.

Marletta M.A. Yoon P.S., Iyengar R., Leat C.D. y Wishnok J.S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide as intermediate. Biochemistry 1988;24:8706-8711.

Melkova Z., Sean B.L. y Rodríguez D. Bcl-2 prevents nitric oxide mediated apoptosis and poli (ADP-ribose) polymerase cleavage. FEBS Letter 1997;403:273-278.

Molnar M., Suto T., 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.

Moncada S., Palmer RM. y Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. (Review) Pharmacol. Rev 1991; 43, 109-142.

Morgan G., Blaylock B.H., Cuthbertson H.F. Galey N. y Ranal F, The effect of nitric oxide and peroxyxynitrite on apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes. Free Radical Biol. Med. 1998;25(6):748-752.

Myatt L. Brewer A.S. y Langdon G. Attenuation of the vasoconstrictor effects of thromboxane and endothelin by nitric oxide in the human fetal placental circulation. Am. J. Obstet. Gynecol 1992;166(1pt):224-30.

Naoki Unno, Mencon M., Smith M., Douglas E. y Mitchell P. Hiperpermeability of intestinal epithelial monolayers is induced by °NO:effect of low extracellular pH. Am. J. Physiol. 1997;35:G923-G934.

Nathan C. y Xie Q.W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. J. Biol. Chem. 1994;;269:13725-13728.

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

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

Novaro V., Rettori V., González E.T., Jawerbaum A., Faletti A., Canteros G. y De Gimeno M.A.F. Interaction between uterine PGE and PGF<sub>2α</sub> production and the



nitridergic system during embryonic implantation in the rat. Prostaglandins 1996;51:363-376.

Padmaja S. y Huie R.E. The reaction of nitric oxide with organic peroxy radicals. Biochem. Biophys. Res. Commun 1993;195:539-544.

Palmer M.R.J., Ferrige A.G. y Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. Nature (London) 1987;327:524-526.

Palmer R.M.J., Ashton D.S. y Moncada S. Vascular endothelial cells synthesise nitric oxide from L-arginine. Nature (London) 1988;333:664-666.

Parr E.L. Apoptosis as the mode of the uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats. Biol Reprod 1987;36:211-225.

Paz M. Fluckiger, Kagan H. y Gallop PM. Specific detection of quinoprotein by redox cycling staining. J Biol Chem 1991;266:689-692.

Pryor W.A. y Squadrito G.L. The chemistry of peroxynitrite and peroxynitrous acid: Products from the reaction of nitric oxide with superoxide. Am J. Phys 1996;268:L699-L721.

Psychoyos A.: Nouvelle contribution al l' oeuf chez la ratte. C.R. Hebd. Séanc. Acad. Sci Paris 1960;251:3073.

Psychoyos A. Endocrine control of egg implantations. En: Handbook of Physiology, edited by Greep, R.O., Astwood, E.G. and Geiger, S.R. Washington: American Physiological Society, 1973, p 187.

Psychoyos A. Hormonal control of uterine receptivity for nidation. J. Reprod. Fert. 1976 Suppl 17:36-42.

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

Puppo A. y Halliwell B. Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron: Is haemoglobin a biological Fenton reagent?. Biochem J. 1988;249:185-190.

Purcell T.L. Given R., Chwalisz K. y Garfield R.E. Nitric oxide synthase distribution during implantation in the mouse. Mol. Human. Reprod. 1999;5(5):467-75.

Radommsky. MW., Palmer RM. y Moncada S: Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. Lancet. 1987; 1057-1058.

Reinius S. Ultrastructure of blastocyst attachment in the mouse. *Cell Tissue Res* 1967;152:525-542.

Ress DD., Palmer RMJ. y Schulz R: Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br. J. Pharmacol* 1995;101:746-752.

Riely C.A. Cohen G. y Lieverman M. Ethane evolution : A new index of lipid peroxidation. *Science* 1974;183:208-212.

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

Shacter E., Williams J.A., Stadman R. y Levine R. *Free Radicals: a practical Approach. Mechanism of oxidative cell damage.* Edited by Neville A. Puchard and Frank J. Kelly. Oxford University press 1996. 159-162.

Shukovski Liora y Tsafiri A. The involvement of nitric oxide in the ovulatory process in the rat. *Endocrinology* 1994;135(5):2287-2290.

Sladek S.M., Regestein A.C., Lykins D. y Roberts J.M. Nitric oxide synthase activity in pregnant rabbit uterus decreases on the last day of pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol* 1993;169:1285-91.

Singh M.M., Trivedi R.R., Chauhan S.C., Srivastava .M., Makker S.R., Chowdhury S.R. y Kamboj V.P. Uterine estradiol and progesterone receptor concentration activities of certain antioxidant enzymes and dehydrogenases and histoarchitecture in relation to time of secretion of nidatory estrogen and high endometrial sensitivity in rat. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1996;5(2):215-223.

Sinnhuber R.O. y Yu T.C. 2-Thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity of fishery products. II. The cuantitative determination on malondialdehide. *Food Technol* 1958;12:9-12.

Stephen M., Sladek M.D. Anne C., Regenstein M.D. y David Likins M.A. Nitric oxide synthase activity in pregnant rabbit uterus decreases on the last day of pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol* 1993;169:1285-95.

Suburo A.M. y Chaud M. Distribution of neuronal and non neuronal NADPH diaphorases and nitric oxide synthases in rat uterine horns under different hormonal conditions. *Biol. Reprod.* 1995;52:631-637.

Sudhir J., Monzy T. y Laloraya M. Programmed lipid peroxidation of biomembranes generating linked phospholipids permitting local molecular mobility: a peroxidative theory of fluidity management. *Biochemical Biophys Res Commun* 1993;195(2):574-580.

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.

Szabo C. Role of the L-arginine-nitric oxide pathway in the changes in cerebrovascular reactivity following hemorrhagic hypotension and retransfusion. *Circ. Shock* 1992;37(4):307-16.

Szabó Csaba, Michael O' Connor y Andrew L. Salzman. Endogenously produced peroxynitrite induces the oxidation of mitochondrial and nuclear protein in immunoestimated macrophages. *FEBS Letters* 1997; 409:147-150

Tabibzadeh y Babaknia. The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. *Human Reprod.* 1995;10(6):1579-1602.

Traylor T.G. y Sharma V.S. Why °NO. *Biochemistry* 1992;31:2847-2849.

Turnbull AC. Maternal Mortality and present trends. En: Hypertension in pregnancy. Sharp F, Symonds EM, eds. Ithaca. NY: Perinatology Press. 1997:135-150.

Van Buren G., Da-Seng Yanf y Kenneth E. Estrogen-induced uterine vasodilatation is antagonized methyl ester, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1992;167:828-33.

Vanderford PA., Wonf JC. y Chang R. Diethylamine/nitric oxide (NO) adduct, an NO donor produces potent pulmonary and systemic vasodilation in intact newborn lambs. *J. Cardiovasc. Pharmacol* 1994; 23, 113-119.

Vanhoute, PM., Rubanyi GM. y Houston DS: Modulation of vascular smooth muscle contraction by the endothelium. *Ann.Rev. Physiol* 1986; 48:307-320.

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

Vilar-Rojas C. y Hicks J.J. Prostaglandinas y reproducción: ovulación, transporte e implantación. *Ginec. Obstet. Mex.* 1982b;50:15-20.

Weiner C.P., Martínez E.Z., Ghodsi A. y Chestnut D.H.. In vitro release of endothelium derived relaxing factor by acetylcholine is increased during the guinea pig pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1989;161:1599-1605.

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 D.A., Osawa Y., Darbyshire J.F., Jones C.R. Inhibition of cytochromes P450 by nitric oxide and nitric oxide-releasing agent. Arch. Biochem. Biophys. 1993;300:115-123.

Wink D.A., Nims R.W., Darbyshire J.F., Christodoulou D., Hanbauer I. y Cox G.W. Reaction kinetics for nitrosation of cysteine and glutathione in aerobic nitric oxide solutions at neutral pH. Insights into the fate and physiological effects of intermediates generated in the NO/O<sub>2</sub> reaction. Chem. Res. Toxicol 1994;7:519-525.

Wink D.A., Hanbauer L. y Grisham M.B. Direc and indirect effects of nitric oxide. Biologically relevant chemical reaction in biology of °NO. Methods Enzymol 1996;268:12-31.

Wink D.A., Cook J.A. y Kim S. Superoxide modulates the oxidation and nitrosation of thiols by nitric oxide derived reactive intermediates. J. Biol. Chem. 1997;272:11147-11151.

Wink D.A. y Mitchell J.B. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. Free Radical Biol. Med. 1998;25(4/5):434-456.

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

Yalampalli C. y Garfield RE. Inhibition of nitric oxide synthesis in rat during pregnancy produces signs similar to those of preeclampsia. *Am J. Obstet Gynecol* 1993; 169:1316-1320.

Yalampalli C., Izumi H., Byam-Smith M. y Gardfiel R.E. An L-arginine-nitric oxide guanosine monophosphate system exists in the uterus and inhibits contractility during pregnancy. *Am. J. Obstet Gynecol* 1994;170:175-85.

Zentella M., Saldaña Y. Papel fisiológico de los radicales libres. *Bol. Educ Bioq. (México)* 15(4):152-161 1996.





**NITRIC OXIDE SYNTHESIS INHIBITION SUPPRESSES IMPLANTATION AND  
 DECREASES cGMP CONCENTRATION AND PROTEIN PEROXIDATION**

Genoveva Durán-Reyes<sup>1</sup>, María del Rocío Gómez-Meléndez<sup>1</sup>, Gabriela Morali-de la Brena<sup>2</sup>,  
 Efraín Mercado-Pichardo<sup>3</sup>, Rafael Medina-Navarro<sup>1</sup>, Juan José Hicks-Gómez<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Coordinación de Investigación Médica, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico D.F., P.O. Box 12-855, Telephone Number 627-69-14, Fax Number 761-0952. <sup>2</sup>Unidad de Investigación Médica en Farmacología, C.M.N Siglo XXI, IMSS. <sup>3</sup>Area de Reproducción Animal Asistida, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa México D.F. <sup>4</sup>Unidad de Investigación del Hospital Juárez de México, México D.F.

(Received in final form July 19, 1999)

**Summary**

The effect of Nw-nitro-L-arginine on embryonic implantation and cGMP carbonyl group concentration was assessed at the rat implantation site (IS) and non-implantation site (NIS). The intraluminal administration of 25 µg (2.3 mM) of Nw-nitro-L-arginine inhibited implantation in 34.7% and embryo survival (100%), while in addition, decreasing cGMP concentration both at the site (1664.2 ± 333.8 pmoles/mg of protein for the control and 1321 ± 384.3 for those treated), as well as at the NIS (1203.7 ± 200 to 780.2 ± 168.5). Carbonyl group concentration was considerably less at the implantation site treated with Nw-nitro-L-arginine than in the control (0.062 ± 0.012 nmoles/mg of protein and 0.45 ± 0.1, respectively). Nonetheless, the NIS was not significantly different (0.12 ± 0.04 and 0.15 ± 0.05). Our results show that a nitric oxide (NO) dependent system parallel to the formation of cGMP and protein peroxidation products is important at the blastocyst implantation site in order for the endometrium to acquire the necessary properties for an adequate receptivity.

*Key Words:* nitric oxide, cGMP, protein peroxidation, implantation, embryonic development

Nitric oxide (NO) is one of many toxic gases found in "smog". It has been implicated in physiologic, as well as pathologic processes (1, 2). NO is a free radical, biologically synthesized from L-arginine through a reaction specifically catalized by the enzyme nitric oxide synthase (NOs). This enzyme can be competitively inhibited by arginine analogues such as Nw-nitro-L-arginine, N<sup>G</sup>-methyl-L-arginine or Nw-nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME). This inhibition has served as a magnificent tool for obtaining further information on NO (1, 3, 4).

In pregnant rats, it has been shown that the administration of NO synthesis inhibitors during the third trimester of pregnancy decreases the plasma concentration of cGMP and causes signs

similar to pre-eclampsia (5, 6). In contrast, the administration of compounds that generate NO, as well as its precursor, L-arginine, revert such effects (1). Although the role of NO in vasodilation during pregnancy has been demonstrated (7, 8, 9), its mechanism of action, tissue origin, effect of its metabolites, and moment of its synthesis have still to be explained. It is thought that vascular changes occurring during pregnancy, such as pre-eclampsia, are related to a decrease in NO concentration in endothelial cells caused by an increase in the superoxide anion, which combines with NO and inactivates it (10).

Currently, it has been shown that nitric oxide's mechanism of action is through this radical's effect on the heme group of guaninyl cyclase (11, 12) and cyclooxygenase enzymes (13). Nonetheless, since NO is a molecule with a very short half-life, it is probable that its mechanism of action also takes place through the oxidating effect of its metabolites, as peroxynitrite (-ONOO), on certain macromolecules. The -ONOO is a very reactive oxidating compound arising from the reaction between NO and the superoxide anion ( $O_2^-$ ) (14). Previous works by Szabó C and col. demonstrated that the nitric oxide synthase inhibitor, N<sup>G</sup>-methyl-L-arginine, decreased the oxidation of a great number of proteins, caused by the peroxynitrite (-ONOO) endogenously generated in a tissue culture (15). On the other hand, it was also shown that peroxynitrite causes a variety of oxidative reactions in proteins, such as the formation of carbonyl groups (16), and induces apoptosis in tissue cultures (17). It is probable that the peroxidation of macromolecules is a normal process and, in fact, indispensable in the apoptotic process that takes place during implantation in the uterus. Independent studies previously carried out, have shown that the concentrations of the NO, superoxide anion and lipid peroxidation products increase in the rat endometrium during the implantation of the embryo (18, 19, 20), but the relationship between them and their relationship with protein peroxidation is unknown.

Embryo implantation, an event that in the rat starts on the evening of the fifth day of pregnancy, is preceded by the differentiation of a non-receptive endometrium into a receptive one. This transformation implies an increase in vascular permeability, the presence of edema, and the subsequent formation of decidual tissue at the site where the blastocyst will be implanted (21, 22). In addition, in this same species, the adhesion of the blastocyst to the maternal epithelium implies the displacement of this tissue through its planned cellular death or apoptosis (23). Unfortunately, the mechanisms and stimuli behind this implantation event are still unknown.

Although it has been demonstrate that the vascular permeability seen in the uterus during implantation can be induced by prostaglandins or histamine (18), it is unknown what factors regulate this phenomenon. Recent studies have established that NO regulates the production of cGMP and prostaglandins by means of this free radical's stimulating effect on the enzymes guaninyl cyclase (11, 12) and cyclooxygenase (13). We propose that the presences of NO and cGMP are required at the embryo implantation site during the stage of maximum receptivity in order for to increase the membrane fluidity (24) and vascular permeability necessary for the formation of edema (25). In addition, the synthesis of cGMP is regulated by NO. In studies carried out in the rat endometrium, Vilar and col demonstrated that cGMP concentration as well as the aqueous content, is higher at the embryo implantation site than in the adjacent tissue (non-site) (26). It is probable that the suppression of the NO synthesis during this stage is related to the degree of protein peroxidation.

In the present study, endometrium suppress protein peroxidation.

#### *Biologic material*

Sprague-Dowley-strain 250 g, kept under light. These rats were mated with fertile rats and the spermatozoides in the

At day five of pregnancy droperidol 6.5 mg/l administration by injection (2.3mM) of Nw-nitro 0.85% saline solution the surgical procedure after surgery (6th day) injection of 0.8 ml of removed, and the uterus were collected in a microscope. The right with D-arginine (control) separated from those for biochemical tests allowed to evolve to number of embryos

A group of 10 rats, with nitro-L-arginine control administered 7 pmol horn was injected with

#### *Homogenization*

The fragments corresponding sodium phosphate buffer Stirrer Type RZRI-6 The sediment was eluted This last supernatant (29) and the carbonyl was used.

#### *Biochemical tests*

CGMP: cGMP quantified AMERSHAM equipment

In the present study, we demonstrated that the inhibition of NO synthesis in the rat endometrium suppresses implantation, decreases cGMP concentration and alters the level of protein peroxidation.

### Methods

#### *Biologic material*

Sprague-Dowley-strain-9 to-10-weeks-old female rats were used, of an approximate weight of 250 g, kept under light and temperature controlled conditions with feed and water *ad libitum*. These rats were mated using the threesome method (one male and two females) with proven fertility rats and the mating result was confirmed the following morning by the presence of spermatozoides in the vaginal smear. This day was considered as day 1 of pregnancy.

At day five of pregnancy, a group of 10 rats, after midventral laparotomy under anesthesia (with droperidol 6.5 mg/Kg weight and ketalar 60 mg/Kg weight), received intrauterine administration by injection through the uterine wall in the right uterine horn (treated), 25 µg (2.3mM) of Nw-nitro-L-arginine (6, 7, 13, 18) (Sigma Chemical Co.) contained in 50 µl of 0.85% saline solution. In the left horn (control), 25µg of D-arginine was administered. After the surgical procedure, rats were sutured. Five rats from this group were sacrificed 24 hours after surgery (6th day of pregnancy; day of the implantation), with a previous intravenous injection of 0.8 ml of tripane blue stain in 1% water. The uteri were extracted, the fat was removed, and the uterine horns then flushed with PBS from the oviductal end. The flushings were collected in a watch glass. Embryos were then morphologically assessed under the microscope. The right horn treated with Nw-nitro-L-arginine was separated from the left treated with D-arginine (control) and the implantation sites (IS) stained with the coloring were separated from those not stained or non-implantation sites (NIS). These fragments were used for biochemical testing with previous tissue homogenization. The remaining five rats were allowed to evolve to day 19 of pregnancy, time at which they were sacrificed to count the number of embryos

A group of 10 rats, used as controls, were administered 75 µg of L-Arginine plus 25 µg of Nw-nitro-L-arginine contained in 50 µL in the left uterine horn. Another group of 10 rats were administered 7 pmoles of vasopressin (27) (Sigma Chemical Co.). In both groups, the right horn was injected with 25 µg of Nw-L-nitro-Arginine.

#### *Homogenization*

The fragments corresponding to the IS and NIS were separately homogenized at 20% in a 20 mM sodium phosphate buffer solution at pH 7.4 with a glass tube using the "Caframo" Warton Ont Stirrer Type RZRI-64 homogenizer. The homogenates were centrifuged at 3000 x g/15 min. The sediment was eliminated and the supernatant recentrifuged at 44000 g/30 min at 4° C (28). This last supernatant was used to determine the proteins concentration by the Lowry method (29) and the carbonyl groups (30). In all cases, a Beckman J2-HS centrifuge and rotor JA 20.1 was used.

#### *Biochemical tests*

**CGMP:** cGMP quantification was done using a radioimmunoassay (RIA) technique employing AMERSHAM equipment (AMERSHAM LIFE PRODUCTS). Tissue sections of IS and of NIS

were rapidly frozen immediately after collection by immersion of the fresh tissue in liquid nitrogen at  $-196^{\circ}\text{C}$ , so as to prevent alterations to cGMP and associated enzymes before analysis. Frozen tissue was homogenized in cold 10% trichloroacetic acid at  $4^{\circ}\text{C}$  to give a 10% w/v homogenate, which was centrifuged at 2000g for 15 minutes at  $4^{\circ}\text{C}$  and the supernatant was recovered.

The supernatant was washed 4 times with 5 volumes of water saturated diethyl ether. The upper ether layer was discarded after each wash. The aqueous extract was dried under a stream of nitrogen at  $60^{\circ}\text{C}$ . The dried extract was dissolved in a suitable volume of assay buffer prior to analysis. The cGMP quantification was done following the supplier's instructions.

**Carbonyl groups: using the 2,4-dinitrophenylhydrazine technique (DNFI) (30).** From each of the supernatants obtained after centrifuging at 44000 g, two 600  $\mu\text{l}$  aliquots were obtained (0.7-1.0 mg of protein). Both samples were precipitated with 200  $\mu\text{l}$  of 10% trichloroacetic acid and centrifuged at 3000 g/10 min. One of the two sediments obtained was treated with 300  $\mu\text{l}$  of 2N HCl and the other with a similar volume of 0.2% DNFI p/v in 2N HCl. The two samples were incubated at  $25^{\circ}\text{C}$  for 60 min in a shaking bath. 400  $\mu\text{l}$  of a mixture of ethanol and ethyl-acetate (1:1) (v/v) was immediately added to each one. Afterwards, they were centrifuged at 3000 g/10 min and the precipitates obtained were washed 6 times more with ethanol-ethyl-acetate. The sediments were carefully removed and dissolved in 600  $\mu\text{l}$  of 6mM guanidine HCl with 20 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5. The insoluble debris was removed by centrifugation at 6000 g/10 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The difference spectrum, with a maximum peak at 376 nm, of DNFI treated sample *versus* HCl control was determined, and the results are expressed as nmol of DNFI incorporated/mg of proteins based on an average absorptivity of  $21.0\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  for the most aliphatic hidrazones (30).

**Statistics.** Results are expressed as mean  $\pm$  S.E. mean. Comparisons between means were made using Student's unpaired t test.  $P < 0.05$  was considered to be significant for all tests.

## Results

The number of implantation sites in the treated uterine horn ( $4.9 \pm 1.3$ ) showed no significant differences when compared to the control ( $5.1 \pm 0.8$ ) or with the right uterine horn of a normal rat ( $5.5 \pm 1.1$ ). The number of implantation sites was considered as the number of endometrial zones that on the sixth day of pregnancy (implantation) stained with tripane blue. The intraluminal administration of 25 $\mu\text{g}$  (2.3mM) of Nw-Nitro-L-Arginine in the right uterine horn (treated) caused the inhibition of implantation in 34.7% and of embryonic development in 100%. In the left horn (control), the inhibition of the implantation and embryonic development was similar to those seen in the normal rat (Table 1). The number of implantation sites observed on the sixth day of pregnancy (stained zones) represent the total receptive zones for embryo implantation. If this number is equal to the sum of the number of embryos on day 19 of gestation plus the number of resorption nodules (the latter indicate implantation), the implantation is considered to be 100%, often not even present under normal circumstances. For example, for the control horn, 5.1 correspond to 100% implantation, while 4.3 (3.2 embryos implanted + 1.1 resorption nodules) that represent the number of implanted embryos, correspond to 84.3% implantation and the remaining 15.7% to implantation inhibition.

The total number of implanted embryos correspond to the sum of embryos present on day 19 plus the resorption nodules. In the control horn, 4.3 equals 100% of the implanted embryos and

3.2 (viable embryos inhibition of the pi physically observing whether the blastoc; lumen on the sixth d

Embryo weights (on the placenta, were si rats. Similarly, the r from the treated horn

Effect of Nw

Uterine Horn	Implan S Da
Control	5.1:
Treated	4.9:
*(normal rat)	5.5:

In the 3 cases, N=24. "a" different from "b" cases  $p < 0.001$ .

cGMP concentration Nw-nitro-L-arginine in the implantation the control horn), a: It is worth highligh

3.2 (viable embryos on day 19) is equivalent to 74.4%. The remaining 25.6% represents the inhibition of the presence of embryos. The assessment of viable embryos was done by physically observing their macroscopic morphological characteristics. In order to corroborate whether the blastocysts were affected by the inhibitor, they were recovered from the uterine lumen on the sixth day of pregnancy, with similar characteristics as the normal ones.

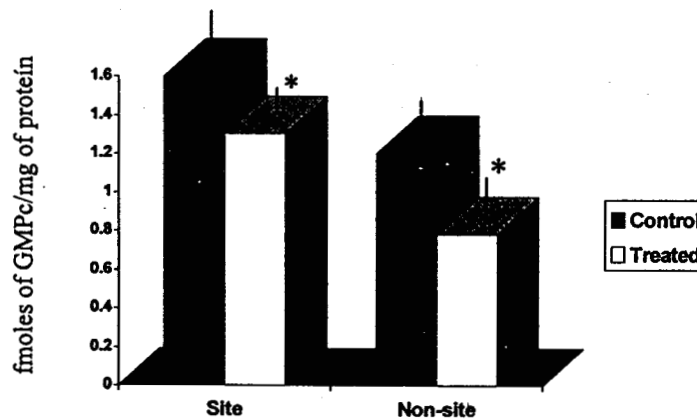
Embryo weights (on day 19 of pregnancy) obtained from the control horns, as well as those of the placenta, were similar to those obtained from the right uterine horns from a group of normal rats. Similarly, the number of luteal bodies, both from the ovary of the control horn, as well as from the treated horn was similar to the right horn of normal rats (Table 1).

**Table 1**  
**Effect of Nw-Nitro-L-Arginine on Implantation and Embryonic Development**

Uterine Horn	Implantation Site Day 6	Embryos viables on day 19	Reabsorption Nodules Day 19	Implanted Embryos Day 19	Inhibition of Implantation %	Inhibition of Presence of Embryos (%)
Control	5.1±0.8	3.2±0.5 <sup>a</sup>	1.1±0.7 <sup>c</sup>	4.3	15.7 <sup>e</sup>	25.6 <sup>g</sup>
Treated	4.9±1.3	0 <sup>b</sup>	3.2±2.1 <sup>d</sup>	3.2	34.7 <sup>f</sup>	100 <sup>h</sup>
*(normal rat)	5.5±1.1	3.7±0.4	1.0±0.8	4.7	14.5	21.3

In the 3 cases, N=24. X ± SD. \*Results obtained from the right uterine horn of a group of normal rats. "a" different from "b", "c" different from "d", "e" different from "f" and "g" different from "h". In all cases p < 0.001.

cGMP concentration/mg of protein was significantly less (p < 0.01) in the horns treated with Nw-nitro-L-arginine than in the control treated with D-arginine. This behavior was similar both in the implantation site region (1321 ± 384.3 pmoles of the treated horn vs 1664.2 ± 333.8 of the control horn), as well as that of the non-implantation site (780.2 ± 168.6 vs 1203.6 ± 200). It is worth highlighting that the implantation site had a greater cGMP concentration than the



**Fig. 1**

Effect of Nw-L-Nitro-Arginine on GMPc concentration.

\* p < 0,05 when compared with the control. N = 8.

non-site (Fig. 1).

At the implantation site, the level of protein peroxidation was seven times greater ( $p < 0.001$ ) in the control than in the treated horn ( $0.45 \pm 0.1$  vs.  $0.062 \pm 0.012$  nmoles of carbonyls/mg of protein, respectively) (Fig. 2). At the non-site, the differences were not significant between the treated and control horn ( $0.12 \pm 0.04$  and  $0.15 \pm 0.05$ ) (Fig. 2).

The intraluminal administration of 75  $\mu$ g of L-Arginine whit 25  $\mu$ g of Nw-nitro-L-Arginine reverts the obtained result. In addition, the administration of 7 pm of vasopressin was ineffective.

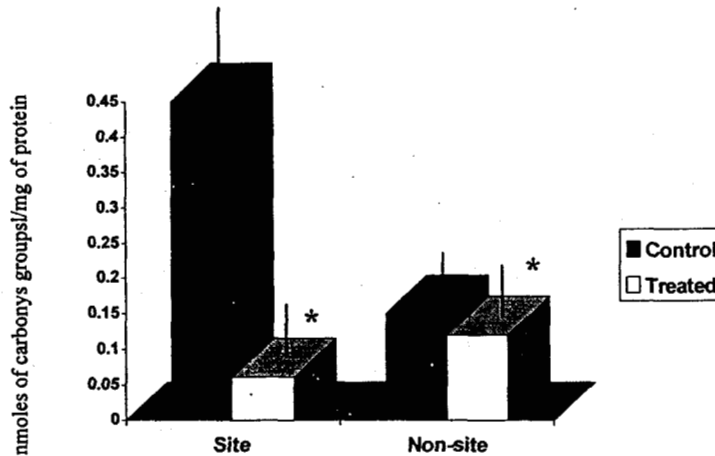


Fig. 2

Effect of Nw-L-nitroarginine on protein peroxidation.  
\* $p < 0.001$  when compared to the control. N = 8.

### Discussion

The intraluminal administration of 25  $\mu$ g (2.3 mM) of the nitric oxide synthase specific inhibitor, Nw-nitro-L-arginine on the afternoon of the fifth day of pregnancy (period of maximum uterine receptivity) decreased implantation in 34.7%, without having any affect on the morphological aspect of the blastocysts, and inhibiting the presence of embryos by 100% on the nineteenth day of pregnancy. (Table 1). Nonetheless, vascular permeability, determined by the number of stained zones, was not affected. Biswas S. and col (31) administrated 5 mg of another specific inhibitor, L-NAME on the fifth day of pregnancy, completely suppressing the vascular reaction and retarding embryonic development. It is probable that this is mainly due to the dosis they used, as well as the type of inhibitor. Although it is known that nitric oxide produces its effects by two different mechanisms, one by linking to the heme group of guanylyl cyclase or oxigenase and the other, through its metabolites as peroxinitrite, the mechanism of action behind the implantation is unknown.

Novaro V et al. in their nitric oxide synthase ro prostaglandins  $E_2$  and F oxide regulating the pro

It has been shown that p increased vascular perm in the ratio  $E_2/F_{2\alpha}$  PGs a that vascular permeabil synthase inhibitor (Nw-l at least two finely sync has on cyclooxygenase treatment on the day concentration in uterine

It is important to point respect to the non-site, nitric oxide syntase in oxide-cGMP via at the with sheep, finding th antagonizes blood flow found that the same ir administration of the se

We believe that durin activated and induced, membrane fluidity (20 estrogens and progeste With respect to the la maintaining NO by ir suggest that NO and c la implantación. Nov oxide synthase, a cc hormones, and the oth

It is probable that th decreases in the activ the synthesis of nitr cGMP is higher at th the presence of edema

The implantation site tissue, the non-impl: implantation stage th groups that would n necessary for the for discovered that lipic

Novaro V et al. in their interesting studies showed that in the uterine rat tissue, the activity of nitric oxide synthase rose significantly on day 5 of pregnancy with a profile similar to that of prostaglandins  $E_2$  and  $F_{2\alpha}$ , for which they suggest the existence of a system dependent of nitric oxide regulating the production of prostaglandins (18).

It has been shown that prostaglandins  $E_2$  and  $F_{2\alpha}$  are mediators of the effect of estrogens on the increased vascular permeability that must prevalect at the implantation site, while an imbalance in the ratio  $E_2/F_{2\alpha}$  PGs alters the vascular response and implantation (21, 32). We demonstrated that vascular permeability is not affected when uterine horn is treated with the nitric oxide synthase inhibitor (Nw-Nitro-L-arginine). We believe that during implantation, nitric oxide has at least two finely synchronized action routes, one through the activation that this free radical has on cyclooxygenase (13), and the other on guaninyl cyclase (11, 12). Our results show that treatment on the day 5 of pregnancy with the inhibitor significantly decreases cGMP concentration in uterine tissue on day 6 of pregnancy.

It is important to point out that the increased cGMP concentration at the implantation site with respect to the non-site, and the decrease of this nucleotide when the horn is treated with the nitric oxide syntase inhibitor, leads us to believe that estrogens regulate the arginine-nitric oxide-cGMP via at the site where the blastocyst will be implanted. Van Buren and col worked with sheep, finding that the Nw-nitro-L-arginine methyl ester, an inhibitor of NO synthesis, antagonizes blood flow in the uterus produced by estrogens (33). In addition, Magnes and col. found that the same inhibitor suppresses the increase in cGMP concentration caused by the administration of the same hormones (34).

We believe that during implantation constitutive and inducible nitric oxide synthases are activated and induced, respectively, since this involves a process that requires an increase in membrane fluidity (20), as well as the migration of macrophages to the uterus (35) and where estrogens and progesterone play a very important role in the formation and destination of NO. With respect to the latter, Sugino N. and col. (36) reported that progesterone contributes in maintaining NO by inhibiting the production of the superoxide anion. These results and ours suggest that NO and cGMP play an important role en la regulación del flujo sanguíneo durante la implantación. Nowadays there has been the existence of two main isoforms of the nitric oxide synthase, a constitutive one from the endothelial and neuronal cells regulated by hormones, and the other inductible, mainly synthesized by macrophages (37, 38, 39, 40).

It is probable that the inhibition of implantation and embryonic development may be due to decreases in the activity of guanylyl cyclase and cGMP concentration caused by a blockage in the synthesis of nitric oxide. In our laboratory, we demonstrated that the concentration of cGMP is higher at the implantation site than in the non-site, and that this increase is related to the presence of edema (26).

The implantation site showed a greater index of protein peroxidation than that seen in adjacent tissue, the non-implantation site. This difference could be due to the fact that during the implantation stage the endometrial membrane fluidifies in order to free and expose certain groups that would normally be hidden (40, 42) or that some protein peroxidation products are necessary for the formation of the decidual or embryo implantation. Other authors (19, 24, 43) discovered that lipid peroxidation is considerably higher on day 5 of implantation in the rat

< 0.001) in  
ng/ml of  
between the

L-Arginine  
ineffective.

c inhibitor,  
um uterine  
morphological  
eteenth day  
number of  
ner specific  
lar reaction  
: dosis they  
s its effects  
cyclase or  
1 of action

(implantation day), and they suppose that endometrial membrane fluidity during this stage is a consequence of its results.

The lesser protein peroxidation in the uterine horn treated with Nw-nitro-L-arginine leads us to suppose that the formation of peroxynitrite (-ONOO) decreased when there were insufficient amounts of NO, and as a consequence OH radicals could not be efficiently produced, those most reactive. The superoxide anion ( $O_2^-$ ) produced by the leukocytes induces a poor protein peroxidation, unless the of superoxide dismutase (SOD) converts the  $O_2^-$  into hydrogen peroxide (8), which through the Fenton reaction produces ·OH radicals. This is highly improbable due to the presence of catalase (43) and peroxidase in the uterus during the maximum stage of receptivity (44). Anyway, there are few studies that demonstrate the mechanism which makes the macromolecules peroxidation increase at implantation site.

Szabo C. and cols demonstrated that  $N^G$ -methyl-L-arginine decreased protein oxidation induced by polisaccharides in macrophages by a mechanism dependent on peroxynitrite (15, 16), while the group comprised by Zora Melkova.S.B. and cols found that the expression of the inducible nitric oxide synthase enzyme stimulates apoptosis in tissue cultures (17). On the other hand, it has been demonstrated that nitric oxide and peroxynitrite play an important role in the removal of neutrophils stimulating the apoptotic process in these cells (45). It is probable that peroxynitrite and peroxidation products participate in the apoptotic process seen not only in the epithelium, but also in neutrophils present in the endometrium during implantation.

Future studies should be conducted to show which of the nitric oxide synthases predominate and how they are regulated. We believe that they are in high amounts at the implantation site with respect to the non-implantation site. It is known that the nitric oxide produced by the constitutive isoform links directly to the enzyme heme group as in guanylyl cyclase, therefore increasing cGMP, while the inducible isoform exerts its effects by means of the release of large amounts of nitric oxide, that under these conditions, links rapidly to the superoxide anion and forms peroxynitrite (46).

In conclusion, the intrauterine administration of the nitric oxide synthesis inhibitor, Nw-nitro-L-arginine, during the greatest stage of receptivity in the rat, decreases the percentage of implantation, suppresses embryony development, and in uterine cells, decreases the concentrations of cGMP and carbonyl groups present in proteins, for this reason, we suppose that the production of NO is associated to guanylyl cyclase's activity, as well as to the level of protein peroxidation.

#### Acknowledgements

This study was made possible by the support from the INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL and The FONDO DE FOMENTO A LA INVESTIGACION (FOFOI) Fund No. FP003/351, and is part of the PhD thesis based on a scholarship from CONACYT for MD Genoveva Durán Reyes carried out at the UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA IZTAPALAPA MEXICO.

1. S. MONCADA,
2. J.R. LANCASTI
3. C. NATHAN, F
4. J.F. Jr. KERWIN
5. C. BAYLIS, C. I
6. I. BUHNMSCI  
Reprod. **10** 2723
7. C. YALLAMPA
8. M. LALORAY/  
762-770 (1989).
9. G. DURÁN-RE  
Méx. **66** 371-37
10. G. GERDA,  
KRAAYENBRI
11. L. IGNARRO, J
12. T. G. TRAYLO
13. D. SALVEMIN  
NEEDLEMAN
14. J.S. BECKMAJ  
Natl. Acad. Sci
15. C. SZABO, MI  
147-150 (1997)
16. C. SZABO, Sh
17. Z. MELKOVA
18. V.NOVARO,  
CANTAROS,
19. M. LALORAY  
Mol. Biol. Int.
20. G. DURAN-R  
Méx. **67** 29-36
21. T.G. KENNEI
22. P.A. ABRAH/  
23. E.L. PARR, T
24. L. MALINI, B
25. N. UNNO, M.  
35 G923-G934
26. C.VILAR-RO
27. M. MOLNÁR
28. G. DURAN-R  
303 (1994)
29. O.H. LOWRY  
265-275 (195
30. L.D. YOUNC  
(1992).
31. S. BISWAS, ;
32. C. VILAR-RO



## References

is stage is a

leads us to  
insufficient  
uced, those  
oor protein  
en peroxide  
able due to  
m stage of  
high makes

ion induced  
, 16), while  
e inducible  
her hand, it  
he removal  
able that  
only in the

redominate  
ntation site  
iced by the  
e, therefore  
ase of large  
anion and

4w-nitro-L-  
centage of  
reases the  
we suppose  
the level of

ANO DEL  
)FOI) Fund  
YT for MD  
'OLITANA

1. S. MONCADA, R.M.J. PALMER, E.A. HIGGS, *Pharmacol. Rev.* **43** 109-142 (1991).
2. J.R. LANCASTER, *American Scientist.* **80** 248-259 (1992).
3. C. NATHAN, *FASEB J.* **6** 3051-3064 (1992).
4. J.F. Jr. KERWIN, M. HELLER, *Med. Res. Rev.* **14** 23-74 (1994).
5. C. BAYLIS, C. MITRUKA, B. DENG, *J. Clin. Invest.* **20** 278-281 (1992).
6. I. BUHINMSCHI, C. YALLAMPALLI, C. CHWALISZ, R.E. GARDFIELD, *Human Reprod.* **10** 2723-2730 (1995).
7. C. YALLAMPALLI, R.E. GARFIELD, *Am. J. Obstet. Gynecol.* **169** 1316-20 (1993).
8. M. LALORAYA, G.P. KUMAR, M.M. LALORAYA, *Biochem Biophys Res Commun.* **161** 762-770 (1989).
9. G. DURÁN-REYES, M.R. GÓMEZ-MELÉNDEZ, J.J. HICKS-GOMEZ, *Ginec. Obst. Méx.* **66** 371-376 (1998).
10. G. GERDA, A. GUSTAAF, A. DEKKER, P. HERMAN VAN GEIJN, A. KRAAYENBRINK, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **43** 113-122 (1992).
11. L. IGNARRO, *J. Biochem. Soc. Trans.* **20** 465-469 (1992).
12. T. G. TRAYLOR, V.S SHARMA, *Biochemistry.* **31** 2847-2849 (1992).
13. D. SALVEMINI, T.P. MISKO, J.L. MASFERRER, L. K. SEIRBERT, M.G. CURRIE, P. NEEDLEMAN, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90** 7240-7244 (1993).
14. J.S. BECKMAN, T.W. BECKMAN, P. JUN CHEN, A. MARSHAL, A. BRUCE, *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **87** 1620-1624 (1990).
15. C. SZABO, MICHAEL O' CONNOR AND L. ANDREW SALZMAN, *FEBS Letters* **409** 147-150 (1997).
16. C. SZABO, *Shock.* **37** 307-16 (1992).
17. Z. MELKOVA, S. BONG LEE, D. RODRIGUEZ, *FEBS Letter.* **403** 273-278 (1997).
18. V.NOVARO, V.RETTORI, E.T. GONZALEZ, A. JAWERBAUM, A. FALETTI, G. CANTAROS, M.A.F.de GIMENO, *Prostaglandins.* **51** 363-376 (1996).
19. M. LALORAYA, S. JAIN, T. MONZY, S. KOPERGAONKKAR P. KUMAR, *Biochem.. Mol. Biol. Int.* **39** 933-940 (1996).
20. G. DURAN-REYES, M. R. GOMEZ MELÉNDEZ, J..J. HICKS-GOMEZ, *Ginec. Obst. Méx.* **67** 29-36 (1999.)
21. T.G. KENNEDY, *Biol. Reprod.* **16** 286-291 (1977).
22. P.A. ABRAHASOHN, T.M.T. ZORN, *J. Exp. Zool.* **266** 603-628 (1993).
23. E.L. PARR, TUNG, M.B. PARR, *Biol Reprod.* **36** 211-225 (1987).
24. L. MALINI, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **167** 561-567 (1990).
25. N. UNNO, M. MENCON, M. SMITH, E. DOUGLAS, AGUIRRE, M.P. FINK, *J. Physiol* **35** G923-G934 (1997).
26. C.VILAR-ROJAS, J.J. Hicks, *Int. J. Fertil.* **27** 56-59 (1982).
27. M. MOLNÁR, F. HERTELENDY, *Am. J. Obstet. Gynecol.* **166** 1560-7 (1992).
28. G. DURAN-REYES, M. DIAZ-FLORES, S.CASTILLO, J.J. HICKS, *Int. J. Fertil.* **39** 299-303 (1994)
29. O.H. LOWRY, N.J. ROSEMBROUGH, A.L. FARR, R.J. RANDALL, *J. Biol. Chem.* **1943** 265-275 (1951).
30. L.D. YOUNGMAN, J.Y. KIM PARK, B.N. AMES, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89** 9112-9116 (1992).
31. S. BISWAS, S.N. KABIR, A.K. PAL, *J. Reprod Fertil.* **114** 157-161 (1998).
32. C. VILAR-ROJAS, J.J. HICKS, *Ginec. Obstet. Méx.* **50** 15-20 (1982).

33. A. GEORGE VAN BUREN MD, DA-SENG YANF, E. KENNETH, *Am. J. Obstet. Gynecol.* **167** 828-33 (1992).
34. R.R. MAGNESS, T. ROY, C.R. ROSENFELD, (abstract 567). In: proceeding of the thirtieth annual meeting of the Society for Gynecologic Investigation, San Antonio, Texas, March 18-21, (1992).
35. M. DE, G.W. WOOD, *J.Endocrinol.* **126** 417-424 (1990).
36. N. SUGINO, K. SHIMAMURA, H. TAMURA, M. ONO, NAKAMURA, K.GINO, *Endocrinol.* **137** 749-754 (1996).
37. M.R.J. PALMER, A.G. FERRIGE, S. MONCADA, *Nature* **327** 524-526 (1987).
38. L.J. IGNARRO, G.M. BUGA, K.S. WOOD, R.E. BYMES, G. CHAUDHURI, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **84** 9265-9269 (1987).
39. M.A. MARLETA, P.S. YOON, R. IYENGAR, C.D. LEAT, J.S. WISHNOK, *Biochemistry* **24** 8706-8711 (1988).
40. J. GARTHWAITE, S.L. CHARLES, CHESS-WILLIAMS, *Nature (London)* **336** 385-388 (1988).
41. J.J. HICKS, G. DURAN-REYES, M.DIAZ-FLORES, *Contraception* **50** 581-589 (1994).
42. G. DURAN-REYES and, J.J. HICKS, *Contraception* **56** 49-53. (1997).
43. J. SUDHIR, T. MONZY, L. MALINI, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195** 574-580 (1993).
44. M.M. SINGH, R.R. TRIVEDI, S.C. CHAUHAN, V.M.L. SRIVASTAVA, A. MAKKER, S.R. CHOWDHURY, V.P. KAMBOJ, *J Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **59** 215-223 (1996).
45. G. MORGAN BLAYLOCK, B.H. CUTHBERTSON, F. HELEN GALEY, N. RANALD FERGUSON, N.R. WEBSTER, *Free Radical Biology & Medicine* **25** 748-752 (1998).
46. J.S. BECKMAN, W.H. KOPPENOL, *Am. J. Physiol* **271** (Cell Physiol. 40) C1424-C1437 (1996).

Robert B. Raff  
 School of Phar  
 Room 540  
 Temple Univer  
 3307 N. Broad  
 Philadelphia, P

*Pharmacology Letters*  
 rigorous experimental  
 studies will be include  
 are commentaries, nev  
 tual or mathematical).

#### Types of Papers

1. *Accelerated Con*  
 branch of pharma
2. *Current Advance*  
 significance meri  
 emerging areas c  
 or synthesis of p  
 specialized intere
3. *Dialogue: An o*  
 alternative intere  
 Comment.

Publication Schedule  
*Pharmacology Letter*  
 SCIENCES' weekly r  
*Pharmacology Letter*

#### Format

Submissions by facsi  
 be found at the end o

## El óxido nítrico como regulador de los cambios hemodinámicos en la gestación

■ M. en C. Genoveva Durán-Reyes\*, Med. Cir. María del Rocío Gómez Meléndez\*,  
Dr. Juan José Hicks Gómez\*\*

### ■ RESUMEN

El óxido nítrico ( $\bullet$ NO) producido por la mayoría de las células animales, ha sido considerado como un segundo mensajero, ya que es el resultado de un proceso de transducción celular inducido por un primer estímulo externo. El  $\bullet$ NO se forma durante la conversión de la L-arginina a L-citrulina por una reacción catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa. De esta enzima se ha caracterizado dos isoenzimas; una constitutiva activada por hormonas es producida por las células del endotelio y actúa en el relajamiento del músculo liso y la otra inducible cuya síntesis se estimula por citocinas, es producida por los macrófagos. A medida que el embarazo evoluciona, las concentraciones de  $\bullet$ NO, sus metabolitos, nitratos y nitritos, el GMPc y la enzima que lo sintetiza, el óxido nítrico sintasa, aumentan en forma paralela hasta alcanzar un pico máximo poco antes del parto. Se considera que el  $\bullet$ NO es la molécula que mantiene el tono vascular típico de la preñez, ya que durante la preeclampsia, este radical libre así como sus metabolitos se encuentran significativamente disminuidos, además, la administración de donadores del  $\bullet$ NO o de su precursor, la L-arginina, revierte

las alteraciones vasculares de ese padecimiento. El mecanismo de acción del  $\bullet$ NO sobre el endotelio vascular es por mediado por la activación de la enzima guanilil ciclasa, ocasionando el aumento en la concentración de GMPc y la relajación del músculo liso. En tanto que el óxido nítrico generado por los macrófagos actúa como mecanismo de defensa al unirse con otros radicales como el anión superóxido ( $O_2$ ).

(Durán R, G y col: *El óxido nítrico como regulador de los cambios hemodinámicos en la gestación.* Ginec Obst Mex. 1999; 67: 29 )

### ■ SUMMARY

Nitric oxide ( $\bullet$ NO) produced by the majority of animal cells, has been considered a second messenger, since it is the result of a transduction process induced by a first stimulus. Biochemically,  $\bullet$ NO is produced during the conversion of L-arginine to L-citruline by a reaction catalized by the enzyme nitric oxide synthetase. Two isoenzymes have been characterized from this enzyme: a constitutive isoenzyme activated by hormones produced by the endothelial cells and acting on smooth muscle relaxing properties and the other, an inducible isoenzyme whose synthesis is stimulated by cytokines, and produced by macrophages. As

pregnancy progresses, the concentrations of  $\bullet$ NO, its metabolites, nitrates and nitrites, cGMP and the synthesizing enzyme, nitric oxide synthetase, increase parallelly until reaching a maximum peak before birth. It is considered that  $\bullet$ NO is the molecule that maintains the typical vasodilated tone during prgnancy. During preeclampsia, this free radical, as well as its metabolites are found to be significantly decreased, in addition, the administration of  $\bullet$ NO donors or of the precursor of L-arginine reverts the vascular abnormalities of this condition. The mechanism of action behind  $\bullet$ NO on the vascular endothelium is by its stimulating effect on the enzyme cyclase guanilate, causing an increase in cGMP concentration and the relaxation of the smooth muscle. The nitric oxide generates by macrophages acts as a defense mechanism when linked with other radicals as the superoxide anion ( $O_2$ ).

(Durán R, G y col: *Nitric oxide as a regulator of hemodinamic chages in gestation* Ginec Obst Mex 1999;67:29; )

**P**aradójicamente, el óxido nítrico ( $\bullet$ NO), que es uno de los gases tóxicos del smog, es producido por la

\* Unidad de Investigación Médica en Bioquímica  
Hospital de Especialidades. Centro Médico  
Nacional Siglo XXI AP 12-855

\*\* Jefe de la Unidad de Investigación del Hospital  
Juárez de México

mayoría de las células animales, osteoclastos, fibroblastos, células musculares, macrófagos, neuronas etc. El  $\bullet$ NO ha sido considerado como un segundo mensajero, en otras palabras, la producción de esta molécula es el resultado de un proceso de transducción inducido por un primer estímulo, que bien puede ser una molécula o un cambio en la estabilidad membranar<sup>1,2</sup>.

La molécula del  $\bullet$ NO es considerada un radical libre (tiene un electrón desapareado que le confiere gran reactividad) con propiedades fisiológicas similares a las del factor relajante derivado del endotelio, con el que fue relacionado; actualmente se considera que ambas moléculas corresponden al mismo compuesto. Bioquímicamente este radical libre se produce durante la conversión de la L-arginina a L-citrulina por una reacción catalizada específicamente por la enzima óxido nítrico sintasa<sup>3</sup>. Se han descrito dos isoenzimas principales de esta enzima, una constitutiva dependiente de calcio y cuya presencia ha sido demostrada tanto en las células endoteliales como en las nerviosas es estimulada por hormonas. La segunda isoenzima es inducible, independiente del calcio y se ha detectado en macrófagos respondiendo a la estimulación por citocinas.

Estudios recientes conducen a pensar que la importancia fisiológica del óxido nítrico depende del tipo celular del que proviene; el  $\bullet$ NO derivado de las células endoteliales funciona como vasodilatador por medio de la activación que ejerce este radical sobre las enzimas guanilil ciclasa y/o ciclooxigenasa y el sintetizado por los macrófagos, que generalmente se transforma en otros radicales

libres más reactivos como el peroxinitrito (ONOO) que interviene en los mecanismos de defensa.

El estudio del  $\bullet$ NO se realiza indirectamente por medio de la concentración de sus metabolitos estables, nitratos y nitritos, cuantificando la liberación de citrulina marcada a partir de arginina, midiendo la concentración de GMPc<sup>4</sup> intracelular y utilizando inhibidores específicos de la óxido nítrico sintasa como son la L-nitro-arginina (L-NA) y la L-nitro-argininametiléster (L-NAME). La actividad de la enzima también se utiliza con frecuencia para determinar indirectamente la concentración del NO<sup>1</sup>.

#### El óxido nítrico y el embarazo

Durante la gestación se alteran diversas actividades en las que participa el músculo liso como efector expresando efectos en los sistemas gastrointestinal y vascular; en este último se produce una relajación que conduce a la disminución de la presión sanguínea y como consecuencia a una reducción de la resistencia vascular periférica e incremento del gasto cardiaco. Además, se induce resistencia al efecto presor de sustancias vasoactivas como la angiotensina II y la noradrenalina (Gant 1973). Aunque se ha demostrado que la prostaciclina interviene en estas adaptaciones hemodinámicas, recientemente se propuso al NO como la sustancia que mantiene el tono relajado que se observa durante el embarazo.

Desde 1989 Weiner y col.<sup>5</sup> observaron en segmentos de arteria uterina de cobayas embarazadas, que la concentración del óxido nítrico era mayor en gestantes que en no embarazadas.

Otros autores encontraron en el plasma y orina de ratas grávidas que la concentración de nitratos, metabolitos estables del óxido nítrico, se elevó de  $2\mu\text{moles}/24\text{ h}$  al inicio de la gestación hasta un pico máximo de  $6.5\mu\text{moles}/14\text{ h}$  al día 15 de embarazo o pseudopreñez (75% de la gestación); este pico máximo declinó hasta volver alcanzar el valor inicial de  $2\mu\text{moles}$  al final de la gestación<sup>6</sup>. Además Kirk y col demostraron durante esta etapa que la concentración de nitratos siempre fue paralela a la producción de GMPc, y la administración del inhibidor específico de la óxido nítrico sintasa, La L-nitro-arginina, suprimió los resultados obtenidos, dichos resultados que por un lado manifiesta sus efectos por medio del GMPc. En el útero humano se demostró que la producción tanto del  $\bullet$ NO como del GMPc aumentó después de la administración de la L-arginina (el sustrato para la síntesis de  $\bullet$ NO) y el dietil/óxido nítrico (donador de óxido nítrico), además, el inhibidor L-nitro-arginina-metiléster suprimió dicha síntesis<sup>7</sup>. De esta manera se confirma que el  $\bullet$ NO y no la citrulina, es el responsable del aumento en la producción del GMPc (Tabla I)

Diversas evidencias indican que al acercarse el parto en la rata, la concentración del  $\bullet$ NO declina para dar lugar a las contracciones que prevalecen en ese periodo. Stephen y col<sup>8</sup> demostraron que la actividad de la óxido nítrico sintasa disminuye de  $6\text{ pmoles}/\text{mg}$  de proteína a  $1\text{ pmoles}$  al acercarse al parto. Se sugiere que esta disminución se debe a que durante el nacimiento los compuestos vasodilatadores deben disminuir para permitir la contracción que pre-

Tabla I

**Presencia de NO en los órganos de hembras preñadas**

Especie

Cobayo

rata

humano

conejo

Presencia de NO (óxido nítrico) en los órganos de hembras preñadas con controles no preñadas.

valece durante el embarazo y el parto. El apoyo a lo anterior lo demuestran los estudios de Garfield y colaboradores.<sup>7</sup> demostaron la presencia de NO en los órganos de hembras preñadas y en los controles no preñadas. En el humano, que se estudió a las 36 semanas de gestación, se demostró que el NO también está presente en los órganos durante el parto.

También se ha manifestado la presencia de NO en los órganos de hembras preñadas. En la rata, se ha manifestado la presencia de NO en los órganos de hembras preñadas. En el humano, se ha manifestado la presencia de NO en los órganos de hembras preñadas. En el conejo, se ha manifestado la presencia de NO en los órganos de hembras preñadas.

**Presencia de NO en los órganos de hembras preñadas**

Cita

Carl P., Weiner MD., Richard G.,

Am J

Gynecol. 1994; 171: 838-43.

Conrad KP., Vernier KA. Am J

Physiol. 1989; 257: R847-R853.

\*Myatt L, Brockman DE.

placenta, 1993; 14: 373-383.

\*\*Myat L, Brewer AS, Am J Obstet

Gynecol, 1992; 166: 224-230.

\*\*\*Buhimschi I.YallampalliC, Don

Y, Garfield RE. Am J Obstet Ginecol

1995; 172: 1577-84.

Stephen M., Sladek, Anne

C. Reegenstein, MD. Lykins, MA.

Roberts JM. Am J Obstet Ginecol

1993; 169: 1285-91.

Presencia de NO (óxido nítrico) en los órganos de hembras preñadas con controles no preñadas.

Los autores estudiaron la presencia de NO en los órganos de hembras preñadas y en los controles no preñadas. En el humano, que se estudió a las 36 semanas de gestación, se demostró que el NO también está presente en los órganos durante el parto.

También se ha manifestado la presencia de NO en los órganos de hembras preñadas. En la rata, se ha manifestado la presencia de NO en los órganos de hembras preñadas. En el humano, se ha manifestado la presencia de NO en los órganos de hembras preñadas. En el conejo, se ha manifestado la presencia de NO en los órganos de hembras preñadas.

La administración de las mismas hormonas. Este antagonismo en la vasodilatación producida por estrógenos, sugiere que el •NO y el GMPc juegan un papel muy importante en la regulación del flujo sanguíneo durante el embarazo.

Chang y col.<sup>12</sup> demostraron que la inhibición de la síntesis de NO con nitro-L-arginina, aumentó la resistencia vascular y la presión arterial, además, disminuyó el flujo sanguíneo umbilical, por lo que sugieren que el óxido nítrico regula el tono vasodilatado típico del embarazo.

**El •NO en las alteraciones**

**vasculares del embarazo**

Preeclampsia-eclampsia, un desorden hipertensivo de la preñez caracterizado por vaso espasmo, proteinuria y edema es la causa principal de morbilidad materna y muerte fetal<sup>13</sup>. Las mujeres con preeclampsia se vuelven susceptibles a agentes presores, particularmente angiotensina II, debido probablemente a una inadecuada regulación de la resistencia vascular. Aunque los mediadores de esta resistencia vascular alterada durante la preeclampsia están asociados con un desequilibrio entre la prostaciclina y su antagonista endógeno el tromboxano, la administración de estos compuestos no revierte las alteraciones ocurridas durante la preeclampsia y los inhibidores de su síntesis no provocan cambios vasculares de importancia.<sup>14</sup>

Estudios en animales sugieren que el óxido nítrico sintetizado por las células endoteliales tiene un papel importante en la vasodilatación gestacional. Buhimschi y col demostraron que la administración crónica del inhibidor de la síntesis del •NO (L-nitro-arginina metil-éster) a partir del día 1 de embarazo hasta el último tercio de la misma, aumenta la presión sistólica y disminuye el peso de los embriones. La administración simultánea del inhibidor y del sustrato, L-arginina, revierte ambos efectos. Condiciones similares se han demostrado en cobayos<sup>15</sup>. En humanos voluntarios la infusión de L-arginina disminuye las presiones sistólica y diastólica, y lo hace más eficazmente en pacientes hipertensos, dicha acción se asocia con un aumento de los niveles plasmáticos de citrulina y GMPc<sup>16</sup>. Vale

Tabla II

## EFECTOS DE LOS INHIBIDORES ESPECÍFICOS DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA

Efecto	Cita
↑de la presión sistólica (rata)	Q-P Liao. <i>Human Reprod</i> 1996;11 (12): 277-84
albuminuria, hipertensión, ↓del peso de los embriones	Buhimschi. <i>Human Reprod</i> 1996;10(10):2723-30.
trombocitopenia (rata)	MolnarM. <i>AmJObstet Gynecol</i> 1994;170:1458-66
↑las contracciones del útero (rata y humano)	Franchi. <i>AM Proc Natl Acad Sci</i> 1994; 91: 543
	Buhimshi. <i>J Obstet Gynecol</i> 1995; 172: 1577-84.

↑: aumentada, ↓: disminuida.

la pena mencionar que el trinitrato de glicerilo, un donador del •NO, ha sido ocasionalmente utilizado como relajante uterino, este compuesto fue aplicado en forma de parches (Deponit 10, Schwarzpharma, Germany) en mujeres con contracciones a pretérmino<sup>17</sup>.

La asociación entre la síntesis del óxido nítrico y la regulación de la presión sanguínea, ha conducido a varios investigadores a postular que la preeclampsia se debe a una producción deficiente del NO. Buhimschi y Yallampalli<sup>18</sup> demostraron que las ratas tratadas con L-NAME, desarrollaron presión sistólica elevada, disminuyeron el peso de sus embriones e incrementaron la mortalidad de los mismos de una manera dependiente de la dosis. Además, Molnár y colaboradores administraron continuamente el Inhibidor L-NAME a las ratas desde el día 18 de la gestación hasta el primer día después del parto y encontraron que éstas desarrollaron hipertensión y albuminuria concomitante a una disminución del peso de sus embriones sin afectar la duración

de la gestación. El mismo autor<sup>19</sup> demostró que la hipertensión provocada por la administración de L-NME en las ratas preñadas declinó a los valores normales después del parto y no se presentó cuando a las ratas vírgenes se les administró el compuesto. Además, en las ratas macho la administración crónica de L-NAME no causa cambios significativos en la presión arterial<sup>20</sup>, por lo que se sospecha que la unidad feto-placentaria tiene un papel muy importante en la síntesis del óxido nítrico. Estos autores también encontraron trombocitopenia tanto en preñadas como en no preñadas tratadas con L-NAME (Tabla II).

Recientemente Novaro y colaboradores<sup>21</sup> encontraron que el L-NAME induce disminución de la síntesis de prostaglandinas E y F<sub>2a</sub> en el tejido uterino durante el 5º día de embarazo en la rata. Dichos resultados sugieren la existencia de un sistema •NO-dependiente, el cual modula la síntesis de prostaglandina en el útero de este mamífero durante la implan-

tación. Otros trabajos han establecido que el •NO puede estimular la actividad de cicloxigenasa, y de esta manera incrementar la síntesis de prostaglandinas<sup>22,23,24</sup>. Es probable que el óxido nítrico module la decidualización endometrial por medio de su estímulo sobre la síntesis de prostaglandinas, ya que algunos autores demostraron que durante la decidualización en la rata se elevan en forma paralela los niveles de las prostaglandinas E y F<sub>2α</sub> y el •NO<sup>25</sup>

En contraste Haddad AJ<sup>26</sup> encontró que la pérdida temprana de los embriones de rata está asociada con la producción local del óxido nítrico proveniente de los macrófagos, informando además que la aminoguanidina, un inhibidor selectivo de la óxido nítrico sintasa inducible, inhibe en los macrófagos la producción *in*

*vitro* de óxido nítrico y reduce significativamente la pérdida de embriones en ratones. Esto demuestra que el efecto del óxido nítrico depende del tipo celular del cual proviene, mientras el derivado del endotelio contribuye en el establecimiento de la preñez, el sintetizado por los macrófagos participa en el rechazo del embrión, debiendo considerarse que al tratarse del mismo mensajero, la diferencia puede estar sustentada por la concentración del •NO producido por cada tipo de células involucradas.

Parece ser que la fuente de producción del •NO es clave en la determinación de su efecto. Mientras que el •NO formado a partir de la óxido nítrico sintasa constitutiva es importante en el mantenimiento vasodilatador del embarazo, el formado a partir de

la isoenzima inducible producida por los macrófagos, participa en el rechazo del embrión. No obstante, en el establecimiento del embarazo es indispensable un equilibrio en la producción de las isoenzimas constitutiva e inducible.

Uno de los mecanismos responsables de la preeclampsia es la pérdida de la eficiencia de la vía L-arginina-óxido nítrico, dando como consecuencia la disminución plasmática de la concentración de 3'-5'-guanosina monofosfato cíclico encontrada durante este padecimiento<sup>6</sup>. Mucho se ha mencionado acerca de los efectos del •NO sobre la relajación del músculo liso, sin embargo su regulación por hormonas o factores de crecimiento, así como su mecanismo de acción e interacción con otras moléculas permanece poco estudiado.

Tabla III

## Efecto de los estrógenos y la progesterona sobre la regulación del óxido nítrico

### Los estrógenos

Aumentan la actividad biológica del NO al incrementar la producción de SOD

Arnal JF. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:4108-4113.

El gene que codifica para la eNOs tiene afinidad por el receptor de estrógenos.

Venema RC. *Biochim Biophys Acta* 1994;1218:413-420.

Niyahora K. *Eur J Biochem.* 1994; 223: 719-726.

Los estrógenos disminuyen la motilidad en ratas y aumentan la concentración de NO y GMPc.

Franchi. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 539-543.

### La progesterona

En la rata, inhibe la producción de óxido nítrico y radicales libres por los macrófagos

Sugino N. *Endocrinology* 1996;137(2): 749-754.

En las ratas preñadas, no preñadas y en machos, revierte el aumento de presión sistólica provocado por la L-nitro-arginina.

Q-P Liao. *Human Reprod* 1996; 11(12): 2777-84.

•NO: óxido nítrico, SOD: superóxido dismutasa. eNOs óxido nítrico sintasa endotelial.

## Efectos

Los efectos sobre la vasodilatación durante el embarazo, se deben principalmente a la propiedad que tiene el •NO para unirse al grupo hemo de enzimas como la guanilil ciclasa y/o la cicloxigenasa, conduciendo al aumento del GMPc o de la síntesis de prostaglandinas. Con respecto al proceso de reproducción hay trabajos que apoyan las hipótesis de que el papel benéfico del •NO sobre la regulación de la vasodilatación se debe por un lado al efecto de este radical sobre la estimulación de la síntesis de prostaglandinas, la cual demostró ser paralela al aumento de las contracciones del útero, y por el otro sobre la síntesis del GMPc y el aumento de la relajación del útero<sup>27</sup>. Franchi AM<sup>23</sup> demostró en el útero de rata, que el •NO aumentó la producción de ácido araquidónico y sus metabolitos, dicho aumento disminuyó significativamente con los inhibidores específicos de la óxido nítrico sintasa además, en úteros tanto de ratas<sup>28</sup> como de conejas<sup>29</sup> preñadas, se encontró que las concentraciones del •NO y el GMPc así como la relajación del músculo liso aumentaron durante toda la preñez pero disminuyeron al acercarse el parto.

Por otro lado, Novaro y col<sup>21</sup> demostraron que el inhibidor L-NAME (inhibidor de la óxido nítrico sintasa) suprimió la producción de las prostaglandinas E y F<sub>2α</sub> en el tejido uterino durante el 5° día de la gestación (implantación), estos resultados fueron paralelos a la inhibición de la actividad de la óxido nítrico sintasa.

Todo parece indicar que tanto la formación del GMPc como la de prostaglandinas inducidos por el

•NO son importantes durante el embarazo, sin embargo, debe existir un control que según las necesidades del organismo desencadene una ruta y bloquee la otra.

## Regulación

La mayoría de los autores ha estudiado la regulación del •NO por medio de la inhibición específica de su enzima formadora, la óxido nítrico sintasa. Las dos isoenzimas más estudiadas son la óxido nítrico sintasa endotelial o constitutiva y la producida por los macrófagos o inducible. La regulación de estas dos isoformas es diferente, de tal manera que la primera es estimulada por hormonas, mientras que la segunda por citocinas o/y factores de crecimiento.

Liao Q-P y col.<sup>30</sup> encontraron que la progesterona, pero no el estradiol, revierte el aumento de presión sistólica provocado en las ratas preñadas después de la administración del inhibidor L-NAME, además, el antiprogéstágeno RU486 la aumenta nuevamente, por lo que se sugiere que la acción de la hormona sobre la presión sanguínea es mediada a través de sus receptores. Por su parte Sugino y col. descubrieron que la progesterona inhibe la producción del •NO generado por los fagocitos mononucleares obtenidos del cuerpo lúteo de ratas (tabla III). Se propone que la progesterona podría actuar inhibiendo la producción del •NO vía los receptores de esta hormona, ya que estos receptores se han encontrado en células ricas en macrófagos como son los neutrófilos y los eosinófilos del pulmón de conejo. Es posible que el efecto de la progesterona sobre la vasodilatación del embarazo se efectúe indirectamente disminu-

yendo la producción de •NO generado por los macrófagos y permitiendo de esta manera que predomine la síntesis del •NO generado por las células del endotelio<sup>31</sup>.

Por otro lado, se encontró durante la preñez en la rata<sup>28</sup> y el cobayo<sup>9</sup>, que las concentraciones de 17β-estradiol aumentaron paralelamente con la actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial y que el gene que codifica para este enzima tiene afinidad por el receptor de estrógenos, por lo que se sospecha que la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial es mediada por el receptor de estrógenos. Además, el tratamiento de las células endoteliales con el 17β-estradiol aumentó los niveles del ARNm para la óxido nítrico sintasa endotelial, un efecto que se inhibió con el pretratamiento con el antiestrógeno tamoxifeno. No obstante, estos descubrimientos requieren de más estudios, ya que aun presentan mucha controversia. Arnal y col. encontraron que los estrógenos aumentaron la actividad biológica del óxido nítrico debido a que estas hormonas elevan la producción de la superóxido dismutasa, disminuyendo de esta manera la concentración del anión superóxido: el anión superóxido disminuye la concentración del •NO al combinarse con el anión superóxido para formar el peroxinitrito<sup>32</sup>.

Geller y col.<sup>33</sup> encontraron que los lipopolisacáridos, la interleucina I (IL-1), el factor de necrosis tumoral (γTNF) y el interferón γ (IFN-γ) aumentan significativamente la concentración del ARNm para la óxido nítrico sintasa inducida por los macrófagos. Los mismos autores demostraron en



hepatocitos de rata que la dexametasona disminuye en 30% los niveles de ARNm para la misma enzima; esto puede deberse al efecto estabilizador de las membranas que posee este glucocorticoide, el cual evita la liberación de moléculas indispensables (algunas hidrolasas

lisosomales<sup>34,35</sup>) para los procesos de transcripción. Por lo anterior se demuestra que la regulación de la isoenzima inducible es diferente de la constitutiva presente en las células endoteliales.

Los estudios realizados hasta la fecha sugieren que durante el

embarazo los estrógenos aumentan la vasodilatación, por medio del •NO generado por la óxido nítrico sintasa de origen endotelial; mientras que la progesterona inhibe la formación de •NO proveniente de la acción enzimática de la óxido nítrico sintasa inducible.

#### ■ REFERENCIAS

1. Moncada S, Palmer MJ, Higgs EA: *Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology*. Pharmacological Reviews 1991; 43(2): 109-142.
2. Genoveva Durán-Reyes, Ma. del Rocío Gómez Meléndez y Juan José Hicks Gómez: *Importancia de los radicales libres durante el ciclo reproductor*. En prensa. Aceptado para publicarse en el volumen 66 correspondiente a 1998 de la Revista de Ginecología y Obstetricia de México.
3. Fostermann V, Pollock JS, Schimidt HHW, Heller M and Murad F: *Calmodulin-dependent endothelium derived relaxing factor nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 1788-1792.
4. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, and Chaudhuri G: *Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide*. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 9265-9269.
5. Weiner CP, Martínez EZ, Ghodsi A, Chestnut DH: *In vitro release of endothelium derived relaxing factor by acetylcholine is increased during the guinea pig pregnancy*. Am J Obstet Gynecol 1989; 161: 1599-1605.
6. Kirk P, Conrad Gary M, Joffe, Harriet K, Robert K, Rochelle G, Roger P, Chavez JE, Monique D. *Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats*. FASEB J 1993; 7: 566-571.
7. Buhimschi Irina, Yallampalli C, Dong Y-L: *Involvement of a nitric oxide-guanosine monophosphate pathway in control human uterine contractility during pregnancy*. Am J Obstet Gynecol 1995; 172: 1577-84.
8. Stephen M, Sladek MD, Anne C, Regenstein MD, David Lykins MA, James M: *Nitric oxide synthase activity in pregnant rabbit uterus decreases on the last day of pregnancy*. Am J Obstet Gynecol 1993; 169:1285-95.
9. Weiner CP, Knowles RG, and Moncada S: *Induction of nitric oxide synthases early in pregnancy*. Am J Obstet Gynecol 1994; 171: 838-43.
10. Gorge A, Van Buren MD, Da-seng Yanf, Kenneth E: *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.
11. Magness RR, Roy T, Rosenfeld CR: *Endothelium-derived relaxing factor (EDFR) modulates estradiol-17 $\beta$  increases in uterine blood flow (UBF) in nonpregnant sheep (abstract 567)*. In: *Proceeding of the thiryninth annual meeting of the Society for Gynecologic investigation*, San Antonio, Texas, March 18-21, 1992.
12. Chang JK, Roman C, Heyman MA. *Effect of endothelium-derived relaxing factor inhibition on the umbilical placental circulation in fetal lamb in utero*. Am J Obstet Gynecol 1992; 166: 727-734.
13. Redman GWG: *Current Topic: pre-eclampsia and the placenta*. Placenta 1991; 12: 301-308.
14. Goodman RP, Killans AP, Branch RA: *Prostaglandin production during pregnancy: comparison of production during normal pregnancy and pregnancy complicated by hypertension*. Am J Obstet Gynecol 1982; 142:817-822.
15. Chwalisz K, Ciesla I and Garfield RE: *Inhibition of nitric oxide (NO) synthesis induces preterm parturition and preeclampsia like conditions in guinea pigs*. 1994. Society for Gynecologic Investigation, 41<sup>st</sup> Annual Meeting, Chicago Illinois, Usa. Abstr.
16. Neri I, Di Renzo GD, Caserta G, Gallinelli A, Facchinetti F: *Impact of the L-arginine/nitric oxide system in pregnancy*. Obstetric Am Gynecological Survey, 1995; 50(12): 851-858.
17. Greenspoon Js, Kovacic A: *Breech extraction facilitated by glycerin trinitrate sublingual spray*. Lancet 1991; 338: 124.
18. Irina Buhimschi, Chandrasekhar Yallampalli., Kristof Chawliz and Robert E. Garfiel: *Pre-eclampsia-like conditions produced by nitric oxide inhibition: effects of L-arginine, D-arginine and steroid hormones*. Human Reprod 1995; 10(10): 2773-2730.
19. Molnár M., Sht T., T/h T., Hertelendy F: *Prolonged blockade of nitric oxide synthesis in gravid rats produces sustaines hypertension, proteinuria, thrombocytopenia, and intrauterine grow retardation*. Am J Obstet Gynecol 1994; 170: 1458-66.
20. Baylis C., Mitruka B: *Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage*. J Clin Invest 1992; 20: 278-81.
21. Novaro V, Rettori V, González ET, Jawerbaum A, Faletti A, Canteos G y Gimeno MAF: *Interaction between uterine PGE and PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  production and the nitridergic system during embryonic implantation in the rat*, Prostaglandins 1996; 51: 363-376.
22. Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, and Needleman P: *Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes*. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 7240-7244.
23. Franchi AM, Chaud M, Rettori V, Suburo A, McCann SM y Gimeno M: *Role of nitric oxide in eicosanoid synthesis and uterine in estrogen-treated rat uteri*. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 539-543.
24. Rettori U, Gimeno M, Lyson K and McCann SM: *Nitric oxide mediates norepinephrine-induced prostaglandin E<sub>2</sub> release from the hypothalamus*. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 11543-11546.
25. Kennedy TG, and Lukash: *Induction of decidualization in rat by the intrauterine infusion of prostaglandins*. Biol Reprod 1982; 27: 253-260.
26. Haddad EK, Duclos AJ and Baines MG: *Early Embryo Loss Is Associated With Local Production of nitric oxide decidual mononuclear cells*. J Esp Med 1995; 182: 1143-1152.
27. Radomski MW, Palmer RM and Moncada S: *Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive nitric oxidase synthase in vascular endothelial cells* Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 10043-10047.
28. Yallampalli C, Izumi H, Byam-Smith M, Gardfiel RE: *An L-arginine-nitric oxide guanosine monofosphate system exists in*

- the uterus and inhibits contractility during pregnancy.* Am J Obstet Gynecol 1994; 170: 175-85.
29. Sladek SM, Regestein AC, Lykins D, Roberts JM: *Nitric oxide synthase activity in pregnant rabbit uterus decreases on the last day of pregnancy.* Am J Obstet Gynecol 1993; 169: 1285-91.
30. Liao Q-P, Buhimschi IA, Saade G, Chdwalisz K y Gardfield RE: *Regulation of vascular adaptation during pregnancy and ppsartum: effects of nitric oxid inhibition and steroid hormones.* Human Reprod 1996; 11(12): 2777-2784.
31. Sugino N, Shimamura H, Tamura M, Ono M, Nakamura Y, Ogino K, and Kato H: *Progesterone inhibits superoxide radical production by mononuclear phagocytes in pseudopregnant rats.* Endocrinology 1996; 37(2): 749-754.
32. Arnal JF, Clamens S, Pechet C, Negre-Salvayre A, Allera C: *Ethinylestradiol does not enhance the expression of nitric oxide sintase in bovine endothelial cells but increases the release of bioactive nitric oxide by inhibiting superoxide anion production.* Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 4108-4113.
33. Geller DA, Nussler AK, Di Silvio M, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Wang SC, Simmons RL y Billiar RT: *Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes.* Proc Natl Acad Sc USA 1993; 90: 522-526.
34. JJ Hicks, G Durán-Reyes, and M Diaz-Flores: *Effect of dexamethadone as an inhibitor of implantation and embryo development in rat: lysosomal role.* Contraception 1994; 50(6): 581-589.
35. Genoveva Durán-Reyes, Margarita Díaz-Flores, Sebastian Castillo and Juan José Hicks: *Nuclear Presence of two lysosomal enzymes in rat implantation sites.* Int J Fertil 1994; 39(5): 299-303.

## Importancia de los radicales libres durante el ciclo reproductor

M EN C GENOVEVA DURÁN REYES\*, MA. DEL ROCÍO GÓMEZ MELÉNDEZ\*\*,  
DR. JUÁN JOSÉ HICKS GÓMEZ

### RESUMEN

Los productos de la peroxidación, los radicales libres y los compuestos antioxidantes aumentan notablemente durante la ovulación, la implantación y a medida que transcurre la gestación. La concentración del radical anión superóxido ( $O_2^-$ ) aumenta aproximadamente seis veces en el proestro, mientras que su enzima reguladora, la superóxido dismutasa, disminuye. La presencia del radical superóxido está relacionada con el edema y la proliferación celular del estro. Este radical también está relacionado con el aumento de la fluidez y polaridad de las membranas durante la implantación. A medida que evoluciona la preñez aumentan los productos de lipoperoxidación y los compuestos antioxidantes, sugiriendo que los lipoperóxidos durante esta etapa evocan a los mecanismos de defensa, de tal manera que al final de la gestación los antioxidantes superan a los fenómenos peroxidativos. Por otro lado, el radical óxido nítrico ha cobrado gran importancia durante la gestación, ya que es considerado como uno de los relajantes más potentes del músculo liso. La inhibición de su síntesis provoca signos semejantes a los de pre-eclampsia y su administración logra revertir muchas alteraciones vasculares. El papel de los radicales libres no se limita a efectos nocivos, sino que oportunamente y en concentraciones adecuadas, éstos participan como inductores de factores de crecimiento o en la fluidez de las membranas.

(Durán R. G. y col.: *Importancia de los radicales libres durante el ciclo reproductor* Ginec. Obst. Mex. 1998; 66:371)

### SUMMARY

The peroxidation products, the free radicals, and the antioxidant compounds notable increase during ovulation, implantation, and pregnancy evolution. Superoxide anion ( $O_2^-$ ) rise six time more on the proestrous, than on other stages, while its regulation enzyme, the superoxide dismutase (SOD), decreases. The presence of superoxide anion is related with the edema and the cellular proliferation on the estrous. Superoxide anion is also connected with the increase of fluidity and polarity of the membranes during the implantation. As the pregnancy elapse the lipoperoxides products and the antioxidant compounds augment suggesting that lipoperoxides evoke defense mechanism in a way that, at the end of the pregnancy, the antioxidants exceed peroxidatives phenomena. By the other hand, the nitric oxide radical has gained great importance during the pregnancy because it is considered one of the most powerful relaxants

Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI A:P:12-855.  
Este trabajo forma parte de la tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas\* de la UAM Iztapalapa y de Maestría en Biología de la Reproducción\*\* de la Enep Iztacala UNAM.

of smooth muscle. The inhibition of its synthesis provokes similar signs to the pre-eclampsia and its administration can revert many vascular alterations. The role of free radicals is not limited to dangerous effects, but it also, in adequate concentrations, includes the as stimulators of growth factors, and participants of the membranes fluidity.

(Durán R. G. y col: *Importance of free radicals during the reproductive cycle*. Ginec. Obst. Mex. 1998; 66:371).

En el humano los productos de la lipoperoxidación, la presencia de radicales libres y los compuestos antioxidantes son notablemente marcados durante la ovulación, la implantación y a medida que transcurre la gestación, sugiriendo por lo tanto, que éstos juegan un papel muy importante en el ciclo reproductor.

Un radical libre es una entidad química que contiene uno o más electrones desapareados. La presencia de electrones desapareados modifica la reactividad química de un átomo o molécula y lo hace generalmente más reactivo que su correspondiente no radical. Sin embargo, la reactividad química de los diferentes tipos de radicales es muy variable.

Los radicales libres pueden ser generados dentro de las células como intermediarios de procesos bioquímicos, tal como aquellos que involucran enzimas redox y transferencia de electrones. La mayoría de los radicales de interés para la biología o la medicina son los derivados del oxígeno; de los cuales, pueden mencionarse el radical superóxido ( $O_2^-$ ), el hidroxilo (OH) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que aunque no es un radical libre, está estrechamente relacionado porque es el principal precursor del radical hidroxilo<sup>1</sup>.

Con el fin de controlar el efecto de los radicales libres los organismos aeróbicos han desarrollado mecanismos de defensa contra el ataque de estos radicales; una línea de defensa que actúa contra especies reactivas de oxígeno e incluye la superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión (GSH) peroxidasa, y otra segunda representada por compuestos que minimizan la peroxidación de las membranas e incluye a la vitamina E y la glutatión peroxidasa que se encuentra unida a las membranas<sup>2</sup>.

Una amplia variedad de tipos celulares normales y malignos generan y liberan anión superóxido ( $O_2^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en respuesta a factores de crecimiento. Estos compuestos a concentraciones submicromolares pueden actuar como mensajeros inter e intracelulares capaces de promover respuestas de crecimiento en cultivo. El mecanismo puede involucrar la interacción con receptores específicos u oxidación de moléculas de transducción como las proteínas cinasas, proteínas fosfatasa, factores de transcripción o inhibidores de los factores de transcripción<sup>3</sup>. En el útero, la concentración del radical superóxido y los productos de lipoperoxidación sufren cambios cíclicos que se correlacionan con los fenómenos regulados por estrógenos.

Otro radical que ha cobrado importancia principalmente en reproducción es el óxido nítrico (NO), se piensa que este compuesto equivale al clasificado como el factor relajante derivado del endotelio (EDRF). Este radical es un potente vasodilatador del músculo liso, que además previene la agregación de las plaquetas y su adhesión al endotelio. El NO presente en los tejidos se descompone rápidamente en presencia del anión superóxido para formar

el peroxinitrito (ONOO), un compuesto altamente reactivo con propiedades similares a las del radical hidroxilo (OH). Los macrófagos generan óxido nítrico y anión superóxido durante sus actividades en inflamación, por los que se sugiere que el daño al tejido es vía la formación de peroxinitrito. Durante la gestación, la concentración de este radical se eleva en los momentos que se requiere de mayor vascularización, como es la implantación, y disminuye cuando predomina la vasoconstricción que prevalece en el parto. Se piensa que la formación del óxido nítrico está regulada por medio de la superóxido dismutasa, ya que esta enzima descompone al anión superóxido, el que a su vez inhibe la formación del  $NO^4$ .

La lipoperoxidación es uno de los efectos de los radicales libres, y se define como la interacción de estas moléculas con los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de las membranas; tal ataque ocurre en los hidrógenos alílicos sobre los átomos de carbono entre dos dobles enlaces. Los componentes fosfolípidicos de las membranas celulares son blancos altamente vulnerables a daño oxidativo debido a la susceptibilidad que poseen sus cadenas de ácidos grasos polinsaturados para peroxidarse. De esta manera se producen cambios en la fluidez y permeabilidad de las membranas. Durante las reacciones de lipoperoxidación el rompimiento de los enlaces de carbono da lugar a la formación de alcanales como el malondialdehído, el cual puede reaccionar con grupos tioles y dar lugar a cromolípidos. Estos compuestos se utilizan con frecuencia para medir el daño peroxidativo<sup>5</sup>.

Los lipoperoxidos se forman en procesos biológicos normales *in vitro*; el radical superóxido y otras especies reactivas de oxígeno son producto de la acción de oxidasas como xantina oxidasa, NADPH oxidasa, las enzimas del citocromo P450 y la prostaglandina sintasa. La oxidación enzimática del ácido araquidónico (liberado a partir de lípidos como un resultado de la activación de la fosfolipasa  $A_2$ ) durante la biosíntesis de eicosanoides es acompañada por la generación de hidroperóxidos y formación de radicales libres derivados del oxígeno<sup>6</sup>.

La lipoperoxidación puede ser potencialmente dañina, debido a que la falta de control de este fenómeno conduce al rompimiento de las membranas celulares. Además, este fenómeno está íntimamente relacionado con procesos degenerativos tales como cáncer, arteriosclerosis y pre-eclampsia/eclampsia, no obstante, de manera controlada dicho fenómeno es vital.

El propósito de este trabajo, es revisar el perfil oxidante/antioxidante que se presenta durante el ciclo estral, la implantación y la gestación, dando énfasis a los radicales libres más estudiados en este campo. Además, hacer hincapié en que un desequilibrio en el sistema oxidante-antioxidante conduce al bloqueo del embarazo.

### El ciclo estral

Durante el ciclo estral en el útero de la rata, se ha encontrado que las concentraciones del anión superóxido ( $O_2^-$ ) y superóxido dismutasa (SOD), sufren cambios cíclicos. Durante el proestro la concentración del  $O_2^-$  se incrementa seis veces, mientras que la de su enzima dismutadora, la superóxido dismutasa, disminuye en la misma proporción<sup>7</sup> (figura 1). Se piensa que el radical superóxido está relacionado con la regulación de los cambios uterinos durante el ciclo estral. Se demostró que la presencia del radical superóxido durante el proestro causa edema y proliferación celular, mientras que la SOD se encuentra disminuida durante esta etapa, pero aumenta durante el diestro 1 y 2. Esto hace suponer que la pérdida del anión superóxido y del edema<sup>8</sup> se deben a la regulación de este radical por la superóxido dismutasa. Resulta interesante saber que durante el ciclo estral en el ovario, la SOD y el anión superóxido sufren cambios cíclicos, presentándose en este caso un aumento de la SOD durante el proestro simultáneo a la disminución del anión superóxido<sup>9</sup>. La presencia de altos niveles de SOD durante el proestro puede formar parte de una acción tiempo secuencial, generando suficiente peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el cual es el sustrato adecuado para la acción de la peroxidasa que se encuentra elevada en este órgano durante el estro<sup>10</sup>. Además, se ha demostrado que la hormona luteinizante (LH) induce 30' después de su administración aumento en la actividad de la SOD y tres horas después el aumento en la actividad de la peroxidasa y la disminución del ascorbato. Se piensa que el  $O_2^-$  tiene un papel benéfico en la esteroidogénesis lútea por medio de una reacción de radicales libres que involucra ascorbato para la oxidación de pregnenolona a progesterona<sup>10</sup>.

### La implantación

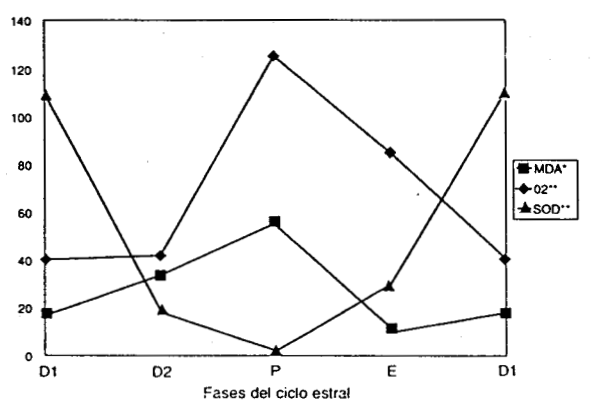
La implantación es el fenómeno en donde las membranas del blastocisto y el útero sufren alteraciones biofísicas que favorecen la fusión de ambas membranas. Además, en

nuestro laboratorio<sup>11</sup> demostramos durante esta etapa, que las membranas de orgánulos como los lisosomas también presentan alteraciones que permiten la liberación selectiva y hormono dependiente de hidrolasas lisosomales. Se ha demostrado que la fusión de las membranas es dependiente de la fluidez de la bicapa fosfolípida. Laloraya y col<sup>12,13</sup> encontraron disminución del ambiente polar del endometrio uterino de la rata durante los primeros cuatro días de preñez. Dicha disminución, fue seguida de un aumento considerable durante las primeras horas de día 5 (implantación) y una nueva disminución a las 10 AM. Además, descubrieron que el comportamiento polar fue paralelo a la fluidez de las membranas celulares. El incremento en la fluidez durante la implantación puede ser consecuencia de un incremento del radical superóxido ( $O_2^-$ ) durante este tiempo. Se encontró que el  $O_2^-$  estimula la peroxidación de ácidos grasos de la membrana y eventualmente conduce a la pérdida total de la integridad de la membrana<sup>8</sup>. Además, durante las primeras cinco horas del día de la implantación, se encuentra considerablemente elevado el malondialdehído (un producto de la peroxidación de lípidos) y presenta un comportamiento similar al del anión superóxido<sup>12,14</sup> (figura 2).

Los elevados niveles del  $O_2^-$  en el sitio de implantación, coinciden con el aumento de la permeabilidad vascular presentada durante la etapa de implantación, este incremento permite el flujo de nutrientes de la madre al embrión<sup>15</sup>. También se sabe que la peroxidación de las membranas ocasiona la liberación de hidrolasas lisosomales, las que por un lado permiten la lisis del tejido epitelial materno para favorecer su unión al embrión, y por el otro participan en la desrepresión del DNA durante la implantación<sup>11</sup>. En nuestro laboratorio comprobamos que la dexametasona, un compuesto que suprime la fluidez de las membranas, evita la liberación de hidrolasas e impide la implantación<sup>16</sup>.

**Figura 1**

Perfil uterino de lipoperoxidación durante el ciclo estral en el útero de la rata

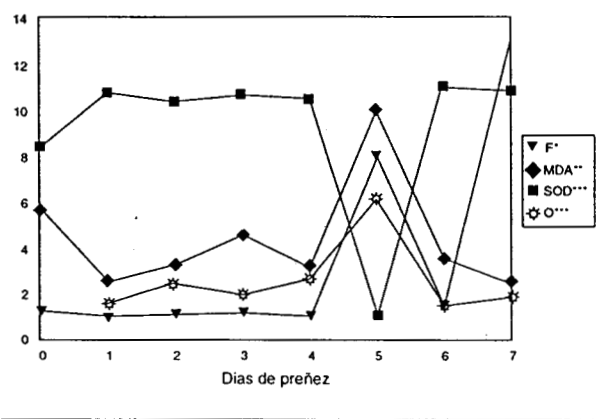


Fases del ciclo estral

Perfil de lipoperoxidación (malonaldehído: MDA), actividad de superóxido dismutasa (SOD) y radical anión superóxido ( $O_2^-$ ) en el útero de la rata durante las fases de ciclo (diestro 1 y 2, proestro y estro). MDA (nM/mg de peso seco/min.) SOD (u/mg de proteína/min x 10)  $O_2^-$  (x 10 espectro). \*Sudir J, Monzy T, Pradeep K, Malini L. Biochem Biophys Res Commun 1993;195(2):574-580. \*\*Malini L, Pradeep K, Manmohan M. Biochem Biophys Res Commun 1988;157(1):146-153.

**Figura 2**

Perfil uterino de lipoperoxidación durante la perimplantación en la rata



Perfil de fluidez de la membrana (F: espectro), concentración de malonaldehído (MDA: nM/mg proteína/min), actividad de superóxido dismutasa (SOD: u/mg peso seco x 10) y concentración de anión superóxido ( $O_2^-$  - espectro X 10). \* Laloraya M. Biochem Biophys Res Commun (1990); 167 (2):561-567. \*\* Sudir J., Monzy T., Pradeep K., Malini L. Biochem Biophys Res Commun. (1993);195(2):574-580.\*\*\*Laloraya M., Kumar P., Manmohan M. Biochem Biophys Res Commun (1993);161(2):762-770.

Por sus propiedades bioquímicas, la presencia del anión superóxido ( $O_2^-$ ), resultaría sumamente tóxica sin un mecanismo de control. La enzima superóxido dismutasa (SOD), presenta un comportamiento inversamente proporcional al del  $O_2^-$  (figura 1 y 2) sufriendo que su presencia regula el proceso y que una asincronía entre estos dos compuestos resultaría perjudicial para el establecimiento de la preñez.

Se sabe que durante la implantación del blastocisto se produce un aumento en la producción de radicales libres de oxígeno, los cuales, junto con los lipoperóxidos interfieren con la fisiología endotelial: el anión superóxido regula la concentración de uno de los principales relajantes del endotelio, el óxido nítrico (NO). El radical libre óxido nítrico es un compuesto cuyo principal efecto es la relajación del músculo liso, por lo que durante la preñez este juega un papel muy importante en los cambios vasculares. La regulación de la concentración de este radical es por medio su reacción con el  $O_2^-$  para dar origen a otro compuesto, el peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), un compuesto que tiene gran efecto bacteriostático. De esta manera una alteración en la concentración de radicales libres puede ser la causa de las alteraciones vasculares ocurridas durante la preclampsia/eclampsia<sup>17</sup>.

En nuestro laboratorio pretendemos demostrar inhibiendo la síntesis de NO, que este radical es indispensable para que el endometrio adquiera la vascularización necesaria durante la etapa de implantación.

### La preñez

El progreso de la gestación se acompaña del aumento en la síntesis y contenido de fosfolípidos del tejido placentario, así como disminución de la actividad de las enzimas limitantes de las rutas glicolítica y gluconeogénica, sugiriendo que dichas alteraciones son la expresión de su senectud<sup>18</sup>.

Los procesos de peroxidación aumentan a medida que avanza la preñez. Dicho incremento peroxidativo evoca a los mecanismos de defensa, de tal manera que al final de la gestación los mecanismos de protección son más fuertes que los de peroxidación. Diamant S y col<sup>16</sup> encontraron en el plasma humano, que la formación de malondialdehído aumenta de 3.08 durante el 1<sup>er</sup> trimestre del embarazo hasta 6.9 nmoles/mg de proteína/30 min durante el 3<sup>er</sup> trimestre. Por otro, lado Uotila J. y col<sup>19</sup> descubrió en los tejidos de la placenta, que las unidades de glutatión peroxidasa/g de hemoglobina aumentan de 37.5 al inicio del embarazo hasta 46.1 al final del mismo, el selenio de 143 µg/l a 151, la vitamina E de 21.4 a 38.1 nmoles/l y el colesterol de 4.3 a 6.9 nmoles/l. (figura 3). Se supone que la lipoperoxidación durante la preñez esta regulada por un sistema de peroxidasa dependiente de NADPH, ya que la peroxidación microsomal y mitocondrial de la placenta es dependiente de este cofactor. Cabe mencionar que la peroxidación lipídica en la placenta de nacimientos efectuados por cesárea es considerablemente menor que aquella de partos normales, esto puede deberse a que el mecanismo de iniciación de labor en nacimientos espontáneos esta regulado posiblemente por prostaglandinas<sup>20</sup> (el metabolismo del ácido araquidónico produce radicales libres). Se supone

que el proceso de lipoperoxidación normal durante la preñez se controla por una adecuada respuesta antioxidante.

La concentración plasmática de los productos de oxidación de los radicales libres es significativamente más alta en preñez complicada por pre-eclampsia que en preñez normal. Se ha encontrado que la presión sanguínea y la presencia de radicales libres aumentan en proporción lineal, por lo que se postula que la actividad de radicales-libres tiene efectos patológicos sobre la presión sanguínea. Esta hipótesis se refuerza por el hecho de que los productos de radicales libres tienen marcados efectos sobre el músculo liso y la agregación de las plaquetas, Katrina J y col<sup>21</sup> demostraron que un producto de la peroxidación del ácido linoléico (dieno conjugado) se encuentra más elevado en el plasma de mujeres pre-eclámplicas a partir de la semana 28 de la gestación que en las embarazadas normales, dicha elevación permaneció hasta el puerperio y se correlacionó directamente con la gravedad de la pre-eclampsia, incluyendo el aumento de la presión diastólica.

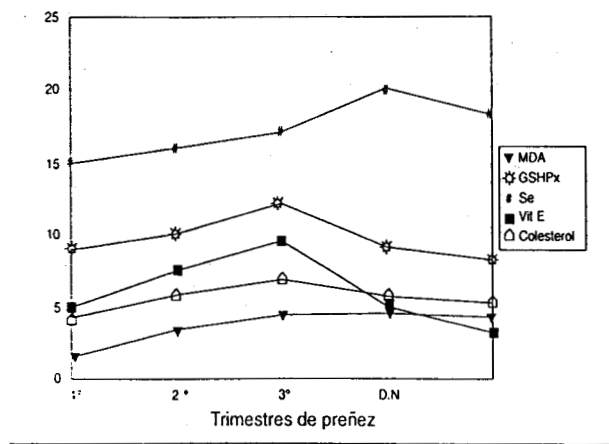
Preclampsia/eclampsia, la complicación médica más común del embarazo, constituye el síndrome de vasoconstricción con elevada presión arterial, edema, proteinuria y convulsiones. Aunque el concepto de que esta patología se debe principalmente a un desequilibrio en la relación prostaglandinas/tromboxanos, esta hipótesis no aclara la etiología del padecimiento.

La actividad de los radicales libres *in vivo* puede estar relacionada con la síntesis de algunas prostaglandinas y sus derivados vasoactivos. Un estudio demostró que la concentración de prostaglandina  $E_2$  es baja, mientras que la  $F_2$  es alta en mujeres preñadas. Además, en pre-eclampsia severa la prostaciclina disminuyó considerablemente y se correlacionó inversamente con la presencia de productos de lipoperoxidación<sup>22</sup>.

Durante la preñez normal en la mujer y otros mamíferos como la rata, ocurre pronunciada vasodilatación de la

Figura 3

Perfil de peroxidación durante la preñez en el humano



Malondialdehído (MDA): nM/mg peso seco/min. Glutatión peroxidasa (GSHPx): unidades/mg de proteína x 10. Selenio (Se): µg/l x 10. Vitamina E (vit E): µmol/l. Colesterol nmol/l. Tabla modificada a partir de datos de Uotila J, Tuimala R, Ahotupa M. Europ J Obstets Gynecol Reprod Biof 1991;42:95-100.

vasculatura materna. Dichos cambios finalmente aseguran la adecuada liberación de oxígeno y nutrientes al feto. Se sabe que el NO es uno de los principales relajantes del músculo liso, y el bloqueo de su síntesis conduce a alteraciones tales como pre-eclampsia e hipertensión del recién nacido.

Conrad y col<sup>23</sup> encontraron que en el plasma y orina de ratas grávidas, la concentración de óxido nítrico aumenta a partir del día seis de preñez hasta obtener un pico máximo al día 13 cuyo valor es el doble del encontrado antes del embarazo. Este aumento se mantiene hasta el término de la preñez y declina bruscamente al acercarse el parto. Se piensa que el NO es un relajante endógeno que disminuye al acercarse el parto probablemente con la finalidad de favorecer el trabajo de labor necesario durante el nacimiento. Por otro lado, un inhibidor competitivo de la enzima que sintetiza el NO (óxido nítrico sintasa), la nitro-L-arginina, suprime el aumento de NO producido durante la preñez, por lo que la producción del NO se lleva a cabo a partir de L-arginina. Se supone que el NO participa como relajante del músculo liso activando a la guanil ciclasa y al GMPc, el que posteriormente estimula el metabolismo del calcio. Además, la concentración de GMPc aumenta en forma paralela a la producción de NO<sup>24</sup>. En el útero de conejos se encontró actividad de óxido nítrico sintasa, y también se descubrió que esta enzima disminuye su actividad a 80% el último día de la gestación. Ya que el NO es un compuesto con una vida media muy corta es de esperarse que el sitio en donde ejerce su efecto es el mismo de su producción.

La participación del NO durante la preñez ha podido demostrarse en otros órganos. Weiner CP y col encontraron que a medida que progresa la gestación en cobayos, la actividad de la óxido nítrico sintasa aumenta en riñón, corazón, músculo esquelético y esófago, sugiriendo que las alteraciones características de la preñez como son el reflujo esofágico, el aumento en el gasto cardiaco y la permeabilidad glomerular son regulados por este radical. Además dichos aumentos se suprimen al agregar un antiestrógeno, por lo que esta hormona regula su producción. La progesterona demostró no tener algún efecto<sup>25</sup>.

Algunos autores han utilizado el NO como medida terapéutica en el tratamiento de algunas alteraciones vasculares de la preñez. En ovejas, el NO inhalado en dosis de 6-100 ppm dilata selectivamente la circulación pulmonar e incrementa la oxigenación dentro de los dos minutos después de su administración. Además, cuando el óxido nítrico fue administrado por un período de 24 horas, los cambios fueron sostenidos y la supervivencia aumentó<sup>26</sup>.

#### CONCLUSIÓN

Actualmente se sabe que el papel de los radicales libres no se limita a efectos deletéreos, sino que a concentraciones nmolares y bajo estímulos adecuados estos participan en la proliferación y mantenimiento celular. Sin embargo, una producción inadecuada de estos compuestos provoca reacciones en cadena y formación de otros radicales aun más tóxicos, como es el caso del óxido nítrico que en presencia del anión superóxido produce peroxinitrito, un potente bacteriostático.

Durante el ciclo reproductor y la gestación los radicales libres y sus antioxidantes mantienen un perfil de concentraciones finamente regulado que si se puede puede

conducir a alteraciones como las presentadas durante la preeclampsia, en la que la disminución del NO ocasionada seguramente por aumento del O<sub>2</sub>- provoca la disminuida vasodilatación característica de este padecimiento.

En la actualidad el estudio del óxido nítrico en la regulación de la preñez ha cobrado gran importancia no sólo a nivel del útero sino de otros órganos, por lo que muchos investigadores intentan demostrar su regulación y mecanismo de acción con el fin de poderlo utilizar como medida terapéutica. En nuestro laboratorio nosotros pretendemos demostrar que la supresión de la síntesis de este compuesto desde las etapas más tempranas de la preñez en la rata (implantación) es capaz de bloquear el desarrollo embrionario provocando síntomas similares a los de pre-eclampsia.

#### REFERENCIAS

1. Pardee AB: GI events and regulation of cell proliferation. *Science* 1989;246:603-608.
2. Hubel CA, Roberts JM, Taylor RN et al: Lipid peroxidation in pregnancy: new perspectives on pre-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 1989;161:1025-1034.
3. Free Radicals Biology & Medicine, Vol 18, No. 4, pp 775-794, 1995 Copyright. 1995 Elsevier Science. Printed in the USA.
4. Fre Radicals: *From Basic Science to Medicine*. G. poli, E. Albano & M.U. Dianzani (eds). 1993 Birkhauser Verlag Basel/Switzerland.
5. Rice-Evans C, Bruckdorfer KR: Free radicals, lipoproteins and cardiovascular dysfunction. *Mol Aspects Med* 1992;13:1-111.
6. Cross A, Jones OG: *Enzymic mechanism of superoxide production*. *Biochim Biophys Acta* 1991;1057:298.
7. Laloraya M, Kumar GP, Laloraya M M: *Changes in the superoxide radical and superoxide dismutase levels in the uterus of Rattus norvegicus during the estrous cycle and a possible role for superoxide radical in terine oedema and cell proliferation at proestrus*. *Biochem Cell Biol*. 1991;69:313-316.
8. Halliwell, B, Gutteridge, JMC: *Oxygen is posonus-an introduction to oxygen toxicity and free radicals*. In *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon Press, Oxford 1985;. pp. 1-19.
9. Laloraya M, Kumar P, Mannmohan M: *Changes in the levels of superoxide anion radical and superoxide dismutase during the estrous cycle of Rattus norvegicus and induction of superoxide dismutase in rat ovary by lutropin*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988;157(1):146-153.
10. Agrawal P., Laloraya M M: *Iduction of peroxidase in corpora lutea of rat ovary by lutropin* *Biochem J* 1997 166:205-208.
11. Durán-Reyes G, Díaz-Flores M, Hicks JJ: *Nuclear presence of two lysosomal enzymes in rat implantation sites*. *Int J Fertil* 1994;39(5):299-303.
12. Laloraya M, Kumar G P, Laloraya M M: *Nitric oxide in pregnancy*. *Biochem Biophys Res Comun* 1989;161(2):762-770.
13. Malini L: *Fluidity of the phospholipid bilayer of the endometrium at the time implantation of the blastocyst-a spin label study*. *Biochem Biphys Res Commun* 1990;167(2):561-567.
14. Sudhir J, Monzy T, Malini L. *Programmed lipid peroxidation of biomembranes generating kinked phospholipids permitting local molecular mobility: a peroxidative theory of fluidity management*. *Biochemical Biophys Res Commun* 1993;195(2):574-580.
15. Keys JL, King GJ, Kenedy JG: *Increased uterine vascular permeability at the time of embryonic attachment in the pig*. *Biol Reprod* 1986;34:405-411.
16. Hicks JJ, Durán-Reyes G, Díaz-Flores M: *Effect of dexamethasone as an inhibitor of implantation and embryo development in rat; lysosomal role*. 1994;50:851-589.
17. Gerda G, Gustaaf AD, Herman P: *Endotelial function in normal and pre-eclamptic pregnancy: a hypothesis*. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1992;43:113-122.
18. Diamant Y. Z, Mayorek N, Neuman S: *Enzymes of glucose and fatty acid metabolism in early and term human placentas*. *Am J. Obstet Gynecol* 1975;121:58-61.

19. Outila J, Tuimala R, Aarnio T., Pyykko K, Ahotypa M: *Lipid peroxidation products, selenium-dependent glutathione peroxidase and vitamin E in normal pregnancy*. European Journal of Obstetrics & Gynecology, and Reproductive Biology 1991;42:95-100.
20. Robak J, Sobannska B: *Relationship between lipid peroxidation and prostaglandin generation in rabbit tissues*. Biochem. Pharmacol 1976;25:2233-2236.
21. Katrina J, Erskine, Iversen SA, Davies R: *An altered Ratio of 18:2(9.11) to (9.12) linoleic acid in plasma phospholipids as a possible predictor of pre-eclampsia*. The lancet 1985;9:554-555.
22. Ongari MA, Ritter JM, Orchard MA, Waddell KA, Blair I A, Lewis PJ: *Correlation of prostacyclin synthesis by human umbilical artery with status of essential fatty acid*. Am J Obstet Gynecol 1984;149:455-60.
23. Conrad K, Joffe G, Kruszyna H, Kruszyna R, Lory G, Rochelle R, Smith P Chavez J, Mosher M. FASEB J 1993;7:556-571.
24. Kirk P C, Gary MJ, Harriet K, Robert K, Lori G, Rochele, Roger P, Smith JE, Chavez, Monique DM: *Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats*. FSEB J 1993;7:566-571.
25. Weiner CP, Richard MDG, Knowles, PhD, Salvador Moncada, MD, PhD: *Induction of nitric oxide synthases early in pregnancy*. Am J Obstet Gynecol 1994;171:838-43.
26. Wong J, Vanderford PA, Fineman JR: *Endothelin-1 produces pulmonary vasodilatation in the intact newborn lamb*. Am J Physiol 1993;265:H1318-1325.