



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

PLANTEL IZTAPALAPA

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION INTRAUTERINA DEL
INHIBIDOR DE LA OXIDO NITRICO SINTASA
N_ω-NITRO-L-ARGININA METIL ESTER SOBRE LA
IMPLANTACION EMBRIONARIA EN LA RATA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN BIOLOGIA DE LA
REPRODUCCION ANIMAL**

P R E S E N T A :

BIOL. ROBERTO DE ARO HERNANDEZ

TUTOR: DR. EFRAIN MERCADO PICHARDO.

ASESOR: DR. ADOLFO ROSADO GARCIA.

MEXICO, D. F.

DICIEMBRE 1997.

**Efecto de la administración intrauterina
del inhibidor de la óxido nítrico sintasa
N^o-nitro-L-arginina metil éster sobre
la implantación embrionaria
en la rata.**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Bioquímica de la Reproducción de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa bajo la dirección de los doctores Efraín Mercado Pichardo y Adolfo Rosado García

A mi hermano
Polo

quien más que nadie deseaba
que esto fuera posible.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a la Universidad Autónoma Metropolitana por haberme permitido realizar mis estudios de maestría en sus instalaciones; también, sinceramente, agradezco a quienes fueron mis profesores, especialmente a los investigadores del Area de Reproducción Asistida y a mis sinodales, los doctores Adolfo Rosado García, Efraín Mercado Pichardo y Luis Arturo Baiza Gutman, por cuanto contribuyeron en mi formación.

INDICE

Sección	Página
I - Introducción	1
1.1.- Anatomía del útero	1
1.2.- El embrión en estado de blastocisto	2
1.3.- Porque estudiar la implantación embrionaria	2
1.4.- Consideraciones iniciales sobre la implantación embrionaria en la rata	2
1.5.- fertilización, inicio del desarrollo embrionario y transporte a través del oviducto	3
1.6.- Modelos de experimentación en implantación en la rata	3
1.7.- Periodos de la gestación temprana en la rata	4
1.8.- Implantación del blastocisto	4
1.9.- Cambios en el epitelio uterino previos a la implantación	6
1.10.- Importancia y función del epitelio luminal uterino	7
1.11.- Cambios en el estroma (reacción decidual)	8
1.12.- Implantación retardada	8
1.13.- El líquido luminal uterino	9
1.14.- sustancias químicas implicadas en el proceso de implantación	9
1.15.- Factores de crecimiento	12
1.16.- Otras sustancias involucradas en la implantación	12
1.17.- El óxido nítrico	13
1.18.- Porque el nombre óxido nítrico	13
1.19.- Biosíntesis del óxido nítrico	14
1.20.- Oxido nítrico sintasas	14
1.21.- Inhibidores de las óxido nítrico sintasas	15
1.22.- ¿Es el óxido nítrico una hormona?	15
1.23.- Oxido nítrico y endotelio	16
1.24.- Oxido nítrico y sistema inmune	17
1.25.- Oxido nítrico y sistema nervioso	18
1.26.- mecanismo de acción de los estrógenos	19
1.27.- El óxido nítrico como mediador de los efectos de los estrógenos	20
1.28.- El óxido nítrico en el útero	20
II.- Hipótesis	22
III.- Objetivo	22
IV.- Material y Métodos	23
V.- Resultados	25
VI.- Discusión	28
VII.- Referencias	31

1. Introducción

A fin de perpetuarse, toda especie debe contar con individuos que se reproduzcan. El éxito de la viviparidad en los mamíferos depende de una asociación muy íntima entre tejidos maternos y embrionarios a fin de permitir un adecuado intercambio de sustancias entre ambos organismos. Durante la preñez en los mamíferos pueden distinguirse dos fases: una de progesteración, en la cual el óvulo fecundado inicia su desarrollo, permanece libre en el líquido oviductal y uterino; y otra de gestación, en la que el embrión se ha unido al endometrio y continúa su desarrollo en estrecha relación con la madre. Dichas fases suelen ser llamadas también periodos de preimplantación y de postimplantación, respectivamente (Dickmann, 1969). La implantación del embrión es considerada como la fase de transición entre los dos periodos de la preñez y se considera que es un evento crucial en el proceso reproductivo de los mamíferos (Flamigni y col., 1991).

La implantación puede definirse como el proceso mediante el cual el embrión adquiere una posición fija y establece relación con el sistema circulatorio de la madre (Weitlauf, 1979). Existen diferencias notables en la preparación para y durante dicho proceso en diferentes especies (Schlafke y Enders, 1975; Denker, 1990, 1993). Sin embargo, en las especies estudiadas hasta ahora, hay evidencias suficientes para concluir que para que la implantación se lleve a cabo, se requiere de una interacción coordinada entre el embrión y el útero; el embrión debe haber alcanzado el estado de blastocisto y en el útero deben haber ocurrido cambios dependientes de hormonas que conduzcan al desarrollo de un endometrio receptivo al embrión (Psychoyos, 1973a,b, 1986; Parr y Parr, 1989; Abrahamsohn y Zorn, 1993; Weitlauf, 1994).

1.1 Anatomía del útero

Al igual que la vagina y el oviducto, el útero es un órgano tubular. En la rata el útero es bifurcado y cada parte recibe el nombre de cuerno uterino. Cada cuerno uterino consiste de tres capas: el perimetrio (Gr. *perys*, alrededor + *metron*, útero) o capa de tejido conectivo más externa; el miometrio (Gr. *mys*, músculo + *metron* útero) o capa muscular intermedia, la cual consta de células de músculo liso dispuestas circular y longitudinalmente; y el endometrio (Gr. *endos*, interior, dentro de + *metron*, útero) o mucosa (Chatterjee y col., 1996). El endometrio consta de estroma y epitelios luminal y glandular. El epitelio luminal es cilíndrico o columnar simple y da hacia la luz uterina, está separado del estroma por la lámina basal. A diferencia del epitelio luminal, el epitelio glandular es cúbico y forma glándulas que se extienden hacia el estroma. La tercera parte del endometrio, el estroma, está formado principalmente por fibroblastos (células en forma de huso), son estas células las que experimentan cambios denominados reacción decidual, que conducen a la formación del nido o decidua, donde el embrión se aloja.

1.2 El embrión en estado de blastocisto

La implantación embrionaria se lleva a cabo cuando el embrión se encuentra en estado de blastocisto. En dicha fase de desarrollo el embrión consta de dos capas celulares, la masa celular interna y el trofoblasto, además de la zona pelúcida que envuelve al embrión. El blastocisto presenta una cavidad que recibe el nombre de blastocele. A fin de implantarse, debe desprenderse de su zona pelúcida, lo cual en la rata ocurre principalmente por la acción del líquido luminal uterino. Como en muchos otros animales, en la rata el blastocisto presenta una gran invasividad, característica importante para penetrar el endometrio y para que pueda implantarse también en condiciones in vitro (Biggers, 1976; Sherman y Matthaiei, 1980).

1.3 Porque estudiar la implantación embrionaria

Para muchos investigadores el estudio de la implantación embrionaria es por demás fascinante, en parte porque aunque el embrión puede implantarse en múltiples órganos, independientemente del ambiente hormonal, la implantación en el útero, el órgano en el que dicho proceso ocurre normalmente, sólo es posible bajo una estricta sincronización de la madre y del embrión, para lo cual el ambiente hormonal es decisivo (Psychoyos, 1973a,b; Murphy y Shaw, 1994). Actualmente no se sabe como el embrión le informa al útero de su presencia, lo cierto es que antes de que ocurra el contacto físico entre el embrión y el endometrio, este último experimenta cambios locales en la zona próxima al primero lo cual conduce a pensar que el embrión libera un mensaje químico, el cual es reconocido por el endometrio y este responde con un aumento en la permeabilidad vascular, y posteriormente experimenta la reacción decidual, proceso mediante el cual el estroma endometrial se transforma en el nido o decidua.

Aunque durante las últimas décadas han habido importantes avances en el entendimiento de dicho proceso, el cuestionamiento inicial aun persiste: ¿cómo se percata el útero de la presencia del blastocisto? Muchos trabajos han sido diseñados para probar si una determinada sustancia participa o no en la implantación, sin embargo, debido a las diferencias notables en dicho proceso en diferentes especies, el que una sustancia participe en determinada especie, no necesariamente implica que en otra especie aun relacionada tendrá participación.

1.4 Consideraciones iniciales sobre la implantación embrionaria en la rata

Si consideramos como primer día de gestación aquel en el que la hembra presenta espermatozoides en el lavado vaginal matutino, criterio que seguiremos en este trabajo, la implantación embrionaria en la rata se inicia en el día 5 de gestación y está bien establecida en el día 7 (Psychoyos, 1966, 1973a,b). Otra opción, actualmente menos utilizada, es considerar como día cero de gestación el día en que se encuentran espermatozoides en la inspección microscópica del lavado vaginal matutino (Shelesnyak, 1952, 1960; Moulton y col., 1978), en dicho caso la implantación inicia en el día 4 de gestación y esta bien establecida en el día 6. Cabe mencionar que nos referimos al inicio de la implantación como el día

en que ocurren cambios en el embrión y en el útero que indican que la interacción entre ellos ha iniciado, como es el desprendimiento de la zona pelúcida y el aumento en permeabilidad vascular respectivamente (día 5 de gestación) y no al proceso de adhesión al epitelio, lo cual ocurre en el día 6 de gestación. Dicha aclaración es pertinente porque el lector de esta tesis puede leer en el trabajo de revisión de Abrahamsohn y Zorn (1993) que la implantación en la rata se inicia en el día 6 de gestación, y si no está familiarizado con dicho proceso, podría conducir a confusión. Por otra parte, si el modelo de estudio es la rata pseudopreñada, el primer día de pseudopreñez es aquel en el que se presenta el botón vaginal (no siempre se presenta), si se le aparea con un macho vasectomizado; mientras que si se estimula directamente el cervix (eléctrica o físicamente), el segundo día de pseudopreñez es aquel en el que se observa una cantidad masiva de leucocitos en la inspección microscópica del lavado vaginal.

1.5 Fertilización, inicio del desarrollo embrionario y transporte a través del oviducto

La fertilización del ovocito en la rata como en muchos mamíferos se lleva a cabo en el ámpula del oviducto (McLaren, 1975). Una vez que el ovocito es fecundado, su metabolismo se reactiva, se reinicia la meiosis, se funden los pronúcleos masculino y femenino, originándose el cigoto e iniciándose el desarrollo embrionario, mientras es transportado por las acciones ciliar y contráctil del oviducto hacia el útero (Shelesnyak, 1960; Psychoyos, 1973a,b; McLaren, 1975)

En la rata, los embriones normalmente llegan a los cuernos uterinos en la tarde del día 4 de preñez (aproximadamente 90 horas después de la ovulación), en el estado de 9 a 16 células (Psychoyos, 1967). Presumiblemente entran en grupo y son rápidamente distribuidos a lo largo de los cuernos uterinos (Croxato y Ortiz, 1991).

Los blastocistos retienen la zona pelúcida hasta la tarde del día 5. Cuando se lavan los cuernos uterinos en la tarde de este día, se les recupera libres de la zona pelúcida y muestran una marcada disminución en su volumen (Dickmann y Noyes, 1961). El porcentaje de blastocistos libres de zona pelúcida incrementa de 4% a las 2 p.m. a 77% a las 6 p.m. (Noyes, Dickmann, Doyle y Gates, 1963; Dickmann, 1966).

1.6 Modelos de experimentación en implantación en la rata

Para estudiar la implantación en la rata pueden utilizarse ratas preñadas, ratas pseudopreñadas o ratas ovariectomizadas preparadas hormonalmente. Las conclusiones acerca de los eventos uterinos no dependientes y dependientes del embrión son muy similares en los tres grupos, por lo que los experimentos llevados a cabo con ratas pseudopreñadas y ratas tratadas hormonalmente reflejan los eventos que ocurren en la rata gestante. Cuando se transfieren embriones en estado de blastocisto, recuperados de ratas en el día 5 de gestación a ratas pseudopreñadas en los días 1 a 4 de gestación, los embriones permanecen en diapausa e inician la implantación hasta que la rata receptora se

encuentra en el día 5 de pseudopreñez (Psychoyos, 1966). Si se transfieren en el día 5 de pseudopreñez los embriones se implantan sin retraso, mientras que si se transfieren en el día 6 de pseudopreñez los embriones resultan dañados severamente, degeneran y nunca se implantan (Psychoyos, 1966, 1967), resultados similares se obtienen si se liga la unión útero-tubaria en ratas gestantes y se transfieren los embriones a los cuernos uterinos. Por otra parte, cuando se ovariectomizan ratas gestantes en la mañana del día 4 de gestación la implantación sólo ocurre si en la tarde de este día además de progesterona se administra estradiol, mientras que si la ovariectomía se lleva a cabo en la tarde del día 4, la implantación ocurre normalmente con la sola administración de progesterona. Utilizando ratas ciclantes, ovariectomizadas, Psychoyos (1966) demostró que la administración de progesterona durante 48 horas y después progesterona más estradiol es el patrón hormonal necesario para ocasionar que el endometrio esté receptivo a los embriones transferidos y estos puedan implantarse.

1.7 Periodos de la gestación temprana en la rata

De la sección anterior se desprende que la gestación temprana en la rata consta de tres periodos sucesivos en el endometrio: a) *un estado neutral o pre-receptivo*, el cual es dependiente de progesterona y que prevalece temprano en el día 5 de gestación. De hecho, dicho estado puede ser alargado indefinidamente si se practica ovariectomía en cualquier momento desde el día 2 de gestación hasta antes del medio día del día 4, administrando progesterona diariamente. El embrión pierde su zona pelúcida pero no se implanta. Este periodo se caracteriza también por una sensibilidad subóptima del endometrio al embrión. Sólo estímulos traumatizantes son capaces de inducir decidualización en este periodo. b) *estado de receptividad o de sensibilidad*, en el que el endometrio responde al embrión o a estímulos suaves como lo es la inyección intraluminal de una pequeña gota de aceite. Este estado dura sólo unas horas y a su duración se le denomina ventana de implantación, ya que es el único estado uterino en que la implantación es posible. c) *estado refractario*, en el que el ambiente uterino es hostil a los embriones no implantados; los embriones transferidos a ratas en este periodo nunca se implantan e incluso estímulos traumáticos resultan inefectivos en ocasionar la reacción decidual, por lo que el endometrio ha perdido la capacidad de alojar al embrión Casimiri y Psychoyos, 1980; Psychoyos, 1986, 1991).

1.8 Implantación del blastocisto

En la rata la implantación se inicia en el día 5 de preñez (Psychoyos, 1967, 1973a,b, 1986, 1991; Casimiri y Psychoyos, 1980). Durante este proceso, el blastocisto permanece pequeño, se orienta siempre por su región abembrionica a la región antimesometrial del endometrio, conforme el endometrio experimenta edematización ocurre un grado progresivo de proximidad denominado aposición, el cual conduce a la interdigitación de las microvellocidades de la región apical de las células del trofoblasto con las microvellocidades de la región apical de las

células epiteliales lumbinales. El cierre del lumen uterino y la interdigitación de las microvelocidades se conoce como reacción de fijación (attachment). El cierre depende principalmente de la resorción de las secreciones uterinas como resultado de la intensa endocitosis por las células del epitelio luminal uterino y por el edema que se presenta en el endometrio circundando a cada blastocisto. Le sigue la etapa de adhesión, en la cual las microvelocidades han desaparecido, la intimidad entre los participantes aumenta y sus membranas corren paralelamente una a la otra en forma ondulante, están separadas por una distancia de menos de 20 nm y se establece la fijación firme entre ambos epitelios con la participación primero de moléculas de adhesión celular y posteriormente de uniones intercelulares tipo desmosomas. Posteriormente, el trofoblasto desplaza células del epitelio luminal uterino (penetración por desplazamiento). En este tipo de penetración, el trofoblasto emite prolongaciones en forma de cuña entre el epitelio luminal y la membrana basal y reemplaza al epitelio luminal. El desplazamiento de las células del epitelio luminal ocurre una vez que estas han muerto por apoptosis (Parr y Parr, 1987). Mientras esto ocurre, las células estromales adyacentes al blastocisto experimentan el proceso de decidualización. Una vez llevado a cabo el desplazamiento del epitelio, el blastocisto hace una pausa y entonces, prolongaciones de la decidua penetran la membrana basal para que posteriormente el trofoblasto la atraviese (Schlafke, Welsh y Enders, 1985). Finalmente, el blastocisto se alojará en el estroma decidualizado (Abrahamson, 1993, Denker, 1990, 1993; Weitlauf, 1994) en el endometrio antimesometrial, en el se forma la primera área decidualizada que se hace aparente durante la implantación inmediatamente rodeando al embrión y que es llamada decidua primaria o zona decidual primaria. El desarrollo de la placenta resulta del crecimiento y diferenciación de las células del cono ectoplacentario y asociación con tejidos de origen alantoideo. El cono ectoplacentario ocupa el polo embrionario y por lo tanto, la placenta se forma en la región mesometrial del útero (Abrahamson y Zorn, 1993).

La primera manifestación macroscópica de que el proceso de implantación ha comenzado, es el aumento en permeabilidad vascular endometrial en áreas adyacentes al blastocisto (Psychoyos, 1973a,b; Kennedy, 1983) y ocurre antes de que exista contacto físico entre el embrión y el endometrio (Psychoyos, 1973a,b; Abrahamson y Zorn, 1993; Weitlauf, 1994). Colorantes de alto peso molecular como azul de pontamina, azul de Evans o azul Geigy, así como albúmina marcada con iodo radioactivo salen de los capilares del estroma sólo en áreas adyacentes al blastocisto (dichas sustancias sólo abandonan la circulación donde existe permeabilidad vascular aumentada). Resultados similares se observan mediante el uso de partículas de torotrast. Este cambio en permeabilidad permite identificar las regiones uterinas donde ocurre la implantación (sitios de implantación) de las regiones adyacentes (sitios de interimplantación) y estudiar los cambios propios de ellas. Primeramente descrito por Psychoyos en la rata (1960, 1961), el incremento en permeabilidad uterina ha sido demostrado en numerosas especies.

En el estroma uterino de la rata ocurre proliferación del epitelio vascular durante los días previos a la implantación (Goodger y Rogers, 1993). No obstante su alta proliferación, la densidad de las células endoteliales disminuye y es indistinguible de los sitios de interimplantación en el día 7 de gestación (Goodger y Rogers, 1995), debido principalmente al edema endometrial. Abrahamson y col. (1983) reportaron que en los sitios de implantación en la rata las células endoteliales son fenestradas y existen huecos entre ellas. Dichas modificaciones no se encontraron en los sitios de interimplantación.

1.9 Cambios en el epitelio uterino previos a la implantación

Mientras el embrión es transportado por el oviducto, en el endometrio ocurren cambios morfofisiológicos que conducen a un estado de receptividad, en el cual es sensible a estímulos embrionarios. En la rata, varios estudios han demostrado que la preparación del endometrio implica entre otros cambios, la supresión de la mitosis en células epiteliales y su inducción en las células del estroma de grado y distribución limitada (Tachi, Tachi y Lindner, 1972; Marcus, 1974; Tachi y Tachi, 1974). Las células del endometrio que experimentan mitosis en los primeros dos días de preñez se localizan tanto en el epitelio luminal como en el epitelio glandular; en el tercer día ocurre un cambio en dicho patrón y las células en mitosis predominan en el estroma, mientras que en epitelio alcanzan un nivel muy bajo. En el quinto día, si se inicia la implantación, las células estromales se continúan dividiendo, de no ser así, el número de células en mitosis disminuye en las siguientes horas (Tachi y Tachi, 1974). Estos datos pueden correlacionarse con los niveles hormonales propios de la preñez. En la tarde del segundo día de preñez, en el ovario se eleva la producción de progesterona, y al parecer esta hormona ocasiona aumento en el número de receptores a estrógenos en las células del estroma y disminución de los mismos en el epitelio (Martel y Psychoyos, 1978, 1982).

Los epitelios se caracterizan por poseer polaridad (Denker, 1990, 1993). Es decir, constan de una región apical y de una región laterobasal; la primera carece de moléculas de adhesión, de manera que las cavidades nunca se cierran completamente, mientras que la región laterobasal posee abundantes moléculas de adhesión, haciendo posible la unión entre las células epiteliales y entre el epitelio con la lamina basal, sin embargo, conforme se acerca el momento de la implantación, el epitelio se vuelve adhesivo en su porción apical, lo que hace suponer que nuevas proteínas son sintetizadas o redistribuidas. Murphy y col. (1979, 1982a) estudiaron la región apical de la membrana plasmática de células del epitelio luminal uterino de ratas tratadas hormonalmente para simular los primeros días de gestación y reportaron un aumento en la densidad de las partículas de intermembrana de $2350/\mu\text{m}^2$ en el día 1 de gestación a $4000/\mu\text{m}^2$ en el día 6 con una densidad intermedia entre ambos días.

La superficie de las células epiteliales uterinas se ha estudiado determinando la capacidad de unión de varias sustancias como lectinas. Enders y col. (1980) reportaron que durante la adhesión, la superficie del epitelio luminal uterino contiene glucoproteínas (determinado mediante tinción con ácido tánico) y

que aun cuando presenta carga negativa, demostrado por su capacidad de unir hierro coloidal y ferritina catiónica, no existe remoción localizada o pérdida del glucocalix o cambios. Actualmente sin embargo, se acepta que el glucocalix de la superficie de las células epiteliales lumbinales disminuye en grosor y que la pérdida de ácido siálico favorece la exposición de moléculas de galactosa, las evidencias son las siguientes: Hewitt y col. en su carga como prerrequisito para la adhesión. Actualmente sin embargo, se acepta que el glucocalix de la superficie de las células epiteliales lumbinales disminuye en grosor y que la pérdida de ácido siálico favorece la exposición de moléculas de galactosa, las evidencias son las siguientes: Hewitt y col. (1979) encontraron que la carga negativa de la superficie de las células epiteliales uterinas disminuye progresivamente del día 1 al día 6 de gestación en la rata, Murphy y Rogers (1994) llegaron a la misma conclusión al trabajar con ratas preparadas hormonalmente compatible con la fijación y encontraron una disminución en la cantidad absoluta del glucocalix. Además, Murphy y Turner (1991) reportaron que los carbohidratos galactosa, fucosa glucosamina y galactosamina están presentes en la superficie de las células epiteliales.

Otro cambio a nivel de membrana es la aparición de protusiones apicales largas parecidas a un hongo (Ljungkvist, 1971) o a una anémona de mar (Psychoyos y Mandon, 1971), las cuales reciben el nombre de pinopodos. Dichas estructuras miden varios micrómetros y son dependientes de progesterona (Murphy y Rogers, 1981; Martel y col., 1991) y están involucradas en pinocitosis (Enders y Nelson 1973; Parr y Parr, 1974). Al igual que las microvellocidades, los pinopodos experimentan regresión antes de que ocurra la adhesión entre el embrión y el endometrio. Por el número de cambios que experimenta la membrana plasmática de las células del epitelio luminal uterino, no es de asombrar que a dicho conjunto de cambios Murphy (1993) lo llamó: *"transformación de la membrana plasmática"*. Considerando que las células trofoblásticas y uterinas se unen mediante sus regiones apicales, las que comúnmente no son adhesivas, Denker (1990, 1993) se ha referido a esto como una *paradoja de la biología celular*.

1.10 Importancia y función del epitelio luminal uterino

Al ser el epitelio luminal uterino el primer punto de contacto con el trofoblasto, es de esperar que su función sea fundamental, lo cual es así. Ferrando y Nalvandov (1968) dañaron el epitelio luminal uterino de la rata pseudopreñada y Lejeune y col (1981) desprendieron dicho epitelio in vivo y estimularon el endometrio y en ambos casos la formación del deciduoma no ocurrió. Esto me hace recordar como Psychoyos (1991) se refirió al proceso de implantación embrionaria: *"Actualmente está bien establecida la noción de que el útero y el embrión tienen una acción que se sobrelapa; el proceso completo puede considerarse un diálogo. Para sostener este diálogo, ambos participantes deben haber alcanzado un cierto grado de madurez, sin la cual la conversación es imposible."* Es decir, una deficiencia en el sistema de comunicación o la pérdida de un elemento que participa en dicho sistema impide que el dialogo se lleve a

cabo. Actualmente se considera que el epitelio luminal uterino funciona como un transductor de la señal embrionaria (Lejeune y col., 1981; Moulton y Koenig, 1986). En este punto es conveniente recordar que el proceso de implantación aunque tiende a ser semejante en especies relacionadas, puede tener elementos que marcan en ocasiones una gran diferencia, cuando se desproveen el endometrio del ratón del epitelio luminal el embrión se implanta independientemente del ambiente hormonal (Cowell, 1969), lo cual, como ya hemos visto, no ocurre en la rata.

1.11 Cambios en el estroma (Reacción decidual)

Como ya se mencionó, la reacción decidual la experimenta el estroma endometrial, el cual consta de células de tejido conectivo en forma de uso. La reacción decidual implica cambios de estas células, las cuales se vuelven redondas, aumentan en tamaño y disminuye el espacio extracelular en el estroma decidualizado. A nivel ultraestructural se presenta un aumento en el contenido de organelos involucrados en la síntesis de macromoléculas, se acumulan lípidos, glucógeno y filamentos intermedios y se establecen uniones celulares con otras células (Lundkvist, 1978). Las primeras células deciduales están ya presentes cuando el epitelio es desplazado y el trofoblasto alcanza la membrana basal. La decidualización es inicialmente antimesometrial. Después avanza gradualmente hacia la región mesometrial, de manera que unos días más tarde puede ser observada en dicha región.

En el endometrio antimesometrial, la primera área decidualizada que se hace aparente durante la implantación es una capa angosta inmediatamente rodeando al embrión. Esta es llamada la decidua primaria o zona decidual primaria (Parr y Parr, 1989) Esta consta de células deciduales completamente transformadas (células deciduales maduras), las que predominan en la decidua antimesometrial. Las células localizadas más lejos del embrión presentan características morfológicas que son intermedias entre las células deciduales maduras y los fibroblastos. Estas son llamadas células predeciduales, las que, a su vez, están rodeadas por una capa de fibroblastos indiferenciados que se sitúan adyacentes al miometrio (Welsh y Enders, 1985) Cabe mencionar que los investigadores se refieren al nido o decidua al que ocurre como producto de la reacción decidual normal durante la gestación y a deciduoma como el producto de la reacción decidual en animales pseudopreñados o tratados hormonalmente, los cuales han sido estimulados.

1.12 Implantación retardada

Implantación retardada es la condición en la cual el embrión permanece más tiempo en el lumen uterino de lo usual, desprovisto de su zona pelúcida, sin implantarse. La implantación retardada se presenta en el armadillo, el corzo, la rata y el ratón, entre otros. En la rata la implantación retardada ocurre en condiciones normales sólo si copula en el estro postparto y es provocada por las condiciones hormonales propias de la lactancia, por lo que se dice que presenta implantación retardada facultativa (Psychoyos, 1973a,b). Durante la implantación

retardada en la rata el desarrollo del embrión se detiene en el estado de fijación. El desarrollo posterior y la fase de adhesión pueden ser estimulados mediante la administración de una pequeña dosis de estradiol.

1.13 El líquido luminal uterino

El líquido luminal uterino cumple varias funciones: a) permite el ascenso de los espermatozoides al sitio de fertilización, b) proporciona una nutrición adecuada al embrión durante su desarrollo, desde su llegada al lumen uterino hasta que se ha llevado a cabo la implantación y c) mantiene un ambiente apropiado para conservar la integridad física y bioquímica de las estructuras del blastocisto.

El líquido luminal uterino ha llamado la atención en el estudio de la implantación en parte debido a que el intercambio de sustancias entre el endometrio y el blastocisto se lleva a cabo en un medio líquido. Cualquier sustancia química secretada por el embrión que sirva como mensajero debe ser muy activa a concentraciones pequeñas o secretado en grandes cantidades, puesto que se diluye en el líquido uterino. Dado que el número de células del blastocisto es muy pequeño, esta última es la menos probable (Croxato y Ortíz, 1991).

1.14 Sustancias químicas implicadas en el proceso de implantación

Actualmente se sabe que el embrión participa activamente en los eventos tempranos asociados con el establecimiento de la preñez, pero los mecanismos involucrados por el embrión y por la madre no han sido del todo dilucidados (Garret y col., 1988; Weitlauf, 1994). Los blastocistos de rata cultivados in vitro experimentan contracciones y dilataciones, por lo que si esto ocurre también in vivo, podría ser que la señal que proporciona el embrión sea de naturaleza física, la cual el epitelio transduciría a una señal química, la que a su vez sería liberada al estroma. Los investigadores prefieren pensar que la señal liberada por el embrión es de naturaleza química y, como lo expresó Kennedy en 1983: *"quizá se aceptará que la señal liberada por el embrión es de naturaleza física sólo hasta que se descarte toda posibilidad de que sea una señal química"*.

Se han publicado numerosos trabajos en los que se plantea la participación de sustancias que posiblemente participen como señal embrionaria, otras definitivamente actúan sólo en el organismo materno. Obviamente, la implantación es un proceso en el que participan concertadamente múltiples sustancias (Kennedy, 1983; Weitlauf, 1994).

A continuación se describe la participación de varias sustancias en el proceso de implantación en la rata.

Histamina

Shelesnyak (1957) fue el primero en proponer que la histamina es probablemente la señal liberada por el embrión, capaz de provocar decidualización. Brandon y Wallis (1977) reportaron que al tratar ratas con antagonistas de los receptores H1 y H2 de la histamina, el inicio de la

implantación, evaluado por el número y la intensidad de los sitios de implantación, fue afectado adversamente. Además, Johnson y Dey (1980) encontraron que en ratas con implantación retardada, la administración concomitante de histamina y estradiol reduce la cantidad de estradiol requerida para llevar a cabo la implantación. Sin embargo, un estudio reciente (Salamonsen, 1996) muestra que las células cebadas (productoras de histamina) no son importantes en la implantación en la rata.

Estrógenos

El ambiente hormonal es decisivo para que la implantación se lleve a cabo. En el útero de la rata, durante los días 2-4 de preñez predomina la acción de la progesterona. Sin embargo, por la tarde del día 4 se presume que ocurre un aumento en los niveles de estrógenos y a esto se le atribuye que el endometrio se vuelva receptivo en el día 5. La participación del aumento previo de estrógenos sobre la implantación se considera actualmente aceptable en roedores (Weitlauf, 1994). En otras especies, como el conejo por ejemplo, en las cuales no existe el aumento de estrógenos previo a la implantación, se cree que el embrión es capaz de sintetizar los estrógenos requeridos para que ocurra el proceso de implantación (para revisión véase Dickmann y col., 1976; Kennedy, 1983; Weitlauf, 1994). La participación de los estrógenos en la implantación en la rata fue dilucidada principalmente por estudios llevados a cabo mediante la transferencia de embriones (ver revisiones de Psychoyos, 1966, 1967, 1973a,b). Shelesnyak (1960) propuso que en la rata ocurre una oleada estrogénica en la tarde del cuarto día de preñez, justo cuando el nivel de estrógenos se incrementaría en dichos animales, en caso de no haber quedado preñados. Sin embargo, intentos por determinar dicha oleada o aumento de estrógenos en el día 4 de gestación han sido muy controvertidos (ver revisión de Kennedy, 1983; Weitlauf, 1994), habiendo quienes reportan que los niveles permanecen sin alteración alguna o incluso disminuyen, pero predominando quienes reportan un aumento en los niveles de estrógenos en la tarde del día 4 de gestación (Yoshinaga, 1969, 1971). A este respecto, se ha reportado que la administración de antiestrógenos en el día 4 de gestación ocasionan inhibición de la implantación (Uriel y col., 1992; Dao y col., 1996). Además, durante la implantación embrionaria en la rata, se capta y se retiene más estradiol exógeno marcado por los sitios de implantación que por los sitios de interimplantación (Sartor, 1977), lo mismo se encuentra al inducir implantación en ratas con implantación retardada (Logeat, 1980), lo cual parece indicar la importancia de los estrógenos en la implantación en la rata.

Prostaglandinas

La síntesis de prostaglandinas se lleva a cabo por la enzima ciclo oxigenasa, también conocida como prostaglandina (PG) H sintasa, la que convierte el ácido araquidónico a prostaglandina endoperóxido H_2 , la que a su vez puede convertirse en prostaglandinas E_2 , F_2 y D_2 o tromboxano A_2 (TXA_2) y a prostaciclina (PGI_2).

La respuesta del útero al blastocisto semeja una reacción de inflamación en la cual los productos de la ciclo oxigenasa juegan un papel crucial (Malathy y col., 1986). La activación de la vía de la ciclo oxigenasa ha sido demostrada en los sitios de implantación (Parr y col., 1988). Además, se ha demostrado la activación de la vía de la lipoxigenasa en el útero en el tiempo de la implantación (Malathy y col., 1986) y con la administración de inhibidores de la lipoxigenasa se observa inhibición de la implantación si se administran en el día 4 de gestación, mientras que no se observa tal efecto administrándolos en el día 6 de gestación (Acker y col., 1988).

La administración de indometacina, un inhibidor de la biosíntesis de prostaglandinas impide el aumento en permeabilidad vascular en la rata (Kennedy, 1977; Phillips y Poyser, 1981). La concentración de prostaglandinas se eleva en áreas de permeabilidad vascular endometrial aumentada (Kennedy, 1977) y las prostaglandinas exógenas pueden revertir, al menos parcialmente, los efectos de la indometacina (Oetel y col., 1979). En animales no gestantes, con úteros preparados hormonalmente para experimentar la reacción celular decidual, la reacción artificialmente inducida se reduce mediante la administración de indometacina (Castracane y col., 1974; Kennedy y Lukash, 1982). La concentración de prostaglandinas en el útero se eleva mediante estímulos deciduogénicos artificiales antes de que ocurran cambios detectables en la permeabilidad (Kennedy, 1979, 1980; Kennedy y col., 1980). Kennedy y Armstrong (1981) no pudieron demostrar la síntesis de prostaglandinas por el blastocisto de la rata. Es probable que el blastocisto, así como los estímulos artificiales en ratas pseudo preñadas u hormonalmente preparadas tengan la capacidad de inducir la síntesis de prostaglandinas por el endometrio. Se ha reportado (Boshier, 1976) que hay una disminución en los lípidos neutros del epitelio que rodea al blastocisto. Se sabe que las prostaglandinas pueden ser producidas por el epitelio uterino y ser liberadas al estroma endometrial para llevar a cabo sus efectos (Psychoyos y col., 1995).

Las células estromales cultivadas in vitro presentan decidualización cuando provienen de un útero el que fue estimulado previamente (Kennedy y Ross, 1997). En dichas células aumenta la fosfatasa alcalina y dicho aumento depende de la elevación de la prostaglandina E_2 (PE_2), puesto que al administrar indometacina, ocurrió una disminución tanto de la PE_2 como de la fosfatasa alcalina (Kennedy y Ross, 1997).

El activador del plasminógeno convierte el plasminógeno a plasmina, una serina proteasa. La plasmina disuelve la laminina y la fibronectina de la matriz extracelular y activa la colagenasa para disolver la colagena de la membrana basal (Mignatti y col., 1991). De lo anterior se deriva que la disolución de la matriz extracelular está regulada por la actividad del activador del plasminógeno. Existen dos tipos de activador del plasminógeno, es decir, tipo tisular y tipo urocinasa. Las células deciduales de rata cultivadas in vitro secretan el activador del plasminógeno de tipo urocinasa (PAu) al medio de cultivo. Dicha secreción se impide si se adiciona indometacina al medio. El efecto inhibitorio de la indometacina es revertido por la adición de las prostaglandinas E_2 y $F_{2\alpha}$ (PE_2 y

PF_{2a}) siendo la primera la más efectiva en restablecer la secreción del PAu. Los niveles de RNAm del PAu se reducen con la adición de indometacina y tal reducción es revertida por PGE₂. Ni la indometacina ni la PGE₂ afectan los niveles del RNAm del activador del plasminógeno tipo tisular (PA_t). Dichos resultados indican que la PGE₂ regula el PAu ya sea incrementando la velocidad de transcripción del gene que codifica para el uPA y/o estabilizando sus transcritos. Durante la decidualización ocurre la degradación de algunos componentes de la matriz extracelular del endometrio. En el ratón por ejemplo, el nivel de ácido hialurónico disminuye durante la decidualización. Dicha reducción es independiente del embrión pues ocurre en el deciduoma que es inducido por un estímulo decidualogénico artificial. Así pues, es posible que la PGE₂ participe en el control del recambio de la matriz extracelular regulando la secreción del uPA durante la decidualización (Zhang y col., 1996).

1.15 Factores de crecimiento

La acción de los estrógenos en el útero está mediada en parte por factores de crecimiento, por ejemplo el factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I (IGF-I), el cual es un potente mitógeno en muchas células normales y neoplásicas. El IGF-I circulante es principalmente de origen hepático y la hormona del crecimiento regula positivamente la expresión del gene que codifica para el IGF-I en el hígado (Brown y col., 1986). Sin embargo, la bioactividad del IGF-I en varios tejidos que son blanco de la acción del IGF-I no es simplemente una función de los niveles séricos; hay evidencia de la expresión local del IGF-I y de varias proteínas que unen IGF-I (Murphy y col., 1987). En el útero la expresión local del gene que codifica para el IGF-I es estimulado por estrógenos y los efectos tróficos positivos del estradiol son al menos en parte, mediados por el IGF-I (Murphy y Ghahary, 1990).

1.16 Otras sustancias involucradas en la implantación

Las células del epitelio luminal uterino de rata cultivadas in vitro secretan proteoglicanos que contienen queratan sulfato y heparan sulfato (Carson y col., 1988). Puesto que la superficie del trofoblasto como del epitelio luminal uterino contiene receptores a dichas sustancias, es probable su participación en la implantación (Carson y col., 1988, 1990).

Aun cuando las moléculas de adhesión molecular (CAMs) no han sido analizadas completamente, la CAM 105 se expresa tanto en la superficie del trofoblasto como del epitelio luminal uterino (Svalander y col., 1987, 1989).

La kaliceína de rata (rKi) es una enzima que genera quininas cuya función principal es la regulación del flujo sanguíneo local y la cual puede participar también en angiogénesis y mitogénesis. Estas enzimas se localizan en los epitelios luminal y glandular e incrementan durante la gestación temprana, especialmente en el sitio de implantación (Valdés y col., 1996). Se encuentran preferentemente en la región antimesometrial, se comienzan a notar en el día 5 de gestación y aumentan en el día 6. Es probable su secreción. Algunas células

presentaron citoplasma completamente teñido y otras en la región basal y apical, en el día 7 en el polo apical los sitios de interimplantación mostraron una tinción muy débil. La tinción en glándulas mostró un aumento ocupando el citoplasma completo.

1.17 El óxido nítrico.

A mediados de la década pasada se sabía que el óxido nítrico es un contaminante peligroso, por lo que era considerado una sustancia indeseable. Producido como un subproducto de la combustión a altas temperaturas, el óxido nítrico es uno de varios óxidos de nitrógeno que forman parte de los contaminantes atmosféricos. Sin embargo, en 1987 se descubrió que el factor relajante derivado del endotelio (EDRF), una sustancia humoral producida por el endotelio vascular en respuesta a bradicinina, acetilcolina, sustancia P, etc., es en realidad el óxido nítrico (Palmer, Ferrige y Moncada, 1987), por lo que pronto se demostró que el NO es sintetizado enzimáticamente. A estos descubrimientos les siguieron otros que relacionaron al óxido nítrico (NO) con los procesos de neurotransmisión y respuesta inmune. Actualmente se sabe que el NO participa en múltiples procesos fisiológicos (Moncada y col, 1991; Snyder y Bredt, 1992, 1994).

1.18 Porque el nombre óxido nítrico

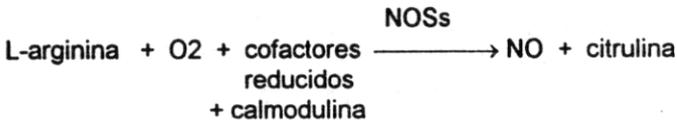
Hay quienes confunden el óxido nítrico (NO) con el óxido nitroso, una sustancia utilizada como anestésico y químicamente estable, por lo que es necesario que al referirnos al óxido nítrico tengamos en mente la misma sustancia. Existen varias combinaciones de oxígeno y nitrógeno. La nomenclatura de la IUPAC para compuestos inorgánicos formados por elementos no metálicos indica que sus nombres son: óxido de dinitrógeno (N_2O), óxido de nitrógeno (NO), bióxido de nitrógeno (NO_2), trióxido de dinitrógeno (N_2O_3), tetróxido de dinitrógeno (N_2O_4) y pentóxido de dinitrógeno (N_2O_5), entre otras. Sin embargo, por muchos años las terminaciones -oso e -ico se han utilizado para distinguir entre el menor y el mayor de un par de números de oxidación. Recordemos que el número de oxidación o estado de oxidación de un elemento es igual a la carga que estaría presente en un átomo si el compuesto estuviera formado o constituido por iones y que una de las reglas para asignar números de oxidación es considerar que el oxígeno, salvo ciertas excepciones (O_2 , O_3 , H_2O_2) tiene un número de oxidación de -2. Así, el óxido de dinitrógeno (N_2O) se llama también óxido nitroso, porque el número de oxidación del nitrógeno en este compuesto es +1; el óxido de nitrógeno (NO) recibe el nombre de óxido nítrico, porque el número de oxidación del nitrógeno en este compuesto es +2.

El NO es un gas en condiciones atmosféricas. La estructura de Lewis para el NO denota que es un radical libre. Recordemos que un radical libre es un átomo o molécula con un electrón desapareado, es decir, en un orbital hay un electrón en lugar de dos, y que a los radicales libres los caracteriza, comúnmente, una fuerte reactividad. Por lo tanto se puede esperar que el NO sea reactivo con moléculas orgánicas y por lo tanto tóxico para los organismos vivos, lo que es así,

ya que si bien es cierto que mediante una síntesis controlada el NO participa en un gran número de procesos vitales, la exposición constante al NO se asocia con daño severo a los tejidos (Kronche y col. 1995).

1.19 Biosíntesis del óxido nítrico

Las bacterias pueden generar NO mediante la reducción de nitritos o por oxidación del amoniaco. En los mamíferos, sin embargo, la síntesis del óxido nítrico es muy diferente y es catalizada por las enzimas óxido nítrico sintasas (NOSs) (EC 1.14.13.39). Existen tres NOSs (isoenzimas), las que aunque difieren en su secuencia y número de aminoácidos, catalizan la reacción mediante la cual, con la participación de cofactores (sustancias orgánicas o inorgánicas requeridas para la actividad enzimática) se sintetiza el NO a partir del aminoácido L-arginina y oxígeno (Schmith y Walter, 1994). Las NOSs no tienen precedente en la utilización de cinco cofactores reducidos: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), flavina adenina dinucleótido (FADH), flavina mononucleótido (FMN), tetrahidrobiopterina (H₄B) y calmodulina. La actividad de las NOSs requiere de la participación del ion calcio (Ca²⁺) acoplado a la proteína calmodulina. La calmodulina es un cofactor proteico que tiene cuatro regiones que unen calcio y a nivel intracelular regula proteínas cinasas, fosfatasas, bombas que expulsan calcio y las óxido nítrico sintasas.



La citrulina puede ser reciclada a L-arginina por acción de las enzimas argininosuccinato sintetasa y argininosuccinato liasa. Prácticamente todos los tejidos pueden convertir la citrulina a arginina. La arginina es un aminoácido catiónico, dibásico y semiesencial que media numerosas funciones biológicas, es un intermediario en el ciclo de la urea y es un precursor necesario para la biosíntesis de proteínas, creatina y poliaminas.

1.20 Óxido nítrico sintasas

Las NOSs se han aislado de varios órganos y tejidos, sin embargo, inicialmente fueron aisladas del tejido nervioso, endotelio vascular y macrófagos por lo que se les ha denominado óxido nítrico sintasa neuronal (NOS_n, también conocida como tipo I), óxido nítrico sintasa endotelial (NOS_e, también conocida como tipo II) y óxido nítrico sintasa de macrófagos (NOS_{mac}, también llamada tipo II) respectivamente y a estas se les considera representativas de las NOSs extraídas de los demás tejidos (Nathan y Xie, 1994). Al analizar la secuencia del DNA de los genes que codifican para las NOSs mediante técnicas de biología molecular se encontró un 60% de similitud en la secuencia entre las NOS_n y NOS_e, mientras que la NOS_{mac} es 50% semejante a la NOS_n y 50% con la NOS_e. La síntesis del NO en los sistemas circulatorio y nervioso se lleva a cabo

en cuestión de segundos, ya que las NOSe y NOSn (llamadas NOSs constitutivas) ya se encuentran presentes en la célula, por lo que solamente requieren interactuar con los cofactores apropiados (incluyendo NADPH y H₂B) para expresar su actividad. Cabe mencionar que la NOSmac, a diferencia de las NOSn y NOSe no depende de un aumento en la concentración de calcio libre citosólico para producir NO, ya que el complejo calcio calmodulina está unido a la NOSmac, y que al ser inducible su producción puede impedirse mediante el uso de inhibidores de la síntesis de proteínas como los antibióticos cicloheximida y actinomicina D (Knowles y Moncada, 1994; Nathan y Xie, 1994).

1.21 Inhibidores de las óxido nítrico sintasas

Debido a sus múltiples funciones catalíticas y propiedades bioquímicas complejas, las NOSs son inhibidas por una amplia variedad de sustancias, por ej. análogos de L-arginina, derivados del imidasol e indasol que se unen al grupo hemo, antagonistas de la calmodulina, colorantes redox activos e inhibidores de flavoproteínas (Fukuto y col., 1995). Los análogos de la L-arginina son el N^ω-monometil-L-arginina (L-NMMA), el N^ω-nitro-L-arginina (L-NNA), su éster, el N^ω-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), N^ω-iminoetil-L-ornitina (L-NIO), N^ωN^ω-dimetil-L-arginina (L-ADMA). Estos inhibidores compiten con la arginina por las NOSs, por lo que si se adiciona arginina simultáneamente con el inhibidor la inhibición es menor en cuanto más arginina se adicione. Otra sustancia más recientemente descrita como inhibidor de las NOSs es la 2-iminopiperidina, la cual se describe como inhibidor de la NOSmac.

1.22 ¿Es el óxido nítrico una hormona?

Las hormonas son mensajeros químicos de naturaleza diversa que son secretados o difunden al torrente circulatorio por células o glándulas endocrinas, viajan por la sangre hasta sus órganos o tejidos blanco distantes y se unen ya sea a receptores específicos de la membrana celular, ejerciendo su acción sin entrar a la célula blanco a través de segundos mensajeros intracelulares como 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), 3',5'-monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), inositol trifosfato, diacilglicerol y Ca²⁺, o bien después de unirse a un receptor intracelular (nuclear) interactuando con una secuencia específica del DNA.

Una vez sintetizado, el óxido nítrico no puede ser almacenado, sino que difunde pasivamente dentro y fuera de la célula en que es producido. Si al salir de la célula entra al sistema circulatorio venoso reacciona fácilmente con la desoxihemoglobina (hemoglobina no unida al oxígeno), si entra al sistema circulatorio arterial reacciona fácilmente con la oxihemoglobina (hemoglobina unida al oxígeno), perdiendo en ambos casos su actividad. Además, la vida media del NO en sistemas biológicos es de sólo 2-5 segundos ya que también reacciona rápidamente con el anión radical superóxido (O₂⁻) y con el oxígeno (O₂), por lo que no podría llegar a otros órganos utilizando el torrente circulatorio.

La acción del óxido nítrico es más bien local, actuando sobre el mismo tipo celular (efecto autocrino) o sobre diferente tipo celular (efecto paracrino) del

órgano donde se produce. Al actuar, el NO interacciona con el grupo hemo de la guanilato ciclasa soluble (citoplásmica), la enzima que convierte el GTP (trifosfato de guanosina) a GMPc (monofosfato de guanosina cíclico). El GMPc actúa sobre proteínas cinasas (enzimas que adicionan grupos fosfato a otras proteínas capaces de expresar actividad enzimática, volviéndolas con esto activas o inactivas), fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (enzimas que degradan a los nucleótidos monofosfatados cíclicos) y canales iónicos (proteínas integrales de membrana que permiten el paso de iones del interior al exterior o del exterior al interior de la célula), mediando así las funciones fisiológicas del NO.

Por lo anterior podríamos decir que el NO no es una hormona. Sin embargo, cabe mencionar que algunos autores emplean el término hormona local para designar la acción local de una sustancia, y que aún falta mucho por conocerse acerca del NO. Por lo tanto, decidir si el NO es o no una hormona es menos importante que intentar entender su papel bioquímico dentro de muchos procesos fisiológicos.

El NO producido es rápidamente oxidado *in vivo* a nitrito(NO_2^-) y nitrato (NO_3^-), sustancias más estables que el NO, las que se presentan y se pueden medir en los líquidos corporales y se excretan principalmente en la orina.

1.23 Oxido nítrico y endotelio

Las paredes de los vasos sanguíneos están formadas por dos tipos celulares, el endotelio, la capa más interna constituida por células epiteliales planas y el músculo liso, el cual entre sus funciones está la de dar soporte a las células endoteliales. Una característica de los vasos sanguíneos es la de poder contraerse y dilatarse, lo que se logra mediante la contracción y relajación del músculo liso, regulando así la circulación de la sangre, o la interrupción en caso de heridas. El músculo liso se contrae en respuesta a varias sustancias, entre ellas noradrenalina, para la cual presenta receptores en la superficie celular. La relajación se lleva a cabo en respuesta a acetilcolina, bradicinina, sustancia P, trombina, nucleótidos de adenina y el ionóforo de calcio A 23187, entre otros. En experimentos llevados a cabo con vasos sanguíneos a los cuales se les desprendió el endotelio, la relajación no ocurrió al administrar acetilcolina. El músculo liso vascular no presenta receptores a acetilcolina, por lo que se sugirió que el endotelio sirve como transductor, es decir, responde a las sustancias conocidas como vasodilatadoras con la producción de al menos otra sustancia, la que actúa sobre el músculo liso ocasionando así la dilatación vascular. Esta sustancia fue conocida como factor relajante derivado del endotelio, el que resultó ser el NO (Palmer y col., 1987).

Una vez que la acetilcolina u otras sustancias vasodilatadoras como la bradicinina actúan sobre las células endoteliales ocasionan una entrada de calcio (la concentración intracelular de calcio es comúnmente $0.1 \mu\text{M}$ y las NOSs presentan más del 95% de su actividad a concentraciones de calcio intracelular de 0.2 a $0.5 \mu\text{M}$, este se une a la calmodulina y el complejo calcio-calmodulina interacciona con la NOS volviéndola activa. La NOS sintetiza NO, el que difunde pasivamente fuera de la célula. El NO que entra a la luz vascular es

inactivado rápidamente, el que difunde en dirección opuesta ocasiona relajación del músculo liso vascular.

Debido a que el NO reacciona con el radical anión superóxido (O₂⁻), puede esperarse que el aumento de este último en la circulación sanguínea impida que el NO ejerza su acción relajante del músculo liso vascular, es decir, que el O₂⁻ actúe como un vasoconstrictor. En efecto, la administración de pirogalol, una sustancia donadora de O₂⁻ ocasiona vasoconstricción, lo cual se explica por la reacción del O₂⁻ y el NO antes de que éste último estimule la contracción del músculo liso vascular.

1.24 Oxido nítrico y sistema inmune

Los macrófagos, también llamados células de Kupffer en el hígado, células de Langerhans en la piel e histiocitos en el tejido conectivo son células fagocíticas grandes del sistema reticuloendotelial que pueden encontrarse en tejidos o libremente móviles en la sangre, se derivan de los monocitos (un tipo de leucocito) y funcionan en la protección de los organismos contra infecciones y sustancias nocivas fagocitando (engolfando) y digiriendo microbios invasores, desechos celulares y células tumorales.

Como ya se mencionó, los macrófagos son capaces de producir NO. La actividad de la NOS_{mac} no se puede medir en ausencia de infecciones ya que se requiere de un estímulo para iniciar su síntesis, puesto que es inducible (Liu y Hotchkiss, 1995). Los estímulos son, comúnmente, el interferón (sintetizado por linfocitos), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF), interleucina-1 (IL-1 (producidos por macrófagos y linfocitos) y lipopolisacáridos (LPS) liberados de las paredes celulares de bacterias gram negativas. El interferón γ y el TNF estimulan la producción de tetrahidrobiopterina, el cual es un cofactor esencial para la síntesis de NO. Aunque los macrófagos responden a los LPS con la producción de NO, la respuesta se maximiza mediante el efecto del interferón γ (Pfeifer y col., 1996). Como podemos apreciar, las señales que disparan la producción del NO son muy variadas en distintos tipos celulares.

El NO puede influir en la producción de más óxido nítrico mediante un efecto autocrino. En este caso el NO actúa sobre el mismo tipo celular estimulando la formación de IL-1 (esta actúa de alguna manera induciendo la expresión del gen que codifica para la NOS_{mac} (formación del RNAm de la NOS_{mac}). Esto se conoce como retroalimentación positiva y parece ser un mecanismo general en células que presentan la NOS_i.

Durante infecciones crónicas los macrófagos sintetizan constantemente NO. Como el O₂⁻ también es producido por los macrófagos, su producción constante ocasiona una mayor formación de peroxinitrito (ONOO⁻). El peroxinitrito se forma de varias maneras, por ejemplo, mediante la reacción del óxido nítrico con el O₂⁻ o a partir del peróxido de hidrógeno y nitrito, todos ellos presentes en los mamíferos. El peroxinitrito es un fuerte oxidante, el que al reaccionar con el material genético puede causar mutaciones que lleven al desarrollo de cáncer en células cercanas a los macrófagos. Otros organelos celulares pueden también resultar alterados, por ejemplo las mitocondrias, importantes productores del O₂⁻,

en presencia de NO son las principales productoras del peroxinitrito, el cual al reaccionar con anillos aromáticos, entre ellos el del aminoácido tirosina, puede conducir a eflujo (salida) de calcio y a despolarización de la membrana mitocondrial interna (las mitocondrias son organelos celulares de doble membrana, en la cual la más interna esta polarizada, es decir, existe una diferencia electroquímica entre la región interna que da a la matriz mitocondrial y la región externa de la membrana que da al espacio intermembranal) dañando así el funcionamiento mitocondrial necesario para la adecuada producción de energía para sostener el metabolismo celular normal. Cabe mencionar que ni el NO ni el O₂- ocasionan por separado estos efectos. Lo anterior ha originado que se desarrollen sustancias que protejan contra los efectos tóxicos del peroxinitrito. En dicha búsqueda se ha encontrado que los ácidos lipoico e hidrolipoico protegen eficientemente contra el daño ocasionado por el peroxinitrito. Además, la administración de los inhibidores de las NOSs, al inhibir la síntesis de NO impiden la formación de dicha sustancia y la dexametasona (un glucocorticoide con potente efecto antiinflamatorio. inhibe la formación de la NOSi regulada por IL-1 (y por TNF), contribuyendo al mismo efecto (Pfeifer y col., 1996; Kronche y col., 1995).

Como ya se indicó anteriormente, los nitratos son los productos finales del metabolismo del NO, por lo que se puede esperar que la concentración de nitratos en la sangre se encuentre elevada en procesos infecciosos. De hecho, en infecciones virales o bacterianas los niveles de nitrato sérico pueden ser de hasta 95 μM , esta es una elevación muy marcada si consideramos que en sujetos sanos los niveles de nitrato varían en un rango estrecho de 30 a 36 μM .

1.25 Oxido nítrico y sistema nervioso

La primera demostración que el sistema nervioso produce NO provino de estudios llevados a cabo con cerebelo. La existencia del NO en el cerebelo fue sugerida por la demostración que en cultivos de neuronas y cortes de cerebelo se libera un factor con propiedades similares al NO, el cual fue identificado posteriormente como NO. Actualmente, los antisueros para la NOSc (sueros que contienen anticuerpos contra la NOSc) han permitido su localización en neuronas de múltiples regiones cerebrales, así como en algunas de las terminaciones nerviosas en tejidos periféricos.

La función del NO en el sistema nervioso parece ser la de neurotransmisor, aunque un tipo de neurotransmisor no convencional, ya que no puede ser almacenado, liberado e inactivado en la forma en que comúnmente ocurre con los demás neurotransmisores (Collard, 1995). La acción de neurotransmisor del NO está íntimamente ligada al glutamato (el aminoácido ácido glutámico en forma iónica). El glutamato, principal neurotransmisor excitatorio (favorece la transmisión de un impulso nervioso) en el cerebro, actúa a través de varios subtipos de receptores situados en el exterior de la membrana plasmática de otras células, algunos de los cuales abren directamente canales iónicos, otros estimulan la formación de inositol trifosfato y diacilglicerol y otros estimulan la producción de GMPc mediante la activación de la adenilato ciclasa soluble. Este

último efecto del glutamato y de otros aminoácidos excitatorios se efectúa mediante la producción del NO, ya que en la acción del glutamato se produce citrulina y los inhibidores de las NOSs como el L-NMMA o el inhibidor específico de la NOSc, el 7-nitro indazol resultaron efectivos en bloquear la formación de GMPc estimulada por glutamato.

La producción excesiva de NO puede contribuir en los síntomas de la epilepsia, enfermedad Alzheimer, demencia relacionada con la enfermedad de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y otras enfermedades neurodegenerativas, posiblemente mediante la formación de peroxinitrito a partir del NO y del anión radical superóxido.

A nivel periférico el NO proveniente de terminaciones nerviosas participa en varios procesos fisiológicos, por ejemplo en la erección peneana y en la regulación de los movimientos indispensables para una correcta digestión de los alimentos ingeridos. En este último caso, las neuronas cuyas terminaciones se encuentran en el tracto gastrointestinal median la relajación fisiológica del intestino, que participa en la actividad peristáltica normal durante la digestión. Por muchos años se había buscado la sustancia que ocasiona la relajación y se sabía que era una relajación evocada neuronalmente no mediada por adrenalina ni por acetilcolina. Los agentes que generan NO (nitroprusuro de sodio, por ejemplo) imitan la relajación NANC del tracto gastrointestinal y se ha comprobado que las terminaciones nerviosas gastrointestinales producen NO. Además, los inhibidores de las NOSs inhiben completamente la relajación del intestino.

1.26 Mecanismo de acción de los estrógenos

Los mecanismos de acción de las hormonas esteroides se han dividido en acción genómica y acción no genómica. Para que el primero se lleve a cabo se requiere que la hormona entre a la célula blanco e interaccione con su receptor intracelular específico. El receptor de estrógenos es un factor de transcripción nuclear dependiente de ligando que puede ser modulado y el cual es capaz de activar genes mediante la unión directa con secuencias específicas de nucleótidos del DNA que presentan los elementos de respuesta a estrógenos. Esta unión altera la eficiencia transcripcional de los genes inducidos por estrógenos, regulando la síntesis de RNAm y por consecuencia de proteínas a fin de efectuar una cascada de interacciones proteína-DNA que finalmente aumentará o disminuirá la expresión de ciertos genes (Toran-Allerand, 1996). Como otras hormonas esteroides los estrógenos también se unen a receptores presentes en la membrana plasmática (Wehiling, 1994). La forma de diferenciar entre la acción genómica y no genómica es el tiempo en que se llevan a cabo, mientras que la acción genómica requiere de 2-8 o más horas, la acción no genómica ocurre en pocos segundos o minutos. Sin embargo, el aspecto más característico de ambos mecanismos de acción es que mientras que el mecanismo de acción genómica se impide mediante la administración de inhibidores de la síntesis de proteínas como actinomicina D o cicloheximida, el mecanismo de acción no genómica es insensible a dichos inhibidores, llevándose a cabo normalmente.

Se sabe que la administración de estrógenos ocasiona la síntesis de DNA después de 15 horas en la rata inmadura o en ratas ovariectomizadas (Stack y Gorski, 1985). Debido a que la oleada previa a la implantación en la rata ocurre 24 horas antes de los primeros signos de que el proceso de implantación ha comenzado, así como de la síntesis y secreción de proteínas específicas al lumen uterino, se acepta que el mecanismo de acción de los estrógenos en la implantación en la rata es genómico.

1.27 El óxido nítrico como mediador de los efectos de los estrógenos

Varios estudios muestran que las NOSs constitutivas pueden ser inducidas hormonalmente. La administración de benzoato de estradiol a ratas ovariectomizadas aumenta el ácido ribonucleico mensajero (RNAm, messenger ribonucleic acid) en el núcleo ventromedial del hipotálamo de la rata. El mayor aumento ocurre en la porción caudal, donde la concentración del receptor a estrógenos es mayor (Ceccatelli y col., 1996). Interesantemente no se observó cambios en la parte anterior de la amígdala medial, sitio donde la expresión de la NOS es elevada pero que no presenta receptores a estrógenos. Contrariamente, en el núcleo arcuato, el cual presenta abundantes receptores a estrógenos no se encontró actividad basal de la NOS y no se detectó inducción por estrógenos (Ceccatelli y col., 1996). En otro trabajo, Weiner y col. (1994) estudiaron la actividad de la NOSs como respuesta a estradiol en varios tejidos, encontrando que con el estradiol aumenta la actividad de la NO sintasa y disminuye con la administración del antiestrógeno tamoxifeno.

La hipertensión y aterosclerosis están relacionadas con una producción deficiente de NO por parte del endotelio capilar y niveles aumentados de lipoproteínas de baja densidad (LDL) circulantes. Las LDL inhiben las NOSs. En comparación con el hombre, la mujer padece menos de alteraciones cardíacas, tal diferencia disminuye al llegar la mujer a la menopausia y la administración de estradiol a mujeres menopáusicas aumenta los niveles circulantes de nitritos y nitratos (lo cual refleja un aumento en la producción del NO), reduce los niveles de LDL y aumenta la HDL.

1.28 Oxido nítrico en el útero

En el útero, los estrógenos tienen múltiples funciones. Recientemente se ha dilucidado que en algunos de estos procesos el NO participa como mediador del efecto de los estrógenos. Rao y col. (1995) estudiaron el efecto del inhibidor de la NO sintasa L-NAME en la acción uterotrópica del estradiol en ratas inmaduras y encontraron que al administrar (i.p.) el inhibidor de la NOS, L-NAME 30 min antes de la administración del estradiol, los efectos de este, medido por bioensayo como la acumulación de líquido y aumento de peso resultaron afectados en forma dosis respuesta, con 5, 10 y 20 mg de L-NAME/kg de peso. Los autores concluyen que el NO es un mediador indispensable en la acción uterotrópica del estradiol en la rata

Las tres NOSs se encuentran en el útero de la rata. En la hembra gestante la actividad de la NOS incrementa conforme avanza la gestación y disminuye a término. El hecho de que la actividad de la NOS en el útero disminuya al final de la preñez, sugiere que el NO ayuda a mantener el miometrio en un estado de quiescencia contráctil durante la preñez y que su disminución permite responder a los estímulos que ocasionan las contracciones uterinas durante el parto (Natuzzi y col., 1993). De hecho la NOSi se encuentra en el miometrio y relaja el músculo liso uterino (Dong y col., 1996). En los días 17-18 de gestación la NOSe se encuentra en el endotelio vascular y la NOSi se encuentra en las células del miometrio y en células del músculo liso vascular. La expresión de las NOSe y NOSi disminuye 2 y 5 veces a término, respectivamente (Yallampally y col., 1993). La acción del NO inhibe las contracciones uterinas durante el embarazo (Riemer y col., 1996). En la mujer se encontró un patrón similar en el miometrio (Bansal y col., 1995), donde en el embarazo a término se observó una caída en la expresión de la NOSi en un 75%. El NO contribuye a la vasodilatación sistémica materna y a la reactividad vascular reducida durante la preñez normal. En la mujer los estrógenos no inducen la NOS dependiente de calcio en células endoteliales uterinas y en células del músculo liso miometrial. El miometrio presenta el receptor de estrógenos pero poco RNAm de la NOSe, el endotelio es rico en NOSe pero no presenta el receptor de estrógenos y la administración de estradiol no aumenta la actividad en ninguno de los dos tejidos, por lo que el flujo sanguíneo en el útero humano parece no estar mediado por la expresión endotelial de la NOSe.

En la rata la NOSe se encuentra en el epitelio luminal y glandular, es baja durante el metaestro, comienza a aumentar en el diestro y es altamente expresada durante el proestro y estro (Chatterjee y col., 1996). Como el periodo de peri-implantación en ratas gestantes corresponde al periodo periovulatorio y en este el NO está elevado, los autores consideran que es posible su participación en la implantación. Sin embargo, el posible papel fisiológico que juega el NO en la implantación no ha sido estudiado. Esto es importante si consideramos que la implantación depende de estrógenos y que al parecer el estradiol depende del NO como mediador de sus efectos. Además, como hemos visto, las prostaglandinas son indispensables en la implantación y la administración de un potente inhibidor de la NOS, el NMMA disminuye la síntesis de las prostaglandinas E2 y F2 α en tejidos uterinos y ováricos in vitro de ratas pseudopreñadas. En base a estas evidencias planteamos la siguiente hipótesis.

II Hipótesis:

La inhibición de la oxido nítrico sintasa previene la implantación embrionaria en la rata.

III Objetivo:

Determinar si la administración del inhibidor L-NAME impide la implantación embrionaria.

IV Material y Métodos

Se utilizaron ratas Wistar, hembras, vírgenes de 200 a 230 gramos de peso las que se mantuvieron a un fotoperiodo de 14h luz (la luz se prendió a las 5:00 a.m.) por 10h de oscuridad y comida y agua ad libitum. Esta condición de fotoperiodicidad se eligió porque se sabe que bajo estas condiciones la rata ovula entre la 1 y 3 de la mañana de la noche proestro-estro (Psychoyos, 1973a). Se aparearon por el método de trio (dos hembras /macho/jaula). Se les tomaron lavados vaginales matutinos con aproximadamente 0.1 ml de solución salina 0.154 M. La muestra se colocó en un porta objetos y se observó al microscopio óptico a 10 X. Las hembras que resultaron gestantes (considerando día 1 de gestación aquel en el que se encontraron espermatozoides en el lavado vaginal matutino) fueron separadas de los machos y colocadas con otras hembras. Con las ratas preñadas se formaron los siguientes grupos:

a) Con la finalidad de determinar si la implantación en la rata es simétrica, se sacrificaron 9 ratas en el día 9 de gestación y se contó el número de implantes en cada cuerno uterino.

b) A ratas gestantes en el día 4 de gestación se les administró intraperitonealmente L-NAME en las siguientes dosis: 50 mg/Kg de peso, a las 10 horas, o 10, 20 o 50 mg/Kg a las 18 horas, o bien tres dosis de 5 o 10 mg/Kg de peso, dos en el día 4 de gestación (10 y 18 horas) y una en el día 5 (10 horas). Todas las administraciones se hicieron en 0.1 ml de solución salina 0.154 M.

c) En el día 4 de gestación entre las 13 y 14 horas, o entre las 17-18 horas o bien entre las 21 y 23 horas se les practicó cirugía para administrar intrauterinamente 200, 500 o 1000 μ g del inhibidor L-NAME en 10 μ l de solución salina 0.154 M en un cuerno uterino (cuerno experimental), o 10 μ l de solución salina 0.154 M en el cuerno uterino contralateral (cuerno control). Se decidió administrar este volumen porque al inyectar el mismo volumen de una solución de azul tripano 0.1% en solución salina se vió que es suficiente para distribuirse en todo el cuerno uterino.

La cirugía se practicó de la siguiente manera:

- 1.- Las ratas se anestesiaron mediante la inyección intraperitoneal de 0.0252 g de pentobarbital sódico por Kg de peso corporal.
- 2.- Se rasuró la región lateral del abdomen, se limpió con un algodón humedecido con antibencil al 2%, se hizo una incisión longitudinal.
- 3.- Se sacó el ovario, oviducto y útero y se localizó la unión útero tubaria y se administró intraluminalmente el L-NAME disuelto en solución salina (cuerno experimental) o únicamente solución salina (cuerno control) en un tiempo de 30 seg, cuidando introducir la aguja solamente lo necesario a fin de hacer posible la inyección intraluminal.

4.- Una vez administrado el L-NAME se retiró cuidadosamente la aguja, se regresaron los órganos a la cavidad abdominal, y se procedió a cerrar utilizando catgut del número 2 para músculo y del número 4 para la pared abdominal, se limpió la superficie operada y los animales se colocaron en jaulas individuales, a fin de evitar que se molestaran entre si.

Todas las ratas en este estudio fueron sacrificadas el día 9 de gestación y se contaron los sitios de implantación. Los animales en los que hubo sangrado excesivo al hacer la incisión o sangrado uterino incluso moderado al momento de inyectar intraluminalmente o pérdida del L-NAME o de la solución salina administrados al retirar la aguja del útero y aquellos en los que al ser sacrificados presentaron edema abdominal fueron descartados del experimento.

los resultados se analizaron mediante el análisis de varianza para un diseño experimental con dos factores (ANOVA) y mediante la T de student para muestras no pareadas.

V Resultados.

En el presente trabajo se estudió el efecto de la administración intraperitoneal e intrauterina del inhibidor de la NOS L-NAME a ratas gestantes en el periodo de peri-implantación embrionaria. Como se aprecia en la tabla 1, la administración intraperitoneal en cualquiera de las dosis (5, 10, 20 o 50 mg de L-NAME/Kg de peso corporal) y tiempos probados (día 4, 10 horas; día 4, 18 horas; o día 4, 10 y 18 horas y día 5 10 horas) no alteró la implantación. En todos los experimentos de este trabajo se utilizaron los cuernos uterinos indistintamente, puesto que no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre ellos en cuanto al número de implantes

La administración intrauterina de 200, 500 y 1000 μ g de L-NAME a las 13-14 o 17-18 horas o bien de 200 o 500 μ g de L-NAME a las 22-23 horas del día 4 de gestación no alteró la implantación embrionaria en la rata, evaluado por el número de implantes en el día 9 de gestación. Sin embargo, cuando la dosis administrada se aumentó a 1000 μ g de L-NAME, se observó una disminución en el número de implantes (tabla 2) al administrarlo el día 4 entre las 22 y 23 horas ($p < 0.05$) y en el día 5 entre las 12 y 13 horas ($p < 0.01$).

Dosis (mg/Kg peso)	Número de implantes
día 4, 18h, intraperitonealmente n=6	
control	12 ± 1.41
5	11.29 ± 1.10
20	12.50 ± 1.87
50	11.33 ± 2.16
día 4, 10h, intraperitonealmente n=6	
50	11 ± 1.10
día 4, 10; 18h y día 5, 10h, intraperitonealmente n=6	
control	11.8 ± 1.62
5	11.33 ± 0.816
10	10.167 ± 1.169

Tabla I. Efecto de la administración intraperitoneal del L-NAME sobre el número de implantes en la rata gestante.

Dosis L-NAME (mg) administrado intrauterinamente	Número de Implantes	
	Cuerno derecho	izquierdo
0	5.7 ± 1.4	6.4 ± 1.2
Día 4, 22 a 23 horas	Cuerno con L-NAME	sin L-NAME
1.0	3.6 ± 2.1*	6.2 ± 1.4
Día 5, 12 a 13 horas		
	1.8 ± 0.9 [▲]	4.0 ± 1.1

Tabla II. Efecto de la administración intrauterina de L-NAME, en los días 4 o 5 de gestación en la rata.

* = estadísticamente significativo ($p < 0.05$)

▲ = estadísticamente significativo ($p < 0.01$)

V Discusión

La implantación en la rata y el ratón depende de un aumento u oleada estrogénica previa (Dey y Johnson, 1986). En la rata, el aumento de los estrógenos circulantes ocurre en el día 4 de gestación (Psychoyos, 1973a,b, Weitlauf, 1994). Se ha reportado que el óxido nítrico es un mediador de la acción de los estrógenos pero actualmente no se sabe el mecanismo por el cual actúa (Kausser y Rubanyi, 1997). El aumento en la permeabilidad vascular endometrial y la reacción decidua dependen de la acción de la PGE_2 y en menor grado de la $PGF_{2\alpha}$, por lo que la inhibición de su síntesis impide ambos procesos (Kennedy, 1996). Por otra parte, Suburo y col. (1995) demostraron que la administración de L-NAME a ratas ocasiona una disminución en la síntesis de prostaglandinas en el útero, este entre otros estudios demuestra que el NO participa en la regulación de la cicloxigenasa, favoreciendo así la síntesis de prostaglandinas, por lo que es probable que en el presente trabajo la disminución en el número de implantes se deba a una disminución en la síntesis de prostaglandinas. Sin embargo, cabe mencionar que la dosis utilizada fue muy superior a las empleadas en otros estudios y que se ha reportado que a altas concentraciones el L-NAME puede actuar sobre receptores muscarínicos, por lo que no debe descartarse esta posible acción del L-NAME en el útero.

El factor de crecimiento epidérmico (EGF, epidermal growth factor), el monofosfato de adenosina cíclico (AMPc, cyclic adenosine monophosphate) y el factor de crecimiento semejante a la insulina tipo uno (IGF-1, insulin-like growth factor) son agentes que imitan algunas acciones del estradiol sobre el útero, a fin de iniciar la implantación. En este aspecto, el EGF administrado intrauterinamente más intraperitonealmente es efectivo en iniciar la implantación en ratas gestantes ovariectomizadas tratadas con progesterona (Johnson, 1996). Por otra parte, el epitelio luminal experimenta muerte celular programada o apoptosis y sólo entonces ocurre la penetración del endometrio por el trofoblasto (Parr, Tung y Parr, 1987). Varios estudios han relacionado la exposición de células al NO con muerte por apoptosis (Williams y col., 1994), por lo que el presente estudio abre la posibilidad de estudiar si la condición que priva en el epitelio luminal uterino en ratas gestantes tratadas con L-NAME es suficiente para impedir la muerte por apoptosis, de manera que se impida la penetración del endometrio y la implantación no se lleve a cabo.

Asimismo, recientemente se encontró el receptor a estrógenos en todos los tipos celulares del embrión de ratón cuando los niveles de estrógenos en la madre están elevados (Behrman, 1994), si esto ocurre también en la rata, es probable que los estrógenos maternos actúen en el embrión, ya que los intentos por demostrar que el embrión de rata produce estrógenos han fracasado. Si el embrión de la rata depende de estrógenos para implantarse y a su vez estos requieren del NO como mediador de sus efectos, esto explicaría porque no se observó inhibición mediante la administración intraperitoneal, quizá en este caso el L-NAME no alcanzó a llegar al lumen uterino y a ejercer su efecto sobre el embrión o la concentración que llegó fue tan pequeña que resultó insuficiente para inhibir la implantación, mientras que la administración intrauterina a dosis

altas sería suficiente para actuar sobre el embrión e impedir su nidación. Si esto es así, es notable que la concentración de L-NAME a la que debe estar expuesto el embrión a fin de resultar dañada su nidación es muy alta.

Es poca la posibilidad de que el NO producido por los macrófagos participe en la implantación en la rata, puesto que tanto macrófagos como leucocitos no se encuentran en la decidua (Tachi y Tachi, 1989) sino que se localizan profundamente en el endometrio (De y col., 1991).

La participación de los estrógenos en la regulación de la producción de NO esta bien documentada. El endotelio de animales hembras y de la mujer producen más NO que el endotelio de animales machos y del hombre. Además, el tratamiento con estrógenos eleva la síntesis de NO en animales ovariectomizados y en la mujer postmenopausica (Kausar y Rubani, 1997). Se ha demostrado que los estrógenos actúan mediante el mecanismo genómico, aumentando la síntesis de transcripción de los genes que codifican para las NOSs constitutivas, sin embargo, los siguientes mecanismos alternativos pueden estar implicados también: a) inhibición de la disminución de la expresión del gene de la NOS ocasionada por citocinas; b) modificación postranscripcional de la proteína NOS; c) aumento en la disponibilidad de L-arginina o de cofactores; d) activación no genómica de segundos mensajeros por ejemplo, Ca^{2+} , AMPc y tirosina cinasa y e) Modulación de los sistemas de degradación del NO por ejemplo, generación de especies de oxígeno reactivas y antioxidantes (Kausar y Rubanyi, 1997). El hecho de que la administración intrauterina en el día 5 de gestación haya sido más eficiente en impedir la implantación, posiblemente implica una inhibición preferentemente postraducciona.

Se sabe que el NO reacciona con el fierro más fácilmente que con el oxígeno, razón por la cual reacciona con el grupo hemo. además, algunas de las acciones del NO podrían estar mediadas por la activación de la ADP ribosiltransferasa independiente del GMPc con la consecuente ribosilación de proteínas celulares (Zhang y Snyder, 1992) y puede tener una acción directa modulando la sensibilidad de receptores (Hoyt y col., 1992).

Se cree que para que la implantación se lleve a cabo debe haber una interacción de sustancias químicas entre el embrión y el endometrio. Varias proteínas son sintetizadas por el epitelio uterino y secretadas al lumen en respuesta a estrógenos, presumiblemente para establecer comunicación con el embrión (Yang y col., 1994), por lo que si el NO es mediador de los estrógenos en estimular su síntesis o secreción, la administración de L-NAME en el presente trabajo podría haber impedido que el endometrio secretara alguna proteína de interés para el proceso de implantación. De lo anterior se desprende que sería importante dilucidar si la secreción de proteínas específicas al lumen uterino en respuesta a estrógenos está mediado por NO.

La actividad de las NOSs constitutivas requieren de calcio y estas se encuentran en el endometrio (Chatterjee y col., 1996). La hormona calcitonina está involucrada en el control hemostático del calcio y es sintetizada por epitelio glandular uterino en el tiempo en que ocurre la implantación (Ding y col., 1994). Se ha encontrado que el antagonista de la progesterona, el RU 486, agente que

bloquea la implantación en la rata, impide el aumento en la síntesis de calcitonina provocada por la administración de progesterona a ratas ovariectomizadas. El estradiol no modifica la síntesis de calcitonina en ratas ovariectomizadas, pero actúa sinérgicamente con la progesterona estimulando su síntesis. Debido a su regulación por progesterona y estrógenos y a que se le encuentra en el útero en el tiempo en que ocurre la implantación, los autores creen que es posible su participación en la implantación. De ser así, es probable que se secrete al lumen uterino y actúe sobre las células del epitelio luminal uterino o bien en el blastocisto, lo que ocasionaría un aumento en la concentración de calcio libre citosólico y esto incrementaría la actividad de las NOSs constitutivas, con un subsecuente aumento en la producción de NO.

VI. REFERENCIAS.

- Abrahamsohn, P.A. y Zorn, T.M.T. (1993). Implantation and decidualisation in rodents. *J. Exp. Zool.* **266**:603-628.
- Acker, G., Hecquet, F., Etienne, A., Braquet, P. y Mencia-Huerta, J. M. (1988). Role of platelet-activating factor (PAF) in the ovoimplantation in the rat: effect of the specific PAF-acether antagonist, BN 52021. *Prostaglandins* **35**:233-241.
- Altafeb, K.M., Spencer, J.T. y Sinbert, S. (1992). Intravenous nitroglycerin for uterine relaxation of an inverted uterus. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **166**: 1237-1238.
- Ben-Shlomo, Y., Kokia, E., Jackson, M.H., Adashi, E.Y. y Payne, D.W. (1994). Interleukin-1 β stimulates nitrate production in the rat ovary: evidence for heterologous cell-cell interaction and for insulin-mediated regulation of the inducible isoform of nitric oxide synthase. *Biol. Reprod.* **51**: 310-318.
- Bhatt, H., Brunet, L.J. y Stewart, C.L. (1991). Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 11408-11412.
- Biggers, J.D. (1976). Methods for studying the blastocyst. En: *Implantation of the ovum* (K. Yoshinaga, R.K Meyer y R.O. Greep, eds.). Harvard University Press, EE.UU., pp. 27-42.
- Boshier, D.P. Effects of the rat blastocysts on neutral lipids and non-specific esterases in the uterine luminal at the implantation area
- Bredt, D.S., Huang, P.M. y Snyder, S.H. (1990). Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature.* **347**: 768-770.
- Bredt, D.S. y Snyder, S.H. (1990). Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 682-685.
- Bredt, D.S. y Snyder, S.H. (1994). Nitric Oxide: A physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.* **63**: 175-195.
- Ceccatelli, S., Grandison, L., Scott, R.E.M., Pfaff, D.W. y Kow, L-M. (1996). Estradiol regulation of nitric oxide synthase mRNAs in rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* **64**: 357-363.
- Chatterjee, S., Gangula, P.R.R., Dong, Y-L. y Yallampalli C. (1996). Immunocytochemical localization of nitric oxide synthase-III in reproductive organs of female rats during the oestrous cycle. *Histochem. J.* **28**: 715-723.

Collard, K.J. (1995). On the role of nitric oxide as a cellular messenger in brain. *Moll. Cell. Biochem.* **149/150**: 249-256.

Conrad, K.P., Joffe, G.M., Kruszyna, H., Cruszyna, R., Rochelle, L.G., Smith, L.P., Chavez, J.E. y Mosher, M.D. (1993). Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats. *FASEB J.* **7**: 566-571.

Denker, H.W. (1990). Trophoblast-endometrial interactions at embryo implantation: A cell biological paradox. *Troph. Res.* **4**: 3-29.

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

Dey, S.K. y Johnson, D.C. (1986). Embryonic signals in pregnancy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **476**: 49-62.

Dickmann, Z. (1979). Systemic versus local hormonal requirements for blastocyst implantation: a hypothesis. *Persp. Biol. Med.* **22**:390-393.

Dickmann, Z. y Noyes, R.W. (1961). The zona pellucida at the time of implantation. *Fertil. Steril.* **12**: 310-318.

Ding, Y.Q., Zhu, L.J., Bagch., M.K. y Bagchi, I.C. (1994). Progesterone stimulates calcitonin gene expression in the uterus during implantation. *Endocrinology* **135**: 2265-2274.

Dong, Y-L., Gangula, P.R.R. y Yallampali, C. (1996). Nitric oxide synthase isoforms in the rat uterus: differential regulation during pregnancy and labour. *J. Reprod. Fertil.* **107**: 249-254.

Enders, A.C., Chavez, D.J. y Schlafke, S. (1981). Comparison of implantation in utero and in vitro. En: *Cellular and Molecular Aspects of Implantation* (S.R. Glasser y D.W. Bullock eds.), Plenum Press, Nueva York, pp. 365- 382.

Ferrando, G., y Nalvaldov., A.V. (1968). Relative importance of histamine and estrogen on implantation in rats. *Endocrinology* **83**: 933-937.

Figueroa, J.P. y Massmann, G.A. (1995). Estrogens increases nitric oxide synthase activity in the uterus of nonpregnant sheep. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* **173**: 1539-1545.

Flamigni, C., Bulletti, C., Polli, B., Ciotti, P.M., Prefetto, R.A., Galassi, A. y DiCosmo, E. (1991). Factors regulating interaction between trophoblast and human endometrium. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **513**:176-190.

Garthwaite, J. y Bullock, C. L. (1995). Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu. Rev. Physiol.* **57**: 683-706.

Giles, W., Falconer, J. y Leitch, I. (1997). Ovine fetal umbilical artery doppler systolic diastolic ratios and nitric oxide synthase. *Obstet. Gynecol.* **89**:53-56.

Griffith, O.W. y Dennis, J.S. (1995). Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu. Rev. Physiol.* **57**: 707-36.

Hoyt, K.R. Zung, L-H., Aizenman, E. y Reynolds, L.T. (1992). Nitric oxide modulates NMDA-induced increases in intracellular Ca^{2+} in cultured rat forebrain neurones. *Brain Res.* **592**: 310-316.

Imthurn, B., Rosselli, M., Jaeger, A. W., Keller, P.J. y Dubey, R.K. (1997). Differential effects of hormone-replacement therapy of endogenous nitric oxide (nitrite/nitrate) levels in postmenopausal women substituted with 17β -estradiol valerate and cyproterone acetate or medroxyprogesterone acetate. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* **82**: 388-394.

Jones, B.J. y Murphy, C.R. (1994). A high resolution study of the glycocalyx of rat uterine epithelial cells during early pregnancy with the field emission gun scanning electron microscope. *J. Anat.* **185**: 443-446.

Jovanovic, A., Grobovic, L. y Tulic, I. (1994). Predominant role for nitric oxide in the relaxation induced by acetylcholine in human uterine artery. *Biol. Reprod.* **9**: 387-393.

Kennedy, T.G. (1983). Embryonic signals and the initiation of blastocyst implantation. *Aust. J. Biol. Sci.* **36**: 531-543.

Keys, J.L. y Kennedy, T.G. (1990). Effect of indomethacin and prostaglandin E2 on structural differentiation of rat endometrium during artificially induced decidualization. *Am. J. Anat.* **188**: 148-162.

Knowles, R.G. y Moncada, S. (1992). Nitric oxide as a signal in blood vessels. *Trends Biochem. Sci.* **17**: 399-402.

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

Kronche, K-D., Fehsel, K. y Bachofen, V.K. (1995). Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **376**: 327-343.

Learmont, J.G. y Poston, L. (1996). Nitric oxide is involved in flow-induced dilation of isolated human small fetoplacental arteries. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **174**:583-588.

Lees, C., Langford, E., brown, A.S., De Belder, A., Pickles, A., Martin, J. y Campbell, S. (1996). The effects of S-nitrosoglutathione on platelet activation, hypertension, and uterine and fetal doppler in severe preclampsia. *Obstet. Gynecol.* **18**:14-19.

Lejeune, B., Hoeck, J.V. y Leroy, F. (1981). Transmitter role of the luminal uterine epithelium in the induction of the decidualization in rats. *J. Reprod. Fertil.* **61**:235-240.

Liu, R.H. y Hotchkiss, J.H. (1995). Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: a review. *Mut. Res.* **339**: 73-89.

Luxford, K.A., Murphy, C.R. (1993). Cytoskeletal control of the apical surface transformation of rat uterine epithelium. *Biol. Cell.* **79**: 111-116.

Malathy, P.V., Cheng, H.C. y Dey S.K. (1986). Production of leukotrienes and prostaglandins in the rat uterus during preimplantation period. *Prostaglandins* **32**: 605-614.

McLaren, A. (1975). Fertilization cleavage and implantation. En: *Reproduction in farm animals* (E. S. E. Hafez, de.), 3a. edición. EE. UU., Lea y Febiger, pp. 143-165.

Mignatti, P., Mazziari, R. y Rifkin, D.B. (1991). Expression of the urokinase receptor in vascular endothelial cells is stimulated by basic fibroblast growth factor. *J. Cell. Biol.* **113**: 1193-1201.

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

Moncada, S., Palmer, R.M.J. y Higgs, E.A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **44**: 109-142.

Moulton, B.C., Koenig, B.B. y Borkan, S.C. (1978). Uterine lysosomal enzyme activity during ovum implantation and early decidualization. *Biol. Reprod.* **19**: 167-170.

Murphy L.J., Bell, G.I. y Friesen, H.G.(1987). Tissue distribution of insuline-like growth factor I and II messenger ribonucleic acid in the adult rat. *Endocrinology* **120**: 1279-1282.

Murphy, L. y Ghahary A. (1990). Uterine insuline -like growth factor-1: regulation of expression and its role in estrogen-induced uterine proliferation. *Endocrinol. Rev.* **11**: 443-453.

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

Natuzzi, E.S., Ursell, P.C. , Harrison, M., Buscher, C. y Riemer, R.K. (1993). Nitric oxide synthase activity in the pregnant uterus decreases at parturition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **194**: 1-8.

Niimura, S. e Ishida, K. (1987). Immunohistochemical demonstration of prostaglandin E-2 in preimplantation embryos. *J. Reprod. Fertil.* **80**: 505-508.

Noyes, R.W., Dickmann, Z., Doyle, L. y Gates, A.H. (1963). Ovum transfer Synchronous and asynchronous in the study of implantation. En: *delayed implantation* (E.C. Enders, de.), EE.UU., University Chicago Press, pp. 197-211.

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

Papka, R.E., McNeill, D.L., Thompson, D. y Schmidt, H.H.H. (1995). Nitric oxide nerves in the uterus are parasympathetic, sensory, and contain neuropeptides. *Cell. Tissue Res.* **279**: 339-349.

Parr, M.B. (1982). Apical vesicles in the rat uterine epithelium during early pregnancy: a morphometric study. *Biol. Reprod.* **26**: 915-924.

Parr, M.B., Tung,H.N. y Parr, E.L. (1986). The ultrasture of the rat primary decidual zone. *Am. J. Anat.* **176**: 423-436.

Parr, M.B., Tung,H.N. y Parr, E.L. (1987).Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats. *Biol. Reprod.* **36**: 211-225.

Parr, M.B., Parr, E.L., Munaretto, K., Clark, M.R. y Dey, S.K. (1988). Immunohistochemicallocalisation of prostaglandin synthase in the rat uterus and embryo during the periimplantation period. *Biol. Reprod.* **38**: 333-343.

Parr, M.B. y Parr, E.L. (1989). The implantation reaction. En: *Biology of the uterus* (R.M. Wynn y W.P. Jollie, eds.), 2a. edición, EE.UU., Plenum Medical Book Company, pp. 223-227.

Pfeiffer, S., Leopold, E., Schmidt, K., Brunner, F. y Mayer, B. (1996). Inhibition of nitric oxide synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine. *British Journal of Endocrinology* : 1433-1440.

Pfeilschifter, J., Eberhardt, W., Hummel, R., Kunz, D., Mohl, H., Nitsch, D., Ploss, C. y Walker, G. (1996). Therapeutic strategies for the inhibition of inducible nitric oxide synthase (potential for a novel class of anti-inflammatory agents). *Cell Biol. Int.* **20**: 51-58.

Psychoyos, A. (1966). Recent researches on egg implantation. En: *Egg Implantation* (G.E.M. Wolstenholme y M. O'Connor, eds), Boston, Little, Brown, pp. 4-15.

Psychoyos, A. (1967). The hormonal interplay controlling egg implantation in the rat. En: *Advances in Reproductive Physiology* (A. McLaren, de.), Logos Press, Londres, pp. 257-277.

Psychoyos, A. (1973a). Hormonal control of ovoid implantation. *Vitams Horm.* **31**:201-256.

Psychoyos, A. (1973b). Endocrine control of egg implantation. En: *Handbook of Physiology* (R.O. Greep y E.B. Astwood, eds.), sección 7: Endocrinology, volumen II, parte 2, American Physiological Society, EE.UU., pp. 187-215.

Psychoyos A. y Casimiri, V. (1980). Factors involved in uterine receptivity and refractoriness. *Prog. Reprod. Biol.* **7**: 143-157.

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

Psychoyos, A., Nikas, G. y Gravanis, A. (1995). The role of prostaglandines in blastocyst implantation. *Hum. Reprod. Suplemento* **2**: 30-42.

Ramsay, B., Sooranna, S.R. y Johnson, M.R. (1996). Nitric oxide synthase activity in human myometrium and villous trophoblast throughout pregnancy. *Obstet. Gynecol.* **87**: 249-253.

Rao, V.S.N., Chaves, M.C. y Ribeiro, R.A. (1995) Nitric oxide synthase and the uterotrophic response to oestrogen in immature rats. *J. Reprod. Fertil.* **105**: 303-306.

Roberts, C.T., Brown, A.L., Graham, D.E., Seeling, S., Gabbay, K.H. y Rechler, M.M. (1986). Growth hormone regulates the abundance of insuline-like growth factor-I RNA in adult rat liver. *J. Biol. Chem.* **261**: 10025-10025.

Schlafke, S. y Enders, A.C. (1975). Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. *Biol. Reprod.* **12**:41-65.

Schlafke, S., Welsh, A.O. y Enders, A.C. (1985). Penetration of the basal lamina of the uterine luminal epithelium during implantation in the rat. *Anat. Rec.* **212**: 47-56.

Schmidt, H.H.H. y Walter, V. (1994). NO at work. *Cell* **78**: 919-925.

Shelesnyak, M.C. (1952). Inhibition of decidual cell formation in the pseudopregnant rat by histamine antagonists. *Am. J. Physiol.* **170**: 522-525.

Shelesnyak, M.C. (1960). Nidation of the fertilized ovum. *Endeavor* **19**: 81-86.

Shelley, M.E., Hossain, A., McDonough, P.G. y Khan, I. (1994). Differential c-jun gene expression with tonically administered steroids in rat ovary and uterus. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **170**:1410-1415.

Sherman, M.I. y Matthaehi, K.I. (1980). Factors involved in implantation-related events in vitro. *Prog. Reprod. Biol.* **7**: 43-53.

Shew, R.L., Papka, R.E., McNeill, D.L. y Yee, J.A. (1993). NADPH-Diaphorase-positive nerves and the role of nitric oxide in CGRP relaxation of uterine contraction. *Peptides.* **14**: 637-641.

Shion, Y.L. y Murphy, C.R. (1995). The basal plasma membrane and lamina densa of uterine epithelial cells are both altered during early pregnancy and by ovarian hormones in the rat. *Eur. J. Morphol.* **33**: 257-264.

Singh, M.M., Chauhan, S.C., Trivedi, R.N., Maitra, S.C. y Kamboj, V.P. (1996). Correlation of pinopod development on uterine luminal epithelial surface with hormonal events and endometrial sensitivity in the rat. **135**: 107-17.

Singh, M.M., Trivedi, R.N., Chauhan, S.C., Srivastava, V.M.L., Makker, A., Chowdhury, S.R. y Kamboj, V.P. (1996). Uterine estradiol and progesterone receptor concentration activities of certain antioxidants 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.* **59**: 215-224.

Stack, G. y Gorski, J. (1985). Relationship of estrogen receptors and protein synthesis to the mitogenic effect of estrogens. *Endocrinology* **117**: 2024-2032.

Sugino, N., Takiguchi, S., Ono, M., Tamura, H., Shimamura, K., Nakamura, Y., Tsuruta, R., Sadamitsu, K., Ueda, T., Maekawua, T. y Kato, H. (1996). Nitric oxide concentrations in the follicular fluid and apoptosis of granulosa cells in human follicles. *Hum. Reprod.* **11**: 2484-2487.

Snyder, S.H. (1992). Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters? *Science* **257**:494-496.

Snyder, S.H. y Bredt, D.S. (1992). Biological roles of nitric oxide. *Sci. Am.* **266**: 28-35.

Snyder, G.D., Holmes, R.W., Bnates, J.N. y Van Voorhis, B.J. (1996). Nitric oxide inhibits aromatase activity: mechanisms of action. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **58**: 63-69.

Stjernquist, M. y Owman, C. (1987). Interaction of noradrenaline, NPY and VIP with the neurogenic colinergic response of the rat uterine cervix *in vitro*. *Acta Physiol. Scand.* **131**: 553-562.

Suburo, A.M., Chaud, M., Franchi, A., Polak J.M. y Jimeno, M.A.F. (1995). Distribution of neuronal and non-neuronal NADPH diaphorases and nitric oxide synthases in rat uterine horns under different hormonal conditions. *Biol. Reprod.* **52**: 631-637.

Terry, V., Shaw, T.J., Shorey, C.D. y Murphy, C.R. (1996). Actin-binding proteins undergo major alterations during the plasma membrane transformation in uterine epithelial cells. *Anat. Rec.* **246**: 71-77.

Van Buren, G.A., Yang, D-S. y Clark, K. E. (1992). Estrogens-induced uterine vasodilatation is antagonized by L-nitroarginine methyl ester, and inhibitor of nitric oxide synthesis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **167**: 828-833.

Veille, J-C., Li, P., Eisenach, J.C., Massmann, A.G. y Figueroa, J:P: (1997). Effects of estrogens on nitric oxide biosynthesis and vasorelaxant activity in sheep uterine and renal arteries *in vitro*. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **174**: 1043-1049.

Wehiling, M. (1994). Nongenomic actions of steroid hormones. *Trends Endocrinol. Metab.* **5**: 347-353.

Weiner, C.P., Lizasoain, Y., Baylis, S.A., Knowles, R.G., Charles, I.G. y Moncada, S. (1994). Induction of calcium -dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 5212-5216.

Weitlauf, H.M. (1979). Implantation. En: Animal models for research on contraception and fertility (N.Y. Alexander, ed.), EE.UU., Harper and Row, pp. 231-252.

Weitlauf, H.M. (1994). Biology of Implantation. En: The physiology of Reproduction (E. Nobil y J. Neill, eds.), 2a edición, volumen II, EE. UU., Raven Press, pp.391-440.

Yallampalli, C., Garfield, R.E. y Byam-Smith, M. (1993). Nitric oxide inhibits uterine contractility during pregnancy but not during delivery. *Endocrinology* **133**: 1899-1902.

Yallampalli, C., Buhimschi, I., Chwalisz, K., Garfield, R.E. y Dong, Y-L. (1996). Preterm birth in rats produced by the synergistic action of a nitric oxide inhibitory (N^G -nitro- L-arginine methyl ester) and an antiprogesterin (onapristone). *Am. J. Obstet. Gynecol.* **175**: 207-212.

Yasuda, K., Satouchi, K. y Saito, K. (1986). Platelet-activating factor in normal rat uterus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **138**: 1231-1236.

Yang, D., Lang, U., Greenberg, S.G., Myatt, L. y Clark, K.E. (1996). Elevation of nitric levels in pregnant ewes and their fetuses. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **174**: 573-577.

Yang, L.S., Marshall, A., Dao, B. y Koide, S.S. (1994). Synthesis and secretion of an estrous stage-specific protein by rat uterus. *Cell. Biol. Int.* **18**: 889-895.

Zhang, J. y Snyder, S.H. (1992). Nitric oxide stimulates auto-ADP-ribosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 9382-9385.