

Tesis de Posgrado

Influencia de agentes vasoactivos en el proceso implantatorio embrionario : Alteraciones en la diabetes mellitus

Novaro, Virginia

1998

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Novaro, Virginia. (1998). Influencia de agentes vasoactivos en el proceso implantatorio embrionario : Alteraciones en la diabetes mellitus. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3084_Novaro.pdf

Cita tipo Chicago:

Novaro, Virginia. "Influencia de agentes vasoactivos en el proceso implantatorio embrionario : Alteraciones en la diabetes mellitus". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1998.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3084_Novaro.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**“Influencia de agentes vasoactivos en el proceso implantatorio
embrionario. Alteraciones en la diabetes mellitus”**

Autor: Virginia Novaro

Director: Elida Teresa González

Co-director: Martha Fernández de Gimeno

Consejero de Estudios: Lino Baraño

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires
Area: Ciencias Biológicas

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)

**Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
(CONICET)**

-1998-



“ The influence of vasoactive agents in the embryo implantation process in the rat. Alterations in Diabetes Mellitus”.

***Palabras claves:* útero, rata, óxido nítrico, óxido nítrico sintasa, implantación embrionaria, prostaglandinas, estradiol, vasodilatación, factor activador de plaquetas, interferón α , diabetes mellitus.**

***Keywords:* uterus, rat, nitric oxide, nitric oxide synthase, embryonic implantation, prostaglandins, estradiol, vasodilatation, platelet-activating factor, interferon α , diabetes mellitus.**



A Ale

A la Universidad de Buenos Aires y al CONICET por darme la oportunidad de aprender y desarrollar la tarea científica.

A la Dra. Martha Fernández de Gimeno que desde hace años me guía en la investigación.

A la Dra. Elida Teresa González por su dirección y paciencia durante estos años.

A la Dra. Alicia Jawerbaum por su buena disposición para ayudarme.

A mis compañeros de trabajo que me acompañaron todo este tiempo y me sacaron de las emergencias: María Ester Castro, Silvina Pérez Martínez, Mariana Farina, Alicia Faletti, Alicia Motta, Ana Franchi, Valeria Rettori, Ramona Morales, Elisa Cebal, Mariel Boquet, Belén Herrero, Julio Fernández Cueto, Marcelo Viggiano, Martín Berón de Astrada, Alejandro Lomniczi; y las chicas de administración que me ayudaron con los trámites pesados.

A Cupy y Enrique, mis viejos.

A Barto, mi abuelo.

A mis hermanos Gabriela, Andrés y Marcos, mis cuñados Dagui, Valeria y Susan y mis sobrinos Manuel, Jimena, Elisa y Julia.

A mis amigos que siempre están Valeria D., Alina, Andrés, César, Gabriela, Valeria J., Fabián, Hernán, Beltrán y Sergio.

A Ale, todo lo que fue y lo que va a ser.

El contenido de este trabajo de tesis ha sido parcialmente publicado en:

"Interaction between uterine PGE and PGF_{2α} production and the nitridergic system during embryonic implantation in the rat". V.Novaro, V.Rettori, E.T.González, A.Jawerbaum, A.Faletti, G.Canteros y M.A.F.Gimeno. Prostaglandins 51:363-376, 1996.

"Nitric Oxide Synthase regulation during embryonic implantation". V.Novaro, E.T.González, A.Jawerbaum, V.Rettori, G.Canteros y M.A.F.Gimeno. Reproduction, Fertility and Development 53(9), 1997.

"Uterine nitric oxide and prostaglandin E during embryonic implantation in non-insulin-dependent diabetic rats". V.Novaro, A.Jawerbaum, A.Faletti, M.A.F. Gimeno y E.T.González. Reproduction, Fertility and Development aceptado para su publicación 1998.

Abreviaturas

Ca^{2+} = calcio

AMPc = adenosín 3',5' – monofosfato cíclico

GMPc = guanosín 3',5' – monofosfato cíclico

i.p. = intraperitoneal

i.l. = intraluminal

p.s. = peso seco

p.h. = peso húmedo

min. = minutos

Las demás abreviaturas están indicadas en el texto

INDICE

	Página
RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCION	3
1- El útero de rata	3
1- A) Su anatomía e histología	3
1- B) Fisiología uterina	6
1- C) Metabolismo uterino	6
2- Desarrollo del embrión	7
2- A) Desarrollo pre-implantatorio del embrión de mamíferos	7
2- B) Desarrollo post-implantatorio del embrión de mamíferos	8
3- La implantación embrionaria	10
3- A) Sincronización entre el desarrollo embrionario y la receptividad uterina	10
3- B) Secuencia de eventos en el proceso implantatorio embrionario	14
3- C) Formación del tejido decidual	15
3- D) Importancia de agentes vasoactivos en el inicio del proceso implantatorio embrionario	17
4- Prostaglandinas	18
4- A) Características generales	18
4- B) Estructura química de las prostaglandinas	18
4- C) Biosíntesis de prostaglandinas	20
4- D) Mecanismos de acción de las prostaglandinas. Efectos biológicos en el tejido uterino	22
4- E) Efectos biológicos de las prostaglandinas en el embrión	23
4- F) Participación de las prostaglandinas en la implantación embrionaria	24
5- Señales embrionarias que participan en la preñez temprana	26
5- A) Importancia de las señales embrionarias	26
5- B) El PAF como señal embrionaria temprana	26

5- C) El IFN α como señal embrionaria temprana	27
6- El óxido nítrico	28
6- A) Características generales	28
6- B) Inhibidores de la síntesis de óxido nítrico	31
6- C) Efectos biológicos del óxido nítrico	31
6- D) Efectos biológicos del óxido nítrico sobre el tejido uterino	32
6- E) El óxido nítrico durante la preñez en los mamíferos	33
7- Influencia estrogénica en el proceso implantatorio embrionario	35
7- A) El estradiol condiciona la implantación embrionaria en los mamíferos	35
7- B) Efecto del estradiol sobre la síntesis endometrial de PGs	38
7- C) Efecto de las hormonas ováricas sobre la síntesis de NO	38
8- La diabetes mellitus	39
8- A) Consideraciones generales de la enfermedad	39
8- B) Modelos animales para el estudio de la diabetes mellitus	40
8- C) Importancia del modelo de diabetes tipo II por su similitud con la diabetes gestacional	41
8- D) Alteraciones reproductivas en la diabetes mellitus	42
8- E) Alteraciones del desarrollo embrionario en la patología diabética	44
8- F) Alteraciones de prostanoïdes en la diabetes mellitus	45
OBJETIVOS	47
MATERIALES Y METODOS	49
-Materiales	49
a) Modelo experimental	49
-Ratas en ciclo estral	49
-Ratas preñadas	50
-Ratas preñadas sin embriones en el útero (con ligadura oviductal)	50
-Ratas ovariectomizadas (ovx)	50
-Ratas ovariectomizadas con sustitución estrogénica (ovx+Eo)	50
-Ratas preñadas inyectadas con dexametasona	51
-Ratas preñadas inyectadas con Tamoxifeno	51
-Ratas preñadas inyectadas intraluminalmente con inhibidores de la enzima NOS	52
-Ratas con diabetes no-insulino-dependiente	53
b) Determinaciones	55

-Presencia de sitios implantatorios y determinación del "tiempo de inicio de la implantación embrionaria"	55
-Recuento de mórulas y determinación de la "tasa de implantación"	56
-Determinación de la actividad de la enzima Fosfolipasa A ₂ (PLA ₂)	56
-Determinación de la producción uterina de prostaglandinas (PGs)	57
-Determinación de la actividad de la enzima Oxido Nítrico Sintasa (NOS) en útero	59
-Estadística	61
RESULTADOS	62
<u>Sección A:</u> Producción uterina de PGs durante el período peri-implantatorio	62
A-1. Actividad de la enzima PLA ₂ en útero aislado de ratas en días peri-implantatorios de la preñez	62
A- 2. Presencia de embriones en el útero y actividad de PLA ₂	64
A- 3. Producción de prostanoideos por el tejido uterino aislado de ratas en días peri-implantatorios de la preñez	66
A- 4. Presencia de los embriones en el útero y producción de PGs	67
A- 5. Señales embrionarias modulan la síntesis uterina de PGs	68
Conclusión sección (A)	73
<u>Sección B:</u> Actividad uterina de la enzima NOS en el período peri-implantatorio	74
B-1. Actividad de la NOS en útero aislado de ratas en días peri-implantatorios de la preñez	74
B-2. Modulación "in vitro" de NOS sobre la enzima PLA ₂	75
B-3. Efecto de la modulación de la actividad de la NOS sobre la síntesis de PGs uterinas en el día de la implantación	77
B-4. Los embriones condicionan la modulación de la síntesis de PGs uterinas por el NO en el día de la implantación	83
B-5. Presencia de los embriones en el útero y actividad NOS	85
B-6. Señales embrionarias modulan "in vitro" la actividad NOS uterina	87
Conclusión sección (B)	88
<u>Sección C:</u> Caracterización de la enzima NOS uterina durante la peri-implantación	88
C-1. Inhibición "in vivo" de la actividad de la NOS con dexametasona	88

C-2. Isoformas de la NOS presentes en el útero durante la implantación embrionaria	90
C-3. Modulación "in vivo" de la actividad NOS uterina por estradiol, efecto del Tamoxifeno	91
Conclusión sección (C)	94
<u>Sección D:</u> La producción uterina de NO es crucial durante la Implantación embrionaria	94
Conclusión sección (D)	100
Sección (E): Efecto de la patología diabética en la implantación embrionaria	100
E-1. La actividad uterina de la NOS está incrementada en las ratas diabéticas no-insulino-dependientes	101
E-2. La producción uterina de PGE está incrementada en las ratas diabéticas no-insulino-dependientes	102
E-3. Presencia de los embriones en el útero diabético y producción de PGs	103
E-4. La "tasa" y el "tiempo de inicio de la implantación" no están alterados en las ratas diabéticas	104
E-5. La actividad NOS no se incrementa en forma localizada en el útero de ratas sanas y diabéticas	105
E-6. La producción uterina de PGE es menor en los sitios de implantación tanto en ratas control como diabéticas	107
E-7. El tratamiento de los animales diabéticos con insulina no revierte las alteraciones en la producción de PGs y actividad de la NOS uterinas	108
Conclusión sección (E)	110
DISCUSION	111
-La actividad de la enzima PLA ₂ y la producción de PGs uterinas acompañan en el proceso implantatorio embrionario en la rata	111
- Señales embrionarias modulan la producción uterina de PGs durante la implantación	113
- La actividad uterina de la NOS aumenta durante el proceso implantatorio embrionario en la rata	117
- Señales embrionarias modulan la actividad uterina de la NOS durante la implantación	118
- El sistema nitridérgico modula la síntesis de PGs uterinas durante la implantación embrionaria	119

- Distintas isoformas de la NOS participan en el proceso implantatorio embrionario	122
- El estradiol "in vivo" modula la actividad uterina de la NOS	124
- La síntesis uterina de NO es crucial durante la implantación embrionaria	126
- Localización endometrial de los agentes vasoactivos	127
- El proceso implantatorio embrionario en la patología diabética de tipo no-insulino-dependiente se encuentra "compensatoriamente regulado"	128
CONCLUSION FINAL	135
REFERENCIAS	137

RESUMEN

En el presente trabajo abordamos la implantación embrionaria en ratas controles y diabéticas desde el punto de vista del fenómeno vasoactivo que conlleva.

Las prostaglandinas son necesarias para permitir la implantación de los embriones en el lumen, ya sea incrementando el flujo sanguíneo y la vasodilatación del útero durante la deciduización endometrial, como regulando la actividad contráctil del tejido miometrial.

El óxido nítrico ha sido reconocido como agente vasodilatador y miorelajante, y parte de su efecto es mediado a través de la regulación de la síntesis de prostaglandinas en diversos procesos fisiológicos.

Se ha determinado variaciones en la síntesis uterina de prostaglandinas y de óxido nítrico en la preñez temprana en la rata, y se ha establecido una relación causal entre ambos mecanismos fisiológicos durante la implantación embrionaria.

En el útero dichos agentes vasoactivos aumentan durante los días peri-implantatorios de la preñez, como resultado de la combinación de la acción de los esteroides ováricos y de agentes locales derivados del embrión o de la madre.

Las isoformas Ca^{2+} -dependiente y Ca^{2+} -independiente de la enzima sintetizadora de óxido nítrico son las responsables del incremento en la actividad enzimática en el día de la implantación. La inhibición de la síntesis intraluminal de óxido nítrico reduce el número de embriones implantados en un 50%, probablemente alterando la adecuada irrigación sanguínea al sitio de implantación. También se determinó que la producción uterina de prostaglandina E y $\text{F}_{2\alpha}$ depende tanto de la producción de óxido nítrico como de señales embrionarias tempranas.

Nuestros resultados indican además, que la acción vasoactiva del óxido nítrico y de las prostaglandinas puede modularse de manera tal de compensar alteraciones metabólicas en la rata diabética de tipo no-insulino-dependiente, y permitir que el proceso implantatorio ocurra eficientemente en esta patología.

SUMMARY

This thesis addresses the process of embryo implantation in control and diabetic rats focusing in the vasoactive changes it involves. We have established the role of prostaglandins and nitric oxide. The first group of molecules is required to allow embryo implantation in the uterine lumen, by increasing uterine blood flow and vasodilatation during endometrial decidualization and by regulating the contractile activity of the myometrial tissue. On the other hand, nitric oxide, a recognized vasodilating and muscular relaxing agent, exerts part of its effects in several physiological processes by modulating prostaglandin synthesis. In the present work we have determined the existence of significant changes in the uterine synthesis of prostaglandins and nitric oxide during the early pregnancy in the rat and we have established a causal relationship between both mechanisms during the embryonic implantation.

The observed increase in the concentration of these vasoactive agents in the uterus takes place in the peri-implantation days, as a result of the combined action of ovarian steroids and local factors derived either from the embryo or the maternal tissue. Both the Ca^{2+} -dependent and independent isoforms of the nitric oxide synthetase are responsible for the increase in enzymatic activity in the implantation day. The relevant role played by nitric oxide is revealed by the fact that inhibition of uterine nitric oxide synthesis reduces the number of implanted embryos by 50%, probably because it alters the appropriate blood supply to the implantation site. In addition, it was determined that the production of prostaglandin E and $\text{F}_{2\alpha}$ depends both on the production of nitric oxide and on early embryonic signals.

Our studies also indicate that the vasoactive effect of nitric oxide and prostaglandins is modified in the non-insulin dependent diabetic rat in such a way as to compensate the metabolic alterations that this pathology involves, thus allowing an efficient embryo implantation.

INTRODUCCION

1- EL UTERO DE RATA

1 - A) Su anatomía e histología

El útero de rata por su morfología es considerado como de tipo bipartito dúplex o bicorne. Ambos cuernos uterinos desembocan en el extremo superior de la vagina y se relacionan con los ovarios mediante sendas trompas de Fallopio u oviductos (Biology of the Uterus 1989) (Figura I).

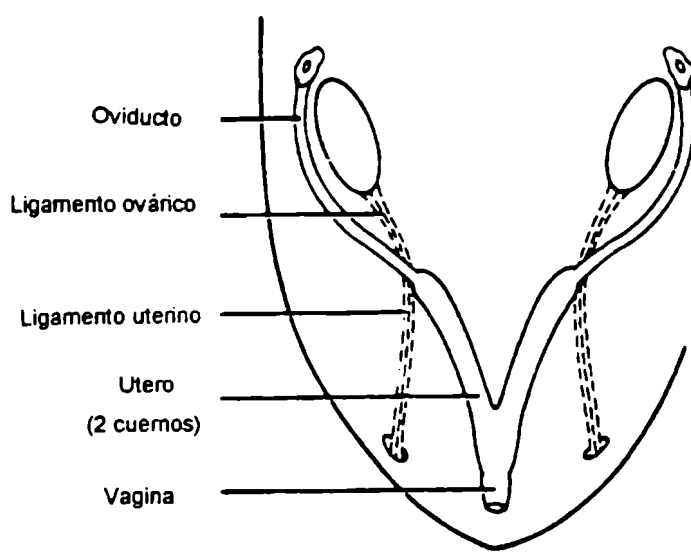


Figura I. Diagrama de una vista ventral del sistema genital femenino. Se representa en este caso un útero bicorne típico de roedores. Del libro *Biology of the Uterus*, Second Edition por R.M. Wynn y W.P. Jollie, Plenum Medical 1989.

Desde el punto de vista histológico, el útero está constituido por el endometrio y el miometrio. El endometrio está compuesto por un epitelio cilíndrico simple (con microvellosidades y células ciliadas que se comunican con la luz del órgano), la lámina basal y el estroma (con abundante irrigación sanguínea y glándulas de secreción que se abren hacia la luz) (Biology of the Uterus 1989; Uterine Function,

Molecular and Cellular Aspects 1990; Strauss y Gorpide, 1992). El miometrio está constituido por células musculares lisas formando o una capa circular interna y una capa longitudinal externa, ambas rodeadas por la serosa (de células mesoteliales) que se continúa con el peritoneo (Figura II).

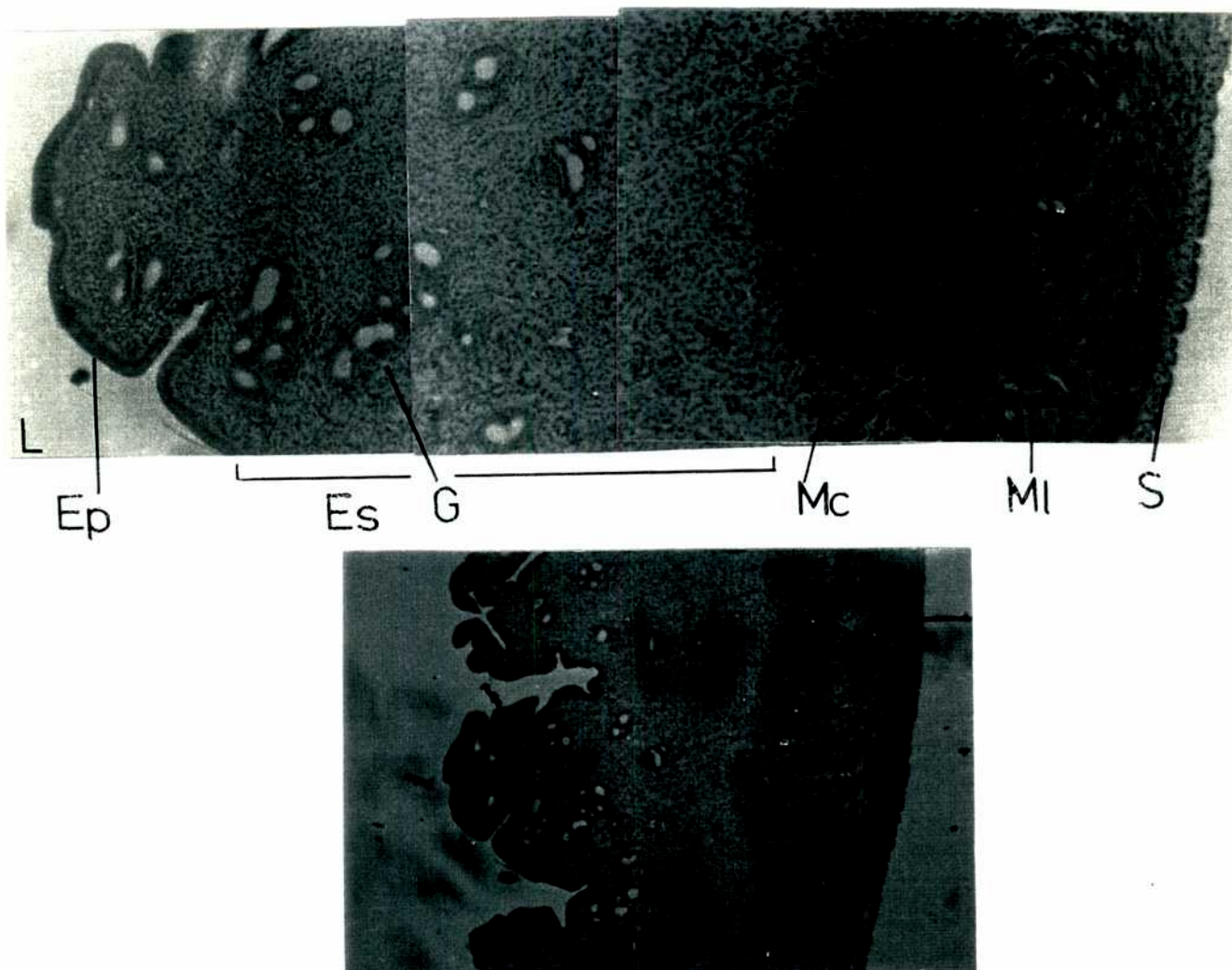


Figura II. Fotos de un corte histológico longitudinal de útero de rata en estadio de estro con tinción de hematoxilina-eosina. Pueden observarse las distintas capas celulares: el epitelio cilíndrico simple (Ep) que se comunica con la luz del órgano (L), el estroma endometrial (Es) con abundantes glándulas epiteliales (G), el miometrio circular (Mc) y el miometrio longitudinal (MI) y la capa serosa (S). Aumento 20 X (foto superior con vista seriada) y 4 X (foto inferior con vista general). Fotografías realizadas junto con el laboratorio de Embriología Animal de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la U.B.A.

Si bien la principal regulación del tejido uterino es hormonal, existen principalmente dos tipos de fibras nerviosas en el útero: las colinérgicas y las adrenergicas, pertenecientes a los sistemas simpático y parasimpático. Ambas se hallan asociadas a vasos sanguíneos y células musculares.

El ovario es el responsable de la secreción de las hormonas esteroideas necesarias para mantener el ciclo sexual en los mamíferos, en respuesta a las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH) liberadas por la hipófisis. En la rata, el ciclo se denomina "estral" ya que esta principalmente bajo regulación estrogénica (Figura XII a). El ciclo dura entre cuatro y cinco días y los cambios histológicos se ven reflejados tanto en el útero como en la vagina de la rata. En la noche del proestro se produce el pico de estrógenos que desencadena la ruptura folicular y la ovulación. Se pueden utilizar frotis vaginales para diagnosticar las fases del ciclo estral según los tipos celulares que se desprenden, que a su vez se deben a los cambios hormonales producidos por el ovario (Biology of the Uterus 1989).

Así, el diestro se caracteriza por la presencia en los frotis vaginales de abundantes leucocitos; el proestro por la presencia destacada de células redondeadas nucleadas; el estro por la abundancia de células escamosas anucleadas que se desprenden del epitelio vaginal; y el metaestro por la presencia de los distintos tipos celulares anteriores, en proporciones equivalentes.

Si bien son importantes los cambios en el epitelio del endometrio y de la vagina que ocurren a lo largo del ciclo estral, son más dramáticos los cambios endometriales que ocurren durante la gestación temprana para permitir la implantación del blastocisto (Biology of the Uterus 1989; Strauss y Gorpide, 1992). Este proceso se denomina "decidualización" e involucra la transformación del epitelio luminal y del estroma, y será descrito posteriormente.

1 - B) Fisiología uterina

El músculo liso uterino o miometrio presenta actividad contráctil espontánea, la cual se inicia en una zona específica del tejido llamada *marcapaso*. Las contracciones son coordinadas y reguladas por las fibras nerviosas que llegan al útero. Las uniones estrechas o "gap junctions" existentes entre las células miometriales son fundamentales para coordinar la actividad contráctil, ya que los músculos lisos no están organizados en fibras como los músculos esqueléticos (Biology of the Uterus 1989; Uterine Function, Molecular and Cellular Aspects 1990).

La motilidad uterina sufre cambios a lo largo del ciclo estral en preparación para una posible implantación del blastocisto. Si ésta se produce, las condiciones del órgano cambiarán radicalmente, desarrollando una quiescencia manifiesta, mientras dura la gestación, y disparando una extrema actividad contráctil en el momento del parto que ocurre en el día 21 de gestación en la rata (Uterine Function, Molecular and Cellular Aspects 1990).

Estos distintos comportamientos están ligados a la presencia de esteroides sexuales. La progesterona provoca una relativa quiescencia a través de la inhibición de la formación de uniones gap y de la síntesis de agentes uterotónicos, las prostaglandinas. Las prostaglandinas aumentan la actividad miometrial "in vitro", porque incrementan la entrada de Ca^{2+} al citoplasma (Yang y col., 1997). Los estrógenos causan indirectamente el incremento de las contracciones miometriales, ya que estimulan la producción de prostaglandinas (Behrman y Romero, 1992).

1 - C) Metabolismo uterino

Las distintas respuestas uterinas a la acción de las hormonas ováricas, neurotransmisores, prostanoideos, etc., serán las responsables de los cambios cíclicos en el metabolismo, así como de las adaptaciones durante la preñez y el parto, y las alteraciones regresivas durante la declinación de las funciones ováricas en la

menopausia (Biology of the Uterus 1989; Uterine Function, Molecular and Cellular Aspects 1990).

La acción estrogénica estimula el desarrollo uterino, el incremento en el metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y proteínas y la formación de edema endometrial (Strauss y Gurside, 1992).

El tejido uterino durante la gestación debe incrementar su tamaño, hacerse receptivo para la implantación de los blastocistos, constituirse en un órgano parácrino que favorezca el desarrollo del embrión, y prepararse para el parto. Se ha observado durante la gestación en la rata un incremento en el contenido tisular de triglicéridos. Dicho contenido tisular aumenta en los momentos en que la utilización de las reservas lipídicas esta incrementada (Uterine Function, Molecular and Cellular Aspects 1990) (capítulo 16). Por otro lado, la reserva energética para el crecimiento uterino y para el mantenimiento de la actividad contráctil tisular la constituye el glucógeno uterino, cuyo contenido aumenta a lo largo de la gestación.

2 - DESARROLLO DEL EMBRION

2 - A) Desarrollo pre-implantatorio del embrión de mamíferos

La fertilización del ovocito se produce en la ampulla del oviducto en el día 1 de gestación, formando la cigota. A medida que el embrión se transporta a través del oviducto, sufre sucesivas divisiones, alcanzando el estadio de mórula en el día 4 en roedores y humanos, estadio en el cual ingresa a la luz del útero (Guillomot y col., 1993).

En este estadio comienzan a diferenciarse el macizo celular interno (que dará origen al embrión propiamente dicho con todas sus capas celulares) y el trofoectodermo (involucrado en las interacciones con el útero durante la implantación).

Luego, en el estadio de blastocisto se forma la cavidad blastocélica, el embrión se expande y alarga, y está listo para implantarse en el día 5 de gestación (Guillomot y col., 1993).

La expansión del blastocisto es una señal de modificación previa a la implantación. El embrión se libera de la zona pelúcida, mientras el útero se condiciona para recibirlo. Mientras el embrión se traslada, su desarrollo depende del entorno del medio en el que se encuentra. A medida que el embrión aumenta de tamaño, se ve imposibilitado de recibir nutrientes por difusión como ocurre hasta su llegada al útero. Por lo tanto la implantación es el paso siguiente para que se produzca la formación de las membranas fetales que le permitirán al embrión en desarrollo el acceso a la circulación materna, Figura III.

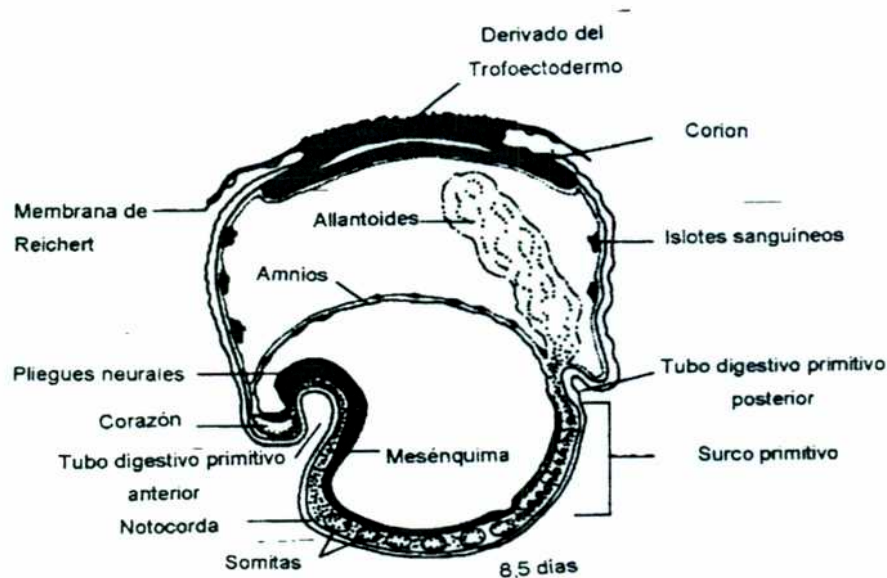


Figura III. Representación esquemática de un embrión de ratón en etapa post-implantatoria. Del libro *Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual*, de B. Hogan, F. Costantini y E. Lacy, Edition Cold Spring Harbor Laboratory, 1986.

2 - B) Desarrollo post-implantatorio del embrión de mamíferos

El proceso implantatorio concluirá con la formación de la placenta, y el inicio de la nutrición hemotrófica. La placentación en los roedores y en humanos es de tipo hemocorial, que implica una íntima conexión entre los tejidos maternos y fetales (Weitlauf, 1994).

En los roedores, los blastocistos se ubican en forma aproximadamente regular en ambos cuernos uterinos, implantándose en el borde antimesometrial de la cavidad uterina formando la *cámara de implantación*, donde cada disco embrionario se orienta hacia el mesometrio (Figura IV) (Guillomot y col., 1993). Una vez que el blastocisto se ha implantado, ocurrirá la diferenciación y organización del feto, con la subsiguiente gastrulación y formación de las membranas que recubren el embrión (corion, amnios y alantoides) a partir del día 7 de gestación (Figura III).

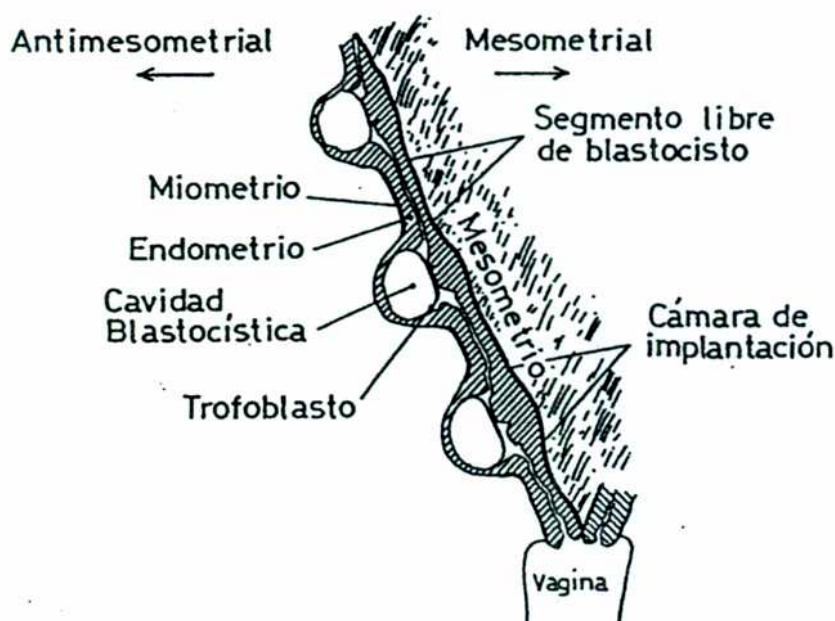


Figura IV. Esquema de la localización anatómica de la implantación embrionaria en la rata en uno de los cuernos uterinos.

El embrión queda envuelto por las membranas extraembrionarias y por la decidua. Una red de capilares a través de la decidua irriga el sitio implantatorio. Una vez establecida la placenta, la cual está especializada en el intercambio de sustancias entre la madre y el feto, será ella la que regule la nutrición fetal, provea al feto de metabolitos y permita la excreción de los productos fetales. Además, la placenta cumple una acción endocrina sintetizando hormonas esteroideas (estradiol y progesterona), en reemplazo del cuerpo lúteo que degenera en un momento preciso

de la preñez según la especie en cuestión. También secreta gonadotrofina coriónica, hormona liberadora de gonadotrofinas y factores de crecimiento con función sistémica y parácrina, necesarios para el mantenimiento de la gestación (Yen, 1992).

El feto crecerá, se diferenciará y madurará progresivamente hasta la finalización de la preñez, y el parto.

3 - LA IMPLANTACION EMBRIONARIA

3 - A) Sincronización entre el desarrollo embrionario y la receptividad uterina

La implantación embrionaria en los mamíferos es el resultado de la interacción entre 2 tejidos, el endometrial y el trofoectodermo, que comienza con la fijación del blastocisto en el útero y culmina con la formación de un nuevo tejido, la placenta.

Son diversos los procesos de origen uterino que influyen sobre la implantación en mamíferos primates y no primates (Weitlauf, 1994; Guillomot y col., 1993; Hodgen y Itskovitz, 1988), aunque los mecanismos no han sido enteramente dilucidados.

En todas las especies de mamíferos, el punto de contacto entre el blastocisto y el tejido materno está dado por las células del epitelio luminal del útero. Hay variaciones importantes en la organización de dicho epitelio, el cual durante el ciclo reproductivo sufre diferentes cambios en la morfología celular y en su actividad metabólica. Estos cambios, tales como proliferación celular, expresión de receptores a hormonas, aumento en la tasa de metabolismo y en la síntesis proteica, están regulados por las hormonas esteroideas (Strauss y Gurpide, 1992). Es evidente entonces que, para que la implantación ocurra, se requieren cambios hormonales precisos que permitan al útero adquirir una capacidad potencial de sufrir la "reacción decidual" (que describiremos posteriormente), y es el embrión el que inducirá finalmente la autólisis de las células epiteliales y la decidualización de células del estroma.

En la rata, los cambios hormonales previos a la implantación consisten en:

a) un pre-estímulo "priming" con estradiol (proestro), el cual permite iniciar los cambios en el endometrio b) secreción luteal de progesterona durante los primeros cuatro días de gestación, lo cual va a inducir la maduración del endometrio mediante proliferación, diferenciación celular y la expresión de receptores a esteroides y c) un pico estrogénico en la mañana del día 4 de preñez (día previo al de la implantación).

Este pico nidatorio de estrógenos induce el estado secretorio y de receptividad del endometrio hacia el estímulo de decidualización del embrión (Weitlauf, 1994; Hodgen y Itskovitz, 1988).

Posteriormente, el mantenimiento de las células deciduales requiere de una continua secreción de progesterona. Durante la implantación y en el período post-implantación ésta proviene del cuerpo lúteo, que es *rescatado* por señales embrionarias. Luego, en ratas y humanos, los esteroides secretados por la unidad fetoplacentaria son suficientes para mantener la gestación (Hodgen y Itskovitz, 1988).

La nidación entonces, sólo puede iniciarse cuando el embrión y el endometrio han alcanzado un estado preciso de sincronización. El blastocisto debe despojarse de la zona pelúcida, y el endometrio debe hacerse receptivo bajo control hormonal (Hodgen y Itskovitz, 1988). Además existen interacciones blastocisto-útero que ocurren durante la implantación y modulan el desarrollo embrionario por un lado, y la receptividad uterina por el otro. Estas interacciones son mediadas por factores de crecimiento, moléculas de adhesión, citoquinas, etc. (Weitlauf, 1994). En ese período de receptividad uterina al embrión, el epitelio presenta una serie de cambios morfológicos en su superficie, como la pérdida de sitios aniónicos (que implica menor repulsión) (Hewitt y col., 1979), la reducción del glicocálix (que implica menor distancia para el contacto de los epitelios), y la expresión de moléculas de adhesión celular (con lo que se hace más receptivo al blastocisto) (Figuras V y VI).



Figura V. Detalle de contactos celulares entre la membrana plasmática del trofoblasto (Tr) y las microvellosidades apicales de las células uterinas (Mv). (Oveja, día 15 de preñez) (microscopía electrónica de transmisión). X 50.000. Del libro *Reproduction in Mammals and Man*, Edited by C. Thibault, M.C. Levasseur, R.H.F. Hunter. Ellipses, Paris, 1993, capítulo 20.

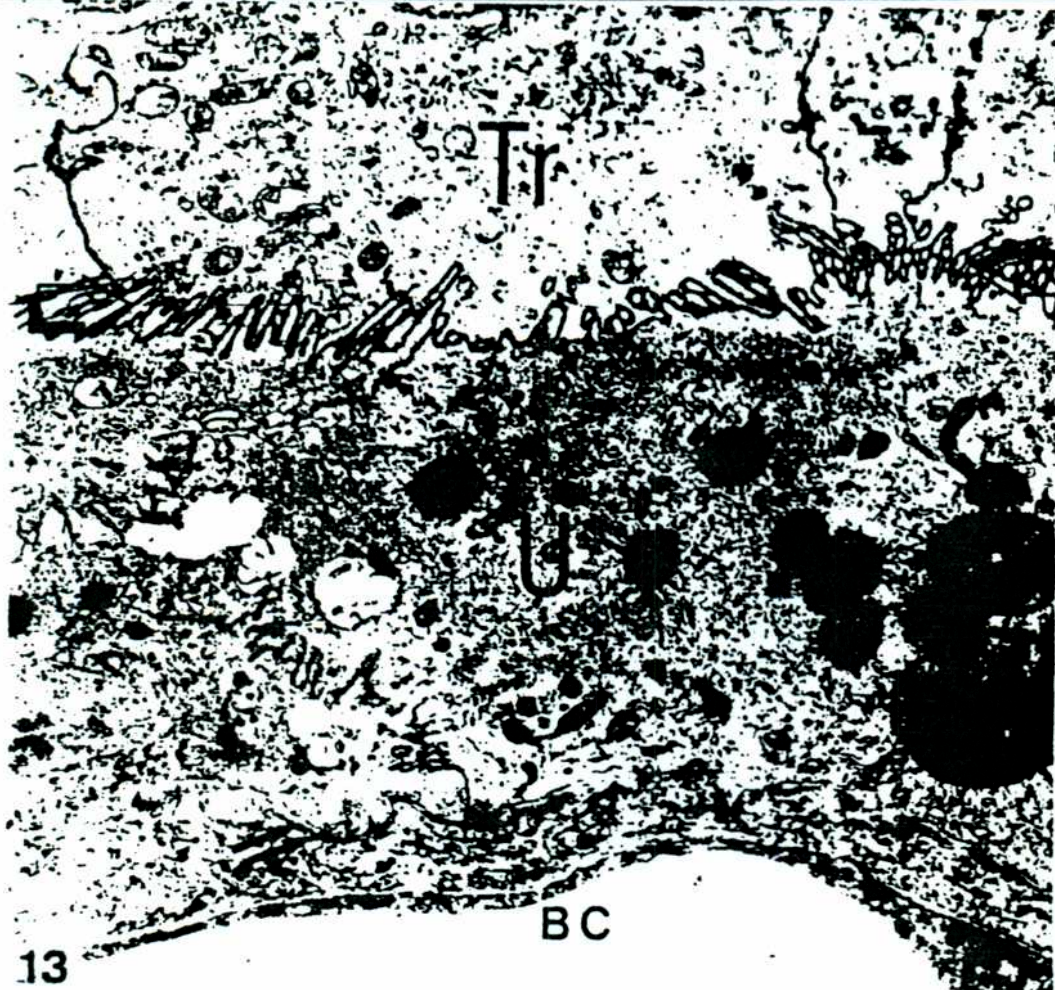


Figura VI. Adhesión de células trofoblásticas (Tr) sobre células epiteliales uterinas (U). La interfase entre los dos tejidos está formada por interdigitaciones de los microvilli (flecha abierta). La lámina basal del epitelio uterino (flecha doble); BC= capilar sanguíneo del estroma (Oveja, día 18 de preñez) (microscopía electrónica de transmisión). X 4.000. Del libro *Reproduction in Mammals and Man*, Edited by C. Thibault, M.C. Levasseur, R.H.F. Hunter. Ellipses, Paris, 1993, capítulo 20.

Esos cambios ocurren en un espacio de tiempo preciso llamado *ventana de implantación* (Hewitt y col., 1979). En la rata esta ventana temporal es entre los días 5 y 6 de gestación. Luego el tejido uterino se hace refractario a la presencia del embrión aún si se inserta artificialmente un blastocisto maduro (Weitlauf, 1994).

3 - B) Secuencia de eventos en el proceso implantatorio embrionario

En el proceso implantatorio en mamíferos, ocurren sucesivamente la aposición de las superficies del trofoectodermo del blastocisto y del epitelio endometrial, que va a asegurar el anclaje del blastocisto en la cavidad uterina. Las membranas apicales de ambos entran en contacto íntimo a través de la reducción de las microvellosidades, como señalamos previamente. Luego, la adhesión de las capas celulares adyacentes, interdigitación de las microvellosidades y formación de desmosomas entre ambas superficies, permiten al blastocisto quedar fijado al tejido materno. Finalmente se produce la invasión del trofoblasto dentro del endometrio uterino (Figura VII) (Hewitt y col., 1979).

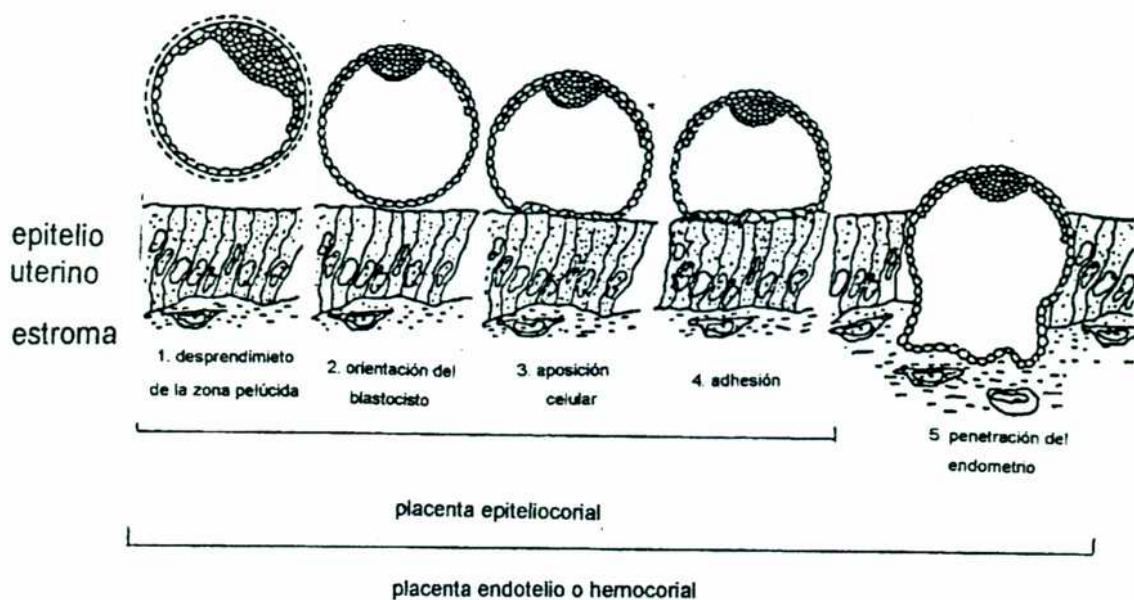


Figura VII. Esquema representando las distintas fases de la implantación en los mamíferos. El disco embrionario ha sido arbitrariamente localizado en el lado opuesto al sitio de implantación. La fase 4 es la última fase de implantación en especies que presentan placentación de tipo epiteliocorial. Del libro *Reproduction in Mammals and Man*, Edited by C. Thibault, M.C. Levasseur, R.H.F. Hunter. Ellipses, Paris, 1993, capítulo 20.

El mecanismo por el cual el blastocisto penetra el epitelio y la lámina basal dependerá de la especie en cuestión y de la estructura tisular particular (Guillomot y col., 1993). En los roedores las células epiteliales se autolisan y son fagocitadas por el trofoblasto. En humanos se forman sincicios comunes con núcleos maternos y trofoblásticos, con propiedades invasivas y de migración. Por otro lado, existen distintos tipos de placentación. En roedores y en humanos es de tipo hemocorial ya que el trofoblasto invade la lámina basal epitelial y penetra el tejido endometrial estableciendo una relación vascular definitiva con la madre. En la gata y la perra la placentación es endoteliocorial ya que el trofoblasto no hace lisis celular sino que rodea los vasos sanguíneos estromales. En vaca, oveja, yegua y cerda la placentación es epiteliocorial, ya que el trofoblasto no invade el tejido epitelial, sino que ambas superficies quedan adyacentes (Figura VII).

3 - C) Formación del tejido decidual

Las células del endometrio receptivo sufren una serie de transformaciones morfológicas en áreas específicas del mismo, bajo regulación hormonal y estímulo embrionario, lo que determinará su proliferación y diferenciación celular en *tejido decidual*.

La decidualización en los roedores comienza en el día 5 de preñez, y se caracteriza por la proliferación y la diferenciación celular, aumento de síntesis proteica, cambios en la morfología de sus células, modificación de sus microvellosidades, acumulación de lípidos y de glucógeno, y modificación de la

matriz extracelular, formación de uniones celulares, y angiogénesis endometrial (Hewitt y col., 1979; Guillomot y col., 1993; Weitlauf, 1994). Esto implica la transformación y proliferación de las células estromales en deciduales. Finalmente ocurrirá un aumento localizado de la permeabilidad vascular endometrial, edema uterino y cierre del lumen (Biology of the Uterus 1989; Strauss y Gurside, 1992) (capítulo 9).

Las células deciduales son de tipo cuboides, ricas en glucógeno y lípidos (Guillomot y col., 1993), que constituyen una reserva nutritiva para el embrión, representan una barrera contra la invasión desordenada del trofoblasto, y están involucradas en evitar el rechazo inmunológico del feto (Weitlauf, 1994; Guillomot y col., 1993).

De esta manera, se forman *deciduomas* temporales a lo largo del cuerno uterino en los roedores, cada uno de los cuales representa una cámara de implantación. La reacción decidual puede ser inducida artificialmente en modelos animales de pseudopreñez, con el resultado de deciduomas que se asemejan a la decidua natural.

El crecimiento de la decidua continúa por varios días, desde el sitio donde se ha localizado el embrión, abarcando gran parte del estroma endometrial.

A medida que la decidualización ocurre, las células trofoblásticas invaden y rompen los vasos sanguíneos maternos, estableciendo la circulación placentar inicial en el caso de la placentación hemocorial.

La decidua madura comprende la porción materna de la placenta, proveyendo el suplemento vascular materno y la producción hormonal, necesarios para mantener la gestación.

La decidualización en las especies de laboratorio difiere de la humana, ya que en los roedores es necesaria la acción de un estímulo (por ej. la presencia del embrión en la cavidad uterina) sobre el endometrio sensibilizado para su inducción, mientras que en la mujer, ésta es producto de la acción combinada de esteroides ováricos y ocurre en cada ciclo menstrual. Si no hay gestación, la proliferación y diferenciación celular lleva a la muerte celular y a la consiguiente

3 - D) Importancia de agentes vasoactivos en el inicio del proceso implantatorio embrionario

Como dijimos anteriormente, el inicio del proceso de transformación celular que permitirá la implantación embrionaria, ocurre en la noche del día 5 de gestación en la rata, cuyo el blastocisto está posicionado e inmovilizado en el útero.

Este proceso se asemeja a una reacción inflamatoria, con infiltración de leucocitos polimorfonucleares y macrófagos, vasodilatación, angiogénesis, edema, aumento de permeabilidad vascular y del flujo sanguíneo (Weitlauf, 1994; Psychoyos, 1973; Kennedy, 1977). Dicho proceso está localizado en los sitios donde los blastocistos se implantarán, los "sitios de implantación", y es esencial para la generación del tejido decidual. Para ello se requiere la producción uterina y/o embrionaria de citoquinas (Wood y col., 1992) y de una serie de mediadores lipídicos proinflamatorios tales como prostaglandinas (PGs) (Yang y col., 1997; Kennedy y Lukash, 1982), leucotrienos (Yee y col., 1993; Tawfik y col., 1987) y el factor activador de plaquetas (PAF) (Acker y col., 1988; O'Neill, 1985).

Es fundamentalmente el epitelio endometrial el que sintetiza PGs en respuesta al estímulo del blastocisto (Yee y col., 1993).

Para que la implantación ocurra entonces, se requieren interacciones sinérgicas entre el embrión en desarrollo y el tejido uterino materno, que culminarán con la fijación embrionaria en el endometrio receptivo. Una vez que el embrión se ha localizado en el útero, permanecerá allí cumpliendo su desarrollo definitivo, hasta ser expulsado en el parto.

4 - Prostaglandinas

4 - A) Características generales

Las prostaglandinas (PGs) constituyen una familia de compuestos lipídicos derivados de ácidos grasos naturales, presentes en numerosos tejidos de mamíferos, invertebrados e incluso vegetales. Fueron descubiertas en 1929 y aisladas en 1963.

Las PGs están ampliamente difundidas en todos los sistemas biológicos, y presentan una gran versatilidad de funciones. Actúan sobre la presión arterial, sobre la agregación plaquetaria, provocan la contracción o relajación de diversos músculos lisos, quimiotaxis y quimiocinesis de células sanguíneas (Behrman y Romero, 1992). En la gestación actúan sobre la luteólisis, la ovulación (Uterine Function, Molecular and Cellular Aspects 1990), la implantación embrionaria (Kennedy, 1977), y el trabajo de parto (Novy y Liggins, 1980).

Su presencia en exceso es responsable de diversos desórdenes, como procesos inflamatorios, alérgicos, alteraciones del ciclo sexual, abortos, etc. (Behrman y Romero, 1992; Kenneth, 1996). Su deficiencia puede conducir a trastornos como la infertilidad, la hipertensión arterial y úlceras gástricas. En la diabetes mellitus tanto el exceso como el defecto de prostanoides ha sido asociado con diversas alteraciones observadas que describiremos posteriormente. Estos trastornos serían la consecuencia de la alteración de mecanismos regulatorios y protectores ejercidos por los prostanoides.

4 - B) Estructura química de las prostaglandinas

Son ciclo-pentanos de 20 átomos de carbono que poseen la estructura básica del hipotético ácido prostanoico (Figura VIII). Según la composición estructural del anillo pentano se las clasifica en diferentes clases de prostaglandinas, donde las de mayor

importancia biológica son las familias E, F e I (Behrman y Romero, 1992) (Figura IX). Tanto las PGs como el tromboxano (potente vasoconstrictor y agregante plaquetario) y la prostaciclina (PGI_2) (potente vasodilatador y antiagregante plaquetario) derivan de la misma molécula intermediaria en la cadena de síntesis, la PGG_2 .

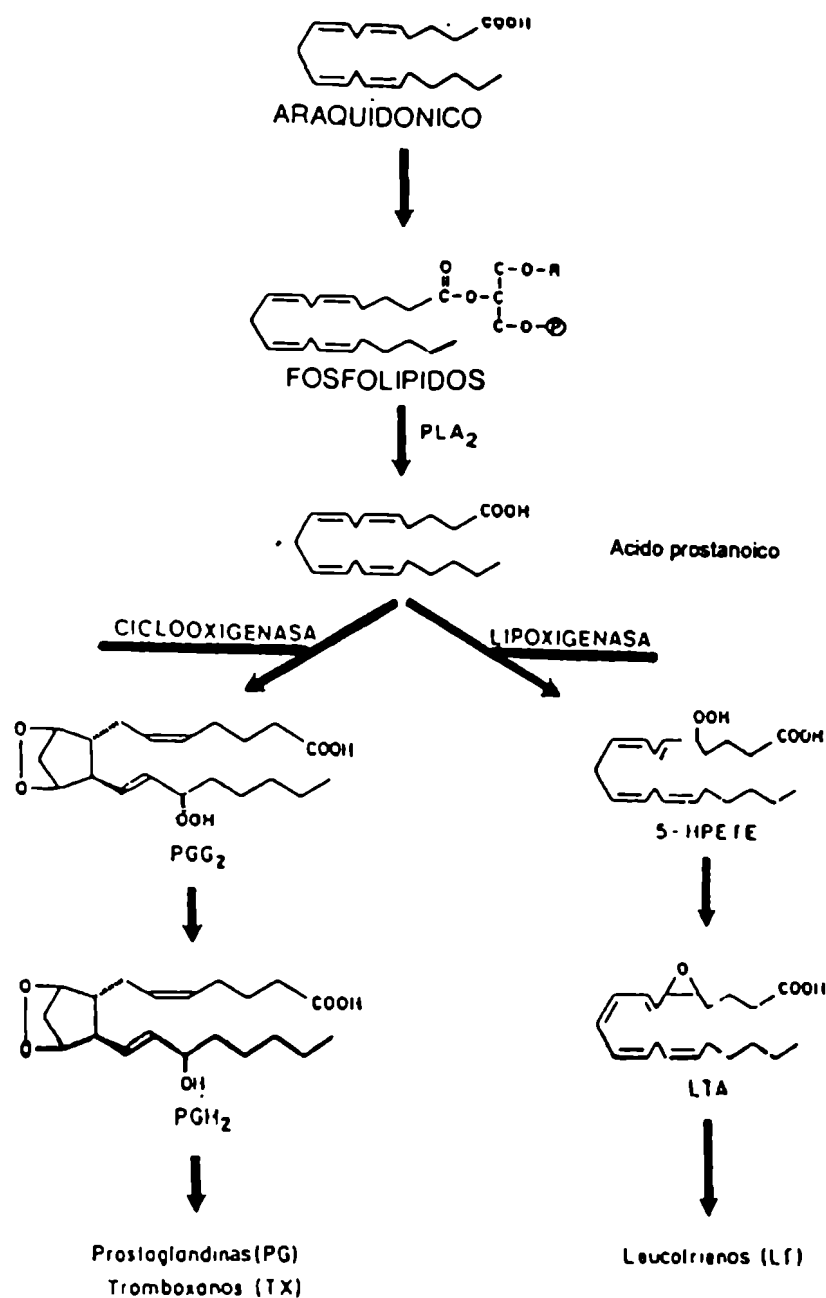


Figura VIII. Cascada del ácido araquidónico en la síntesis de prostaglandinas.

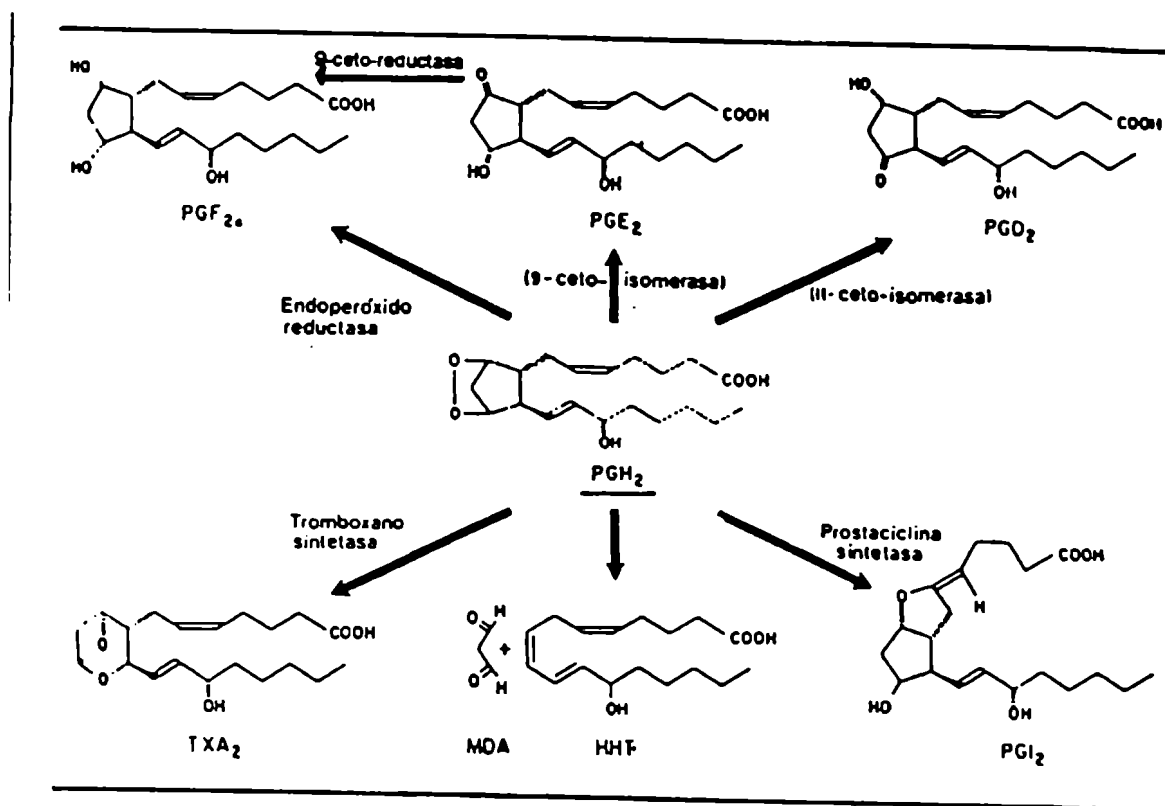


Figura IX. Biosíntesis de prostaglandinas y tromboxanos. MDA: malondialdehído.

4 - C) Biosíntesis de prostaglandinas

Las PGs se sintetizan en respuesta a estímulos de diversa naturaleza :química, hormonal o física. No se almacenan, se liberan luego de sintetizarse, y ejercen sus efectos localmente o en la vecindad del tejido, ya que se metabolizan rápidamente (Behrman y Romero, 1992).

Se sintetizan a partir de ácidos grasos esenciales no saturados de 20 carbonos, donde el ácido araquidónico es el que produce las PGs de mayor importancia biológica. Estos ácidos grasos se encuentran unidos a los lípidos intracelulares (ésteres de colesterol, fosfolípidos, mono, di o triglicéridos).

Por lo tanto para que se sinteticen las PGs es necesaria la liberación del sustrato, en

un paso limitante, a partir de enzimas como la fosfolipasa A₂ (PLA₂), y la fosfolipasa C, entre otras (Figura X) (Chang y col., 1987). Tanto la fosfolipasa A₂ como la C son estimuladas por Ca²⁺

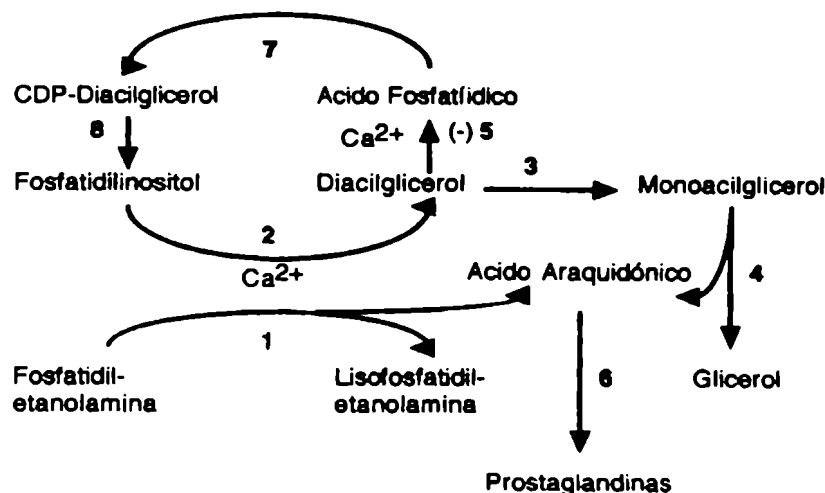


Figura X. Caminos enzimáticos para la movilización del ácido araquidónico. Las reacciones son catalizadas por: (1) fosfolipasa A₂, (2) fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol, (3) diacilglicerol lipasa, (4) monoacilglicerol lipasa, (5) diacilglicerol kinasa, (6) complejo de ciclooxigenasa, (7) fosfatidil transferasa y (8) CDP-diacilglicerol o inositol 3-fosfatidiltransferasa. Del libro *Uterine Function, Molecular and Cellular Aspects*, Edited by M.E. Carsten y J.D. Miller, Plenum Press, New York 1990.

La PLA₂ cataliza la liberación desde la fosfatidiletanolamida del ácido araquidónico (donde se encuentra esterificando en la posición sn-2) y liso-PAF (Van Den Bosch y col., 1990; Glaser y col., 1993). Luego el liso-PAF es acetilado para formar el PAF y el ácido araquidónico será el precursor de la mayoría de los prostanoideos activos en el órgano.

La PLA₂ es una enzima intracelular asociada a la membrana. Es un importante componente de la maquinaria de la célula, que en respuesta a estímulos inflamatorios, mantiene la homeostasis y el remodelado de la membrana celular.

Su papel en el paso limitante en la producción de mediadores lipídicos pro-inflamatorios, hace de esta enzima un blanco farmacológico de interés en dichos procesos.

Como dijimos anteriormente, una vez liberados los ácidos grasos no se almacenan en la célula sino que pueden sufrir diversos procesos catabólicos tales como auto-oxidaciones, elongación de cadena o reacilación.

La ciclooxygenasa, que se encuentra en todas las células de mamíferos excepto en los glóbulos rojos, posee un grupo hemo, y en presencia de oxígeno molecular (O_2), forma con el ácido araquidónico el intermediario PGG_2 (Figura VIII). A partir de ese intermediario, las isomerasas lo convierten a PGE_2 o PGD_2 , mientras que las reductasas lo metabolizan a $PGF_{2\alpha}$. La enzima 9-ceto-reductasa convierte PGE_2 en $PGF_{2\alpha}$ en los tejidos donde está presente (Figura IX).

La ciclooxygenasa presenta dos isoformas, la ciclooxygenasa I o constitutiva, y la ciclooxygenasa II o inducible, de estructura similar pero con diferente regulación. Mientras que la ciclooxygenasa I se expresa en diversos tejidos en forma basal, la ciclooxygenasa II debe ser inducida por agentes pro-inflamatorios en macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y músculo liso (Kenneth. 1996).

Sobre estos pasos descriptos actúan los principales inhibidores de la síntesis de PGs, los anti-inflamatorios no esteroideos como el ácido acetilsalicílico (aspirina) y la indometacina, inhibiendo la acción oxidativa de la enzima ciclooxygenasa y la formación de PGG_2 (Figura VIII y IX).

4 - D) Mecanismos de acción de las prostaglandinas. Efectos biológicos en el tejido uterino

En general, la acción de las prostaglandinas se asocia a cambios en los niveles intracelulares de Ca^{2+} y AMPc a través de la unión a receptores celulares específicos que activan o inhiben ciclasas (Yang y col., 1997).

En el tejido uterino las PGs son sintetizadas tanto en el miometrio como en el

endometrio, y tienen importantes papeles fisiológicos en diversas especies (Uterine Function, Molecular and Cellular Aspects 1990). Las PGE₂ y PGF_{2α} tienen una relevante función uterotónica, a través de la liberación intracelular de Ca²⁺ (Yang y col., 1997). La PGI₂ cumple un importante papel vasodilatador, a través del aumento intracelular de AMPc (Kennedy y Zamecnik, 1978; Magness y col., 1996).

Su síntesis está regulada por las hormonas esteroides (Dey y col., 1982; Bonney y col., 1987) y así, su producción varía a lo largo del ciclo sexual y durante la preñez (Uterine Function, Molecular and Cellular Aspects 1990; Behrman y Romero, 1992).

El incremento en la producción uterina, embrionaria y placentaria de PGs durante la gestación se debe a un aumento en la actividad de la enzima ciclooxigenasa. A lo largo de la gestación los productos de la ciclooxigenasa participan en el proceso de ovulación, implantación, hemodinamia uteroplacentaria, contracciones uterinas del parto y en la preparación del canal de parto.

En todos estos procesos los principales mecanismos de acción biológica involucrados son la capacidad contráctil y la acción vasodilatadora que ejercen los prostanoïdes sobre el músculo liso y vascular uterino.

Durante la gestación las PGs permanecen disminuidas para mantener la quiescencia miometrial, necesaria para el crecimiento y desarrollo del feto anidado (Biology of the Uterus 1989; Uterine Function, Molecular and Cellular Aspects 1990).

4 - E) Efectos biológicos de las prostaglandinas en el embrión

Los embriones de diversas especies (ratón, rata, vaca, oveja, coneja, cerda y humano) producen PGs incluso en períodos preimplantatorios, los cuales participan en el desarrollo fetal, el transporte oviductal, el desprendimiento de la zona pelúcida, la generación de señales hacia el endometrio, implantación y reacción decidua (Guillomot y col., 1993; Weitlauf, 1994). Durante el desarrollo fetal, las PGs participan en el mantenimiento del flujo sanguíneo al sitio de implante, en la organogénesis, en la circulación feto-placentaria y evitan la respuesta inmunológica contra el feto

(Uterine Function, Molecular and Cellular Aspects 1990). Durante el trabajo de parto y la apertura cervical, se agrega el efecto de prostanoïdes sintetizados por el tejido amniótico previo al comienzo del mismo.

4 - F) Participación de las prostaglandinas en la implantación embrionaria

Si bien se sabe que las PGs participan en el proceso implantatorio, se desconocen los mecanismos de regulación de su síntesis en dicho proceso. Sin embargo, se sabe que las hormonas esteroideas incrementan la producción de PGs estimulando a la PLA₂ endometrial (Dey y col., 1982; Bonney y col., 1987). Se ha especulado que las prostaglandinas PGE y PGF_{2α} están mayoritariamente involucradas en la implantación en la rata, dado que su concentración uterina aumenta en el tiempo y lugar adecuados. La síntesis de PGI₂, PGE y PGF_{2α} son mayores en los sitios de implantación (lugares del endometrio donde se localiza el embrión), donde aumentan la permeabilidad vascular (Kennedy y Lukash, 1982; Phillips y Poyser, 1981; Kennedy y Zamecnik, 1978). A su vez su síntesis es mayor en días peri-implantatorios de la preñez (Phillips y Poyser, 1992; Kennedy y Lukash, 1982; Yee y col., 1993).

Tanto en la rata (Kennedy y col., 1983) como en la cerda (Kennedy y col., 1986) y en la mujer (Hofman y col., 1985), el endometrio contiene receptores específicos para PGE₂.

Las PGs actúan en la transformación de células estromales a deciduales que precede la implantación (Frank y col., 1994; Kennedy y Lukash, 1982). incrementan la permeabilidad vascular endometrial local, son vasodilatadoras (Yang y col., 1997; Phillips y Poyser, 1992; Tawfik y col., 1987) y esenciales para el desarrollo del trofoblasto, la disolución de la zona pelúcida y la implantación, dado que la inhibición de su síntesis con indometacina "in vitro" o "in vivo" interfiere con estos procesos (Kennedy y Zamecnik, 1978; Yee y col., 1993; Kennedy, 1977).

Por otro lado, los niveles de dichas PGs están relacionados con el aumento de la contractilidad uterina espontánea, siendo conocido su efecto uterotónico como ya señalamos anteriormente (Gimeno y col., 1982). En la rata, el espaciamiento de los blastocistos en el útero está determinado por las contracciones uterinas. La administración sistémica (Kennedy, 1977) o intraluminal (Yang y col., 1997) de indometacina ocasiona la disminución de la síntesis de PGs y con ello altera la actividad miometrial y el espaciamiento de los embriones. La indometacina administrada intraluminalmente en el útero bloquea o retasa la implantación en ratón (Saksena y col., 1976), conejo (El-Banna, 1980) y rata (Kennedy y Lukash, 1982; Phillips y Poyser, 1981; Kennedy, 1979) ya que interfiere con la respuesta decidual y el aumento de permeabilidad vascular.

Las distintas acciones de las PGs en el tejido uterino del ratón se han relacionado con el tipo de proteína G acoplada al receptor de membrana con el que interactúan (Yang y col., 1997). Este puede estar acoplado a canales de Ca^{2+} (y por lo tanto a la entrada de Ca^{2+} extracelular), relacionado con la estimulación de Fosfolipasa C (y por lo tanto con la movilización intracelular de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares vía fosfatidilinositol), o con la activación de la adenilato ciclasa. Esta última enzima puede ser estimulada o inhibida por las PGs y con ello ocurren variaciones en la síntesis de AMPc.

Durante la peri-implantación en el ratón, la actividad y expresión génica de los receptores de PGs está bajo regulación hormonal, ya que se modifica durante el ciclo y se puede simular en modelos de pseudopreñez con tratamientos con estradiol y progesterona (Yang y col., 1997).

Por lo expresado, es de suponer que la producción uterina de PGs que van a participar en el proceso implantatorio embrionario esté altamente regulada tanto por el embrión como por la madre, para permitir el normal desarrollo de dicho proceso.

5 - SEÑALES EMBRIONARIAS QUE PARTICIPAN EN LA PREÑEZ TEMPRANA

5 - A) Importancia de las señales embrionarias

Aún antes de la implantación el embrión produce señales que son reconocidas por la madre. La naturaleza localizada de la respuesta uterina durante la fase de aposición implica la presencia de señales embrionarias de corto rango de acción, mientras que cambios sistémicos asociados con el *reconocimiento materno de la preñez*, tales como el mantenimiento del cuerpo lúteo secretor y la respuesta inmune modulada, indican señales de amplio rango. Ello indicaría que existen diversas señales embrionarias, y que los mecanismos varían entre especies. Entre las señales que han sido postuladas, podemos destacar: el estímulo físico por el contacto entre el trofoectodermo y el epitelio luminal, y la producción de esteroides embrionarios, gonadotrofinas, histamina, PGs y proteínas diversas (Hodgen y Itskovitz, 1988; Guillomot y col., 1993; Weitlauf, 1994).

5 - B) El PAF como señal embrionaria temprana

El PAF es un glicerofosfolípido con importancia como mediador en vasodilatación local, inflamación y anafilaxis, y ha sido recientemente sugerido que posee capacidad biológica para actuar como un hipotético *factor temprano en el establecimiento de la preñez* en ratón (O'Neill, 1985) y en humanos (O'Neill y col., 1989), para lograr el reconocimiento materno de la misma, en el período anterior a la implantación.

Asimismo se ha descrito en la rata (Yee y col., 1993) y en el ratón (Minhas y col., 1996) que el PAF incrementa la concentración de Ca^{2+} citosólico en células endometriales activando así a la ciclooxigenasa la cual a través de la síntesis de PGs aumenta la permeabilidad vascular endometrial (Kenneth, 1996).

Por otro lado, la síntesis de PAF se incrementa en el tiempo y sitio de

implantación en el ratón y el conejo (Yee y col., 1993; Angle y col., 1988).

Además, con inhibidores de la síntesis de PAF se bloquea la implantación embrionaria en el ratón (O'Neill, 1995) y en rata (Acker y col., 1988), por lo que se reconoce que el PAF juega un papel crítico en preparar al útero para la implantación.

En el endometrio del conejo, se ha detectado mayor concentración de sitios de unión a PAF en el día correspondiente a la implantación y específicamente en los sitios de implantación embrionaria (Kudolo y col., 1991).

Por ello, se piensa que el PAF podría actuar directa o indirectamente estimulando la decidualización y la permeabilidad vascular, a través del aumento en la síntesis de PGs, como se ha demostrado en células endometriales humanas (Smith y Kelly, 1988b; Smith y Kelly, 1988b), bovinas y ovinas en cultivo (Salamonsen, 1991; Battye y col., 1993), donde la síntesis de PGE₂ aumenta ante el agregado de PAF al cultivo celular.

Posiblemente entonces, el PAF derivado del embrión sea un estímulo para la síntesis de PGs endometriales. Este mecanismo parece estar mediado por el influjo de Ca²⁺ a la célula dado que tanto la fosfolipasa A₂ como la C y la ciclooxigenasa son estimuladas por Ca²⁺ (Behrman y Romero, 1992).

5 - C) El IFN α como señal embrionaria temprana

Se han descrito también ciertas proteínas secretadas por el embrión como la Proteína Trofoblástica Ovina (oTP-1) y su análoga, la Proteína Trofoblástica Bovina (bTP-1). Son péptidos del tipo de los Interferones, con 45 a 70 % de homología en secuencia aminoacídica con el Interferón α humano (IFN α). Tanto oTP-1, bTP-1 como el IFN α se unen al mismo receptor en preparaciones de endometrio ovino y provocan "in vitro" una disminución en la síntesis de PGF_{2 α} en células ovinas (Battye y col., 1993; Burgess y col., 1990) y bovinas (Danet-

Desnoyers y col., 1995; Helmer y col., 1989). Otros autores señalan que tanto oTP-1 como $\text{IFN}\alpha$ inhiben la liberación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y PGE en útero de rata (Motta y col., 1995) y células endometriales ovinas (Salamonsen, 1991; Salamonsen y col., 1992). Se cree que favorecen así el mantenimiento del cuerpo lúteo al disminuir la concentración de un agente luteolítico como es la $\text{PGF}_{2\alpha}$. Dado que el mantenimiento del cuerpo lúteo es una de las primeras adaptaciones endócrinas a la preñez, y se lo ha identificado como otro de los posibles factores tempranos para el *reconocimiento materno de la preñez*, resulta interesante evaluar la posible regulación de la producción uterina de PGs por parte del $\text{IFN}\alpha$ en la rata.

Por lo antedicho el PAF y el $\text{IFN}\alpha$ podrían ser señales muy tempranas del embrión pre-implantatorio que iniciarían los cambios requeridos en el endometrio para la implantación.

6 - EL OXIDO NITRICO

6 - A) Características generales

El radical libre óxido nítrico (NO) se genera por la enzima Oxido Nítrico Sintasa (NOS), que en presencia de oxígeno molecular (O_2) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) convierte la L-arginina en L-citrulina y NO, en cantidades equimolares (Figura XI).

El NO es rápidamente metabolizado por oxidación para formar nitritos (NO_2) y nitratos (NO_3)



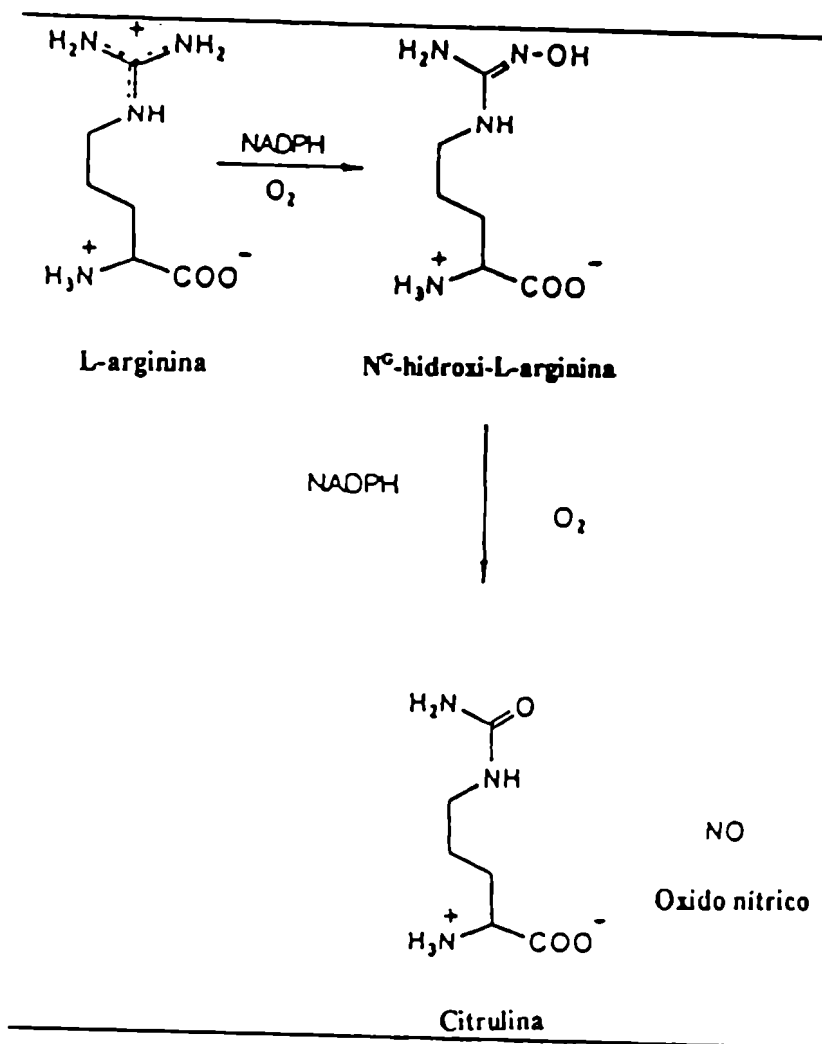


Figura XI. Reacción catalizada por la enzima Oxido Nítrico Sintasa

El NO tiene una vida media de 7 segundos, pero junto con los radicales derivados del oxígeno como el anión superóxido (O₂⁻), generan el peroxinitrito (ONOO⁻) que posee alta toxicidad celular por ser un poderoso oxidante con mayor vida media (Ding y col., 1988; Miller y col., 1996).

La enzima NOS es un homodímero con un grupo hemo. Pertenece a la familia de

los citocromos-P450, y utiliza como cofactores la tetrahidrobiopterina, la flavina adenina dinucleótido (FAD) y la flavina mononucleótido (FMN).

Existen básicamente tres isoformas de la enzima NOS reconocidas hasta ahora, y que se corresponden con tres genes diferentes: la nNOS (encontrada primeramente en el sistema nervioso), la eNOS (encontrada primeramente en el endotelio de los vasos) y la mNOS (encontrada primeramente en los macrófagos) (Knowles y Moncada, 1994).

Tanto la nNOS como la mNOS son citosólicas, y la eNOS coexiste en forma citosólica y asociada a membranas (Förstermann y col., 1994).

Existe además otra forma de clasificarlas según su característica constitutiva, Ca^{2+} /calmodulina-dependiente (cNOS) o inducible, Ca^{2+} /calmodulina-independiente (iNOS).

Entre las constitutivas se encuentran la endotelial (eNOS), y la neuronal (nNOS), y la inducible se corresponde con la hallada en macrófagos (mNOS).

La síntesis de NO por las isoformas constitutivas esta regulada principalmente por el influjo de Ca^{2+} en una forma rápida y transitoria.

La isoforma inducible Ca^{2+} /calmodulina-independiente (iNOS), es regulada por citoquinas, factores de crecimiento y/o lipopolisacáridos de bacterias (endotoxinas), y se encuentra en diversas localizaciones, incluyendo células endoteliales, músculo liso de los vasos, neutrófilos y macrófagos (Sladek y col., 1997; Förstermann y col., 1994; Moncada y col., 1991).

Sin embargo, esta clasificación es sólo una simplificación, ya que se conocen isoformas Ca^{2+} -dependientes que son inducibles (Palmer y col., 1992), e isoformas Ca^{2+} -independientes que son constitutivas (Radomski y col., 1991).

Por lo general las enzimas cNOS se asocian a la síntesis de NO basal, mientras que la enzima iNOS se asocia a niveles mayores de síntesis de NO en forma transitoria y en procesos infecciosos o inflamatorios (Kenneth, 1996).

6 - B) Inhibidores de la síntesis de óxido nítrico

Los glucocorticoides inhiben la expresión génica de la enzima iNOS, bloqueando la inducción de la misma en diferentes tejidos "in vivo", sin afectar la actividad de la isoforma constitutiva de la NOS (Knowles y col., 1990).

El N^w-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) y el N^G-mono-Metil-L-Arginina (L-NMMA) inhiben competitivamente (es decir son análogos del sustrato L-arginina) en forma indistinta a las 3 isoformas de la NOS (Knowles y Moncada, 1994).

La Aminoguanidina (AG) inhibe competitivamente en forma selectiva a la isoforma inducible (Misko y col., 1993).

6 - C) Efectos biológicos del óxido nítrico

Además de actuar como neurotransmisor y de ser un poderoso factor relajante del músculo liso en diversas especies (Kaley y Koller, 1995; Magness y col., 1997; Förstermann y col., 1994), recientemente se determinó que el NO es mediador de diversas funciones biológicas. Tal es el caso del papel del NO mediando la citotoxicidad de los macrófagos (Förstermann y col., 1994), aumentando el flujo sanguíneo, la vasodilatación y el tono vascular (Norman y Cameron, 1996; Förstermann y col., 1994; Sladek y col., 1997), favoreciendo el desarrollo embrionario (Miller y col., 1996; Diket y col., 1994; Förstermann y col., 1994), la decidualización y la adecuada perfusión sanguínea de la placenta (Förstermann y col., 1994), inhibiendo la agregación plaquetaria y la proliferación celular del músculo liso vascular (Norman y Cameron, 1996), participando en procesos de necrosis, apoptosis y degradación de la matriz extracelular (Buhimschi y col., 1996) y en remodelado tisular, inflamación y daño tisular (Miller y col., 1996; Tasikiran y col., 1994; Evans, 1995).

Ha sido ampliamente demostrada su participación en la preñez en diversas especies (Sladek y col., 1997) y en particular en eventos reproductivos tales como la ovulación (Bonello y col., 1996; Shukovski y Tsafiriri, 1994) y el parto

(Buhimschi y col., 1996; Natuzzi y col., 1993; Yallampalli y col., 1993), pero su papel en la implantación embrionaria no ha sido aún explorado.

6 - D) Efectos biológicos del óxido nítrico sobre el tejido uterino

Las distintas isoformas de la NOS se expresan en el útero de rata, ya sea detectando su presencia mediante inmunohistoquímica (Dong y col., 1996) o mediante ensayos de actividad enzimática (Suburo y col., 1995; Shew y col., 1993).

En el útero la nNOS se halla presente en el epitelio mientras que la eNOS en epitelio, estroma, miometrio y decidua. Se ha estudiado tanto en humanos como en rata y ratón (Sladek y col., 1997; Förstermann y col., 1994; Norman y Cameron, 1996).

Se sabe que los estrógenos inducen la enzima iNOS en útero de ratón en ciclo (Huang y col., 1995), y activan a la NOS Ca^{2+} -dependiente en diversos tejidos de cobayo (Weiner y col., 1994a) y en miometrio de oveja no preñada (Figuerola y Massmann, 1995).

Además ha sido demostrado que los efectos vasodilatadores (Rosenfeld y col., 1996), de aumento de flujo sanguíneo (Rao y col., 1995; Van Buren y col., 1992) y de formación de edema endometrial (Chaves y col., 1993) inducidos por los estrógenos están mediados por el NO. Por otro lado, ha sido demostrado que el NO participa en varios procesos modulando la producción de PGs. así como en la contractilidad uterina (Franchi y col., 1994), en la respuesta inflamatoria inducida en miembros en la rata (Sautebin y col., 1995), y en la línea celular de macrófagos RAW264.7 (Salvemini y col., 1993).

Además, el NO juega un importante papel como modulador de la contractilidad del músculo liso uterino en la rata (Yallampalli y col., 1994; Franchi y col., 1994). Por un lado induce relajación miometrial a través de estimulación de la síntesis de GMPc uniéndose al grupo hemo de la guanilato ciclasa, y de esta forma se mantiene la quiescencia uterina durante la preñez (Norman y Cameron, 1996;

Förstermann y col., 1994). Por otro lado se ha descrito recientemente que el NO aumenta la actividad de la ciclooxigenasa (Franchi y col., 1994; Salvemini y col., 1993) que también posee un grupo hemo, induciendo la síntesis y la liberación de PGs y el consecuente aumento en la motilidad del útero en el momento del parto (Chaud y col., 1997).

6 - E) El óxido nítrico durante la preñez en los mamíferos

En ratones ciclantes la detección por inmunohistoquímica de iNOS en el endometrio depende de la presencia de estrógenos (Huang y col., 1995). Hay otros antecedentes que indican que hay cambios en la actividad de las diferentes isoformas de la NOS a lo largo de la preñez. Sin embargo, durante el período de implantación embrionaria se desconoce la existencia de tales cambios. Se ha estudiado extensamente el aumento en la actividad de la NOS y los niveles de NO y GMPc en el músculo uterino luego de la implantación y durante la preñez tardía en cobayos (Weiner y col., 1994b; Weiner y col., 1994b), ratas (Yallampalli y col., 1994; Yallampalli y col., 1993) y humanos (Lees y col., 1994; Norman y Cameron, 1996). Los niveles aumentados de ambos parámetros favorecerían la quiescencia uterina.

En el momento de parto en la rata (Yallampalli y col., 1993; Yallampalli y col., 1994), el sistema uterino NO-GMPc parece disminuir, probablemente bajo regulación hormonal, para permitir las contracciones uterinas que darán lugar a la expulsión de los fetos.

Según Dong y col. (1996), la actividad de la NOS Ca^{2+} -independiente es la que contribuye mayoritariamente a los cambios en la síntesis uterina de NO en la preñez tardía en la rata, ya que está regulada por citoquinas, en cambio la Ca^{2+} -dependiente no varía durante la gestación.

Además, Buhimschi y col. (1996) señalan que en ratas preñadas a partir del día 19 de gestación, la determinación de iNOS por inmunohistoquímica aumenta

mientras que en ratas no preñadas la enzima permanece indetectable.

La medición de la actividad de la enzima NADPH diaforasa de macrófagos, actividad común a un grupo de oxidoreductasas (una de las cuales es la NOS) (Moorhead y col., 1995), es otra forma, aunque algo más inespecífica, por la que se determina la actividad de la NOS.

En el útero de rata la actividad NADPH y la actividad NOS colocalizan (Jaing y col., 1996).

Se ha reportado que en ratas ciclantes, la actividad NADPH diaforasa es más abundante durante el proestro y luego del tratamiento con estradiol (Suburo y col., 1995).

El patrón de actividad NADPH es similar en la decidualización artificial y en la preñez natural en el ratón (Moorhead y col., 1995), con una correlación respectiva al día de preñez. Esto indica que el blastocisto no necesita estar presente en la decidua para inducir la actividad NADPH.

En ratones, durante la preñez media (días 9 y 10), dicha actividad parece ser mayor en las células maternas adyacentes a las células trofoblásticas o en zonas de decidualización en el caso de pseudopreñez (Moorhead y col., 1995). La mayor intensidad en las células endoteliales se alcanza a medida que la gestación avanza, lo cual puede correlacionarse con el incremento del flujo sanguíneo a la placenta en desarrollo.

Estos trabajos parecen confirmar el efecto vasodilatador y miorelajante del NO que está incrementado durante la preñez.

Por lo expuesto, resulta interesante evaluar la actividad de las distintas isoformas de la enzima NOS en relación con el proceso implantatorio embrionario.

7 - INFLUENCIA ESTROGENICA EN EL PROCESO IMPLANTATORIO EMBRIONARIO

7 - A) El estradiol condiciona la implantación embrionaria en los mamíferos

En la mañana del día 4 de preñez en la rata se produce un aumento plasmático de estrógenos que condiciona la implantación de los blastocistos, permitiendo la receptividad del endometrio en la noche del día 5 (Watson y col., 1975; Shaikh, 1971) (Figura XII b). En la Figura XII 'a' se observa el perfil hormonal en ratas en ciclo.

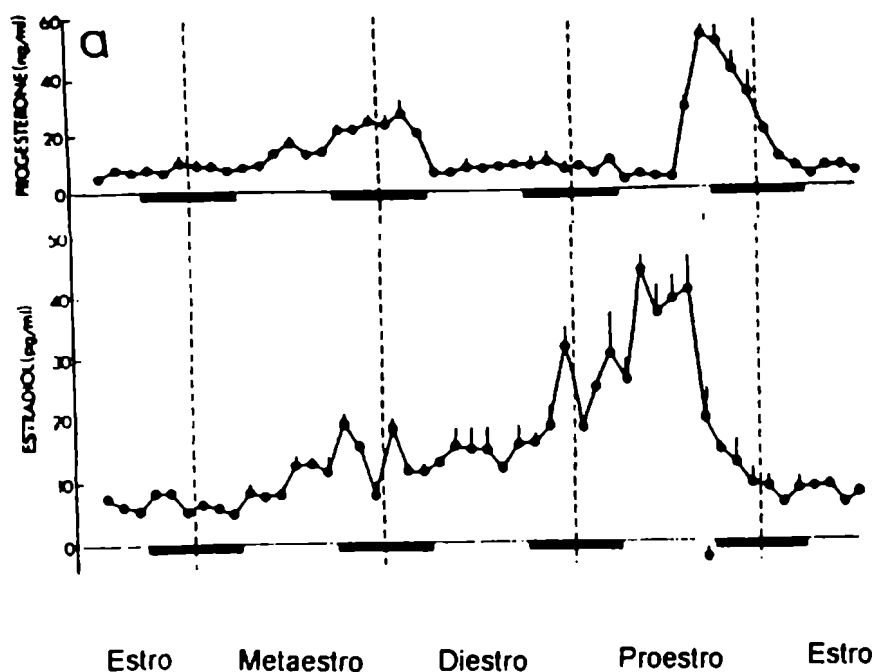


Figura XIIa. Concentraciones de estradiol y progesterona en plasma periférico obtenido cada 2 horas a lo largo de los 4 días del ciclo estral en la rata. Cada punto representa la concentración hormonal media de entre 5 ó 6 ratas. Del libro *The Physiology of Reproduction* Vol. 2, E. Knobil y J.D. Neill, Raven Press, New York, 1988.

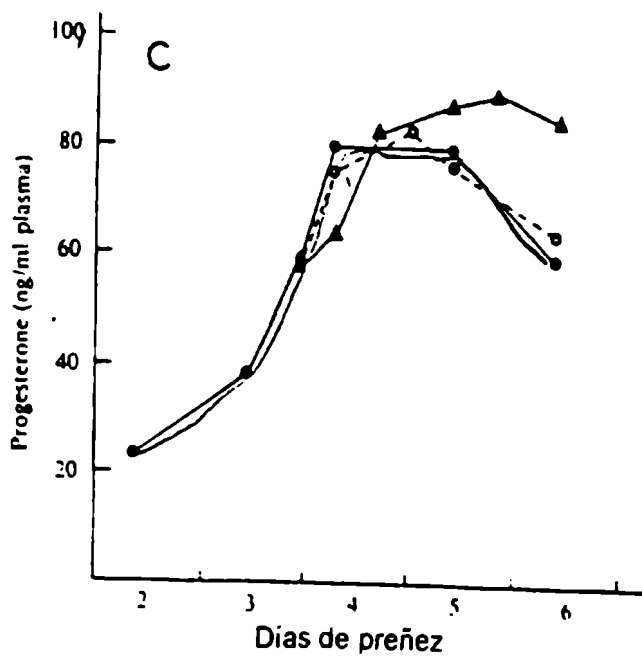
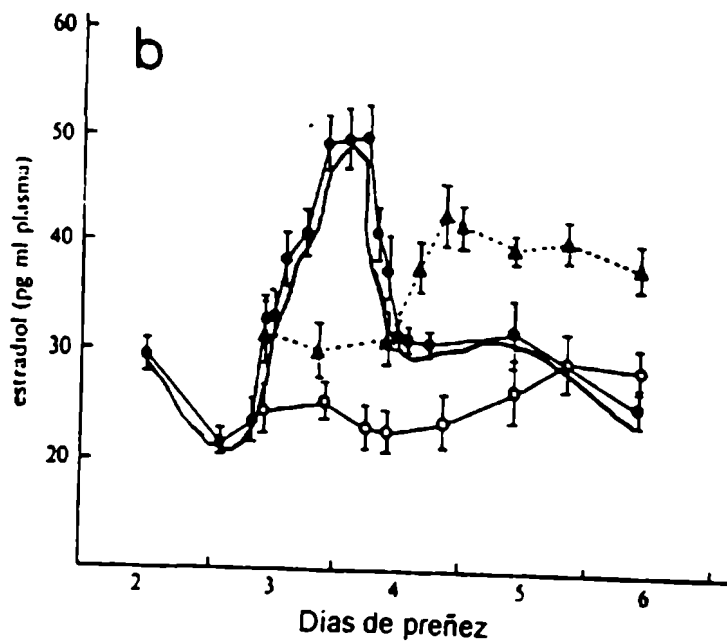


Figura XII b y c. Niveles plasmáticos de estradiol (b) y progesterona (c) durante la preñez temprana en ratas normales (círculo negro), ratas que recibieron oralmente 0,1 mg/kg de Tamoxifeno en el día 2 de preñez (triángulo), o 0,2 mg/kg de Tamoxifeno (círculo blanco). Cada punto es la media de al menos 6 ratas. Líneas verticales indican $\pm$ S.E.M. De la publicación J.Endocrinology (1975), 65, 7-17, WatsonJ. et al.

Por su parte, los niveles plasmáticos de progesterona se incrementan gradualmente desde el día 2 al día 5 de preñez y esta hormona es la responsable de iniciar los cambios en el endometrio uterino (Guillomot y col., 1993; Fenwick y col., 1977) (Figura XII c). Del mismo modo, es aquel aumento de los estrógenos maternos lo que finalmente sensibiliza a las células estromales para la decidualización (Weitlauf, 1994; Heap y col., 1979).

En el cerdo los estrógenos son producidos por el blastocisto, que luego puede implantarse sin un soporte estrogénico materno (Gadsby y col., 1980). En la rata, esta contribución hormonal del blastocisto es controversial.

Gran parte de las modificaciones morfológicas y metabólicas que sufre el endometrio durante la gestación están regulados por las hormonas esteroides maternas, ya que ocurren independientemente de la presencia del embrión (Weitlauf, 1994; Hodgen y Itskovitz, 1988). Sin embargo, en roedores, se ha demostrado que el embrión pre-implantatorio "in vitro" libera estradiol, que también podría influir regulando la receptividad endometrial (Loza Arredondo, 1991).

Recordemos que en las mujeres, el proceso de transformación decidual que ocurre en cada ciclo menstrual en ausencia de embriones, depende exclusivamente de la acción hormonal ovárica (Guillomot y col., 1993), mientras que en los no primates, son los estímulos embrionarios los que inician los cambios vasculares y celulares para la decidualización (Hodgen y Itskovitz, 1988; Weitlauf, 1994).

Se ha encontrado que la concentración de receptores nucleares a estradiol y a progesterona es mayor en los sitios de implantación embrionaria que en los intersitios en el día 6 de preñez en la rata (Logeat y col., 1980), lo cual parece confirmar que las hormonas esteroides regulan el proceso de vascularización y decidualización localizada.

7 - B) Efecto del estradiol sobre la síntesis endometrial de PGs

El Tamoxifeno, un derivado del trifeniletileno, actúa como antagonista de receptores uterinos a estrógenos y como bloqueante de la síntesis ovárica de estradiol (Watson y Howson, 1977; Patterson, 1981). Si se inyecta Tamoxifeno i.p. en el día 2 de preñez, se inhibe el aumento en la síntesis de PGs que se produce en el día 5, por lo que se supone que el estradiol sería el estímulo fisiológico para incrementar la síntesis de PGs en el útero de rata (Phillips y Poyser, 1981; Fenwick y col., 1977).

Además, como dijimos anteriormente, los esteroides ováricos son los que regulan el efecto de las PGE y PGF_{2α} en el período peri-implantatorio en el ratón, a través de la regulación de la expresión de los distintos tipos de receptores endometriales de las PGs (Yang y col., 1997).

7 - C) Efecto de las hormonas ováricas sobre la síntesis de NO

Variaciones durante el ciclo estral en la actividad de la NOS sugieren que esta se regula por hormonas esteroides (Huang y col., 1995).

El hecho de que los estrógenos puedan inducir a la iNOS (Huang y col., 1995) y a la cNOS en una variedad de tejidos (Hayashi y col., 1995; Goetz y col., 1994; Weiner y col., 1994) y que la formación de edema endometrial (Rao y col., 1995; Chaves y col., 1993) y vasodilatación uterina (Van Buren y col., 1992) observadas en ratas tratadas con estrógenos sean mediadas por el NO, nos llevan nuevamente a sospechar un papel crítico desempeñado por el NO en el proceso implantatorio embrionario.

El efecto de la progesterona sobre la actividad de la enzima NOS aún está en discusión. Según algunos autores, la progesterona no influencia la síntesis de NO en tejidos periféricos en el cobayo (Weiner y col., 1994a), otros estudios le asignan un efecto inhibitorio sobre la expresión de la NOS en la rata, a través de

lo cual regula la contractilidad uterina en el parto (Buhimschi y col., 1996). En nuestro laboratorio, se ha demostrado que el tratamiento sistémico de ratas ovariectomizadas con progesterona aumenta la actividad uterina de la isoforma Ca^{2+} -dependiente al doble (Franchi y col., 1996).

Ha sido demostrado que el tratamiento sistémico con Tamoxifeno a cobayos preñados disminuye la actividad Ca^{2+} -dependiente de la NOS cardíaca a valores similares a los hallados en animales no preñados (Weiner y col., 1994a). El tratamiento con estradiol (pero no con progesterona) a cobayos cerca del término de la preñez, aumenta la actividad NOS Ca^{2+} -dependiente en la arteria uterina, corazón y músculo esquelético, mientras que la Ca^{2+} -independiente permanece inalterada (Weiner y col., 1994c).

8- LA DIABETES MELLITUS

8 - A) Consideraciones generales de la enfermedad

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica muy común ya que afecta al 1-2% de la población mundial.

Para el desarrollo de la enfermedad se requieren, además de una susceptibilidad génica, ciertos factores ambientales, tales como la excesiva ingesta de calorías, la obesidad y la ganancia de peso.

Hay dos tipos principales de diabetes, la insulino-dependiente o tipo I y la no-insulino-dependiente (NIDD) o tipo II (Metzger, 1991; National Diabetes Data Group, 1979). La primera afecta a un cuarto de la población diabética y es la más severa. Actualmente se sabe que la predisposición a padecer la diabetes tipo I es hereditaria. La diabetes tipo II es la más difundida y también presenta predisposición genética.

La enfermedad diabetes tipo II tiene su inicio luego de un estado prediabético, caracterizado por una relativa deficiencia en la secreción de insulina. Inicialmente el defecto secretorio en las células β pancreáticas ocurre específicamente ante el

estímulo de sobrecarga de glucosa, pero con el tiempo se desarrolla la enfermedad en sí, principalmente en individuos mayores de 35–45 años (Efendic y col., 1984). Una vez desarrollada la patología, además de la deficiente secreción de insulina, se desarrolla frecuentemente resistencia periférica a la hormona y obesidad (Mallof y Boyd, 1986). La resistencia periférica a la insulina significa que debido a fallas a nivel del receptor periférico a la insulina, se necesita secretar cada vez más hormona en respuesta a la misma sobrecarga exógena de glucosa, para normalizar la glucemia.

La patología diabética está acompañada por una serie de desórdenes vasculares y metabólicos (Wentzel y col., 1995) causados por la hiperglucemia. Tal es el caso del adelgazamiento vascular de la membrana capilar que provoca un consecuente aumento de permeabilidad vascular sistémica, la angiopatía, la retinopatía y la nefropatía (Williamson y col., 1993). Estas alteraciones han sido extensamente analizadas usando modelos animales (Eriksson y Hakan Borg, 1993; Garris y col., 1986; Triadou y col., 1982).

La enfermedad se detecta principalmente por medio de curvas de tolerancia a la glucosa, ya que las glucemias basales pueden no estar elevadas.

8 - B) Modelos animales para el estudio de la diabetes mellitus

Son varios los modelos animales que se han utilizado para estudiar la patología diabética (Eriksson y col., 1991). En la rata, el más conocido es el de la administración en estado adulto de estreptozotocina, droga que provoca la destrucción de las células β pancreáticas.

Portha y col. (1979) describieron un modelo de diabetes mellitus no-insulino-dependiente (NIDD) compatible con la gestación, que resulta de la administración de estreptozotocina a ratas neonatas de 2 días de edad. La destrucción de células β pancreáticas en los neonatos y posterior regeneración parcial espontánea, da lugar a un modelo de diabetes menos severo que en el primer caso. Estos animales en etapa adulta son moderadamente hiperglucémicos,

moderadamente hipoinsulinémicos, e intolerantes a la glucosa (Mallof y Boyd, 1986; Kergoat y col., 1991).

Aunque este modelo carece de algunas características de los animales NIDD como la obesidad y la marcada resistencia periférica a la insulina (Triadou y col., 1982; Welsh y Hellerstrom, 1990), ha sido utilizado extensamente para el análisis de las alteraciones en la preñez, ya que estas ratas se aparean, fertilizan, y hacen trabajo de parto, aunque con un día de retraso (Jawerbaum y col., 1997b).

Este modelo además es comparable a la fisiopatología del estado prediabético en la diabetes gestacional humana que se observa como paso previo al desarrollo de la resistencia a la insulina (Melin y col., 1990) donde el tejido pancreático no se adapta correctamente a las exigencias metabólicas y endócrinas del estado gestante.

Por ello este modelo se considera de interés para el estudio de las primeras etapas de la patología diabética tipo II.

8 - C) Importancia del modelo de diabetes tipo II por su similitud con la diabetes gestacional

En la gestación normal ocurre habitualmente resistencia a la insulina en el segundo trimestre de embarazo, por acción de las hormonas placentarias (Ward y col., 1985). Las células β pancreáticas se ven obligadas a producir mucha más insulina para poder mantener la glucemia en niveles normales. Pero, en la diabetes gestacional, que ocurre en el 1 al 3 % de las gestaciones, las células β pancreáticas no son capaces de incrementar su respuesta secretoria en forma satisfactoria, produciéndose entonces una deficiencia de insulina en el segundo y tercer trimestre de embarazo (O'Sullivan y col., 1973). En estos casos es elevado el riesgo de mortalidad peri-natal, preeclampsia, retardo de crecimiento intrauterino por insuficiencia placentaria, macrosomía y enfermedades metabólicas en el neonato, como hipoglucemia e hipocalcemia (Ward y col., 1985; O'Sullivan y col., 1973). La macrosomía se debe a que la hiperglucemia materna estimula la secreción de

insulina fetal, la cual actúa como hormona de crecimiento.

Luego del parto las mujeres vuelven a ser normoglucémicas, pero un alto porcentaje de las mismas (50%), desarrollan luego de algunos años diabetes tipo II, por lo que se considera a la diabetes gestacional como un estado de prediabetes.

Debido a la similitud entre la diabetes gestacional y el modelo animal de diabetes tipo II obtenido por inyección neonatal de estreptozotocina, se ha utilizado este modelo para el estudio de la diabetes durante la gestación.

8 - D) Alteraciones reproductivas en la diabetes mellitus

En la gestación diabética las modificaciones fisiológicas propias del metabolismo en la preñez se ven agravadas como consecuencia de la hiperglucemia debida a la falta de insulina y/o a la deficiente acción de la misma (Buchanan, 1991; O'Sullivan y col., 1973; Metzger, 1991).

Anteriormente al auge de la terapia insulínica había alta mortalidad materna, infertilidad, y pérdida fetal. El control glucémico con insulina revierte muchas alteraciones metabólicas maternas, pero tanto la gestación como el parto continúan presentando complicaciones en esta patología.

Dependiendo de la severidad de la patología diabética, las complicaciones más frecuentes son esterilidad, abortos espontáneos, muerte fetal intrauterina, malformaciones congénitas (Eriksson y Hakan Borg, 1993), complicaciones en el trabajo de parto, toxemia y polihidroamnios, (Pedersen y Molsted-Pedersen, 1981; Pampfer y col., 1994; Eriksson y Hakan Borg, 1993).

La esterilidad puede tener diversos orígenes como anovulación (Kirchick y col., 1978), patrones alterados en el ciclo (Chieri y col., 1969), reclutamiento folicular disminuido (Garris y col., 1986), esteroidogénesis ovárica disminuida y atrofia ovárica (Vomachka y Johnson, 1982), menores niveles plasmáticos de estradiol (lo que resulta en una menor acción estrogénica a nivel endometrial en los

animales diabéticos) (De Hertogh y col., 1989), o flujo sanguíneo uterino alterado (Wentzel y col., 1995).

La influencia de la diabetes materna sobre el desarrollo temprano y la implantación embrionaria es aún incierta. Sin embargo, se ha descrito extensamente en hijos de madres diabéticas retardo en el crecimiento fetal (Wentzel y col., 1995; Vercheval y col., 1990; Pampfer y col., 1990) y mayor incidencia de defectos congénitos (Pedersen y Molsted-Pedersen, 1981; Pampfer y col., 1994; Eriksson y Hakan Borg, 1993), tanto en pacientes humanos diabéticos como en diabetes inducida experimentalmente en animales.

Se ha descrito también que en pacientes con diabetes gestacional, la expresión de la iNOS está aumentada en las placentas a término en las células endoteliales y trofoblastos, lo cual podría ser la causa de desórdenes vasculares placentarios que caracterizan dicha patología (Schonfelder y col., 1996).

En el animal NIDD, hemos descrito previamente anomalías en la actividad contráctil y en el metabolismo glucosídico, lipídico y producción de prostanoïdes uterinos y embrionarios en el día 10 de gestación (Jawerbaum y col., 1994), así como menor número de embriones implantados (Jawerbaum y col., 1994), menor número de ovocitos ovulados, y mayor producción de PGs por los mismos (Jawerbaum y col., 1996a). El trabajo de parto en estos animales se encuentra retrasado y prolongado en el tiempo (Jawerbaum y col., 1996b).

En la diabetes experimental ha sido demostrado que alteraciones en el ambiente hormonal producen modificaciones en la cinética de los receptores a estrógenos en el tejido uterino (De Hertogh y col., 1989), lo cual podría afectar la implantación. Sin embargo, aún permanece por explorar si la patología diabética realmente altera el proceso implantatorio.

Tanto en las mujeres diabéticas tipo I, tipo II o diabéticas gestacionales, las malformaciones fetales son la principal causa de muerte peri-natal (Eriksson y col., 1991; O'Sullivan y col., 1973). La lesión más específica es el síndrome de regresión caudal, desórdenes del sistema nervioso central, hidrocefalia, anencefalia, espina bífida y macrosomía (Goldman y col., 1985). En los modelos experimentales de diabetes se observa también retraso del desarrollo fetal y malformaciones congénitas severas, principalmente del esqueleto y del tubo neural, que se inducen durante la organogénesis (Pedersen y Molsted-Pedersen, 1981; Pampfer y col., 1994; Eriksson y Hakan Borg, 1993).

Si bien el tratamiento insulínico a madres diabéticas ha reducido los índices de mortalidad peri-natal y la tasa de malformaciones congénitas en sus hijos (Fuhrmann y col., 1983), la naturaleza de la agresión diabética que produce la teratogénesis no es conocida.

Por ello, recientemente se ha prestado mayor atención a los pasos más tempranos del desarrollo embrionario, cerca del período de implantación (Vercheval y col., 1990; Pampfer y col., 1990; Pampfer y col., 1994) y al período organogénico que en el embrión de rata se inicia en el día 9 de gestación, y en el humano en el primer trimestre del embarazo, siendo esos dos los períodos más sensibles a los defectos metabólicos (Eriksson y col., 1991).

En roedores, no se observa macrosomía, ya que a diferencia del feto humano, capaz de sintetizar insulina en respuesta a la glucemia, los islotes β pancreáticos de rata responden a la glucosa materna secretando insulina recién en los primeros días de vida. En estos animales, se observa retardo severo de crecimiento, que se evidencia incluso en las primeras divisiones del embrión diabético, previo a la implantación (Vercheval y col., 1990; Pampfer y col., 1990; Wentzel y col., 1995). En los blastocistos además se encuentra disminuida la proporción de masa celular (de la cual derivarán las capas germinativas embrionarias) (Pampfer y col., 1990).

Al exponer los embriones de roedores en período de organogénesis a concentraciones elevadas de glucosa in vitro, se observa dismorfogénesis y retardo de crecimiento (Moley y col., 1996). De esta forma se ha postulado el efecto teratogénico que poseen concentraciones alteradas de distintos metabolitos en el suero materno, y se ha determinado el período de vulnerabilidad embrionaria.

Los fetos humanos que presentan retardo de crecimiento en las primeras etapas del desarrollo, son los más afectados y con mayor probabilidad de desarrollar malformaciones congénitas.

Por otro lado, en esta patología la placenta posee importantes alteraciones estructurales y metabólicas (Singer y col., 1984), las cuales sumadas a las alteraciones en las concentraciones séricas de metabolitos en la mujer diabética (Efendic y col., 1984), alteran el flujo de nutrientes hacia el feto. De esta forma, el hijo de madre diabética está expuesto a un influjo anormal de glucosa, lípidos y aminoácidos a través de la placenta, lo cual también contribuye a las anomalías fetales a corto o largo plazo.

8 - F) Alteraciones de prostanoïdes en la diabetes mellitus

Hay numerosos estudios que describen alteraciones en la síntesis de prostanoïdes en diferentes tejidos de animales y de pacientes diabéticos. Las alteraciones en el lecho vascular debido a incrementos en la producción de tromboxano, PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$ y defectos en la producción de PGI_2 , ocasionan un daño microvascular que es la complicación más severa de esta patología: la vasculopatía diabética (Schonfelder y col., 1996; Williamson y col., 1993; Garris y col., 1986).

Las alteraciones en la motilidad uterina (Jawerbaum y col., 1994), el flujo útero-placentario (Wentzel y col., 1995), el retraso en el crecimiento fetal (Wentzel y col., 1995; Vercheval y col., 1990; Pampfer y col., 1990) y la insuficiencia placentaria son otras de las complicaciones originadas en desbalances de los prostanoïdes.

Por lo expresado, es razonable suponer que el proceso de implantación, expuesto a desórdenes metabólicos y vasculares en la patología diabética, se encuentre alterado en dicha patología.

OBJETIVOS

Como surge de la reseña precedente, los eventos que ocurren durante la implantación embrionaria en los mamíferos están pobremente dilucidados aún. Fallas reproductivas a nivel de la implantación en la mujer, son la causa frecuente de pérdida embrionaria natural, y contribuyen al alto índice de fracasos en la fertilización asistida y en la transferencia de embriones. Por ello se consideró de interés profundizar el estudio de los mecanismos involucrados en el proceso implantatorio embrionario, utilizando la rata como modelo experimental.

Es objetivo de este trabajo determinar los mecanismos embrionarios y uterinos que puedan participar en la regulación del proceso implantatorio desde el punto de vista del evento vascular que conlleva, y la interrelación existente entre distintos agentes vasoactivos en dicho proceso.

Sabemos que el proceso implantatorio es llevado a cabo bajo regulación estrogénica y que los estrógenos inducen a la enzima NOS en el útero entre otros tejidos. En este trabajo, intentaremos determinar cual es el nivel de regulación y de actividad de la enzima sintetizadora de NO, y su efecto en la producción de PGs en el momento de la implantación embrionaria.

En este contexto, los OBJETIVOS del presente trabajo serán determinar si:

- En el tejido uterino de rata en gestación temprana existen variaciones en los niveles de PGE y PGF_{2α} liberados y en la actividad de la enzima NOS.
- Existe interacción entre ambos sistemas vasoactivos (el NO y las PGs) en el momento en que se inicia la implantación embrionaria.
- Señales embrionarias como el PAF y el IFN_α modulan dichos sistemas vasoactivos durante la implantación.
- El sistema nitridérgico posee relevancia fisiológica como agente vasoactivo en el proceso de nidación en la rata.
- En la patología diabética en la rata el proceso implantatorio embrionario se encuentra alterado, como parte de las alteraciones metabólicas y reproductivas descritas a otros niveles.

MATERIALES Y METODOS

Materiales

En este trabajo se emplearon las siguientes sustancias: Tris, glicilglicina, tween-20, fosfatidilcolina, rojo cresol, antisuero de conejo para cuantificar GMPc, PGE y PGF_{2α}, N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethane-sulfonic acid] (HEPES), NADPH, DL-dithiothreitol, N_w-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) y N_w-nitro-D-arginina metil ester (D-NAME), N^G-mono-Metil-L-Arginina (L-NMMA), Nitroprusiato de Sodio (NP), aminoguanidina (AG), EGTA, azida sódica, seroalbúmina bovina (BSA), Azul de Evans y estreptozotocina obtenidas de Sigma, St. Louis, MO, USA; buffer fosfato salino (PBS), NaCl y CaCl₂ de Merck; [¹⁴C]-arginina (292 mCi mmol⁻¹), [³H]-PGE y [³H]-PGF_{2α}, de Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra; Dowex AG50W-X8 de Bio-Rad, Richmond, USA; buffer acetato de Mallinckrodt Chemical Works, New York, Los Angeles, St. Louis, U.S.A.; insulina NPH de Laboratorios Beta; dexametasona de Sidus, Buenos Aires, Argentina; anestesia Ketalar de Parke-Davis, Argentina y citrato de Tamoxifeno que fue gentilmente cedido por Gador, Buenos Aires, Argentina.

a) MODELO EXPERIMENTAL

Se utilizaron ratas hembras vírgenes variedad Wistar, mantenidas con Purina como alimento y agua "ad libitum". en un ritmo de bioterio 14:10 horas de luz:oscuridad respectivamente, a temperatura de 22+/-2°C y humedad constante.

Los distintos modelos utilizados fueron:

Ratas en ciclo estral: El ciclo estral fue determinado por extendido vaginal.

Un grupo de hembras fue sacrificado en estro como referencia de un control no preñado y del día post-ovulatorio. Este estadio se caracteriza por la presencia de

células escamosas del epitelio vaginal que se desprenden y pueden ser recogidas con una pipeta pasteur para su observación al microscopio óptico.

Ratas preñadas: Hembras adultas fueron apareadas con ratas macho durante la noche del proestro; confirmándose el apareo por la presencia de espermatozoides en los extendidos vaginales a la mañana siguiente, considerándose éste el día 1 de gestación. Los animales se sacrificaron a las 11:00 horas (mañana) de los días 3, 4, 5 ó 6 de gestación, para abarcar los periodos pre y post implantatorios, o a las 18:00 horas (noche) del día 5, para acercarnos aún más al momento de la implantación.

Ratas preñadas sin embriones en el útero (con ligadura oviductal): Un grupo de ratas en el día 2 de gestación fue sometido bajo anestesia de éter a ligadura bilateral a nivel de la unión útero-tubal para evitar el descenso de los embriones al lumen uterino, que ocurre entre los días 4 y 5 de preñez. De esta manera, podemos independizarnos de las señales embrionarias para estudiar los procesos uterinos.

Se cuidó de no interrumpir la vasculatura útero-ovárica.

El grupo control fue sometido a una operación simulada (sham) para descartar los efectos quirúrgicos en las determinaciones subsiguientes.

Estas ratas fueron sacrificadas en los días indicados y fue confirmada la retención de los blastocistos en el oviducto el día del sacrificio mediante microscopía óptica.

Ratas ovariectomizadas (ovx): Ratas prepúberes fueron sometidas a ovariectomía bilateral, utilizándolas 21 días después, con el objeto de evitar el mantenimiento hormonal esteroideo del tejido uterino.

Ratas ovariectomizadas con sustitución estrogénica (ovx+Eo): A un grupo de ratas que sufrió ovariectomía bilateral se le administró i.p. 17- β -estradiol 0,5 μ g y 1 μ g, 48 y 24 horas respectivamente antes del sacrificio, a fin de estudiar el efecto estrogénico. Estas dosis son las que están descriptas en la literatura (Motta y col.,

1995) como capaces de restaurar el sostén estrogénico luego de la ovariectomía.

Ratas preñadas inyectadas con dexametasona: Con el objeto de inhibir la expresión de la enzima NOS, se procedió a la administración de dexametasona (glucocorticoide sintético) "in vivo", usando el siguiente protocolo: se emplearon 3 grupos de ratas preñadas:

Grupo I: fue inyectado i.p. con 50 μ l de solución salina fisiológica (control), o 1 mg/kg. de peso corporal de dexametasona (Knowles y col., 1990). Las inyecciones fueron 2, a las 12:00 y 24:00 horas del día 3 de preñez, y los animales fueron sacrificados en el día 4 a las 12:00 horas.

Grupo II: fue inyectado i.p. con 50 μ l de solución salina fisiológica (control), o 1 mg/kg. de peso corporal de dexametasona. Las inyecciones fueron 2, a las 12:00 y 24:00 horas del día 4 de preñez, y los animales fueron sacrificados en el día 5 a las 12:00 horas.

Grupo III: fue inyectado i.p. con 50 μ l de solución salina fisiológica (control), o 1 mg/kg. de peso corporal de dexametasona. Las inyecciones fueron 4, a las 12:00 y 24:00 horas del día 3 de preñez y a las 12:00 y 24:00 horas del día 4 de preñez, y los animales fueron sacrificados en el día 5 a las 12:00 horas.

Luego del sacrificio, el tejido uterino fue aislado y sometido a la determinación de actividad de la enzima NOS como se describirá posteriormente.

Ratas preñadas inyectadas con Tamoxifeno: Con el objeto de bloquear el efecto trófico de los estrógenos sobre el tejido uterino, un grupo de ratas fue inyectado i.p. con una suspensión salina de citrato de Tamoxifeno (un antagonista de estradiol). El Tamoxifeno se administró a una dosis de 0,2 mg/kg., según lo descripto en (Watson y Howson, 1977; Patterson, 1981), en el día 2 de preñez y las ratas fueron sacrificadas en el día 5 de preñez a las 11:00 o a las 18:00 horas. El grupo control fue inyectado con el mismo volumen de solución salina fisiológica.

La eficiencia del tratamiento con Tamoxifeno fue confirmada mediante la alteración

del ciclo estral en ratas hembras vírgenes, donde el examen de los extendidos vaginales demostró que a la dosis descrita, el Tamoxifeno provoca un arresto del ciclo en un estadio de diestro que permanece constante durante al menos 5 días. Este estadio de diestro se caracteriza por la abundancia de leucocitos en los extendidos vaginales.

Luego del sacrificio, el tejido uterino fue aislado y sometido a la determinación de actividad de la enzima NOS como se describirá posteriormente.

Cabe aclarar que previamente a las inyecciones i.p. de Tamoxifeno, ensayamos la utilización de parches subcutáneos de la droga, de 5 mg colocados en el día 1 de gestación. Al analizar el efecto de estos parches en ratas ciclantes, observamos que recién 7 días después de colocado el mismo, las ratas comienzan a alterar su ciclo estral. Por este motivo no fue utilizado este protocolo y se procedió a inyectar la droga i.p. como señalamos anteriormente.

Para tratar de revertir el efecto del Tamoxifeno en ratas ciclantes, estas fueron inyectadas i.p. en los 2 días subsiguientes con 0,5 y 1 $\mu\text{g/rata}$ de 17- β -estradiol. Para revertir el efecto en ratas preñadas, estas fueron inyectadas i.p. en los días 3 y 4 de preñez con 0,5 y 1 $\mu\text{g/rata}$ o dosis de 10 y 20 $\mu\text{g/rata}$ de 17- β -estradiol para ensayar dosis mayores.

Ratas preñadas inyectadas intraluminalmente con inhibidores de la enzima

NOS: En la mañana (11:00 horas) del día 5 de gestación distintos grupos de animales fueron anestesiados con éter y sometidos a una inyección i.l. en uno de los cuernos uterinos, en el extremo cervical, con 50 μL de buffer fosfato salino (PBS) (control), 50 μL de distintas dosis de L-NAME o D-NAME (0,25 a 20 mg/kg), o con 50 μL de 2 mg/kg. peso corporal de aminoguanidina (AG). El cuerno contralateral se dejó como control interno para cada animal. En el día 7 de preñez, las ratas fueron sacrificadas y el "coeficiente de implantación" obtenido aplicando el siguiente cociente:

de embriones implantados en el cuerno inyectado
coeficiente de implantación = _____

de embriones implantados en el cuerno no inyectado

Con el objeto de determinar si el L-NAME provocó alteraciones en el desarrollo embrionario, paralelamente se realizaron cortes histológicos longitudinales de úteros preñados de día 8 fijados en paraformaldehído 4 %. Se procedió a la tinción de los cortes mediante hematoxilina-eosina para observar las estructuras tisulares uterinas y embrionarias bajo microscopía óptica.

Otro grupo animal inyectado con L-NAME, fue sacrificado en la noche (18:00 horas) del día 5 de gestación para determinar la presencia de sitios de implantación como se describirá posteriormente.

Mientras que el L-NAME es un inhibidor en la misma proporción de las isoformas constitutiva e inducible de la NOS, el D-NAME es su enantiómero inactivo (Knowles y Moncada, 1994). La AG en cambio, es un inhibidor selectivo de la isoforma inducible (Knowles y Moncada, 1994).

Ratas con diabetes no-insulino-dependiente: El grupo de ratas con diabetes mellitus de tipo no-insulino-dependiente (NIDD) se obtuvo mediante la administración subcutánea de estreptozotocina 100 mg/kg. de peso corporal a neonatos de la cepa Wistar (Portha y col., 1979). El grupo control sobre el cual se harán las comparaciones fue inyectado con el vehículo buffer citrato y se lo denominará grupo control o sano.

Para los siguientes estudios, de la progenie inyectada se utilizaron los animales hembra, y se descartaron los machos.

En el modelo de diabetes no-insulino-dependiente utilizado, las glucemias en ayunas

de las hembras adultas están levemente disminuidas, y presentan curvas de tolerancia a la glucosa anormales. La determinación de la tolerancia a la glucosa se realizó de la siguiente manera: luego de la administración i.p. de una solución de dextrosa 1,5 g/kg. peso corporal, las ratas diabéticas presentaron curvas de glucemias (en mg/dl sangre) anormales en relación a las controles, de acuerdo a (Mallof y Boyd, 1986), y como señalamos a continuación:

	Controles	Diabéticas	C vs. D
0 min.	101 +/- 5	130 +/- 5	p<0,05
30 min.	310 +/- 20	392 +/- 5	p<0,001
60 min.	159 +/- 10	280 +/- 20	p<0,001
120 min.	104 +/- 5	209 +/- 13	p<0,001

Es decir, a los 120 minutos de inyectada la glucosa, mientras que en el grupo control las glucemias retoman a los valores basales (0 min.), en el grupo diabético, las glucemias permanecen elevadas por sobre el nivel basal (p<0,001 grupo Diabético 120 min. Vs. 0 min.). Este ensayo nos indica si los animales inyectados con estreptozotocina presentan curvas de tolerancia a la glucosa anormales en estadio adulto, y es el utilizado para clasificar a ese grupo como *diabético*.

Aproximadamente el 90 % de los neonatos inyectados manifestaron ese estado diabético en la etapa adulta.

Este grupo animal fue seguido como los controles, tanto en ciclo estral como en la preñez temprana.

Con el objeto de revertir el estado hiperglucémico, un grupo de ratas NIDD fue inyectado i.p. con insulina NPH de liberación intermedia 1 U/kg peso corporal por día, desde el día 1 de preñez hasta la mañana del sacrificio. Este protocolo retorna las glucemias de los animales diabéticos a valores normales, y es el reportado por (Mallof y Boyd, 1986).

Todos los animales fueron sacrificados por dislocación cervical en los momentos indicados. El tejido uterino fue removido, despojado de grasa, perfundido intensamente y abierto a lo largo de la línea antimesometrial, para luego hacer las determinaciones siguientes:

b) DETERMINACIONES

Presencia de sitios implantatorios y determinación del “tiempo de inicio de la implantación embrionaria”:

Los sitios de implantación embrionaria son evidentes 20 a 24 horas antes que cualquier otra evidencia morfológica, ya que es el primer signo de reacción decidual una vez que los blastocistos están posicionados e inmovilizados en el útero, y es la primer señal macroscópica del evento implantatorio.

Para localizar estos sitios utilizamos un ensayo de exudación plasmática de un colorante que se une a las proteínas plasmáticas (Psychoyos, 1973). Se inyectó intravenosamente un grupo de ratas bajo anestesia Ketalar con 0,5 ml de 0,5% Azul de Evans, en 0,9% de ClNa a las 11:00, 16:00, 18:00 y 20:00 horas del día 5 de preñez siendo sacrificadas 15 min. más tarde. El útero fue removido y los sitios de implantación visualizados como las áreas más intensamente teñidas. Estas áreas corresponden a los sitios con mayor vascularización y aumento de permeabilidad vascular y coinciden con los lugares donde los blastocistos se implantarán. Mediante este método pudimos determinar el número de sitios y el “tiempo de inicio de la implantación”, donde cada sitio se corresponde con un embrión implantando. Definimos entonces el “tiempo de inicio de la implantación” como el momento en que se hacen evidentes macroscópicamente, los sitios de implantación mediante la técnica descrita anteriormente.

En las ratas controles esas áreas comienzan a ser evidentes a las 18:00 horas del día 5 de preñez, indicando que la implantación se inicia aproximadamente en ese momento.

Las porciones uterinas que se encuentran entre 2 sitios de implantación se denominan "intersitios" de implantación. Tanto los sitios como los intersitios de implantación serán objeto de distintas determinaciones que describiremos posteriormente.

Cabe aclarar que el colorante Azul de Evans, a la concentración presente en las porciones uterinas, no interfiere con las determinaciones subsiguientes.

Recuento de mórulas y determinación de la "tasa de implantación":

En el día 4 de preñez, un grupo de animales fueron sacrificados y ambos oviductos de cada animal fueron sometidos a una perfusión con solución salina, con el objeto de obtener embriones en el estadio de mórula. El número y morfología de las mórulas fue observado bajo microscopio óptico a 10 X.

La "tasa de implantación" se obtiene aplicando el siguiente cociente:

Tasa de implantación = número de mórulas / número de sitios de implantación

Determinación de la actividad de la enzima Fosfolipasa A₂(PLA₂):

Se realizó la determinación de la actividad de la enzima PLA₂ en homogenatos de útero de rata según la técnica descrita por Clossa y col. (1991). La enzima PLA₂ cataliza la hidrólisis de ácidos grasos en posición sn-2 de la fosfatidilcolina constituyente de la membrana celular. La liberación de ácidos grasos al medio de incubación trae como consecuencia un descenso en el pH del mismo, lo que es detectado por rojo cresol como indicador de pH. Esto permite medir cambios en la absorbancia del medio de reacción mediante un espectofotómetro, los cuales se correlacionan con la actividad enzimática.

Porciones uterinas de 200 mg de peso fueron homogeneizadas mediante un homogeneizador automático en 2 ml de buffer Tris-HCl (0,05 M, pH 7,4). La actividad PLA₂ fue determinada en una mezcla de reacción (1,5 ml) constituida por 100 µl del tejido homogeneizado y 1,4 ml de solución buffer que contiene: glicilglicina (0,1 M), tween-20 (0,2 %), CaCl₂ (90 mM), y fosfatidilcolina (6,67

mg/ml). La actividad enzimática se expresa como μ moles de ácido graso metabolizado/ (hora x mg p.s.).

Las determinaciones fueron realizadas: i) inmediatamente después del sacrificio (momento inicial) para determinar la actividad enzimática basal, ii) luego de incubar el tejido uterino 60 min. en medio Krebs-Ringer bicarbonato con 11 mM de glucosa, gaseado (5% CO₂, 95% O₂) y temperatura controlada a 37°C, para determinar el efecto de distintas sustancias sobre la actividad enzimática y iii) luego de incubar el homogenato 15 min. en medio Krebs a temperatura ambiente, para exponer directamente la enzima a sustancias exógenas.

Se evaluó la influencia "in vitro" sobre la actividad enzimática, de los siguientes compuestos:

- NP 300 μ M como liberador de NO, fue agregado al medio de incubación del tejido
- L-NMMA 1 mM es un análogo de la L-arginina y actúa como inhibidor competitivo de la enzima NOS, fue agregado al medio de incubación del homogenato tisular.

Debido a que el NP es un compuesto coloreado, no pudo utilizarse para evaluar su efecto sobre el homogenato tisular, ya que produce interferencias colorimétricas con la determinación de actividad enzimática de PLA₂ empleada.

Determinación de la producción uterina de prostaglandinas (PGs):

Determinación de PGE y PGF_{2 α} mediante RIA:

El método clásico de determinación de PGs es el del Radioinmunoensayo (RIA), y fue el que utilizamos para evaluar la liberación al medio de incubación de PGs de tipo E (PGE) y F (PGF_{2 α}) por parte de segmentos uterinos aislados. Según las evidencias reportadas (Behrman y Romero, 1992), las PGs no se almacenan en los tejidos que las producen, por lo que asumimos que los compuestos formados son liberados al medio de incubación tisular.

Porciones uterinas de 50 mg de peso fueron incubadas durante 60 min. en 1 ml

de Krebs adicionado con glucosa (11 mM) en un baño metabólico gaseado con 5% CO₂ y 95% O₂. Al cabo de 60 min. el tejido fue removido y el sobrenadante se acidificó a pH 3 con HCl 1 N y las PGs se extrajeron 3 veces con igual volumen de acetato de etilo. El extracto fue secado bajo atmósfera de N₂ a temperatura ambiente. Estos residuos fueron guardados a -70°C hasta la cuantificación posterior de PGE y PGF_{2α} por RIA de competencia de unión. Este, fue realizado según descripción previa (Faletti y col., 1995), por desplazamiento de unión de la PG tisular con ¹⁴C-PG exógena, reconocidas mediante anti-PGE-BSA (seroalbúmina bovina) como agente inmunogénico en una dilución final de 1:70. Los residuos tisulares y los reactivos fueron reconstituidos en PBS 0,01 M (pH 7,4) que contiene 0,15 M de NaCl; 0,1% de BSA y 0,1% de azida sódica. La reactividad cruzada de PGE₂ fue de 100% con PGE₁ y menos de 0,1% con otras PGs. La reactividad cruzada de PGF_{2α} fue de 60% con PGF_{1α} y menos de 0,1% con otras PGs. La sensibilidad de estos ensayos fue de 15 pg/tubo para ambas PGs. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayos fueron de 6,0% y 12% para PGF_{2α} y 8,2% y 12% para PGE, respectivamente. Las curvas de desplazamiento de unión dieron un coeficiente de entre 0,995 y 0,999. Los resultados fueron expresados como pg/mg p.s.

Se evaluó la influencia sobre la liberación de PGs de los compuestos siguientes, agregados al medio de incubación del tejido durante 60 min.. Al finalizar la incubación, el sobrenadante se sometió a la determinación de PGs como se describió anteriormente.

- Interferón alfa humano IFN α en dosis de 10, 100 y 1000 U/ml
- PAF 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ M
- NP 300 μ M.
- L-NAME o D-NAME 600 o 1000 μ M

En una segunda etapa se procedió a la determinación del contenido tisular remanente de PGE en los sitios e intersitios de implantación. Para ello procedimos a la

homogeneización de las porciones uterinas correspondientes que fueron incubadas durante los 60 min., y la posterior extracción de la fracción prostanoide según lo descrito por (Faletti y col., 1995). Brevemente, porciones uterinas de 50 mg de peso fueron homogeneizadas en etanol absoluto (1:5 m/v). El homogenato fue centrifugado a 1000 xg por 15 min. y el sobrenadante fue transferido a tubos de polipropileno. El pellet fue lavado con el mismo volumen de etanol absoluto, nuevamente centrifugado y el sobrenadante se adicionó al anterior. Los extractos fueron evaporados a sequedad bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. El residuo se guardó a -70°C hasta el radioinmunoanálisis.

Determinación de la actividad de la enzima Oxido Nítrico Sintetasa (NOS) en útero:

Dado que la enzima NOS en presencia de O₂ convierte la L-arginina tisular en L-citrulina y NO, su actividad enzimática fue cuantificada usando el ensayo de conversión de [¹⁴C]-arginina a [¹⁴C]-citrulina descrito por Bredt D.S. y col. (1989) y modificado por Salter y col. (1991). Brevemente, porciones uterinas de 100 mg fueron homogeneizadas en 500 µl de buffer HEPES 20 mM, pH 7,4 adicionado con 0,45 mM Ca²⁺. El homogenato fue incubado a 37°C con L-[¹⁴C]-arginina (0,1 µCi), 0,5 mM NADPH y 1 mM DL-dithiothreitol. Dado el alto contenido tisular de L-arginina (Moncada y Palmer, 1990), no fue necesario adicionar la misma en el medio de incubación.

Con el objeto de inhibir la actividad arginásica que implica un consumo de L-arginina derivado hacia el ciclo de la urea (Knowles y Moncada, 1994), agregamos 25 mM de L-valina en el medio. Dicha concentración fue la más baja que provocó el efecto máximo de inhibición de la síntesis inespecífica de NO. Luego de 15 min. de incubación, las muestras fueron centrifugadas 10 min. a 10.000 xg y el sobrenadante se pasó por una columna de 1 ml de DOWEX AG50W-X8 (de forma Na⁺) equilibrada con 20 mM de HEPES pH 7,4, eluyendo la [¹⁴C]-citrulina retenida con 3 ml de agua. La radioactividad fue medida en un contador de centelleo líquido. Dado que la formación de L-citrulina a partir de L-

arginina es estequiométrica con respecto a la formación de NO, podemos asumir que fue producido por el tejido, una cantidad equivalente de NO. Las variaciones intra e inter-ensayos fueron menores al 10%. La actividad enzimática fue expresada como pmoles NO/(min. x 100 mg p.h.).

Para la diferenciación entre las 2 isoformas de la enzima, la Ca^{2+} -dependiente y la Ca^{2+} -independiente, se procedió de la siguiente manera: se homogeneizaron 300 mg de tejido uterino, en 1,5 ml de buffer HEPES (20 mM pH 7,4). El homogenato de cada muestra fue fraccionado en 3 tubos, y se adicionó 0,45 mM de Ca^{2+} (tubo control), 1 mM de EGTA (tubo EGTA), y 1 mM EGTA + 2mM L-NAME (tubo inespecífico) respectivamente. El EGTA se utilizó como quelante de Ca^{2+} . Cada fracción del homogenato se incubó como se indicó anteriormente, haciendo los siguientes cálculos:

Actividad enzimática total=

$$[^{14}\text{C}]\text{-citulina producida en el tubo con } \text{Ca}^{2+} - [^{14}\text{C}]\text{-citulina en el tubo inespecífico.}$$

Actividad Ca^{2+} -independiente=

$$[^{14}\text{C}]\text{-citulina producida en el tubo EGTA} - [^{14}\text{C}]\text{-citulina en el tubo inespecífico.}$$

Actividad Ca^{2+} -dependiente = Actividad total - Actividad Ca^{2+} -independiente.

Para evaluar el efecto de posibles señales embrionarias sobre la actividad enzimática de NOS, se procedió a preincubar 60 min. el tejido con los siguientes compuestos:

PAF 10^{-6} M

IFN $_{\alpha}$ 10, 100 y 1000 U/ml

PGE o PGF $_{2\alpha}$ 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-6} M

Posteriormente se llevó a cabo la incubación con L- $[^{14}\text{C}]$ -arginina y se continuó como se describió anteriormente.

Para evaluar el posible efecto modulador de los estrógenos maternos sobre la actividad enzimática de la NOS, evaluamos el efecto "in vivo" de Tamoxifeno administrado como se describió anteriormente.

El % de inhibición de la actividad NOS con Tamoxifeno en cada caso, se obtuvo aplicando o el siguiente cálculo:

$$\% \text{ inhibición} = 100 \times (1 - T/C)$$

donde "T" es la actividad enzimática de NOS uterina en ratas tratadas con Tamoxifeno, y "C" en ratas tratadas con vehículo (solución fisiológica).

Estadística

Todos los valores mostrados en este trabajo representan la media y el desvío standard (SEM). La comparación entre grupos fue realizada mediante análisis de varianza de 1 o más variables, y las diferencias entre grupos fue considerada significativa cuy o $p < 0,05$ a partir de un test de comparaciones múltiples Student-Newman-Keuls.

RESULTADOS

Sección A:

Producción uterina de PGs durante el período peri-implantatorio

A-1 Actividad de la enzima PLA₂ en útero aislado de ratas en días peri-implantatorios de la preñez:

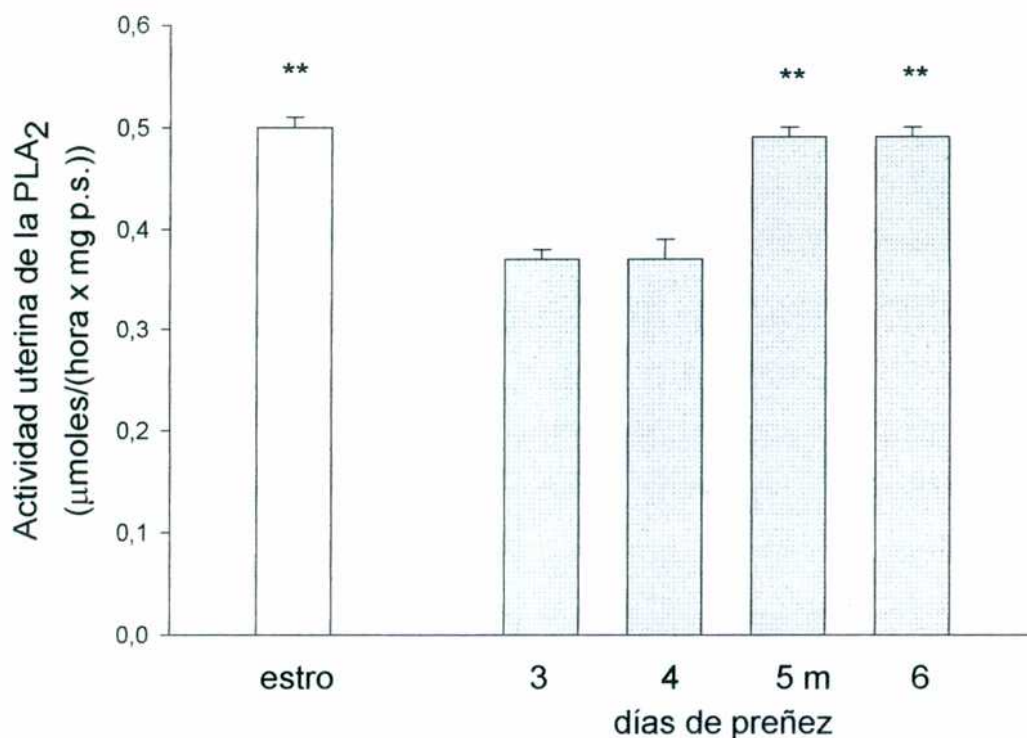
En primer lugar evaluamos la actividad de la enzima PLA₂ como paso limitante responsable de la disponibilidad del ácido araquidónico, precursor de la síntesis de prostanoïdes (Glaser y col., 1993; Chang y col., 1987).

En la **Figura 1** se muestra la actividad de PLA₂ determinada inmediatamente después del sacrificio, en estro y desde el día 3 al día 6 de gestación para abarcar los momentos pre y post-implantatorios.

Se observa un aumento significativo en la actividad de la enzima en los días 5 y 6 de preñez (peri-implantatorio) con respecto a los días 3 y 4 (pre-implantatorio) ($p < 0,01$), igualando a la actividad enzimática presente en ratas en estro (control no preñado).

Figura 1: *La actividad uterina de la PLA₂ está incrementada durante la implantación embrionaria en la rata.*

La actividad de la enzima PLA₂ fue determinada mediante un ensayo colorimétrico de acidificación del medio, en porciones uterinas aisladas de ratas en estro y preñadas durante la peri-implantación. Las ratas fueron sacrificadas en estro (como control no preñado) o en la mañana de los días 3, 4, 5 o 6 de gestación, el útero aislado y sometido a la determinación enzimática. **: $p < 0,01$ vs. días 3 y 4. Los datos representan la media $\pm$ SEM; $n=6$.



Cuando la determinación se hizo en homogenatos uterinos de ratas ovariectomizadas (ovx) y ovariectomizadas con sustitución estrogénica (ovx+Eo), **Figura 2**, la actividad enzimática resultó mayor ($p < 0,01$) en las ratas ovariectomizadas con sustitución estrogénica que en las que no recibieron 17- β -estradiol, lo cual confirma que la actividad PLA₂ se incrementa por acción de los estrógenos (Dey y col., 1982; Bonney y col., 1987). Además, los valores de actividad enzimática en ratas ovx+Eo son semejantes a los obtenidos en ratas en estró, confirmando que el tratamiento estrogénico es el adecuado para simular lo que ocurre durante el ciclo estral.

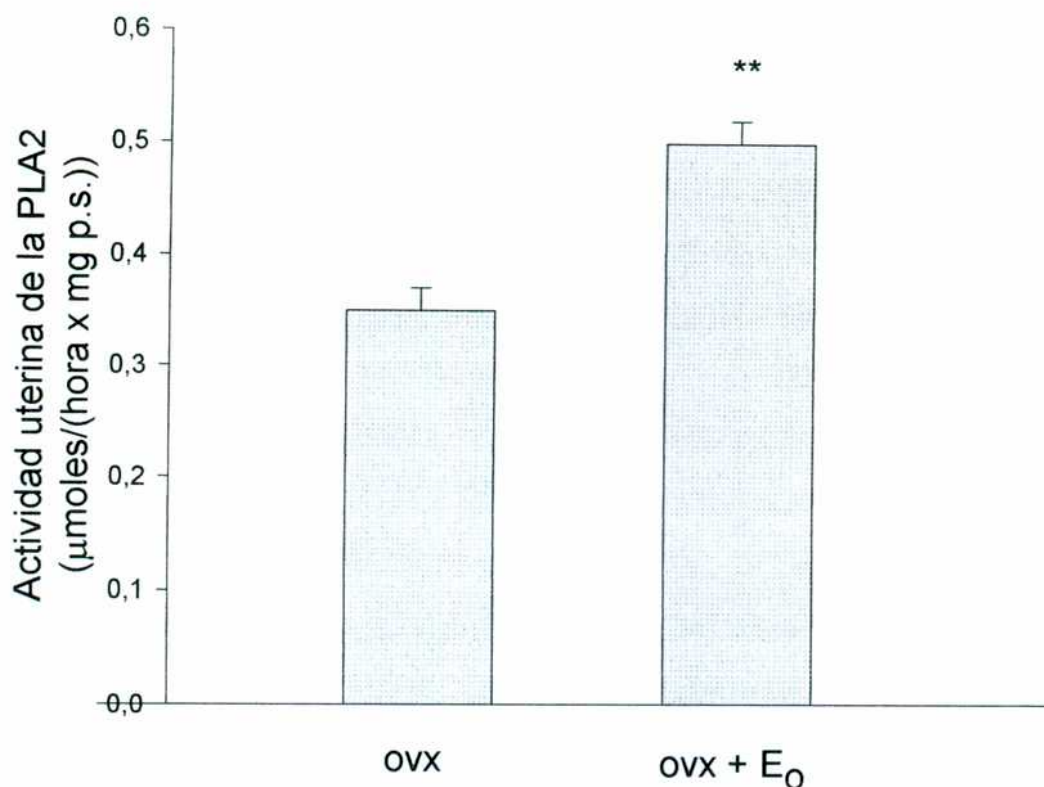


Figura 2: La actividad uterina de la PLA₂ se incrementa por acción de los estrógenos.

La actividad de la enzima PLA₂ fue determinada mediante un ensayo colorimétrico de acidificación del medio, en porciones uterinas aisladas de ratas ovariectomizadas (ovx) y ovariectomizadas con sustitución estrogénica (ovx+E₀). El tratamiento con 17-β-estradiol consiste en inyecciones sucesivas de 0,5 y 1 μg/kg. Las ratas fueron sacrificadas luego del tratamiento, el útero aislado y sometido a la determinación enzimática. **: p<0,01 ovx+E₀ vs. ovx. Los datos representan la media +/- SEM; n=6.

A-2 Presencia de embriones en el útero y actividad de PLA₂:

Para distinguir el origen (uterino o embrionario) de la enzima PLA₂ cuya actividad se encuentra aumentada en los días correspondientes a la implantación, se procedió a la ligadura oviductal en el día 2 de gestación, para impedir la presencia de embriones en

el útero estudiado. Se determinó luego la actividad enzimática uterina en el día 6 de preñez en estos animales que sufrieron ligadura oviductal, no registrándose diferencias significativas entre los controles, el grupo sham y las ratas con ligadura oviductal, como se muestra en la **Figura 3**. Deducimos de ello que la actividad de la enzima PLA₂ aumentada que hemos detectado en el día 6 de preñez es de origen uterino y no embrionario, y no parece ser modulada por factores embrionarios.

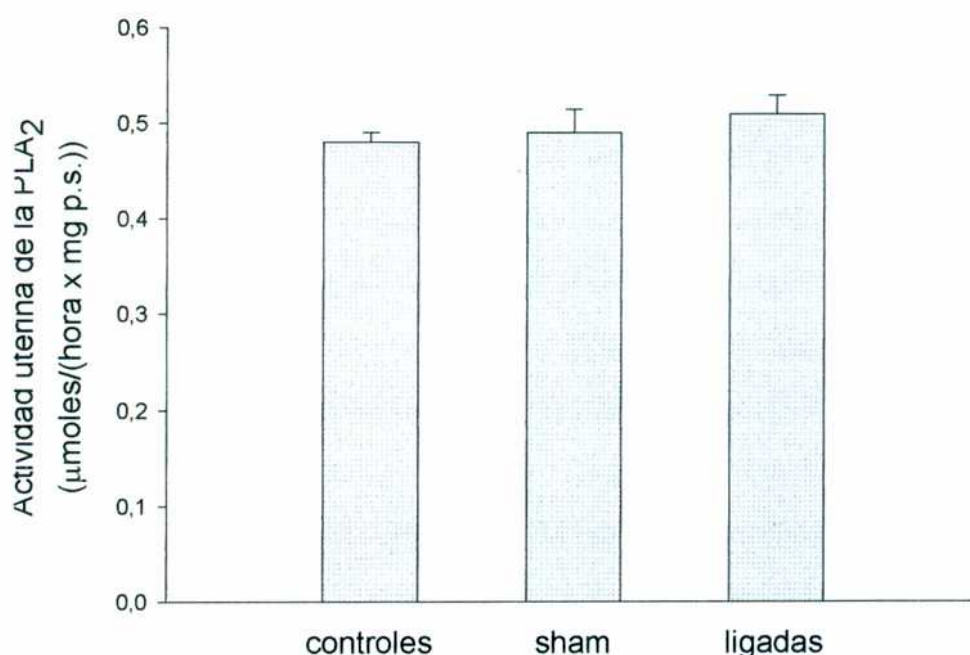


Figura 3: El incremento de la actividad uterina de la PLA₂ durante la implantación no depende de la presencia de los embriones en el útero..

La actividad de la enzima PLA₂ fue determinada mediante un ensayo colorimétrico de acidificación del medio, en porciones uterinas aisladas de ratas preñadas en el día 6 controles, con operación simulada en el día 2 (sham), y con ligadura oviductal bilateral en el día 2 (ligadas). Las ratas fueron sacrificadas en el día 6 de gestación, el útero aislado y sometido a la determinación enzimática. Los datos representan la media $\pm$ SEM; n=6.

A-3 Producción de prostanoideos por el tejido uterino aislado de ratas en días peri-implantatorios de la preñez:

Analizamos luego la liberación uterina basal de PGE y PGF_{2α} durante la preñez temprana, PGs que se sabe están mayoritariamente involucradas en los procesos de decidualización y vasodilatación (Phillips y Poyser, 1992; Frank y col., 1994; Kennedy y Lukash, 1982). Quisimos de esta forma verificar si los cambios en la actividad de PLA₂ pueden reflejarse en alteraciones en los niveles de PGs liberados. Como puede verse en la **Figura 4** los niveles de PGE liberados por el útero aislado al medio de incubación alcanzan un máximo en la mañana del día 5 ($p < 0,001$ vs. días 3 y 4), seguido por una fuerte caída en la noche del mismo día. Por otro lado, la producción de PGF_{2α} también alcanza un máximo en la mañana del día 5 ($p < 0,001$ vs. día 3; $p < 0,01$ vs. día 4) y luego declina a valores inferiores que en días pre-implantatorios ($p < 0,01$ día 6 vs. día 4; $p < 0,05$ día 5 noche vs. día 4).

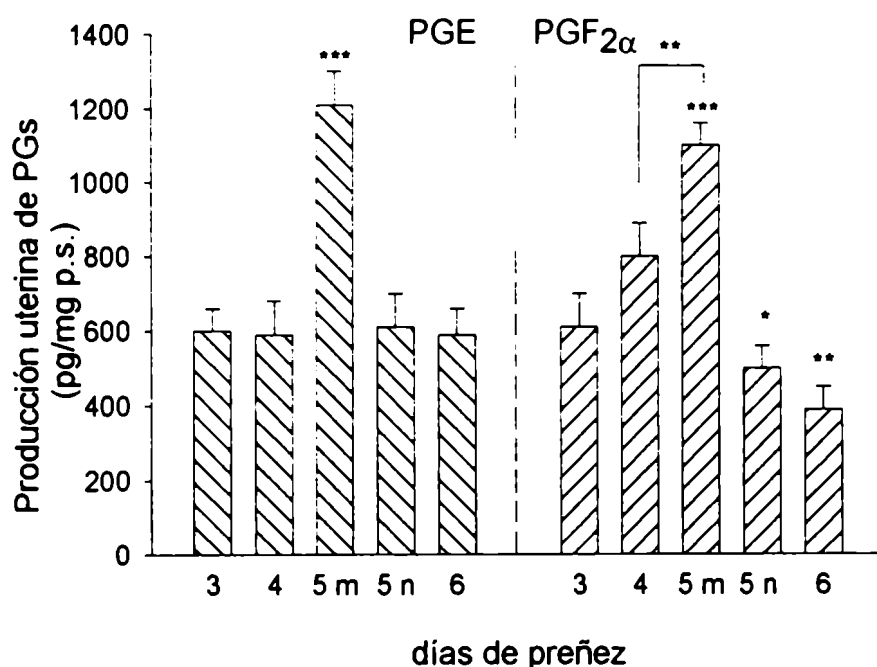


Figura 4: La producción uterina de PGE y $\text{PGF}_{2\alpha}$ aumenta durante el proceso implantatorio embrionario en la rata.

Producción de PGE (izquierda) y $\text{PGF}_{2\alpha}$ (derecha) en porciones uterinas aisladas de ratas preñadas durante la peri-implantación. Las ratas fueron sacrificadas en los días 3, 4, 5 mañana (5m) a las 11:00 horas, 5 noche (5 n) a las 18:00 horas, y 6 de preñez, el útero aislado y sometido a incubación durante 60'. Luego de la incubación se procedió a la determinación de PGs liberadas al medio por RIA. ***: $p < 0,001$ PGE en día 5 m vs. días 3, 4, 5 n y 6; ***: $p < 0,001$ $\text{PGF}_{2\alpha}$ día 5 m vs días 3, 5 n y 6; **: $p < 0,01$ $\text{PGF}_{2\alpha}$ día 5 m vs. día 4; **: $p < 0,01$ día 6 vs. día 4; *: $p < 0,05$ día 5 n vs. día 4. Los datos representan la media $\pm$ SEM; $n=6$.

A- 4 Presencia de los embriones en el útero y producción de PGs:

Evaluamos también la liberación de PGs uterinas en ausencia de embriones en el lumen, en un grupo de ratas que fueron sometidas a ligadura oviductal en el día 2 de gestación. En este grupo experimental no se observa el incremento en la producción de PGE y $\text{PGF}_{2\alpha}$ en la mañana del día 5 descrita anteriormente (Figura 4). De esta manera los niveles de PGs permanecen constantes, como se puede ver en la **Figura 5**. Esto nos indica que el embrión modula positivamente la síntesis de PGE y $\text{PGF}_{2\alpha}$ en el tejido uterino en el día de la implantación.

Además, el hecho de que en presencia de los embriones la $\text{PGF}_{2\alpha}$ disminuya en la noche del día 5 y en la mañana del día 6 con respecto a valores pre-implantatorios (Figura 4), pero no ocurra lo mismo en ausencia de embriones (Figura 5), nos indica que alguna señal embrionaria es inhibitoria sobre la producción uterina de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pero no modifica la producción de PGE.

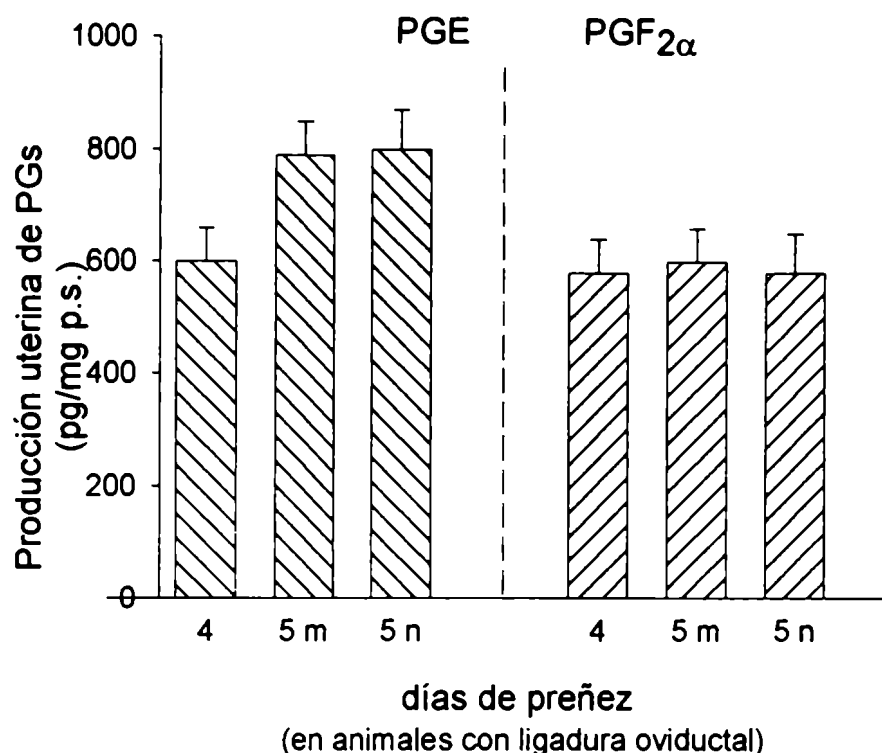


Figura 5: En ausencia de embriones en el útero no se modifican los niveles de producción uterina de PGE y PGF_{2α} durante la implantación.

La producción de PGE (izquierda) y PGF_{2α} (derecha) fue determinada en porciones uterinas aisladas de ratas preñadas con ligadura oviductal (sin embriones en el lumen uterino). Los animales fueron sometidos a ligadura oviductal bilateral en el día 2 de gestación, y fueron sacrificados en los días 4, 5 mañana (5 m) a las 11:00 horas, o 5 noche (5 n) a las 18:00 horas. Luego del sacrificio el útero fue aislado y sometido a incubación durante 60', luego de la cual se procedió a la determinación de PGs liberadas al medio por RIA. Los datos representan la media $\pm$ SEM; n=6.

A-5 Señales embrionarias modulan la síntesis uterina de PGs:

A continuación evaluamos la influencia de posibles factores embrionarios indicadores del estado de preñez, el PAF (O'Neill y col., 1989; O'Neill, 1985) y el IFN α (Motta y col., 1995), sobre la liberación de PGs uterinas luego de incubar el tejido durante 60 min. con dichos compuestos.

Cuando evaluamos el efecto del PAF adicionado al medio de incubación del tejido uterino obtenido durante los días peri-implantatorios de la preñez, sólo en la mañana

del día 5 obtuvimos un efecto modulador inhibitorio del PAF 10^{-6} M sobre la liberación de PGE ($p < 0,01$), **Figura 6**. En cambio, el PAF no tuvo efecto modulador sobre la secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$, **Figura 7**.

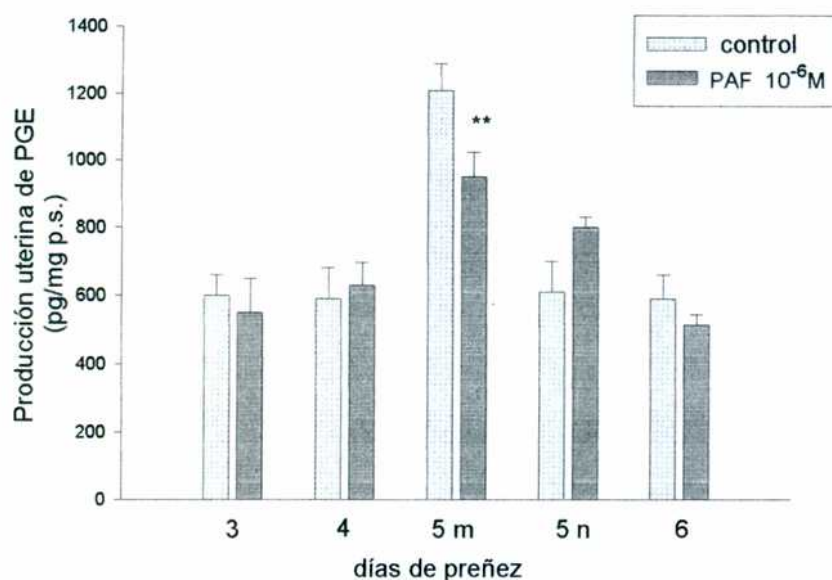


Figura 6: El PAF modula negativamente la producción uterina de PGE sólo en el día de la implantación.

La producción uterina de PGE fue determinada a lo largo del período implantatorio embrionario en presencia de PAF en el medio de incubación. Los animales fueron sacrificados en los días 3, 4, 5 mañana (5 m) a las 11:00 horas, o 5 noche (5 n) a las 18:00 horas y 6 de gestación, su útero aislado y sometido a incubación durante 60' en medio Krebs control o en presencia de PAF 10^{-6} M, luego de lo cual se procedió a la determinación de PGs liberadas al medio por RIA. **: $p < 0,01$ vs. control. Los datos representan la media $\pm$ SEM; $n=6$.

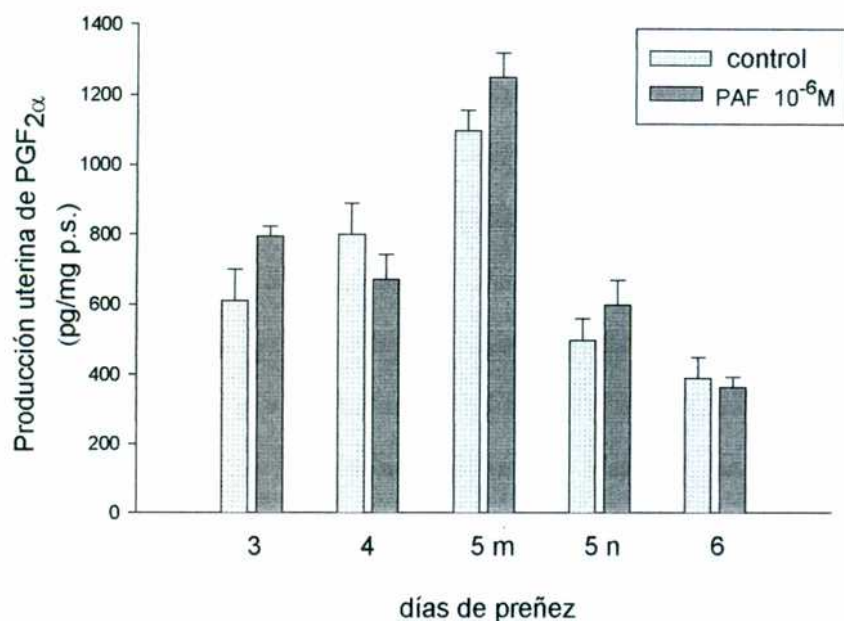


Figura 7: El PAF no modula la producción uterina de $\text{PGF}_{2\alpha}$ durante la peri-implantación.

La producción uterina de $\text{PGF}_{2\alpha}$ fue determinada a lo largo del período implantatorio embrionario en presencia de PAF en el medio de incubación. Los animales fueron sacrificados en los días 3, 4, 5 mañana (5 m) a las 11:00 horas, o 5 noche (5 n) a las 18:00 horas y 6 de gestación, su útero aislado y sometido a incubación durante 60' en medio Krebs control o en presencia de PAF 10^{-6} M, luego de lo cual se procedió a la determinación de PGs liberadas al medio por RIA. Los datos representan la media $\pm$ SEM; $n=6$.

En ratas preñadas en la mañana del día 5 sometidas a ligadura oviductal, el PAF 10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5} M "in vitro" tuvo el mismo efecto inhibitorio sobre PGE que en las controles no ligadas ($p<0,01$), sin modificar la producción de $\text{PGF}_{2\alpha}$, **Figura 8**.

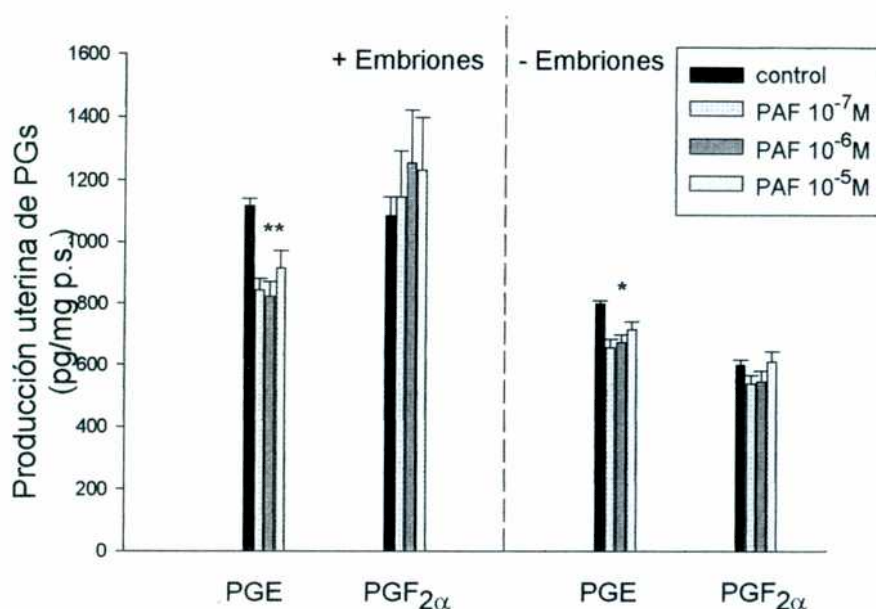


Figura 8: El efecto modulador del PAF sobre la producción uterina de PGs no depende de la presencia de los embriones en el útero.

El efecto del PAF sobre la producción uterina de PGE y PGF_{2α} fue determinado en la mañana del día 5 en animales preñados controles (+Embriones) y en animales preñados sometidos a ligadura oviductal en el día 2 de gestación (-Embriones). Los animales fueron sacrificados en el día indicado, su útero aislado y sometido a incubación durante 60' en medio Krebs control o en presencia de PAF 10⁻⁷, 10⁻⁶ o 10⁻⁵ M, luego de lo cual se procedió a la determinación de PGs liberadas al medio por RIA. **: p < 0,01 vs control. Los datos representan la media +/- SEM; n=6.

El IFN α en concentraciones de 10, 100 y 1000 U/ml provocó un incremento en la liberación tanto de PGE como de PGF_{2α} en ratas preñadas de día 5 controles (p<0,01), mientras que en las ligadas provocó un aumento de PGF_{2α} (p<0,01) pero no de PGE **Figura 9**.

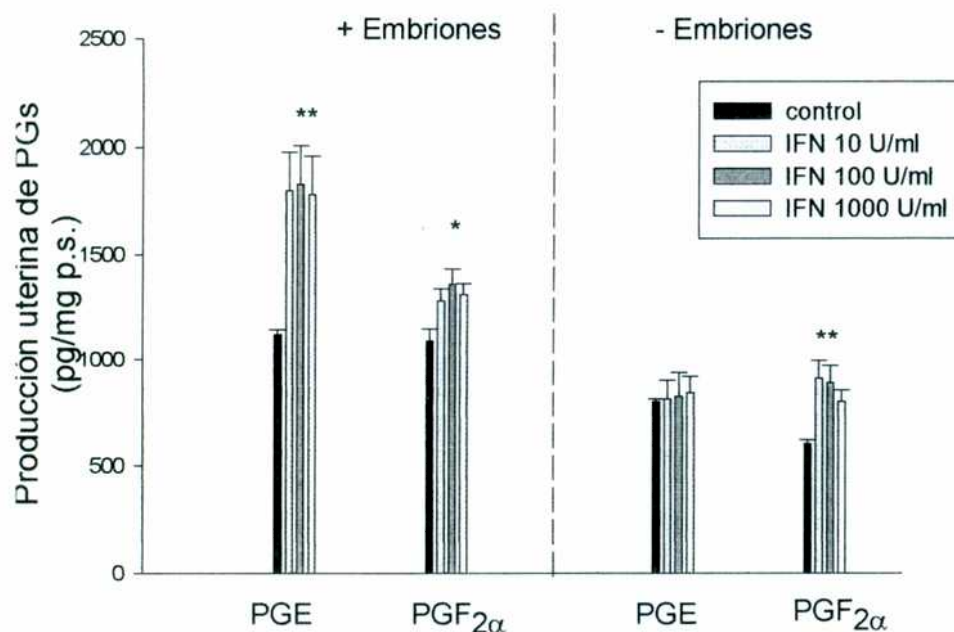


Figura 9: El IFN $_{\alpha}$ modula positivamente la producción uterina de PGE y PGF $_{2\alpha}$ independientemente de la presencia de los embriones en el útero.

El efecto del IFN $_{\alpha}$ sobre la producción uterina de PGE y PGF $_{2\alpha}$ fue determinado en la mañana del día 5 en animales preñados controles (+Embriones) y en animales preñados sometidos a ligadura oviductal en el día 2 de gestación (-Embriones). Los animales fueron sacrificados en el día 5 de gestación, su útero aislado y sometido a incubación durante 60' en medio Krebs control o en presencia de IFN $_{\alpha}$ 10, 100 y 1000 U/ml, luego de lo cual se procedió a la determinación de PGs liberadas al medio por RIA. **: p < 0,01 vs. control; *: p < 0,05 vs. control. Los datos representan la media $\pm$ SEM; n=6.

Sin embargo el IFN $_{\alpha}$ no tuvo efecto alguno sobre la producción de PGE ni PGF $_{2\alpha}$ en los días 3 y 6 de gestación **Figura 10**.

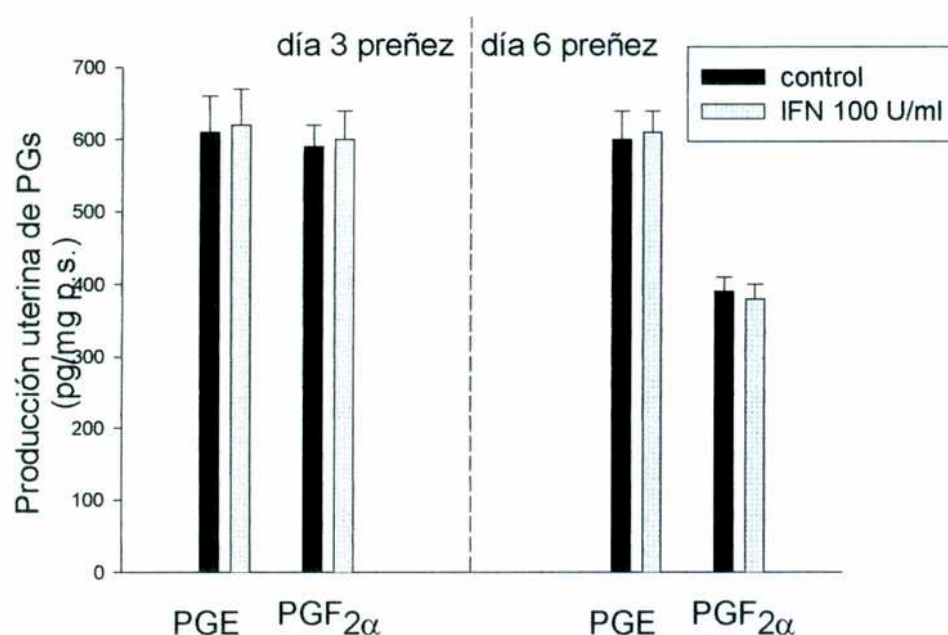


Figura 10: El efecto del IFN_{α} sobre la producción uterina de PGE y PGF_{α} no se observa ni en pre ni en post-implantación.

El efecto de IFN_{α} sobre la producción uterina de PGE y $PGF_{2\alpha}$ fue determinado en días pre y post-implantatorios, días 3 y 6 respectivamente. Los animales fueron sacrificados en los días indicados, su útero aislado y sometido a incubación durante 60' en medio Krebs control o en presencia de IFN_{α} 100 U/ml, luego de lo cual se procedió a la determinación de PGs liberadas al medio por RIA. Los datos representan la media $\pm$ SEM; $n=6$.

Conclusión sección (A)

El incremento en la actividad uterina de PLA_2 en la mañana del día 5 de gestación, probablemente bajo estimulación esfrogénica, permitiría un aumento simultáneo en los niveles de PGE y $PGF_{2\alpha}$ liberadas por el tejido uterino. Sin embargo, el blastocisto debe estar presente para modificar la producción uterina de dichas PGs en forma adecuada para que ocurra la nidación.

Es así como señales embrionarias tales como el PAF y el IFN_{α} ejercerían su regulación sobre la producción uterina de PGE y $PGF_{2\alpha}$ exclusivamente en el momento de la implantación.

Sección B:**Actividad uterina de la enzima NOS en el período peri-implantatorio****B-1 Actividad de la NOS en útero aislado de ratas en días peri-implantatorios de la preñez:**

Sabiendo que el útero de rata presenta actividad de la NOS (Dong y col., 1996; Shew y col., 1993; Suburo y col., 1995), evaluamos dicha actividad a lo largo del período peri-implantatorio, **Figura 11**. Observamos un incremento gradual en la actividad enzimática desde el día previo a la implantación (día 4 $p < 0,01$ vs día 3 y estro) hasta la mañana del día 5, cuyo la NOS alcanza el nivel máximo con respecto a un control (rata no preñada en estro) ($p < 0,001$). Esta actividad permanece elevada en la noche ($p < 0,001$ vs. días 3, 4 y 6) y luego, en el día 6, retorna a los valores pre-implantatorios.

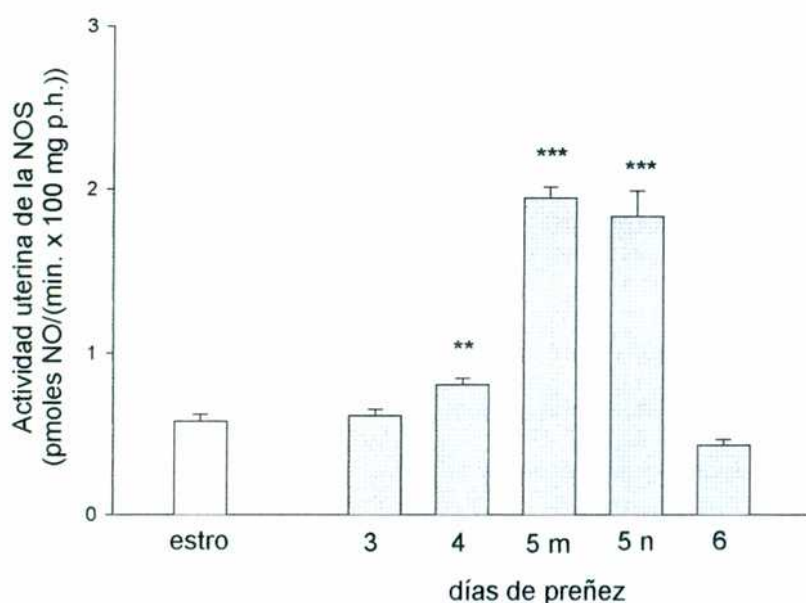


Figura 11: La actividad uterina de la NOS está incrementada durante la implantación embrionaria en la rata.

La actividad uterina de la NOS fue determinada por el ensayo de conversión de [14 C]-arginina a

[¹⁴C]-citrulina en homogenatos de tejido uterino aislado de ratas preñadas durante la peri-implantación embrionaria. Las ratas fueron sacrificadas en estro (como control no preñado) o en los días 3, 4, 5 mañana (5m) a las 11:00 horas, 5 noche (5 n) a las 18:00 horas, y 6 de preñez. Luego del sacrificio, el útero fue aislado y sometido a la determinación enzimática. ***: $p < 0,001$ vs. estro y días 3, 4 y 6; **: $p < 0,01$ vs. estro y días 3 y 6. Los datos representan la media $\pm$ SEM; $n=8$.

B-2 Modulación "in vitro" de NOS sobre la enzima PLA₂:

Teniendo en cuenta el incremento coincidente en la actividad de ambas enzimas en el momento de la implantación embrionaria, evaluamos un posible efecto modulador de la actividad de la NOS sobre la actividad de la PLA₂ en días pre, post e implantatorios.

Para ello, analizamos el efecto de incubar el tejido uterino durante 60 min. con NP 300 μ M como donante de NO al medio de incubación. La actividad fosfolipásica se muestra en la **Figura 12**. El generador de NO no parece tener efecto sobre la actividad fosfolipásica del tejido uterino ni antes (día 3) ni durante (día 5) la implantación.

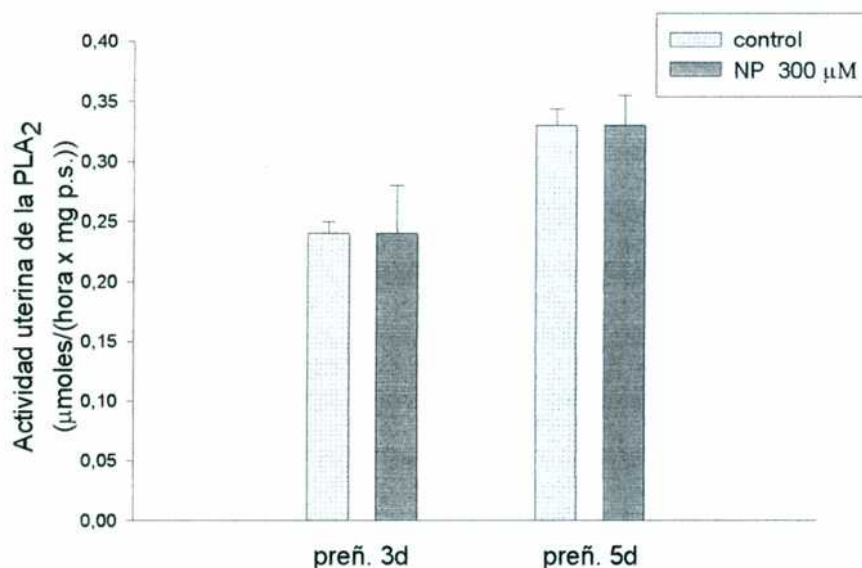


Figura 12: La actividad uterina de la PLA₂ no se modifica en presencia de un liberador de NO. La actividad de la enzima PLA₂ fue determinada mediante un ensayo colorimétrico de acidificación del medio, en porciones uterinas aisladas de ratas preñadas de día 3 (pre-implantación) o 5 (implantación). Las ratas fueron sacrificadas en el momento indicado, el útero aislado, incubado durante 60' en un medio Krebs control o en presencia de 300 μM de NP (un donante de NO) y luego sometido a la determinación enzimática. Los datos representan la media $\pm$ SEM; n=6.

En la **Figura 13** se muestra el efecto de un inhibidor específico de la enzima NOS, el L-NMMA, actuando en una concentración de 1mM directamente sobre el homogenato uterino durante 15 min.. No se observan alteraciones en la actividad de la PLA₂ por efecto de la droga, en útero de ratas en períodos pre y post-implantatorio y de ratas ovariectomizadas con sustitución estrogénica donde la actividad de la PLA₂ está incrementada como señalamos anteriormente (Figura 2).

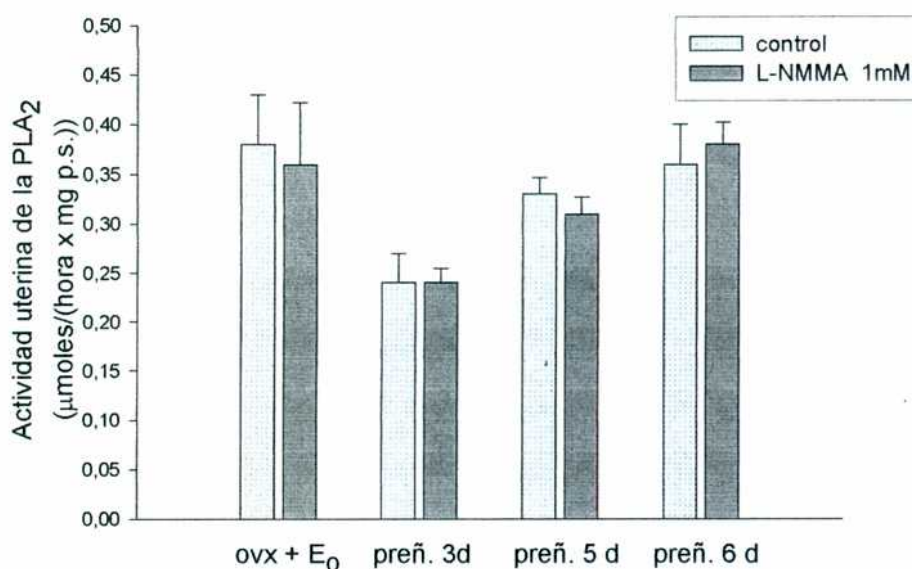


Figura 13: La actividad uterina de la PLA₂ no se modifica en presencia de un inhibidor de la enzima NOS.

La actividad de la enzima PLA₂ fue determinada mediante un ensayo colorimétrico de acidificación del medio, en porciones uterinas aisladas de ratas ovariectomizadas con sustitución estrogénica (ovx+E₀), o preñadas de día 3, 5 o 6. Las ratas fueron sacrificadas en el momento indicado, el útero aislado y homogeneizado. El homogenato tisular fue incubado durante 15' en un medio Krebs control o en presencia de 1 mM de L-NMMA (un inhibidor competitivo de la enzima NOS) y luego sometido a la determinación enzimática. Los datos representan la media $\pm$ SEM; n=6.

Cabe aclarar que, la menor actividad enzimática luego de la incubación del tejido uterino o de su homogenato (Figuras 12 y 13), con respecto a la actividad enzimática en condiciones basales (inmediatamente luego del sacrificio) (Figuras 1 y 2), probablemente se deba al efecto de la incubación per se.

B-3 Efecto de la modulación de la actividad de la NOS sobre la síntesis de PGs uterinas en el día de la implantación:

Considerando los resultados previos, donde observamos que el NO no modifica la actividad de la enzima PLA₂, pero que existe un aumento coincidente en la actividad de ambos sistemas durante la implantación embrionaria, proseguimos a

evaluar si el sistema nitridérgico ejerce un efecto modulador a nivel de la síntesis de PGs.

Está descripta (Rettori y col., 1992; Franchi y col., 1994; Salvemini y col., 1993) una acción activadora del NO actuando sobre el hierro del grupo hemo de la enzima ciclooxygenasa, responsable de la síntesis de prostanoïdes desde su precursor, el ácido araquidónico.

Analizamos la influencia del agregado "in vitro" de NP 300 μM al medio de incubación de porciones uterinas durante 60 min., evaluando los niveles de PGE y $\text{PGF}_{2\alpha}$ liberados al medio, **Figuras 14 y 15**. El análisis estadístico determinó que el dador de NO estimula la liberación de PGE sin modificar la de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en el día 6 de preñez ($p < 0,01$) e inhibe la liberación de PGE ($p < 0,05$) y $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($P < 0,001$) en la noche del día 5 de preñez.

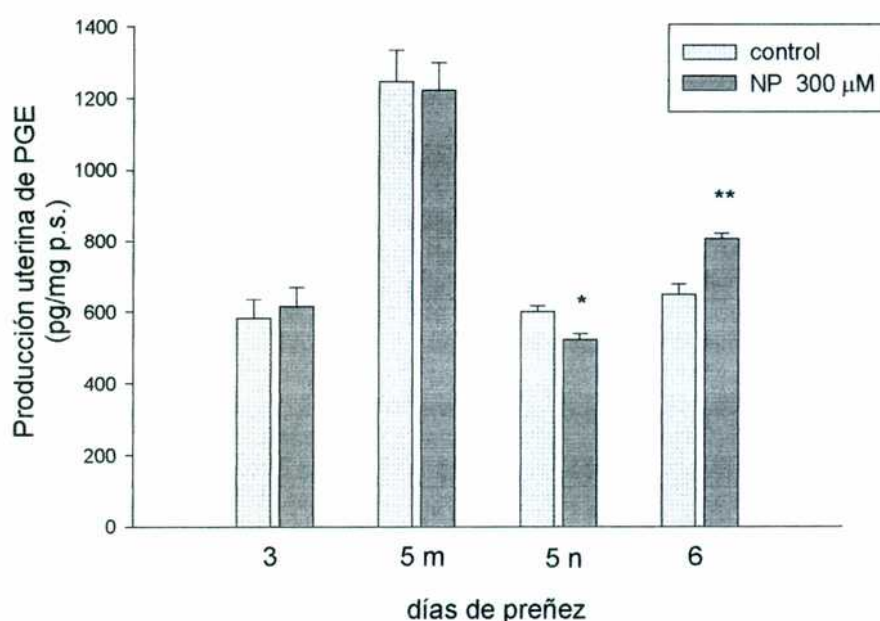


Figura 14: El NP modula la producción uterina de PGE durante la implantación.

La producción uterina de PGE fue determinada a lo largo del período peri-implantatorio embrionario en presencia de NP en el medio de incubación. Los animales fueron sacrificados en los días 3, 5 mañana (5 m) a las 11:00 horas, o 5 noche (5 n) a las 18:00 horas y 6 de gestación,

su útero aislado y sometido a incubación durante 60' en medio Krebs control o en presencia de NP 300 μ M, luego de lo cual se procedió a la determinación de PGs liberadas al medio por RIA. **: $p < 0,01$ vs. control; *: $p < 0,05$ vs. control. Los datos representan la media $\pm$ SEM; $n=6$.

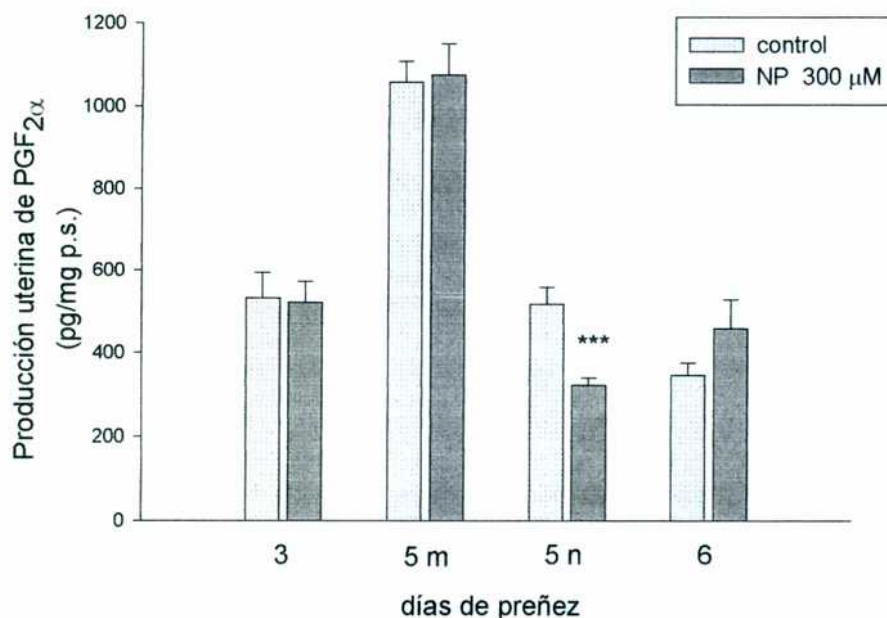


Figura 15: El NP modula la producción uterina de PGF_{2α} durante la implantación.

La producción uterina de PGF_{2α} fue determinada a lo largo del período peri-implantatorio embrionario en presencia de NP en el medio de incubación. Los animales fueron sacrificados en los días 3, 5 mañana (5 m) a las 11:00 horas, o 5 noche (5 n) a las 18:00 horas y 6 de gestación, su útero aislado y sometido a incubación durante 60' en medio Krebs control o en presencia de NP 300 μ M, luego de lo cual se procedió a la determinación de PGs liberadas al medio por RIA. ***: $p < 0,001$ vs. control. Los datos representan la media $\pm$ SEM; $n=6$.

También analizamos el efecto de L-NAME, un inhibidor competitivo de la enzima NOS, sobre la liberación uterina de PGE y PGF_{2α} al medio de incubación durante 60 min.. Como podemos observar en las **Figuras 16 y 17**, la producción de PGE (pero no de PGF_{2α}) se redujo por efecto de L-NAME 600 μ M ($p < 0,05$), exclusivamente en la mañana del día 5 y no en días previos.

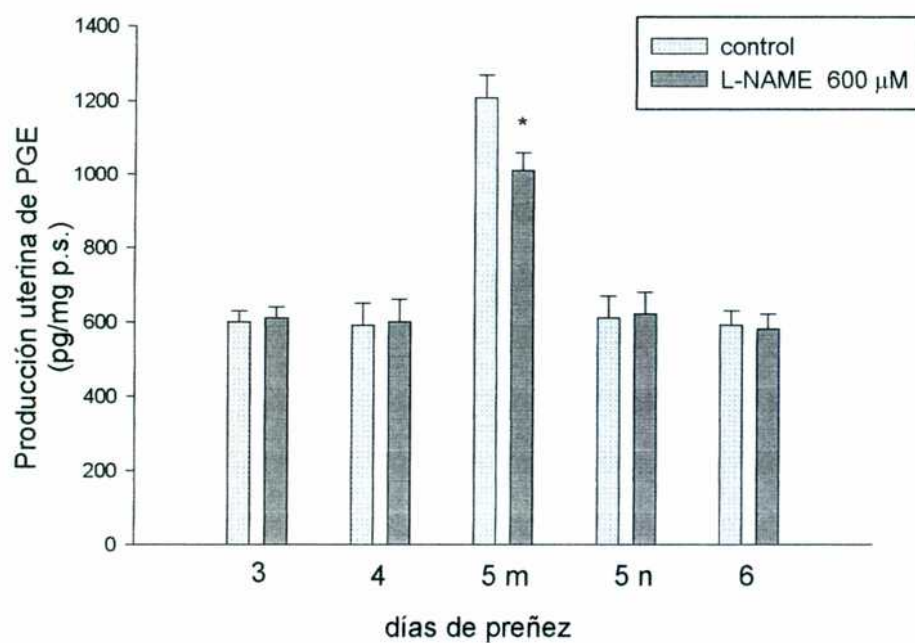


Figura 16: El L-NAME inhibe la producción uterina de PGE sólo en el día de la implantación.

La producción uterina de PGE fue determinada a lo largo del período implantatorio embrionario en presencia de L-NAME en el medio de incubación. Los animales fueron sacrificados en los días 3, 4, 5 mañana (5m) a las 11:00 horas, 5 noche (5 n) a las 18:00 horas, y 6 de gestación, su útero aislado y sometido a incubación durante 60' en medio Krebs control o en presencia de L-NAME 600 μM. Luego de la incubación se procedió a la determinación de PGs liberadas al medio por RIA. *: $p < 0,05$ vs. control. Los datos representan la media $\pm$ SEM; $n=6$.

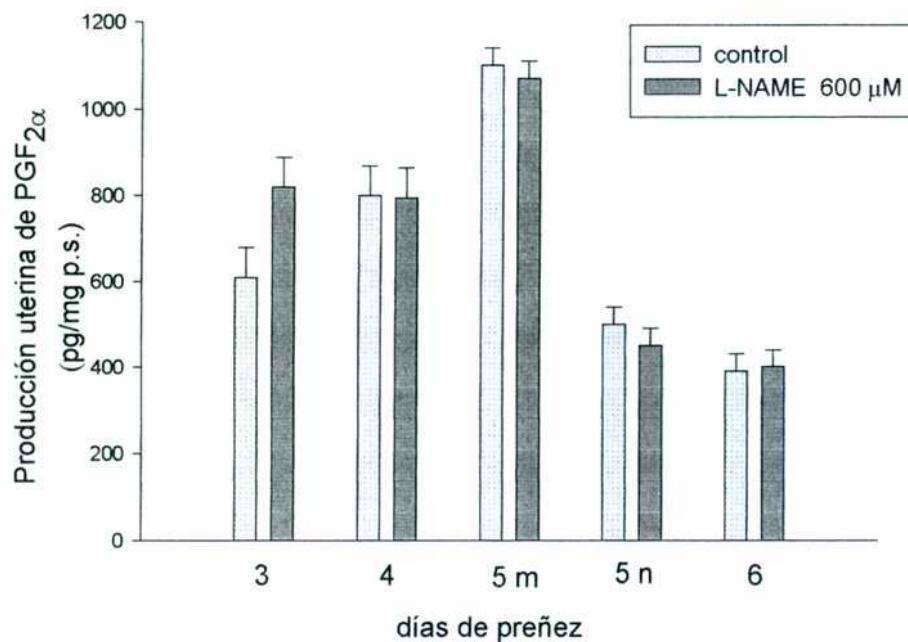


Figura 17: El L-NAME no modifica la producción uterina de $PGF_{2\alpha}$ durante la peri-implantación. La producción uterina de $PGF_{2\alpha}$ fue determinada a lo largo del período implantatorio embrionario en presencia de L-NAME en el medio de incubación. Los animales fueron sacrificados en los días 3, 4, 5 mañana (5m) a las 11:00 horas, 5 noche (5 n) a las 18:00 horas, y 6 de gestación, su útero aislado y sometido a incubación durante 60' en medio Krebs control o en presencia de L-NAME 600 μ M. Luego de la incubación se procedió a la determinación de PGs liberadas al medio por RIA. Los datos representan la media $\pm$ SEM; n=6.

En la **Figura 18** podemos observar en porciones uterinas aisladas en la mañana del día 5 de preñez, que mientras la producción de PGE se reduce por incubaciones con L-NAME 600 μ M ($p < 0,05$) y 1000 μ M ($p < 0,01$), la de $PGF_{2\alpha}$ sólo se reduce con 1000 μ M de L-NAME ($p < 0,05$).

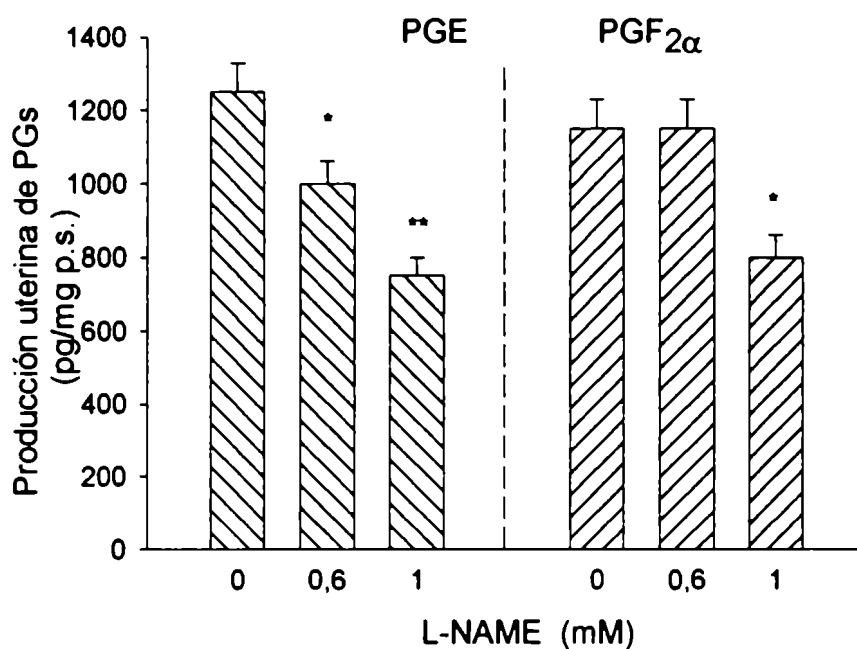


Figura 18: El L-NAME inhibe la producción uterina de PGs en el día 5 de gestación.

La producción uterina de PGE y PGF_{2α} fue determinada en el día de la implantación embrionaria en presencia de L-NAME en el medio de incubación. Los animales fueron sacrificados en la mañana del día 5 de gestación, su útero aislado y sometido a incubación durante 60' en medio Krebs control o en presencia de L-NAME 0,6 o 1 mM. Luego de la incubación se procedió a la determinación de PGs liberadas al medio por RIA. *: $p < 0,05$ vs control; **: $p < 0,01$ vs. control. Los datos representan la media $\pm$ SEM; $n=6$.

Este efecto del L-NAME en el día 5 de preñez es específico ya que su esteroisómero inactivo, el D-NAME 1 mM no tuvo ningún efecto comparado con el control **Figura 19**.

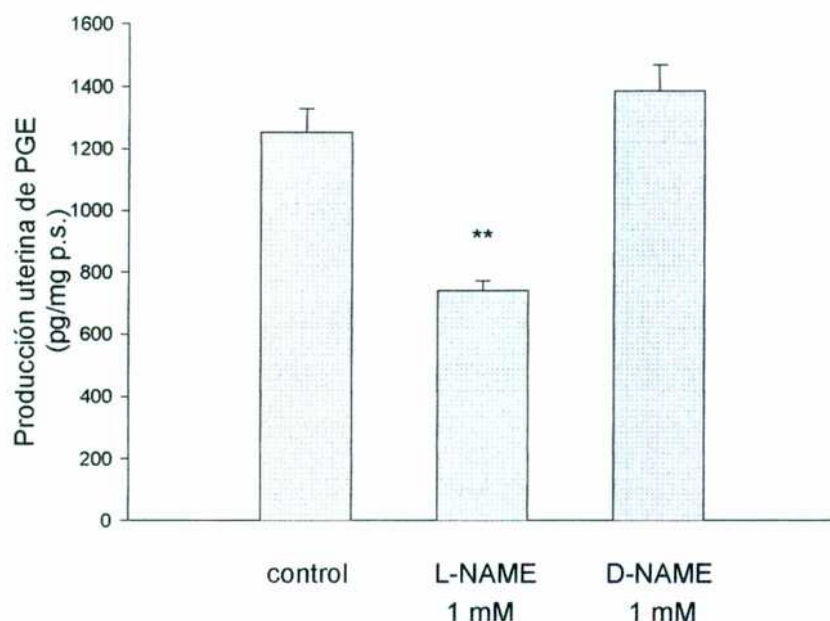


Figura 19: El D-NAME no tiene efecto sobre la producción uterina de PGE en el día 5 de gestación.

La producción uterina de PGE fue determinada en el día de la implantación embrionaria en presencia de D-NAME (esteroisómero inactivo) en el medio de incubación. Los animales fueron sacrificados en la mañana del día 5 de gestación, su útero aislado y sometido a incubación durante 60' en medio Krebs control o en presencia de L-NAME o D-NAME 1 mM. Luego de la incubación se procedió a la determinación de PGs liberadas al medio por RIA. **: $p < 0,01$ vs. control. Los datos representan la media $\pm$ SEM; $n=6$.

B-4 Los embriones condicionan la modulación de la síntesis de PGs uterinas

por el NO en el día de la implantación:

Cuando el efecto de L-NAME 600 μ M fue evaluado en porciones uterinas aisladas de ratas gestantes con ligadura oviductal, es decir, en ausencia de embriones en el lumen uterino, observamos un efecto contrario al descrito en los animales preñados controles. Se observa un incremento en la producción tisular de PGE y $\text{PGF}_{2\alpha}$ en presencia de L-NAME con respecto al control ($p < 0,01$). Este efecto fue exclusivamente en el día 5 por la mañana, lo cual nos estaría confirmando que la producción tisular de PGs está bajo regulación del embrión per se o de alguna

señal embrionaria en el día de la implantación **Figuras 20 y 21.**

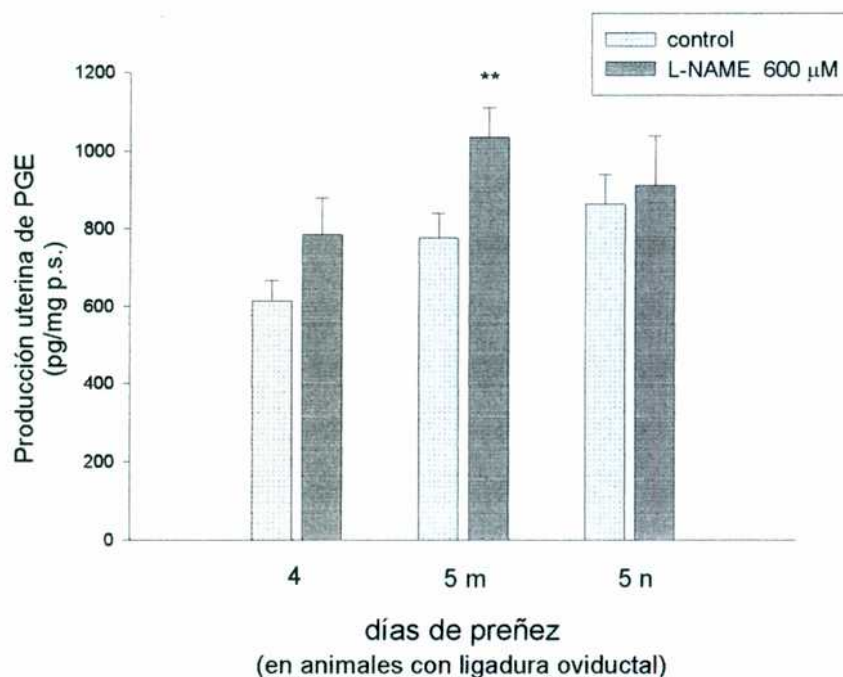


Figura 20: El L-NAME estimula la producción uterina de PGE en el día 5 de gestación en ausencia de embriones en el lumen.

La producción uterina de PGE fue determinada en presencia de L-NAME en el medio de incubación, en animales preñados en peri-implantación que sufrieron ligadura oviductal en el día 2 de gestación. Los animales fueron sacrificados en el día 4, 5 mañana (5 m) a las 11:00 horas, o 5 noche (5 n) a las 18:00 horas, su útero aislado y sometido a incubación durante 60' en medio Krebs control o en presencia de L-NAME 600 μM. Luego de la incubación se procedió a la determinación de PGs liberadas al medio por RIA. **: $p < 0,01$ vs control. Los datos representan la media $\pm$ SEM; $n=6$.

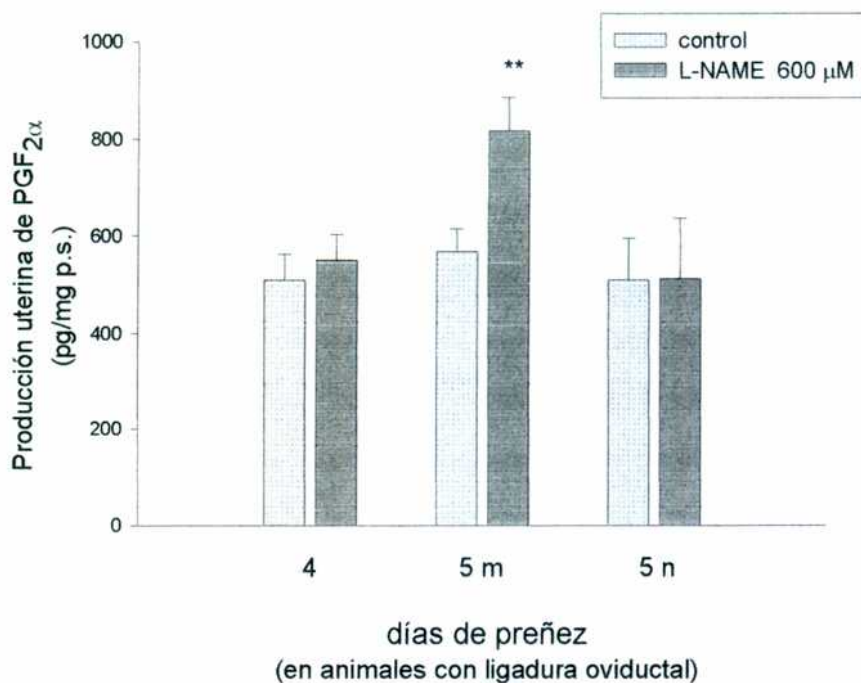


Figura 21: El L-NAME estimula la producción uterina de $PGF_{2\alpha}$ en el día 5 de gestación en ausencia de embriones en el lumen.

La producción uterina de $PGF_{2\alpha}$ fue determinada en presencia de L-NAME en el medio de incubación, en animales preñados en peri-implantación que sufrieron ligadura oviductal en el día 2 de gestación. Los animales fueron sacrificados en el día 4, 5 mañana (5 m) a las 11:00 horas, o 5 noche (5 n) a las 18:00 horas, su útero aislado y sometido a incubación durante 60' en medio Krebs control o en presencia de L-NAME 600 μ M. Luego de la incubación se procedió a la determinación de PGs liberadas al medio por RIA. **: $p < 0,01$ vs control. Los datos representan la media $\pm$ SEM; $n=6$.

B-5 Presencia de los embriones en el útero y actividad NOS:

Previamente hemos determinado que la producción uterina de PGs está modulada tanto por la producción de NO como por la presencia de embriones en el lumen uterino. Estos resultados plantearon la posibilidad de que alguna sustancia derivada de los blastocistos modulara la actividad NOS, que a su vez regulara la producción de PGs. Por esta razón, evaluamos el efecto de bloquear la presencia de los embriones en el útero mediante ligadura oviductal, sobre el incremento en la actividad NOS observado en el día 5 de preñez.

Como podemos ver en la **Figura 22**, la ausencia de embriones en el útero (derecha) no modifica el perfil basal de actividad NOS (izquierda) (idem Figura 11), tanto antes, durante como después de la implantación. Esto sugiere que el incremento en la actividad uterina durante la implantación se halla principalmente bajo influencia del ambiente hormonal materno. Además, se ha podido determinar que la cantidad de NO producido por el tejido uterino en ausencia de embriones es aún mayor que en el útero con embriones, ($p < 0,001$) en todos los días analizados.

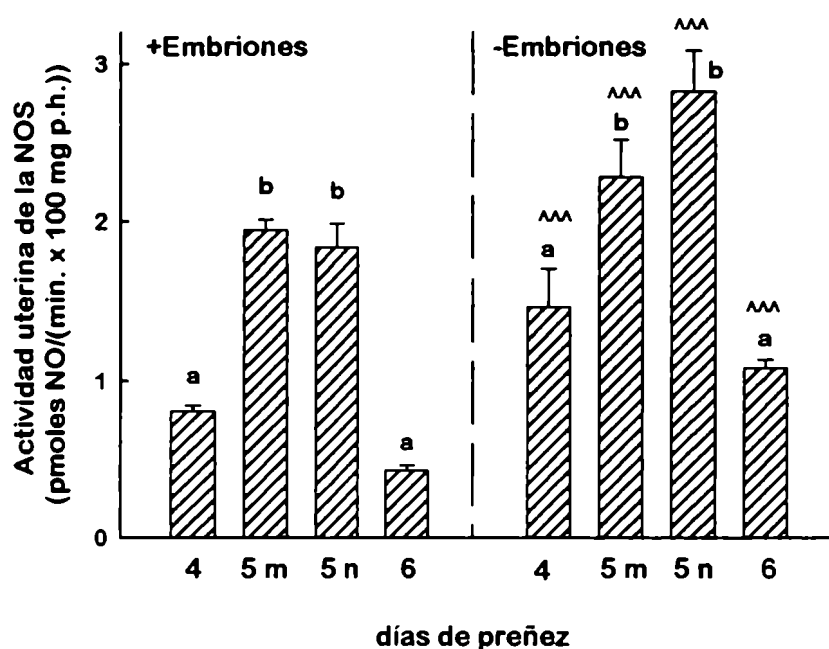


Figura 22: El perfil de actividad uterina de la NOS durante la peri-implantación no depende de la presencia de los embriones en el útero.

La actividad NOS fue determinada por el ensayo de conversión de [14 C]-arginina a [14 C]-citrulina en homogenatos de tejido uterino obtenido en diferentes días de la preñez en ratas sham (+Embriones) o en ratas con ligadura oviductal en el día 2 (-Embriones) durante días peri-implantatorios de la preñez. Las ratas fueron sacrificadas en los días 4, 5 mañana (5m) a las 11:00 horas, 5 noche (5 n) a las 18:00 horas, y 6 de preñez, el útero aislado y sometido a la determinación enzimática. ^^: $p < 0,001$ (-Embriones) vs. (+Embriones) en cada día. Letras diferentes ('a', 'b') representan diferencias significativas dentro de cada grupo. Los datos representan la media $\pm$ SEM; $n=8$.

B-6 Señales embrionarias modulan "in vitro" la actividad NOS uterina:

Evaluamos a continuación, posibles señales embrionarias que podrían estar modulando la actividad NOS uterina.

La **FIGURA 23** nos muestra que el PAF 10^{-6} M, IFN $_{\alpha}$ 100 U/ml, PGE y PGF $_{2\alpha}$ 10^{-6} M, agregados al medio de incubación tisular, no alteran la actividad de NOS uterina en la mañana del día 5 de preñez. En los animales con ligadura oviductal, la incubación con PAF 10^{-6} M, PGE o PGF $_{2\alpha}$ (10^{-6} , 10^{-8} y 10^{-10} M) incrementó la actividad de la enzima NOS ($p < 0,01$). Por su parte, el IFN $_{\alpha}$ (10, 100 y 1000 U/ml) no alteró dicha actividad.

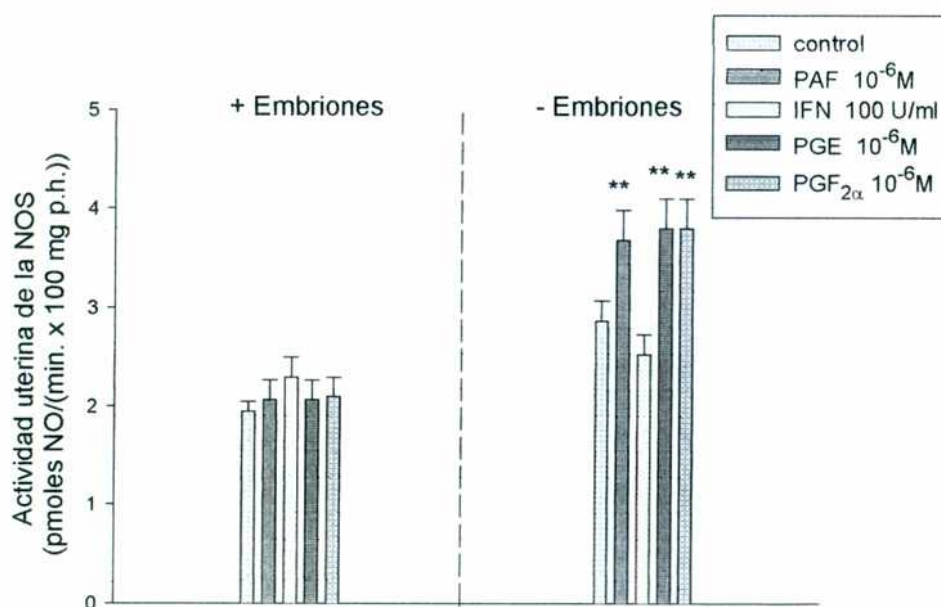


Figura 23: La actividad uterina de la NOS puede ser modulada por PAF y PGs en ausencia de embriones en el lumen.

La actividad uterina de la NOS fue determinada por el ensayo de conversión de [14 C]-arginina a [14 C]-citrulina en homogenatos de tejido uterino aislado de ratas preñadas de día 5 controles (+Embriones) o de día 5 que sufrieron ligadura oviductal en el día 2 de gestación (-Embriones). Las ratas fueron sacrificadas en la mañana del día 5 de preñez, el útero aislado e incubado durante 60' en presencia de PAF, PGE o PGF $_{2\alpha}$ 10^{-6} M o IFN $_{\alpha}$ 100 U/ml. Luego de la incubación, el tejido fue sometido a la determinación enzimática. No se observaron diferencias con otras dosis de PGs (10^{-8} y 10^{-10} M) y de IFN $_{\alpha}$ (10 y 1000 U/ml) por lo que no se muestran en la figura. **: $p < 0,01$ vs. control. Los datos representan la media $\pm$ SEM; n=6.

Conclusión sección (B)

Estos resultados implican la existencia de un sistema nitridérgico que modula la producción de PGs en el útero de rata durante la implantación embrionaria. Este efecto es en un nivel posterior al de la enzima PLA₂, ya que ésta no es regulada por el NO.

La regulación de la producción de PGs y de la actividad de la NOS se modifican en ausencia del embrión. Hemos determinado que la PGE, PGF_{2α} y el PAF de origen uterino o embrionario, actúan como activadores de la enzima NOS sólo en ausencia de embriones en el lumen, es decir, dependiendo de los niveles endógenos maternos de los agentes mencionados.

Sección C:**Caracterización de la enzima NOS uterina durante la peri-implantación:****C-1 Inhibición "in vivo" de la actividad de la NOS con dexametasona:**

Sabiendo que la expresión génica de la NOS, puede inhibirse con la administración de glucocorticoides (Knowles y col., 1990), evaluamos el efecto de la dexametasona administrada "in vivo" sobre la actividad uterina total de la NOS desde el día 3 al 5 de preñez y se muestra en la **Figura 24**. La dexametasona administrada i.p. en 2 dosis de 1 mg/kg. en el día 3 de preñez, inhibió el incremento en la actividad de NOS registrado en el día 4 (grupo I dexametasona vs. control, $p < 0,01$). En cambio, la actividad enzimática en el día 5 de preñez no fue inhibida por dexametasona inyectada el día anterior (grupo II dexametasona vs. control), ni por dexametasona inyectada en 4 dosis en los días 3 y 4 de preñez (grupo III dexametasona vs. control).

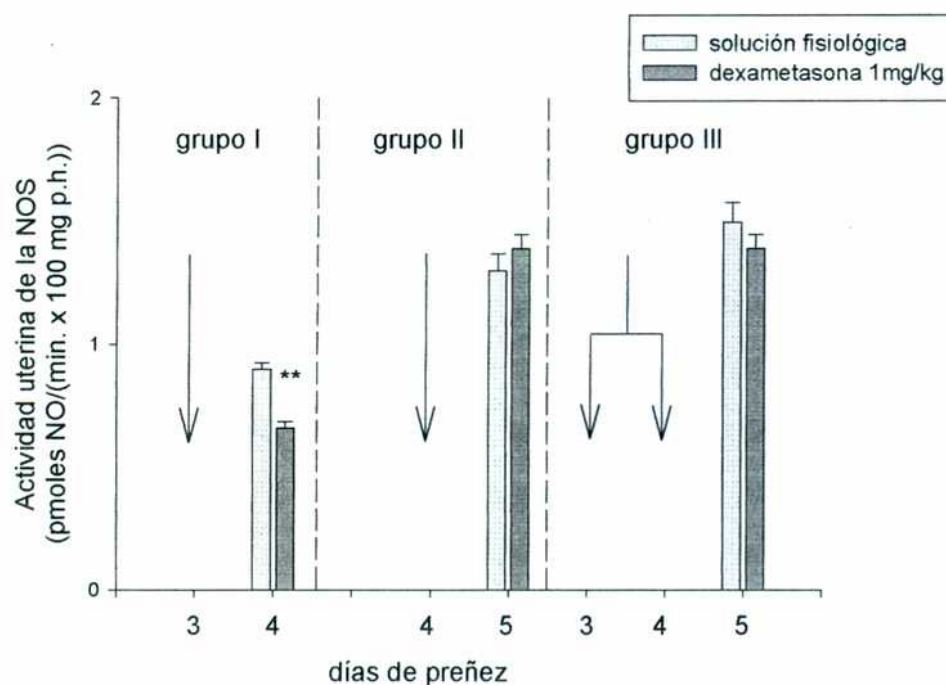


Figura 24: La actividad uterina de la NOS en el día 4 pero no en el día 5 de preñez, se inhibe mediante el tratamiento "in vivo" con dexametasona.

Actividad de la enzima NOS en ratas preñadas, tratadas según distintos grupos:

Grupo I: fue inyectado i.p. con 50 μ l de solución salina fisiológica (control), o 1 mg/kg. de peso corporal de dexametasona. Las inyecciones fueron 2, a las 12:00 y 24:00 horas del día 3 de preñez, y los animales fueron sacrificados en el día 4 a las 12:00 horas.

Grupo II: fue inyectado i.p. con 50 μ l de solución salina fisiológica (control), o 1 mg/kg. de peso corporal de dexametasona. Las inyecciones fueron 2, a las 12:00 y 24:00 horas del día 4 de preñez, y los animales fueron sacrificados en el día 5 a las 12:00 horas.

Grupo III: fue inyectado i.p. con 50 μ l de solución salina fisiológica (control), o 1 mg/kg. de peso corporal de dexametasona. Las inyecciones fueron 4, a las 12:00 y 24:00 horas del día 3 de preñez y a las 12:00 y 24:00 horas del día 4 de preñez, y los animales fueron sacrificados en el día 5 a las 12:00 horas.

Luego del sacrificio, el tejido uterino fue aislado y sometido a la determinación de actividad enzimática por el ensayo de conversión de [14 C]-arginina a [14 C]-citrulina en homogenatos tisulares. **: $p < 0,01$ dexametasona vs. salina (grupo I). Los datos representan la media $\pm$ SEM; $n=6$.

Estos resultados nos estarían indicando la presencia de diferentes isoformas de la enzima NOS activas durante la preñez temprana en la rata, o bien que la sensibilidad a los glucocorticoides cambia.

C-2 Isoformas de la NOS presentes en el útero durante la implantación**embrionaria:**

Con el fin de caracterizar la predominancia de isoformas de la NOS (según su dependencia con respecto al Ca^{2+}), activas en el útero durante los días peri-implantatorios, evaluamos la actividad NOS en presencia o ausencia de Ca^{2+} en el medio de incubación. La **Figura 25** muestra que la actividad Ca^{2+} -independiente está inducida por poco tiempo al iniciarse el proceso implantatorio (la noche del día 5 de gestación) ($p < 0,001$), declinando rápidamente en el día 6 a valores similares a un estro correspondiente a rata no preñada. La actividad Ca^{2+} -dependiente comienza a incrementarse en el día 4 ($p < 0,01$) y alcanza el máximo en la mañana del día de la implantación ($p < 0,001$). En la noche del día 5, al iniciarse la implantación, la actividad Ca^{2+} -dependiente comienza a decaer ($p < 0,05$), y en el día 6 retorna a los valores del día 4 (pre-implantatorios).

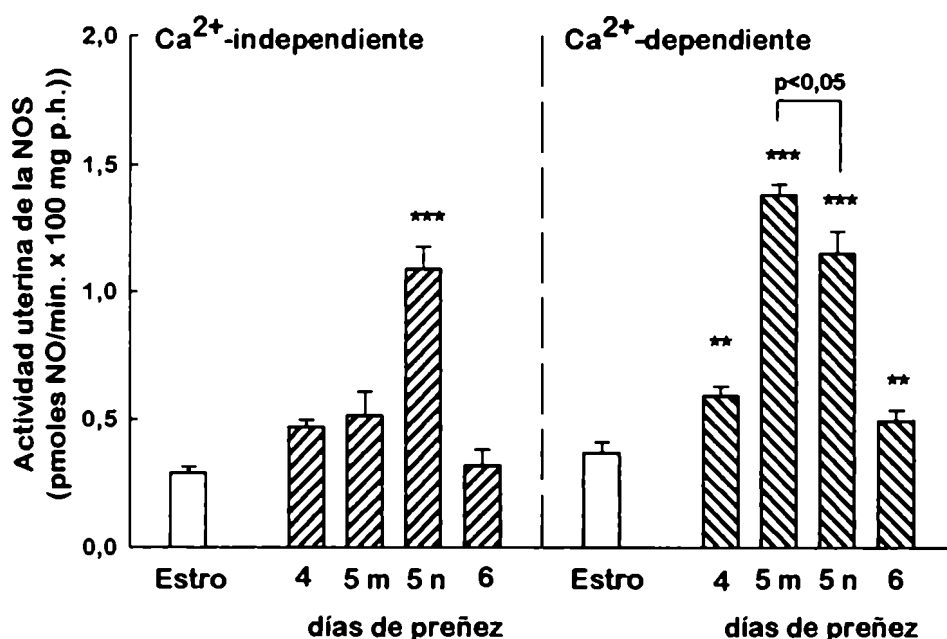


Figura 25: Las isoformas Ca^{2+} -dependiente y Ca^{2+} -independiente de la NOS presentan un máximo de actividad uterina en el momento en que se inicia el proceso implantatorio embrionario.

La actividad de las distintas isoformas de la NOS fue determinada por el ensayo de conversión de [¹⁴C]-arginina a [¹⁴C]-citrulina en homogenatos de tejido uterino obtenido de ratas sacrificadas en estro (como control no preñado) o en los días 4, 5 mañana (5m) a las 11:00, 5 noche (5 n) a las

18:00 horas, y 6 de preñez. ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$ dentro de cada grupo. Los datos representan la media $\pm$ SEM; $n=7$.

C-3 Modulación "in vivo" de la actividad NOS uterina por estradiol, efecto del Tamoxifeno:

Las evidencias experimentales parecen sugerir que factores maternos serían los principales moduladores de la actividad uterina de la NOS, debido a que el perfil basal de la actividad enzimática no se modifica en ausencia de embriones en el lumen uterino (Figura 22). Por otra parte, hemos determinado que la PGE, la $\text{PGF}_{2\alpha}$ y el PAF de origen uterino o embrionario, actúan como activadores de la enzima NOS sólo en ausencia de embriones en el lumen uterino (Figura 23). Intentamos entonces caracterizar un factor materno que regule "in vivo" la actividad enzimática.

Para determinar si el incremento en la actividad NOS en el día 5 es dependiente de regulación por estradiol, cuya concentración se incrementa en el día 4 de gestación en la rata (Watson y col., 1975; Shaikh, 1971), hemos analizado el efecto "in vivo" del Tamoxifeno, un antagonista uterino de la hormona, sobre la actividad NOS.

Como se observa en la **Figura 26**, el tratamiento con 0,2 mg/kg. peso corporal de citrato de Tamoxifeno i.p. en el día 2 de preñez, reduce la actividad de ambas isoformas de la NOS en el día 5, a valores comparables con valores pre-implantatorios ($p < 0,05$ en día 5 por la mañana; $p < 0,001$ en día 5 por la noche).

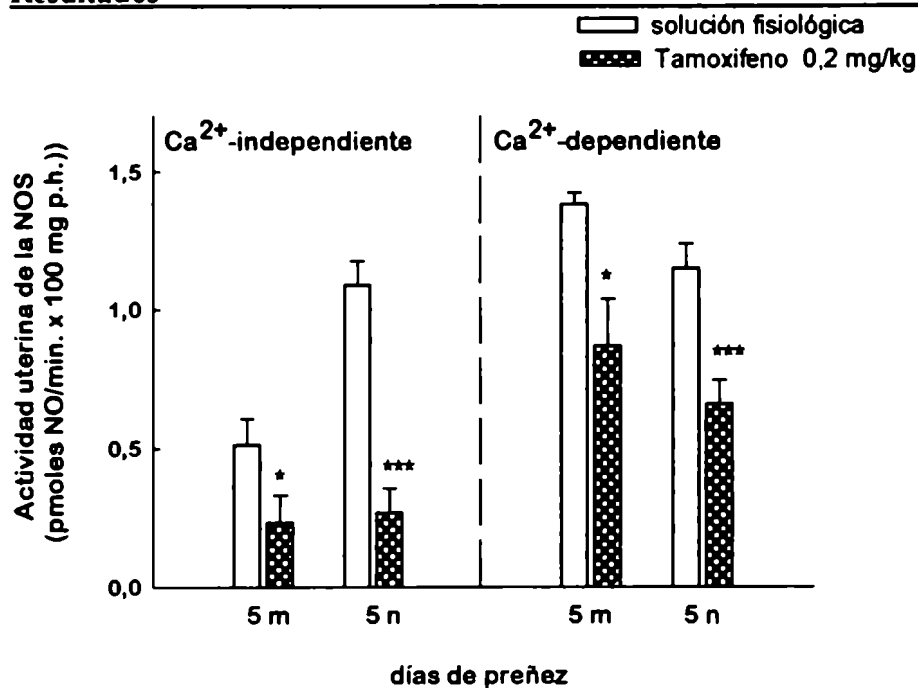


Figura 26: En el día de la implantación embrionaria, la isoforma Ca^{2+} -independiente de la NOS presenta una regulación estrogénica mayor que la isoforma Ca^{2+} -dependiente.

La actividad de las distintas isoformas de la NOS fue determinada por el ensayo de conversión de [^{14}C]-arginina a [^{14}C]-citrulina en homogenatos de tejido uterino obtenido de ratas inyectadas i.p. con 100 μL de vehículo (solución salina) o 0,2 mg/kg de citrato de Tamoxifeno (un antagonista de estradiol) en el día 2 de preñez. Las ratas fueron sacrificadas en el día de la implantación, 5 mañana (5m) a las 11:00 o 5 noche (5 n) a las 18:00 horas. ***: $p < 0,001$; *: $p < 0,05$ Tamoxifeno vs. solución salina. Los datos representan la media $\pm$ SEM; $n=6$.

Estos resultados implican que el máximo de actividad NOS observado en el día 5 de gestación dependería en parte de la presencia de los estrógenos maternos.

Mientras que la isoforma Ca^{2+} -dependiente de la NOS fue inhibida por el Tamoxifeno en la misma proporción, tanto en la noche como en la mañana del día 5, la inhibición de la isoforma Ca^{2+} -independiente fue proporcionalmente mayor en la noche que en la mañana del día 5 ($p < 0,001$), **Tabla 1**.

Actividad uterina de la NOS		
(% inhibición con Tamoxifeno)		
	Ca ²⁺ -independiente	Ca ²⁺ -dependiente
Mañana del Día 5	55,50 +/- 3,12 ^a	37,25 +/- 1,89 ^c
Noche del Día 5	75,25 +/- 1,38 ^b	43,00 +/- 1,68 ^c

Tabla 1: La isoforma Ca²⁺-independiente de la NOS presenta una regulación estrogénica mayor en el momento en que se inicia el proceso implantatorio embrionario.

La actividad NOS fue determinada como se indicó en la Figura 26. El % de inhibición de la actividad NOS con Tamoxifeno en cada caso, se obtuvo aplicando el siguiente cálculo:

% inhibición = $100 \times (1 - T/C)$, donde "T" es la actividad enzimática de NOS uterina en ratas tratadas con Tamoxifeno, y "C" en ratas tratadas con vehículo (solución fisiológica).

Letras diferentes ('a', 'b', 'c') representan diferencias significativas entre Ca²⁺-dependiente vs.

Ca²⁺-independiente. Los datos representan la media +/- SEM; n=6.

Es interesante notar que el efecto inhibitorio del Tamoxifeno en el día 5 de preñez fue significativamente más pronunciado sobre la isoforma Ca²⁺-independiente que sobre la Ca²⁺-dependiente ($p < 0,001$).

Cabe aclarar que en un grupo ratas no gestantes, la inhibición del ciclo con Tamoxifeno inyectado en el día 2 del mismo (correspondiente al metaestro) en una concentración de 0,2 mg/kg. fue revertido con inyecciones de 17- β -estradiol 0,5 μ g/rata en el día 3 y 1 μ g/rata en el día 4 del ciclo. Pero el efecto inhibitorio del Tamoxifeno en un grupo de ratas preñadas, inhibiendo el número de embriones implantados, no fue revertido por la administración de 17- β -estradiol, aún utilizando dosis 20 veces mayores a aquellas que revierten la acción inhibitoria de Tamoxifeno durante el ciclo estral. Es por ello que no analizamos la

reversión del efecto inhibitorio del Tamoxifeno sobre la actividad de la enzima NOS en gestación.

Conclusión sección (C)

Ambas isoformas de la enzima NOS, la Ca^{2+} -independiente y la Ca^{2+} -dependiente, aumentan su actividad durante la implantación embrionaria. La actividad de ambas isoformas depende de los niveles de estrógenos maternos, pero la isoforma Ca^{2+} -independiente parecería presentar una regulación estrogénica mayor.

Sección D:

La producción uterina de NO es crucial durante la implantación embrionaria:

Según nuestras evidencias, el NO parece jugar un papel relevante durante la implantación embrionaria. Resulta interesante evaluar entonces el efecto de la administración "in vivo" de inhibidores selectivos de la NOS, ya que estos podrían alterar el número de embriones exitosamente implantados en el útero.

En primer lugar evaluamos el efecto del inhibidor aminoguanidina (AG), inyectado i.l. en uno de los cuernos uterinos preñados en el día 5 por la mañana. Este inhibidor, con mayor afinidad sobre la isoforma inducible que sobre la constitutiva (Misko y col., 1993), en una concentración de 2 mg/kg, tuvo un efecto inhibitorio ($p < 0,05$) en la mañana del día 5 pero no en el día 4 de preñez sobre el coeficiente de implantación embrionaria (número de embriones implantados en el cuerno inyectado / cuerno no inyectado) evaluado el día 7 de preñez, **Figura 27**.

Esto nos estaría indicando que el efecto del NO es crucial en el momento de la implantación, tal vez regulando mecanismos involucrados en la transformación tisular.

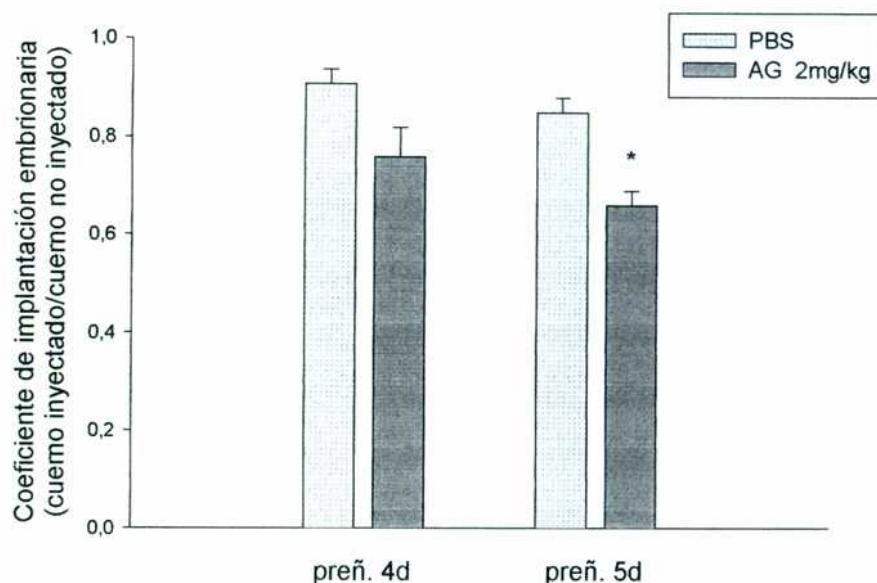


Figura 27: La inhibición de la actividad uterina de la NOS con AG altera el proceso implantatorio embrionario en la rata.

Efecto de inyecciones intraluminales de 50 μ L de vehículo (PBS) o 2 mg/Kg de Aminoguanidina (AG) en uno de los cuernos uterinos en la mañana de los días 4 o 5 de preñez, (el cuerno contralateral es el control interno). El Coeficiente de implantación embrionaria (número de embriones implantados en el cuerno inyectado / cuerno no inyectado) fue evaluado en el día 7 de preñez. *: $p < 0,05$ vs PBS. Los datos representan la media $\pm$ SEM; $n=7$.

Sin embargo, la AG provocó alteraciones vasculares como trombosis en ovario y en tejido conectivo perivisceral, superpuestas a su acción inhibitoria sobre el útero, por lo cual su utilización fue acotada a la determinación de este parámetro. Proseguimos el estudio realizando una curva dosis-respuesta del inhibidor competitivo L-NAME inyectado i.l. en uno de los cuernos uterinos en la mañana del día 5 de gestación. La **Figura 28** muestra que en el día 7 de preñez hay una reducción del 50% en el coeficiente de implantación embrionaria a partir de la dosis de 2,5 mg/kg. de L-NAME ($p < 0,05$), no obteniéndose diferencias con las dosis mayores ensayadas.

El efecto inhibitorio es específico, ya que la administración intraluminal del

esteroisómero inactivo D-NAME no tuvo acción sobre el coeficiente de implantación embrionaria.

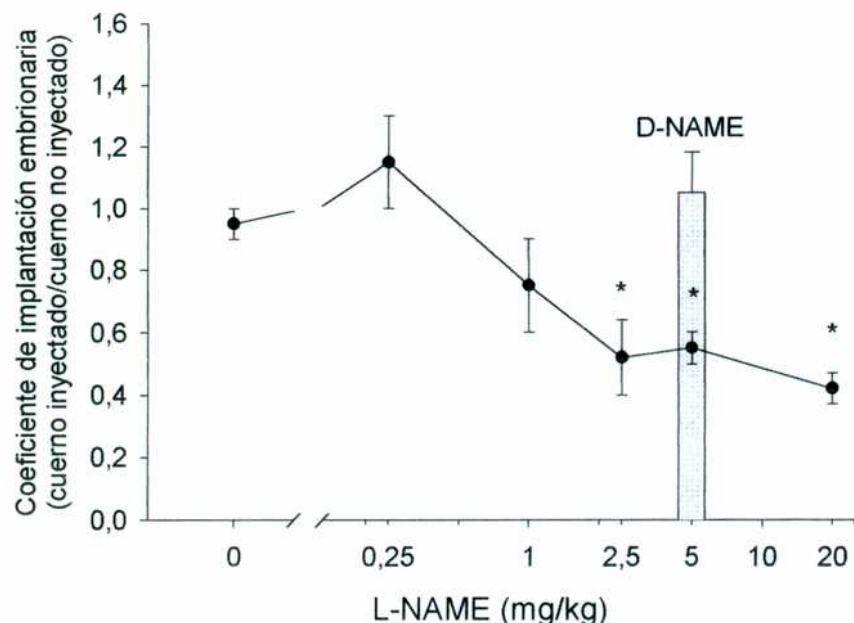


Figura 28: La inhibición de la actividad uterina de la NOS con L-NAME altera el proceso implantatorio embrionario en la rata.

Efecto de inyecciones intraluminales de 50 μ L de vehículo (PBS), distintas dosis de L-NAME o 5 mg/Kg de D-NAME, en uno de los cuernos uterinos en la mañana del día 5 de preñez, (el cuerno contralateral es el control interno). El Coeficiente de implantación embrionaria (número de embriones implantados en el cuerno inyectado / cuerno no inyectado) fue evaluado en el día 7 de preñez. *: $p < 0,05$ vs PBS. Los datos representan la media $\pm$ SEM; $n=8$.

En la **Figura 29** se muestran fotografías de úteros en días 7, 8, y 9 de preñez, donde se observa un menor número de embriones implantados en el cuerno inyectado con L-NAME. Puede observarse que los cuernos inyectados con el vehículo o con el D-NAME no muestran diferencias en el número de embriones implantados cuyo se comparan con el cuerno contralateral control (no inyectado).

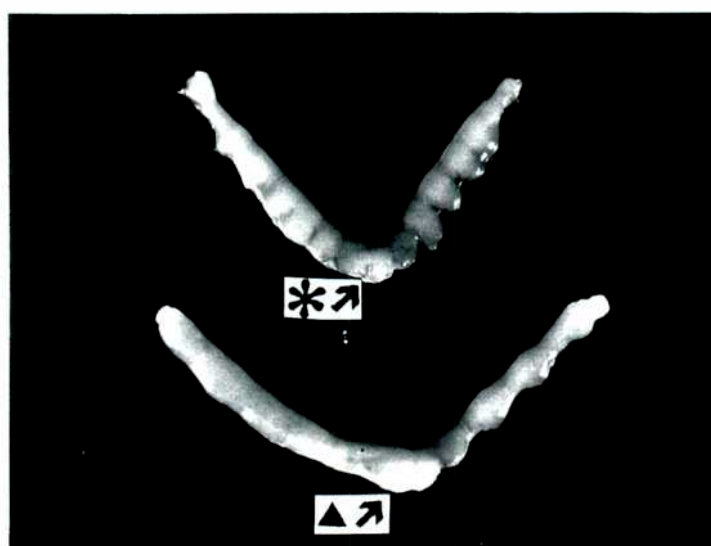
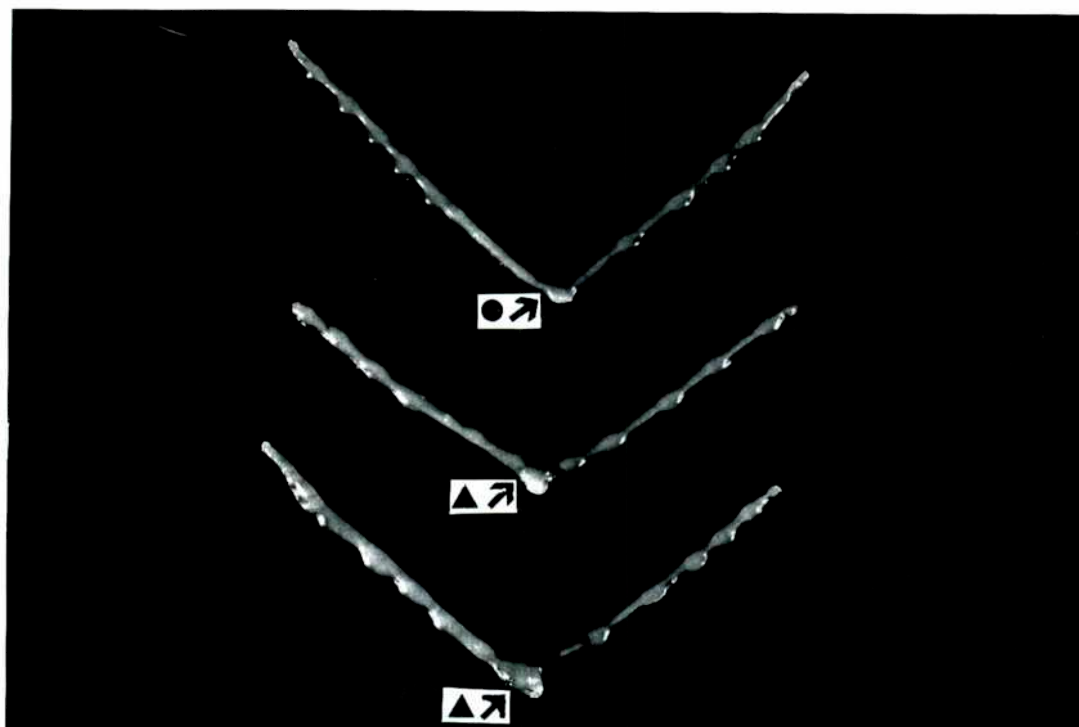


Figura 29: Fotografías de cuernos uterinos de rata en día 7 (arriba), 8 (medio) y 9 (abajo) de gestación, inyectados en la mañana del día 5 con PBS (asterisco), D-NAME 5 mg/kg (círculo) o L-NAME 5 mg/kg (triángulo). Se puede observar que hay menos embriones implantados en el cuerno inyectado con L-NAME. Las flechas indican el cuerno inyectado en cada caso.

Cuando se realizó el control histológico de la presencia de embriones implantados en deciduomas del día 8 en los cuernos que fueron inyectados con L-NAME en el día 5, aparentemente no habría anomalías comparando con los embriones implantados en deciduomas del cuerno que no fue inyectado (control). La **Figura 30** muestra un embrión en el cuerno inyectado con L-NAME. Pudimos observar la presencia de pliegues neurales en los embriones de ambos grupos.

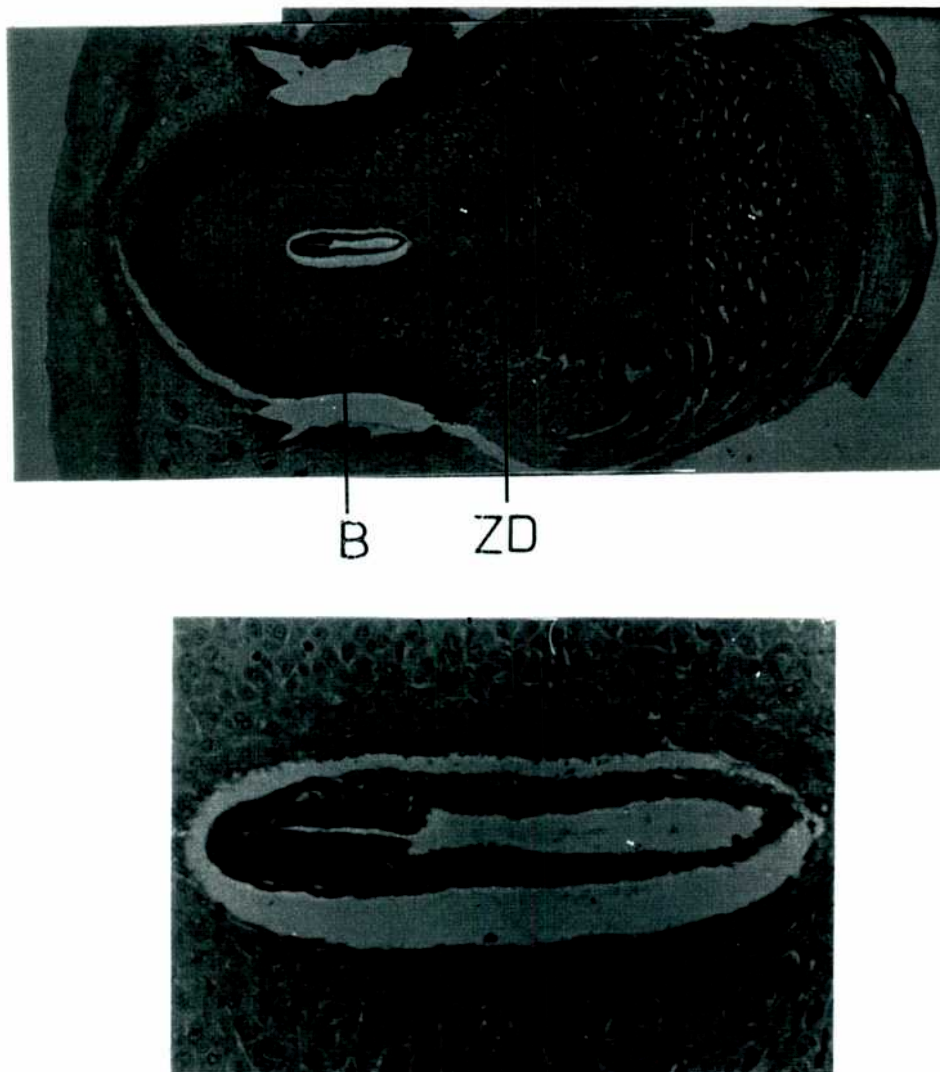


Figura 30: Fotografías de un corte histológico longitudinal de útero de rata en el día 8 de preñez. El corte pasa a través de un sitio de implantación. El blastocisto (B) está presente rodeado por el epitelio luminal. La zona decidual (ZD) presenta células deciduales típicas que rodean al blastocisto. Pueden observarse también abundantes vasos sanguíneos periféricos a la ZD. Se muestra el corte realizado en el cuerno uterino que fue inyectado con L-NAME 5 mg/kg en la mañana del día 5. Aumentos 4X (foto superior seriada) y 20X (foto inferior) para mayor detalle del blastocisto (zona recuadrada). Fotografías realizadas junto con el laboratorio de Embriología Animal de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la U.B.A.

Cabe aclarar que el efecto inhibitorio del L-NAME i.l. también pudo ser observado sobre la aparición de los sitios de implantación en el día 5 por la noche ($p < 0,05$)

Tabla 2, lo cual nos confirma que su efecto es sobre el proceso vasoactivo que inicia la implantación, y no sobre el desarrollo del embrión.

	CONTROL	L-NAME	C vs. L- NAME
# de sitios de implantación	6,20 $\pm$ 1,78	2,42 $\pm$ 1,97	$p < 0,05$

Tabla 2: El efecto inhibitorio del L-NAME sobre la implantación embrionaria afecta la aparición de los sitios de implantación.

Efecto de inyecciones intraluminales de 50 μ L de vehículo PBS (control), o 5 mg/Kg de L-NAME, en uno de los cuernos uterinos en la mañana del día 5 de preñez sobre la aparición de los sitios de implantación en la noche del mismo día. Las ratas fueron sometidas al ensayo de exudación plasmática en la noche del día 5 de gestación (18:00 horas) y sacrificadas luego de 15 minutos para visualizar las áreas uterinas diferencialmente teñidas.*: $p < 0,05$ L-NAME vs. PBS. Los datos representan la media $\pm$ SEM; n=6.

El disminuido número de sitios de implantación localizados con las inyecciones intraluminales tanto del control (PBS) como del L-NAME, pueden deberse a que esas inyecciones se realizan por la mañana del día 5, evaluándose 7 horas

después la presencia de los sitios de implantación, lo cual puede alterar la visualización de los mismo por efecto de la inyección per se.

La reversión del efecto inhibitorio del L-NAME i.l. mediante coinyecciones i.l. de L-arginina 125 mg/kg peso corporal (Chaves y col., 1993) o de PGE₂ 10⁻⁷M (Kennedy y Lukash, 1982) no pudo ser ensayado debido a que el volumen de solvente requerido para la administración de los compuestos es muy elevado, y produjo efectos hemorrágicos y de daño tisular per se, incompatibles con el estudio.

Conclusión sección (D)

La generación local de NO es un paso necesario para la implantación embrionaria ya que ésta se altera en presencia de inhibidores de la enzima NOS. El NO podría estar regulando la adecuada irrigación sanguínea al sitio de implantación o la decidualización endometrial, eventos necesarios para iniciar el proceso implantatorio.

Sección E:

Efecto de la patología diabética en la implantación embrionaria

La diabetes humana presenta importantes alteraciones en la función reproductiva (Buchanan, 1991; O'Sullivan y col., 1973; Metzger, 1991). El proceso implantatorio embrionario no ha sido profundamente analizado en esta patología. El hecho de que este proceso sea altamente sensible al ambiente metabólico, sumado a la evidencia de que la patología diabética este acompañada por una serie de desórdenes vasculares y metabólicos (Wentzel y col., 1995) determinados por la hiperglucemia, nos llevó a investigar la influencia de alteraciones en el proceso

vasoactivo durante la implantación embrionaria en la diabetes.

E-1 La actividad uterina de la NOS está incrementada en las ratas diabéticas no-insulino-dependientes:

La **Figura 31** muestra la actividad uterina de la NOS en ratas sanas (idem Figura 11) y diabéticas. La actividad enzimática es mayor en el grupo diabético durante la preñez temprana ($p < 0,01$), pero el perfil temporal es similar al del grupo control. Hay un incremento progresivo en la actividad NOS desde el día previo al de la implantación (día 4 vs. día 3 y estro, $p < 0,05$) hasta la mañana del día 5, cuyo la actividad alcanza un máximo ($p < 0,001$). Esta actividad permanece alta en la noche del día 5 ($p < 0,001$ vs. días 3 y 4) y luego decae en el día 6 ($p < 0,01$ vs. día 5).

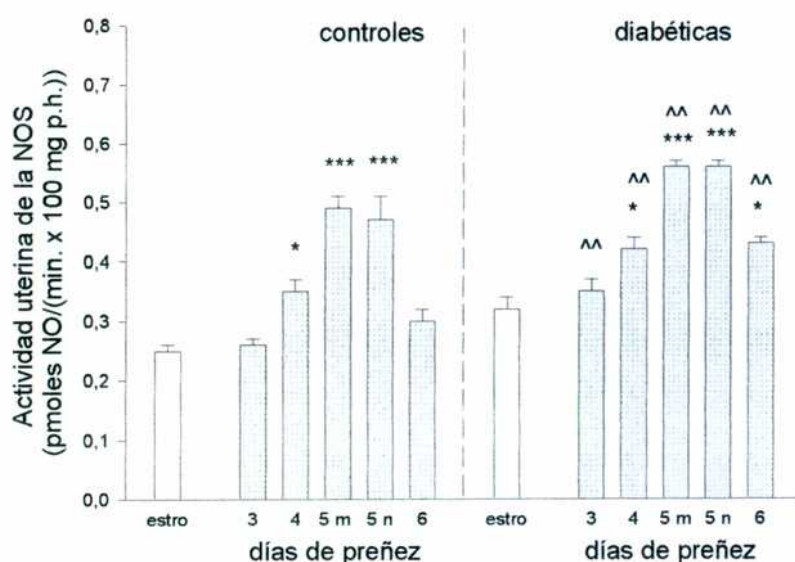


Figura 31: La actividad uterina de la NOS está incrementada en ratas diabéticas no-insulino-dependientes durante la peri-implantación embrionaria.

La actividad uterina de la NOS fue determinada por el ensayo de conversión de [^{14}C]-arginina a [^{14}C]-citrulina en homogenatos de porciones uterinas aisladas durante la peri-implantación embrionaria de ratas preñadas controles (izquierda) o diabéticas (derecha). Las ratas diabéticas se obtienen por inyección peri-natal de estreptozotocina. Los animales fueron sacrificados en estro (como control no preñado) o en los días 3, 4, 5 mañana (5m) a las 11:00 horas, 5 noche (5n) a las

18:00 horas, y 6 de preñez. ^^: $p < 0,01$ diabética vs. control del mismo día; *: $p < 0,05$ y ***: $p < 0,001$ dentro de cada grupo. Los datos representan la media $\pm$ SEM; $n=6$.

Sin embargo, en el grupo diabético la actividad en el día 6 permanece más alta que en los días pre-implantatorios ($p < 0,05$ vs. día 3), mientras que en el grupo control en el día 6 retorna a los valores previos.

E-2 La producción uterina de PGE está incrementada en las ratas diabéticas no-insulino-dependientes:

La Figura 32 muestra la producción uterina basal de PGE en ratas sanas (idem Figura 4) y diabéticas durante los días peri-implantatorios de la preñez. En este caso, observamos grandes diferencias entre ambos grupos. En las ratas control habíamos descrito que los niveles de PGE alcanzan un máximo en la mañana del día 5 ($p < 0,001$ vs. día 4) seguido de un brusco decaimiento en la noche del mismo día. En las ratas diabéticas la producción de PGE permanece alta hasta el día 6 ($p < 0,001$ vs. día 4). Además, la producción de PGE es mayor en el grupo diabético que en el control en todos los días analizados ($p < 0,01$).

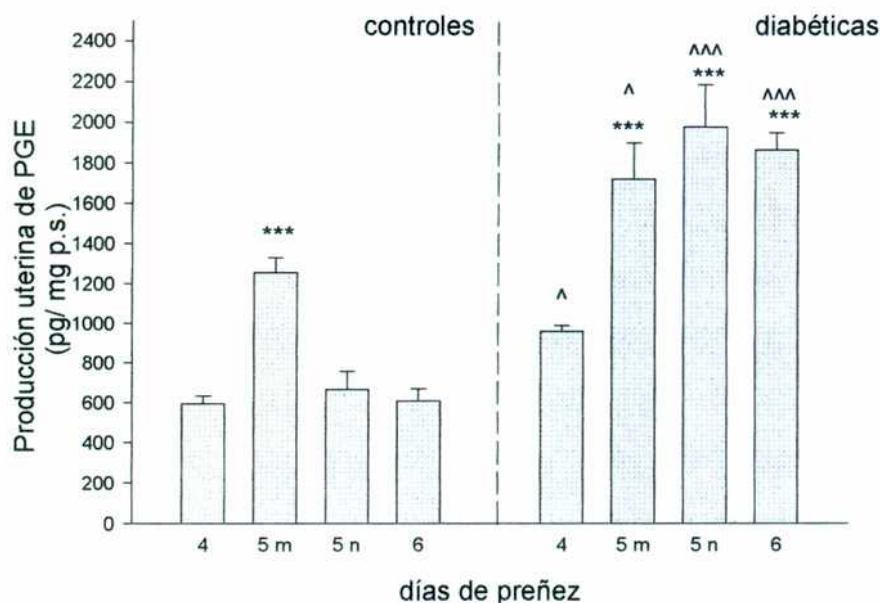


Figura 32: La producción uterina de PGE está incrementada en ratas diabéticas no-insulino-dependientes.

La producción de PGE fue determinada en porciones uterinas aisladas de ratas preñadas controles (izquierda) o diabéticas (derecha) durante la peri-implantación. Las ratas diabéticas se obtienen por inyección peri-natal de estreptozotocina. Los animales fueron sacrificadas en los días 4, 5 mañana (5m) a las 11:00 horas, 5 noche (5 n) a las 18:00 horas, y 6 de preñez, el útero aislado y sometido a incubación durante 60'. Luego de la incubación se procedió a la determinación de PGs liberadas al medio por RIA. ^^^: $p < 0,001$ diabética vs. control del mismo día; ^: $p < 0,05$ diabética vs. control del mismo día; ***: $p < 0,001$ dentro de cada grupo. Los datos representan la media $\pm$ SEM; $n=6$.

E-3 Presencia de los embriones en el útero diabético y producción de PGs:

Para evaluar si el origen de la mayor producción de PGE en ratas diabéticas es uterino o embrionario, evaluamos la producción prostanoide en úteros de ratas cuyos oviductos fueron ligados para evitar el descenso de los embriones al útero. La producción uterina de PGE en la mañana del día 6, tanto en las ratas control como diabéticas, no se modificó por la presencia o ausencia de los embriones, siendo mayor en el grupo diabético que en el grupo de ratas sanas ($p < 0,001$)

Figura 33. Esto parece indicar que, la prolongación del incremento en la producción de PGE es exclusivamente debido al tejido uterino diabético y no a los

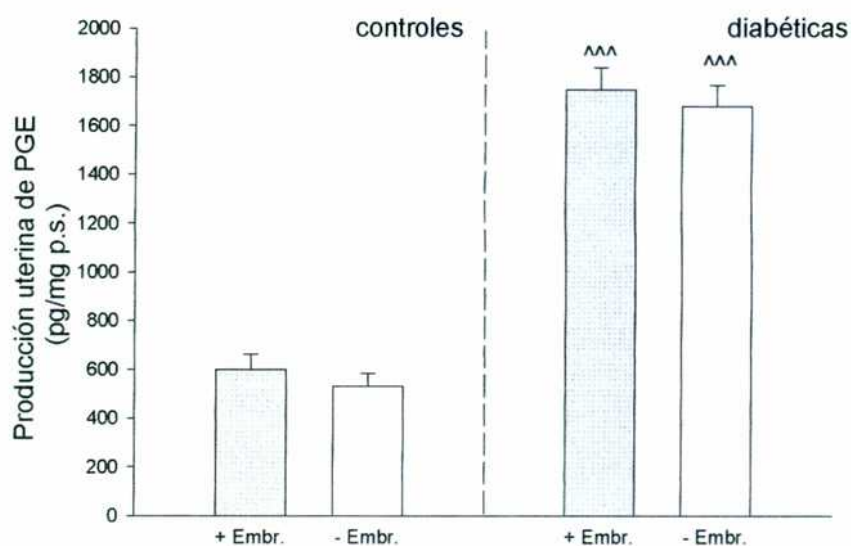


Figura 33: La producción uterina de PGE en post-implantación no depende de la presencia de los embriones en el lumen ni en ratas controles ni ratas diabéticas.

La producción uterina de PGE fue determinada por RIA, en porciones uterinas aisladas de ratas preñadas con operación sham (+ Embriones) o con ligadura oviductal (- Embriones). Las ratas fueron sometidas a ligadura oviductal bilateral en el día 2 de preñez, y sacrificadas en el día 6 de preñez. La determinación se realizó en animales controles (izquierda) y diabéticos (derecha). ^{^^^}: $p < 0,01$ diabética vs. control en la misma condición. Los datos representan la media $\pm$ SEM; $n=6$.

E-4 La “tasa” y el “tiempo de inicio de la implantación” no están alterados en las ratas diabéticas:

Determinamos el número de embriones que están implantándose en el día 5 mediante la evaluación del número de sitios de implantación, y encontramos que se hallan disminuidos en las ratas diabéticas ($p < 0,05$) con respecto a los animales sanos, **Tabla 3**.

Para determinar si la patología diabética afecta el proceso implantatorio en sí, o tiene un efecto nocivo sobre el embrión, evaluamos el número y desarrollo embrionario pre-implantatorio. Dado que el número de mórulas obtenidas por perfusión del oviducto en el día 4 de preñez también está disminuido en las ratas

diabéticas ($p < 0,05$), la tasa de implantación resultó ser del 100 % tanto en los animales sanos como diabéticos.

Por otro lado, los sitios de implantación comienzan a ser evidentes a las 18:00 horas del día 5 de gestación, tanto en las ratas sanas como diabéticas, **Tabla 3**, lo que parece indicar que el inicio de la implantación no está retrasado en esta patología.

	CONTROL	DIABETICA	C vs. D
Número de mórulas	12,85 $\pm$ 1,09	8,27 $\pm$ 1,85	$p < 0,05$
# de sitios de implantación	13,00 $\pm$ 0,64	9,12 $\pm$ 0,97	$p < 0,05$
Tasa de implantación	100 %	100 %	n.s.
Inicio de la implantación	18:00 $\pm$ 1 hora	18:00 $\pm$ 1 hora	n.s.

Tabla 3: La "tasa de implantación embrionaria" y el tiempo de inicio del proceso implantatorio son semejantes en las ratas controles y diabéticas.

La "tasa de implantación embrionaria" y el tiempo de inicio del proceso implantatorio fueron determinados en ratas preñadas controles (C) y diabéticas (D). Las mórulas fueron obtenidas por perfusión de los oviductos en un grupo de ratas en el día 4 de gestación. Otro grupo de ratas fue sometido al ensayo de exudación plasmática a las 16:00, 18:00 y 20:00 horas del día 5 de preñez y sacrificado luego de 15 minutos para visualizar los sitios de implantación. El inicio del proceso implantatorio es el tiempo en que los sitios de implantación comienzan a ser evidentes. La "tasa de implantación embrionaria" esta expresada como el porcentaje de mórulas implantadas. $p < 0,05$ diabética vs. control. Los datos representan la media $\pm$ SEM; $n=8$.

Observamos además que, la morfología de las mórulas provenientes de animales diabéticos no difiere a la de las mórulas provenientes de los animales sanos, y que la distribución de los sitios de implantación está conservada en la patología diabética.

E-5 La actividad NOS no se incrementa en forma localizada en el útero de ratas sanas y diabéticas:

La producción de NO y PGE en el útero peri-implantatorio podría estar localizada en los sitios de implantación, o alternatively, podría ser una respuesta

general del tejido uterino en su totalidad. Para dilucidar esta diferencia, medimos tanto la producción de PGE como la actividad de NOS en los sitios e intersitios de implantación, que se visualizan en la noche del día 5 de gestación a partir de las 18:00 horas, tanto en ratas control como diabéticas (Tabla 3).

La **Figura 34** muestra que la actividad enzimática está incrementada en el grupo diabético en relación al control, tanto en los sitios como en los intersitios de implantación ($p < 0,001$), y además, que la actividad NOS en los sitios es similar a la de los intersitios de implantación, tanto en ratas control como en los animales diabéticos.

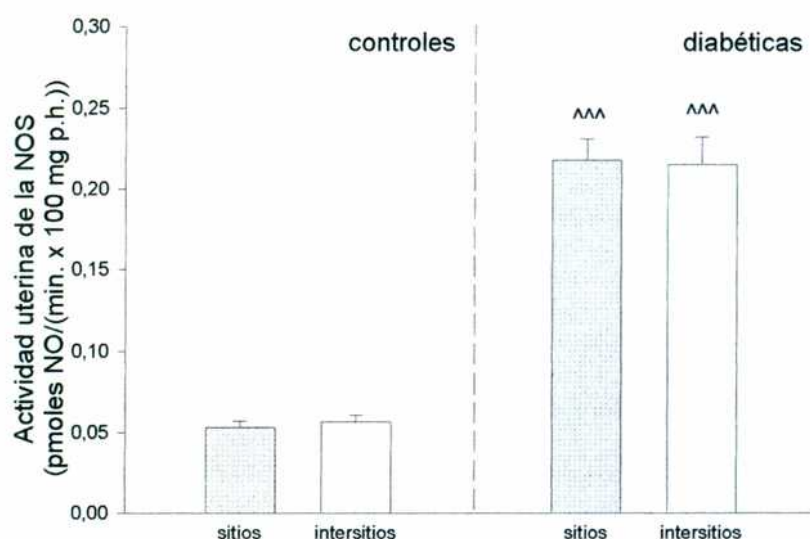


Figura 34: El incremento de actividad de la NOS no está localizado en el útero de ratas controles ni diabéticas.

La actividad NOS fue determinada por el ensayo de conversión de [^{14}C]-arginina a [^{14}C]-citrulina en homogenatos de tejido correspondientes a sitios e intersitios de implantación provenientes de animales preñados controles (izquierda) o diabéticos (derecha). Las ratas fueron sometidas al ensayo de exudación plasmática en la noche del día 5 de gestación (18:00 horas) y sacrificadas luego de 15 minutos para separar las porciones uterinas diferencialmente teñidas. $^^^$: $p < 0,001$ diabética vs. control en la misma localización. Los datos representan la media $\pm$ SEM; $n=6$.

E-6 La producción uterina de PGE es menor en los sitios de implantación, tanto en ratas control como diabéticas:

La **Figura 35** muestra que la producción uterina local de PGE es menor en los sitios de implantación que en los intersitios ($p < 0,05$), tanto en ratas control como diabéticas, siendo mayor en el grupo diabético comparado con el control ($p < 0,05$).

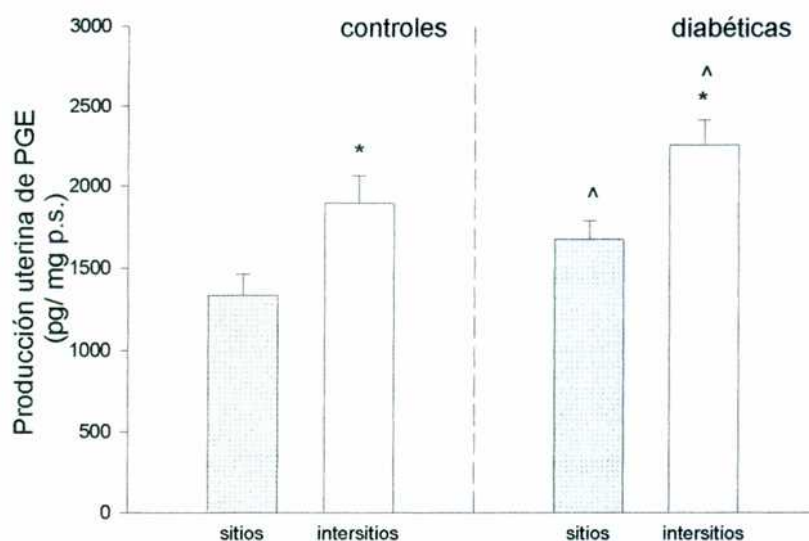


Figura 35: La producción de PGE es menor en los sitios de implantación uterina de ratas controles y diabéticas.

La producción de PGE fue determinada por RIA, en porciones uterinas correspondientes a sitios e intersitios de implantación provenientes de animales preñados controles (izquierda) o diabéticos (derecha). Las ratas fueron sometidas al ensayo de exudación plasmática en la noche del día 5 de gestación (18:00 horas) y sacrificadas luego de 15 minutos para separar las porciones uterinas diferencialmente teñidas. *: $p < 0,05$ sitio vs. intersitio; ^: $p < 0,05$ diabética vs. control en la misma localización. Los datos representan la media $\pm$ SEM; $n=6$.

Para confirmar estos datos, realizamos también la determinación del contenido tisular de PGE remanente luego de los 60 min. de incubación en el grupo control, para determinar si la liberación mayor a partir de los intersitios se correlaciona con un menor contenido tisular en esta región. Pero en estos casos, los

contenidos tisulares de PGE eran muy bajos en ambas porciones y no mostraron diferencias significativas entre los sitios y los intersitios (menos de 400 pg/mg p.s.), **Figura 36**.

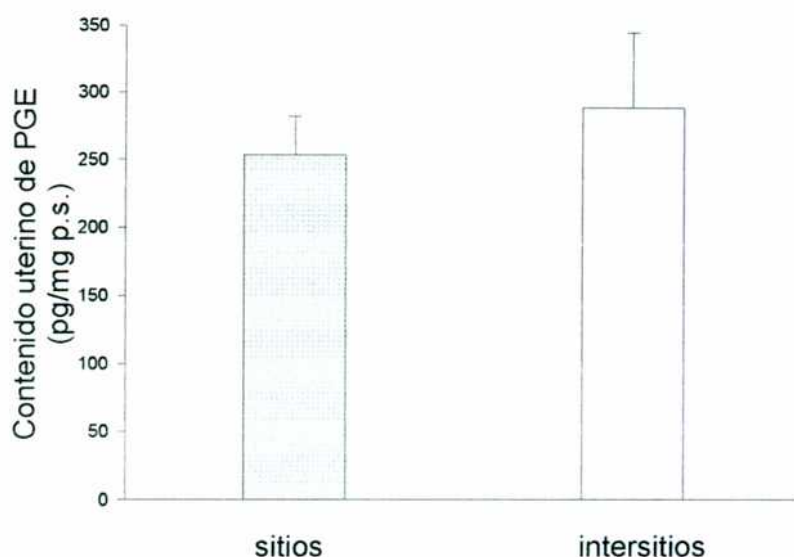


Figura 36: El contenido tisular de PGE no está localizado en el útero de ratas controles.

El contenido uterino de PGE fue determinado en homogenatos tisulares correspondientes a sitios e intersitios de implantación provenientes de animales preñados controles. Las ratas fueron sometidas al ensayo de exudación plasmática en la noche del día 5 de gestación (18:00 horas) y sacrificadas luego de 15 minutos para separar las porciones uterinas diferencialmente teñidas. Luego del sacrificio, se incubaron las diferentes porciones durante 60' y al cabo de ese tiempo se homogeneizó el tejido y se extrajeron las PGs tisulares para el RIA. Los datos representan la media $\pm$ SEM; n=6.

E-7 El tratamiento de los animales diabéticos con Insulina no revierte las alteraciones en la producción de PGs y actividad de la NOS uterinas:

El tratamiento de los animales diabéticos con insulina 1 U/kg por día, desde el día 1 de preñez hasta la mañana del sacrificio, (lo cual retorna la glucemia a niveles normales), no ocasiona la reversión del aumento en la actividad de la NOS **Figura 37**, ni en los niveles de producción de PGE **Figura 38**, observados en los úteros de ratas diabéticas.

Por ello, en principio podríamos suponer que las alteraciones encontradas en la patología diabética no se deben exclusivamente a los niveles alterados de

glucemia, sino a otros efectos de la enfermedad sobre los tejidos involucrados en la implantación.

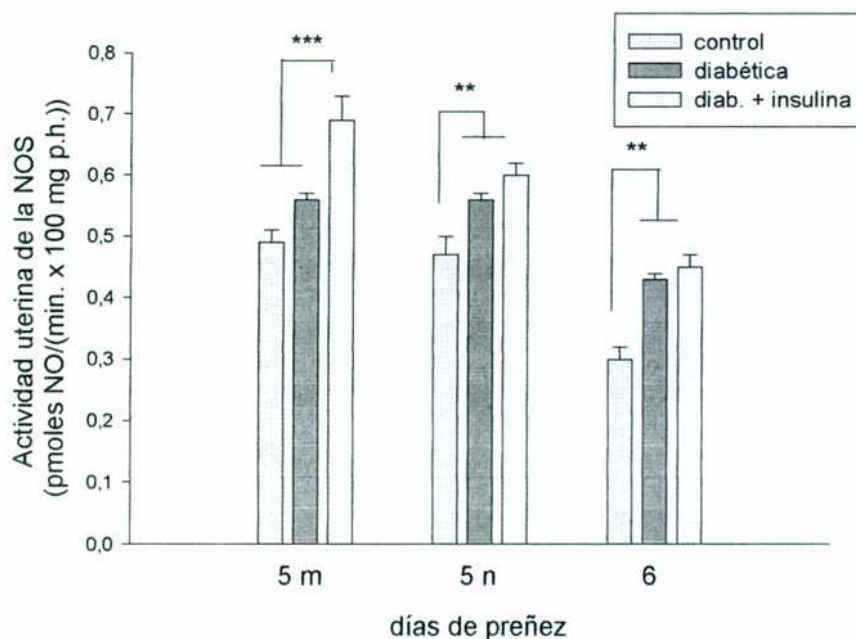


Figura 37: El tratamiento de los animales diabéticos con Insulina no revierte las alteraciones tisulares de actividad de la NOS.

La actividad uterina de la NOS fue determinada por el ensayo de conversión de [^{14}C]-arginina a [^{14}C]-citrulina en homogenatos de porciones uterinas aisladas de ratas preñadas controles, diabéticas o diabéticas con insulina 1 U/kg por día. El tratamiento con insulina se realizó desde el día 1 de preñez hasta la mañana del sacrificio, (lo cual retorna la glucemia a niveles normales). Los animales fueron sacrificados en los días 5 mañana (5m) a las 11:00 horas, 5 noche (5 n) a las 18:00 horas, y 6 de preñez. **: $p < 0,01$ diabética y diabética + insulina vs. control del mismo día; ***: $p < 0,001$ diabética y diabética + insulina vs. control del mismo día. Los datos representan la media $\pm$ SEM; $n=6$.

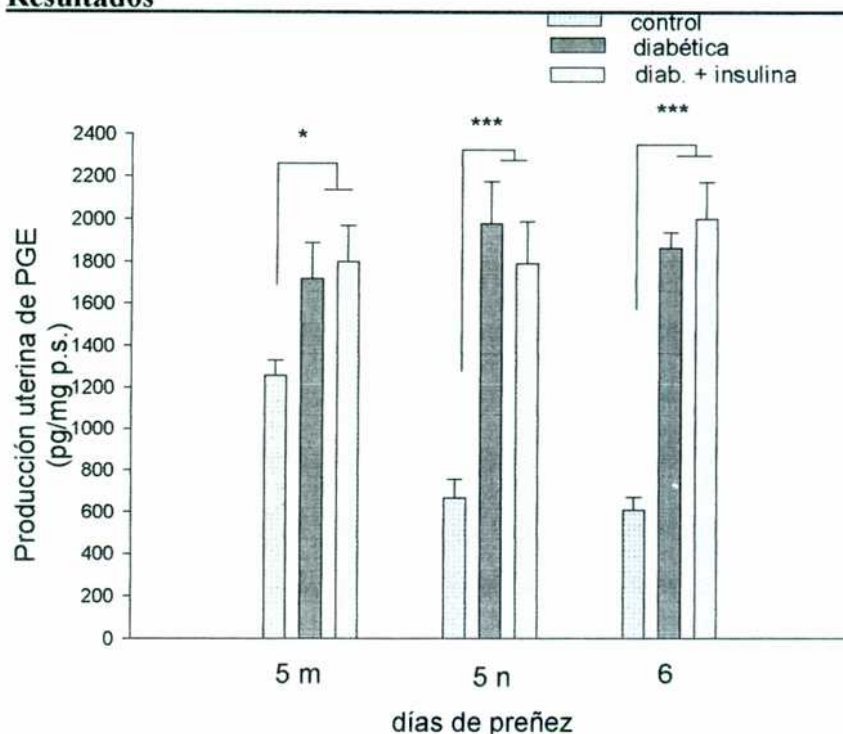


Figura 38: El tratamiento de los animales diabéticos con Insulina no revierte las alteraciones tisulares de producción de PGs.

La producción de PGE por RIA fue determinada en porciones uterinas aisladas de ratas preñadas controles, diabéticas o diabéticas con insulina 1 U/kg por día. Los animales fueron sacrificadas en los días 5 mañana (5m) a las 11:00 horas, 5 noche (5 n) a las 18:00 horas, y 6 de preñez. ***: $p < 0,001$ diabética y diabética + insulina vs. control del mismo día; *: $p < 0,05$ diabética y diabética + insulina vs. control del mismo día. Los datos representan la media $\pm$ SEM; $n=6$.

Conclusión sección (E)

La tasa y el tiempo de inicio de la implantación, no están alterados en esta patología diabética, probablemente debido a un mecanismo "compensatorio" que provee un incremento prolongado en los niveles de NO y PGE. Ambos compuestos resultan necesarios para la implantación embrionaria, permitiendo a los embriones posicionarse adecuadamente dentro del lumen uterino. Observamos en este modelo de diabetes que, el menor número de embriones implantados se debe al menor número de embriones pre-implantatorios más que a alteraciones en el proceso nidatorio en sí.

DISCUSION

Los resultados presentados en este trabajo indican que la implantación embrionaria en la rata está regulada por una combinación de agentes vasoactivos maternos y embrionarios, en un contexto hormonal propio de esta etapa reproductiva. El ambiente uterino materno presente durante la etapa peri-implantatoria podría afectar el desarrollo embrionario temprano, la implantación y la diferenciación posterior del feto. Por ello, la comprensión de las interacciones entre el embrión y la madre durante la preñez temprana constituye una pieza clave en el entendimiento del proceso implantatorio.

La actividad de la enzima PLA₂ y la producción de PGs uterinas acompañan el proceso implantatorio embrionario en la rata

Es ya conocida la importancia de los prostanoideos en el desarrollo de la preñez en los mamíferos. Ellas participan tanto en el proceso implantatorio donde inducen decidualización y vasodilatación endometrial (Weitlauf, 1994; Yee y col., 1993), como en el mantenimiento del estado reproductivo donde regulan el flujo placentario (Uterine Function, Molecular and Cellular Aspects 1990) (capítulo 14) y en el desencadenamiento del parto permitiendo el inicio de las contracciones uterinas (Novy y Liggins, 1980). No obstante, se desconocen los mecanismos de regulación de su síntesis en estos procesos.

Iniciamos el trabajo intentando determinar cuáles son los agentes que modulan la actividad enzimática de la PLA₂, enzima limitante para la síntesis de prostanoideos, relacionando dichos agentes con el proceso vasoactivo de la implantación embrionaria.

Muchos estudios han sugerido la participación de la enzima ciclooxygenasa en el inicio del proceso implantatorio del blastocisto (Kennedy y Lukash, 1982), pero

nuestros resultados mostrarían también un papel significativo de la enzima PLA₂ en este proceso ya que su actividad está incrementada durante la implantación. Existen antecedentes que establecen que la actividad de la enzima PLA₂ endometrial se encuentra incrementada en el día de la implantación en la rata (Cox y col., 1982) y en el cobayo (Downing y Poyser, 1983), lo cual puede relacionarse con un efecto estrogénico estimulador. Un pico de estrógenos en la mañana del día 4 de preñez (Shaikh, 1971), es necesario para iniciar la implantación del blastocisto en la rata. Se sabe que el Tamoxifeno inyectado en el día 2 de preñez inhibe el aumento en la síntesis de PGs del día 5 en el útero de rata (Phillips y Poyser, 1981; Fenwick y col., 1977), por lo que los autores suponen que el estradiol sería el estímulo fisiológico para incrementar la síntesis de PGs.

Nosotros postulamos que un punto de acción del estradiol modificando la síntesis uterina de PGs podría ser a nivel de la enzima PLA₂, ya que la actividad de esta enzima es mayor bajo efecto estrogénico.

Los parámetros que se ven alterados por la ligadura oviductal indican efectos mediados o determinados por los embriones, ya que en la noche del día 5 de preñez los mismos no pueden ser removidos por perfusión, debido a que están levemente fijados al epitelio uterino.

Analizamos entonces el origen del incremento en la actividad de la PLA₂ hallado a partir de la mañana del día 5 (día de la implantación). La ausencia de cambio en la actividad enzimática en los úteros con embriones, con respecto a los úteros sin embriones parece indicar que, el incremento hallado a partir del quinto día de gestación corresponde a la PLA₂ de origen uterino, y que ésta no es modulada por factores embrionarios.

Hemos determinado que el incremento en la síntesis de PGE y PGF_{2α} en la mañana del día 5, y la disminución posterior en la noche del mismo día y en el día 6 de la PGF_{2α} en relación a los valores pre-implantatorios, ocurren sólo si están

presentes los embriones en el útero. Por esta razón nosotros proponemos que los embriones actúan modulando la producción uterina de PGs en la implantación, adicionándose esta regulación al efecto modulador ejercido por la PLA₂ materna.

El incremento en la actividad uterina de PLA₂ en la mañana del día 5 de gestación podría ser entonces la causa de un aumento simultáneo en los niveles de PGE y PGF_{2α} liberadas por el tejido uterino. Estos resultados concuerdan con los presentados por Phillips (Phillips y Poyser, 1992; Phillips y Poyser, 1981) en donde la producción uterina de PGE₂ presenta un máximo en el día 5 de preñez. Este incremento de PGs podría estar relacionado con el proceso de decidualización y con el incremento en la permeabilidad vascular endometrial y en el flujo sanguíneo (mayoritariamente influenciados por la PGE) (Yang y col., 1997), que ocurren durante la implantación embrionaria en la noche del día 5 (Psychoyos, 1973; Kennedy, 1977).

Sin embargo, nuestros resultados muestran que el blastocisto debe estar presente en el útero para modificar la producción uterina de PGE y PGF_{2α} ya que en ausencia de embriones en el útero, no se induce decidualización y ambas PGs permanecen constantes a lo largo del período peri-implantatorio.

El hecho de que la actividad de PLA₂ permanezca elevada en el día 6 mientras que la producción de PGE y PGF_{2α} disminuya, sugiere que luego de la implantación la ciclooxigenasa podría convertirse en la enzima limitante en la producción de PGs, en lugar de la PLA₂.

Señales embrionarias modulan la producción uterina de PGs durante la implantación

Como dijimos, la síntesis de PGs difiere según estén presentes o no los blastocistos en el útero. Analizamos entonces factores de tipo embrionario de

conocida influencia en el proceso de reconocimiento del estado de preñez por la madre, como son el PAF (O'Neill y col., 1989; O'Neill, 1985) y el $\text{IFN}\alpha$ (Motta y col., 1995).

Ha sido demostrado que el PAF induce la producción de PGE por células endometriales humanas (Smith y Kelly, 1988b; Smith y Kelly, 1988b), bovinas y ovinas (Salamonsen, 1991; Battye y col., 1993) y murinas (Minhas y col., 1996).

Por su parte el $\text{IFN}\alpha$ provoca una disminución de $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial que es luteolítica, pero no de PGE que es luteotrófica, en la oveja (Burgess y col., 1990) y vaca (Helmer y col., 1989). Otros autores encontraron que el $\text{IFN}\alpha$ disminuye tanto la síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ como la de PGE en útero de ratas (Motta y col., 1995), y en células endometriales ovinas (Salamonsen, 1991; Salamonsen y col., 1992).

A diferencia de los antecedentes citados, cuyo evaluamos el efecto del PAF sobre la síntesis de PGs uterinas durante los días peri-implantatorios de la preñez en la rata, observamos un efecto modulador sólo en la mañana del día 5 y en este caso, inhibitorio del PAF sobre la liberación de PGE, tanto en presencia como en ausencia de embriones en el lumen uterino.

Se ha dicho que el papel del PAF es contradictorio en la implantación; por un lado se reconoce que actúa preferentemente sobre el desarrollo embrionario más que sobre la decidualización endometrial en la rata (Yee y col., 1993), donde a pesar de ser crítico para la preparación del endometrio, su bloqueo no interfiere con la implantación en si misma (Acker y col., 1988).

Se ha planteado que el PAF favorece la implantación "in vitro" de embriones tempranos de ratón, actuando como un factor autocrino independientemente de la presencia del endometrio (Acker y col., 1988).

La síntesis de PAF disminuye en los sitios de implantación con respecto a los intersitios en la rata (Yee y col., 1993), y en las conejas (Angle y col., 1988), donde luego de alcanzar un nivel máximo de síntesis endometrial en días previos, parece disminuir el día de la implantación, como condición para que la misma se produzca.

Angle y col. (1988), plantean que si bien los blastocistos de conejos no sintetizan PAF, la presencia de los mismos o de algún producto derivado de ellos, modula la síntesis o degradación endometrial de PAF, ya que ésta disminuye en los sitios de implantación embrionaria.

Por otro lado, se sabe que los receptores celulares de PAF pueden estar acoplados a varios sistemas efectores a través de distintas proteínas G de identidad aún desconocida, mediando así respuestas celulares diferentes (Izumi y col., 1995).

Así, el PAF, a través de un tipo de proteína G, estimula la actividad de la Fosfolipasa C, la cual genera diacilglicerol e inositoltrifosfato que produce la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares. A través de la proteína G_{α} , el PAF estimula la enzima adenilato ciclasa produciendo así la liberación de AMPc. Otro efecto posible es la estimulación de la PLA_2 , la cual deacila el ácido araquidónico de los componentes lipídicos de la membrana celular, incrementando así la síntesis de PGs, leucotrienos y tromboxanos (Ver Figura X de Introducción).

Todos estos mecanismos serían estimuladores de la síntesis de PGs, sin embargo Battye y col. (1992) demostraron que el PAF inyectado intraluminalmente durante 5 días en ovejas, disminuye la secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ a través de la disminución de la síntesis de fosfatidilinositol (Ver Figura X de Introducción). Tal vez, éste podría ser el mecanismo por el cual en nuestro sistema se inhibe la producción de PGE. Por ello, podemos suponer que el efecto del PAF sobre la síntesis de PGs puede variar según el tipo de proteína G asociada, dependiendo de la homeostasis interna.

De esta forma, podemos especular que el PAF, cuya acción no modifica la producción de PGs antes de la implantación (momento en que los niveles de PAF son altos), inhibe la producción de PGE en el día 5, y quizás por ello sea importante su disminución en los sitios de implantación como se ha demostrado en conejas (Angle y col., 1988).

Por su parte, el IFN α provocó un incremento en la liberación tanto de PGE como de PGF $_{2\alpha}$. Este aumento fue detectado tanto en animales preñados de día 5 controles, como con ligadura oviductal, y en la misma magnitud. Por otro lado, el IFN α no tuvo efecto sobre la liberación de PGE y PGF $_{2\alpha}$ tanto en pre como en post-implantación (días 3 y 6 de gestación, respectivamente), lo cual nos indicaría que así como ocurre con el PAF, el efecto del IFN α está acotado al momento de la implantación.

Asimismo el IFN α tiene efectos particulares en nuestro sistema animal durante la implantación embrionaria. Se sabe que el IFN α induce la expresión de la ciclooxigenasa en cultivos endometriales bovinos (Helmer y col., 1989). También se sabe que el IFN α atenúa el efecto inhibitorio de la progesterona sobre la PGF $_{2\alpha}$ en células de endometrio humano (Mitchell y Smith, 1992). Estos antecedentes podrían explicar nuestros resultados donde el IFN α provocó un incremento en la liberación de PGE y de PGF $_{2\alpha}$, tanto en animales preñados de día 5 control como con ligadura oviductal.

Dado el gran incremento con el IFN α sobre la liberación de PGE y PGF $_{2\alpha}$ uterinas en el día 5 (cerca de un 100%), probablemente éste sea un factor estimulatorio importante de la síntesis de prostanoïdes en el día de la implantación.

Como dijimos, estos resultados, contradictorios con lo reportado por algunos autores, nos indicarían que el mecanismo de acción del PAF y del IFN α podría ser particular en nuestro modelo animal, y podría relacionarse con un momento específico de la preñez como es la implantación, con un perfil hormonal propio y acotado.

La actividad uterina de la NOS aumenta durante el proceso implantatorio embrionario en la rata

Sabiendo que la enzima NOS está presente en el útero de rata (Dong y col., 1996; Suburo y col., 1995; Shew y col., 1993), evaluamos sus niveles a lo largo del proceso implantatorio y hallamos que se encuentra incrementada en el momento previo a la implantación (mañana del día 5). Este incremento lo podemos relacionar con el pico de estrógenos desde el día 4 a la tarde (Shaikh, 1971), dado que es reconocido el efecto estimulador de los mismos sobre la enzima NOS (Weiner y col., 1994c). Además el sistema del NO está involucrado en el efecto uterotrófico y media el aumento de flujo sanguíneo uterino provocado por los estrógenos (Rao y col., 1995; Van Buren y col., 1992).

Hemos determinado que la producción uterina de PGs depende tanto de los niveles de NO como de la presencia de embriones en el lumen del tejido. Estos resultados plantearon la posibilidad de que alguna sustancia derivada de los blastocistos estimulara la actividad de la NOS, que a su vez aumentara la producción de PGs. Por esta razón, evaluamos si el bloqueo de la entrada de los embriones al útero por ligadura oviductal, inhibe el incremento en la actividad de NOS que comienza en el día 4 y es máximo en el día 5. Este aumento en la actividad enzimática se observa tanto en presencia como en ausencia de embriones, sugiriendo que está principalmente bajo la influencia del ambiente hormonal materno, independientemente de la presencia de los blastocistos. Aunque como dijimos anteriormente, el perfil de actividad de la NOS es similar en las ratas control y los animales con ligadura oviductal, la actividad está significativamente aumentada en este segundo grupo. Una reacción inflamatoria luego de la ligadura o la ausencia de alguna señal inhibitoria derivada del embrión al útero podrían explicar este efecto. Altas concentraciones de PGE₂, como la sintetizada por el útero sólo en presencia de los embriones, podrían inhibir la síntesis de NO "in vivo". Tal es el caso de la regulación positiva o

negativa de la expresión de la iNOS en macrófagos, según la concentración de PGE₂ en el medio de cultivo (Milano y col., 1995).

Señales embrionarias modulan la actividad uterina de la NOS durante la implantación

Evaluamos posibles señales embrionarias que podrían estar modulando la actividad de la NOS uterina. En los animales en día 5 de preñez, la actividad uterina de la NOS no fue alterada por incubación del tejido con PAF, PGE, PGF_{2α} ni IFN α . En los animales preñados en el mismo día pero con ligadura oviductal, es decir, sin embriones en el lumen uterino, el PAF, la PGE y PGF_{2α} provocaron un incremento en la actividad enzimática de la NOS, mientras que el IFN α no tuvo efecto sobre dicha actividad.

No hay antecedentes en la literatura de efectos del IFN α sobre la actividad de la NOS.

Como dijimos anteriormente, se sabe que la PGE₂ estimula o inhibe la iNOS en macrófagos en cultivo dependiendo de la concentración del prostanoide agregado, lo cual podría contrarrestar la retroalimentación patológica que media en la inflamación tisular (Milano y col., 1995).

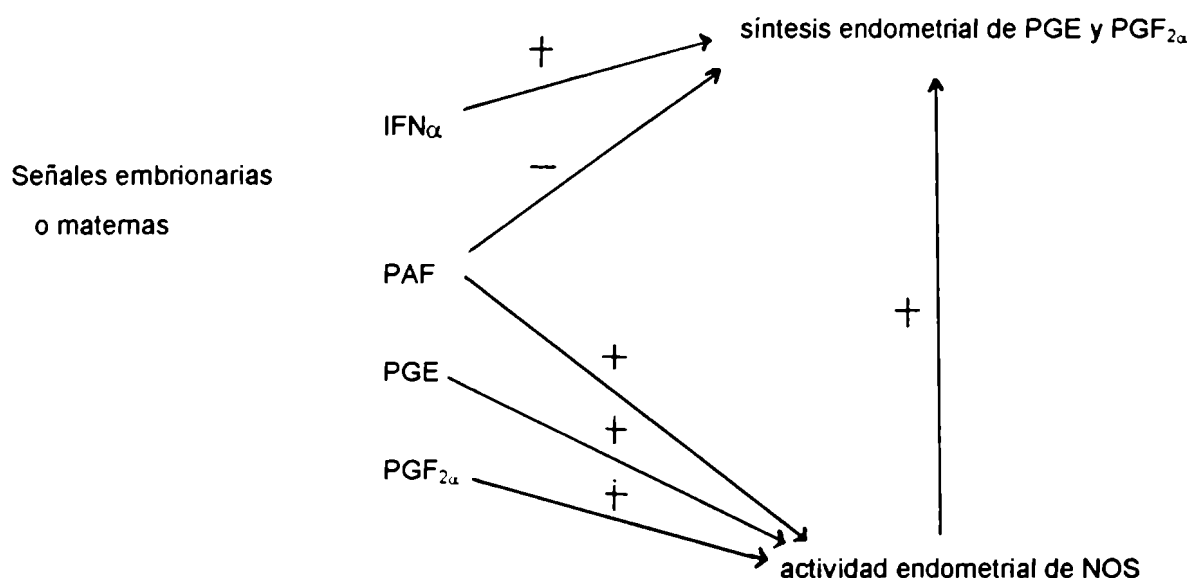
El PAF aumenta la síntesis de NO inducida por LPS en células de hígado de rata a través del incremento de la expresión del mRNA de la iNOS (Mustafa y col., 1996), o a través de aumentar la incorporación de L-arginina a la célula por un sistema transportador. De este modo, el PAF actúa como potente mediador pro-inflamatorio. En otros trabajos se ha demostrado que el PAF activa en forma rápida a la cNOS (Nathan, 1992), posiblemente debido a un aumento en la movilización intracelular de Ca²⁺

En nuestro sistema, la incubación in vitro durante 60 min. con PAF, PGE y PGF_{2α}, provoca la activación de la enzima NOS, quizás por incremento en los niveles intracelulares de Ca²⁺

Los resultados presentados indican que las PGs y el PAF de origen uterino,

podrían actuar como activadores de la enzima NOS. El hecho de que este efecto sea evidente sólo en ausencia de embriones en el lumen, indicaría que depende de los niveles endógenos de los agentes mencionados.

Entonces, en el día 5 de preñez, con los embriones presentes en el lumen, se estimularía la síntesis uterina de PGE y PGF_{2α} directamente, o vía IFN_α. A su vez, el PAF, PGE₂ y PGF_{2α} incrementarían la actividad uterina de la NOS, la cual tendrá asimismo un papel fundamental en el desarrollo del proceso implantatorio embrionario. Por otro lado, cuy o los niveles endógenos de NO son elevados el PAF podría inhibir la síntesis uterina de PGE, en el día 5 de gestación, de manera tal de mantener el sistema prostanoideo regulado.



El sistema nitridérgico modula la síntesis de PGs uterinas durante la implantación embrionaria

Teniendo en cuenta el incremento coincidente en la actividad de la PLA₂ y de la NOS en el momento de la implantación embrionaria, continuamos con la búsqueda de acciones moduladoras del sistema nitridérgico, y evaluamos su posible efecto sobre la actividad fosfolipásica.

El NP, un generador de NO, no parece tener efecto sobre la actividad fosfolipásica del tejido uterino. Tampoco inhibidores específicos de la enzima NOS, como el L-NMMA y el L-NAME provocaron alteraciones en la actividad de PLA₂. Por lo tanto podríamos decir que el NO no parece modular la síntesis uterina de PGs a nivel de la enzima PLA₂.

Asimismo, hemos determinado que un incremento en la actividad uterina de la NOS cerca del momento de la implantación, es responsable del aumento en la producción uterina de PGs, dado que adicionando al medio de incubación un inhibidor competitivo de la NOS, el L-NAME, se reduce la alta producción de PGE₂ y PGF_{2α} del día 5 de preñez a valores pre-implantatorios. Si bien los inhibidores no parecen actuar modulando la síntesis de PGs a nivel de la PLA₂, el efecto parece ocurrir a nivel de la ciclooxygenasa. Numerosos grupos han descripto el efecto estimulador del NO sobre la síntesis de PGs en hipotálamo de rata (Rettori y col., 1992), macrófagos murinos en cultivo (Salvemini y col., 1993), útero de rata estrogenizada (Franchi y col., 1994), y en ovocitos de ratas (Jawerbaum y col., 1997a).

Por otro lado, hemos determinado que la presencia de los embriones en el útero condiciona la modulación nitridérgica de la síntesis de PGs uterinas en el momento de la implantación: cuyo efecto del L-NAME fue evaluado en porciones uterinas aisladas de ratas gestantes con ligadura oviductal, se observó un efecto contrario al de las ratas preñadas controles, es decir, provocó un incremento en la producción tisular de PGE y PGF_{2α}.

Además, el NP (dador de NO) estimula la liberación de PGE en el día 6 (día en que la actividad de la NOS está baja), pero inhibe la liberación de PGE y PGF_{2α} en la noche del día 5 de preñez (momento en que la actividad de la NOS es máxima).

Esto nos estaría confirmando que la producción tisular de PGs está bajo regulación del embrión per se, o de alguna señal embrionaria en el día de la implantación, y que los niveles endógenos de NO podrían estar modificando el efecto

que ejerce el inhibidor L-NAME o el NO exógeno.

Dado que la actividad de la enzima NOS está incrementada en el útero de ratas preñadas con ligadura oviductal con respecto a las preñadas control, parecería entonces que niveles endógenos bajos de NO (en presencia de los embriones en el lumen) estimulan la producción de PGE y PGF_{2α}, mientras que niveles endógenos altos de NO (en ausencia de embriones en el lumen) la inhiben:

Presencia del embrión → bajos niveles endógenos de NO → aumento síntesis endometrial de PGs

Ausencia del embrión → altos niveles endógenos de NO → disminución síntesis endometrial de PGs

Recordemos que en muchas condiciones fisiológicas y patológicas el NO y las PGs cooperan y sinergizan, como por ejemplo actuando vía GMPc y AMPc para mantener el flujo sanguíneo (Kaley y Koller, 1995). Ambas enzimas, la ciclooxigenasa y la NOS son hemoproteínas homodiméricas (Kenneth, 1996). Además la ciclooxigenasa y la NOS constitutivas se regulan en forma semejante en condiciones basales y las inducibles se inducen en forma semejante en condiciones patológicas en procesos inflamatorios, de edema, daño tisular o infarto (Kenneth, 1996; Salvemini y col., 1993).

Estos resultados implican entonces la existencia de un sistema nitridérgico fisiológicamente relevante que puede modular la producción de PGs en el útero de rata durante la implantación embrionaria. Aunque es bien aceptado que el NO media varios fenómenos biológicos, incluyendo la relajación del músculo liso vascular (Kaley y Koller, 1995; Magness y col., 1997; Förstermann y col., 1994) y la formación de edema vascular (Norman y Cameron, 1996; Förstermann y col., 1994; Sladek y col., 1997), no existen otros estudios que demuestren cambios en

la actividad de la NOS ni su acción moduladora sobre la síntesis de PGE y PGF_{2α} cerca del momento de la implantación. Sin embargo, estudios adicionales se requieren para ampliar el conocimiento de las funciones precisas del NO en la implantación.

Distintas isoformas de la NOS participan en el proceso implantatorio embrionario

El incremento en la actividad de la NOS durante la implantación podría ser el resultado de un aumento en ambas isoformas de la enzima (la inducible y la constitutiva).

Dado que los glucocorticoides inhiben la expresión génica de la iNOS bloqueando la inducción de la misma en diferentes tejidos (Knowles y col., 1990), evaluamos el efecto de la dexametasona administrada "in vivo". En este caso, la dexametasona impidió el incremento en la actividad de la NOS sólo en el día 4 y no en el día 5. Esto sugiere la presencia de al menos 2 tipos de isoenzimas de NOS en la preñez temprana. La naturaleza inducible de la enzima cuya actividad se regula en el día 4, coincidiría con un aumento de citoquinas uterinas, según se ha descrito en ratón (Wood y col., 1992; Schini y col., 1994). La ausencia de efecto inhibitorio de la dexametasona "in vivo" sobre la actividad incrementada en el día 5, podría ser el resultado de una preponderancia de la isoforma constitutiva de la enzima en ese momento.

Evaluable luego la actividad de la NOS en relación a su dependencia del Ca²⁺, determinamos que el incremento en la actividad de la NOS en el día 5 de preñez es el resultado del aumento combinado en la actividad de ambas isoformas. Mientras que la isoforma Ca²⁺/calmodulina-dependiente de la NOS aumenta gradualmente y alcanza su valor más alto horas antes de iniciarse la implantación, la isoforma Ca²⁺/calmodulina-independiente tiene un pico justo en el inicio de la implantación (día 5, 18:00 horas). Luego la actividad de ambas isoformas declina hasta valores pre-implantatorios. Esta diferencia implica que las 2 isoformas se

encuentran bajo diferente regulación.

Si consideramos que la dexametasona inhibe la inducción de la iNOS que correspondería a la isoforma Ca^{2+} -independiente, el hecho de que la inhibición de la enzima con dexametasona sólo sea efectiva en el día 4 y no en el día 5 por la mañana, nos podría indicar que en este último caso, la actividad de la enzima Ca^{2+} -independiente está enmascarada por la actividad de la Ca^{2+} -dependiente (que presenta mayor actividad). La actividad Ca^{2+} -independiente de la NOS recién aumenta en la noche del día 5, cuyo nivel se hace equivalente a la Ca^{2+} -dependiente.

Hay antecedentes que indican que la actividad Ca^{2+} -independiente es la que contribuye mayoritariamente a los cambios en la síntesis uterina de NO en la preñez tardía de la rata, evaluada a partir del día 16 de gestación, ya que está regulada por citoquinas (Dong y col., 1996). En cambio la Ca^{2+} -dependiente no varía significativamente a lo largo de la preñez tardía.

Además, en ratas preñadas, la presencia de iNOS uterina determinada por inmunohistoquímica a partir del día 8 de preñez, aumenta con respecto a las no preñadas, y específicamente en los lugares donde están presentes los embriones (Haddad y col., 1995). Estos autores demuestran que la síntesis incrementada de NO por los macrófagos infiltrantes en los sitios de implantación, media la pérdida embrionaria temprana en ratones, evaluada a partir del día 8 de gestación. Coincidente con esto, los resultados presentes muestran que la actividad aumentada de NOS retorna a los valores previos luego de producirse la implantación.

La implantación entonces puede ser vista como un proceso inflamatorio, caracterizado por un aumento en la producción de NO generado por las células inflamatorias infiltrantes (Vane y col., 1994). Estas células pueden proveer la actividad NOS Ca^{2+} -independiente presente en el útero al tiempo de la implantación.

Podríamos especular entonces, que el incremento de actividad de la isoforma Ca^{2+} -independiente participa en el proceso fisiológico de la implantación embrionaria.

El estradiol "in vivo" modula la actividad uterina de la NOS

Habiendo demostrado que en ausencia de embriones en el lumen uterino, el perfil de actividad de la NOS no se altera, buscamos un factor materno que pueda actuar como el principal modulador de dicha actividad.

Para determinar si el incremento en la actividad de la NOS en el día 5 de preñez es dependiente de regulación por estradiol, hemos analizado el efecto del Tamoxifeno, un antagonista del estradiol, sobre la actividad uterina de la NOS. La inhibición "in vivo" del soporte estrogénico al útero, reduce la actividad de ambas isoformas de la NOS en el día 5 de preñez a valores pre-implantatorios. Es interesante notar que este efecto inhibitorio fue significativamente más pronunciado sobre la isoforma Ca^{2+} -independiente que sobre la Ca^{2+} -dependiente, lo cual indicaría que la isoforma Ca^{2+} -independiente está sujeta a una regulación estrogénica mayor.

Como podemos observar en la Figura XII c de la Introducción, el tratamiento de ratas con Tamoxifeno no afecta los niveles plasmáticos de progesterona, por lo cual, en principio, el efecto de dicho tratamiento sobre la actividad de la NOS sólo sería atribuible a la disminución de los niveles plasmáticos de estradiol, como se observa en la Figura XII b de la Introducción.

El hecho de que en las ratas en ciclo, el efecto del Tamoxifeno inhibiendo el mantenimiento del mismo sea revertido con inyecciones de 17- β -estradiol, mientras que en ratas preñadas el efecto inhibitorio de la gestación no sea revertido aún con dosis de 17- β -estradiol 20 veces mayores que las que actúan en el ciclo, señala que en la preñez el sistema de regulación estrogénica es más complejo que durante el ciclo estral. Probablemente, dado que el Tamoxifeno es

un antagonista parcial, sus efectos dependan de los niveles endógenos de estradiol (Patterson, 1981). Es decir, con niveles altos de estradiol endógeno actúa como antagonista y desplaza al estradiol, y con niveles de estradiol endógeno bajos actúa como agonista.

Antecedentes en la literatura confirman que el tratamiento con estrógenos a cobayos aumenta la actividad de la NOS Ca^{2+} -dependiente en arteria uterina y otros tejidos (Weiner y col., 1994c).

El mecanismo de acción de los estrógenos sobre la enzima NOS puede deberse a la inducción de una proteína transportadora que aumenta así la entrada de L-arginina a la célula, o a través de la inducción a nivel genómico de la propia enzima (Van Buren y col., 1992). Otros autores señalan que los estrógenos pueden aumentar la disponibilidad de cofactores de la NOS y así activar la enzima (Huang y col., 1995).

Es sabido que el Tamoxifeno inhibe la implantación en la rata cuy o se lo administra en los primeros 4 días de gestación (Watson y col., 1975; Harper y Walpole, 1967), porque bloquea el aumento pre-implantatorio de estradiol plasmático (Watson y Howson, 1977; Patterson, 1981; Shaikh, 1971).

Sin embargo, este antagonista no es tóxico para los blastocistos en la dosis usada (Harper y Walpole, 1967). El mismo podría estar actuando directamente como un antagonista del receptor uterino a estradiol o indirectamente sobre el ovario, disminuyendo la biosíntesis de estradiol por inhibición de la acción estimuladora de la hormona folículo estimulante FSH (Patterson, 1981; Watson y Howson, 1977).

En vista de nuestros resultados, podríamos especular que parte del efecto de esta droga es debido, indirectamente, a la inhibición del sistema nitridérgico ya que durante la implantación embrionaria el estradiol materno regula la actividad de la NOS en el útero.

La síntesis uterina de NO es crucial durante la implantación embrionaria

Asumiendo que el NO juega un papel relevante durante la implantación embrionaria, inhibidores selectivos de la NOS inyectados intraluminalmente en uno de los cuernos uterinos podrían alterar el número de embriones exitosamente implantados.

El efecto del inhibidor aminoguanidina, con mayor afinidad sobre la isoforma inducible que sobre la constitutiva (Misko y col., 1993), tuvo un efecto inhibitorio sobre el coeficiente de implantación embrionaria (número de embriones implantados en el cuerno inyectado / cuerno no inyectado). Este efecto del inhibidor en la mañana del día 5 pero no en el día 4 de preñez, nos estaría indicando que el papel del NO es crucial en el momento de la implantación, posiblemente ligado a mecanismos involucrados en la transformación tisular. Pero este antagonista provocó también alteraciones vasculares en ovario y en tejido conectivo perivisceral y uterino, por lo cual no proseguimos con su uso.

La inyección intraluminal de otro inhibidor competitivo de la NOS, el L-NAME, en la mañana del día 5 de preñez disminuyó un 50 % el número de embriones exitosamente implantados, sin producir alteraciones sistémicas. Esto parece nuevamente señalar que la generación local de NO es un paso necesario para la implantación embrionaria.

El NO podría estar actuando en múltiples pasos permitiendo la nidación. Podría contribuir al incremento de permeabilidad vascular endometrial en forma directa, incrementando los niveles intracelulares de GMPc. Este a su vez es capaz de aumentar el flujo sanguíneo e inducir vasodilatación (Norman y Cameron, 1996; Förstermann y col., 1994; Sladek y col., 1997). También el NO podría actuar en forma indirecta, modulando la producción uterina de PGs (Sautebin y col., 1995; Franchi y col., 1994; Salvemini y col., 1993). Por su lado, las PGs podrían mediar otras respuestas no vasculares como la deciduización (Frank y col., 1994; Kennedy y Lukash, 1982). En otro aspecto, se ha visto que el NO participa en procesos de degradación tisular y necrosis y que es capaz de inducir la muerte

celular programada (Evans, 1995) y la degradación de la matriz extracelular (Förstermann y col., 1994; Buhimschi y col., 1996; Tasikiran y col., 1994), todos procesos que han sido involucrados en la implantación de los blastocistos en el útero (Blankenship y Given, 1992; Piacentini y Autuori, 1994).

Se sabe que el NO participa en el desarrollo embrionario (Miller y col., 1996; Förstermann y col., 1994). El L-NAME administrado en el período post-implantatorio (Diket y col., 1994) genera malformaciones congénitas en los miembros de embriones de rata. Nosotros hemos observado el efecto del L-NAME inhibiendo la aparición de sitios de implantación en la noche del día 5 de preñez. Además, la ausencia de alteraciones histológicas en los embriones implantados en el cuerno inyectado con el inhibidor previo a la implantación, indicaría que su efecto temprano en nuestro sistema se ejerce a nivel del proceso de nidación. Tal efecto podría consistir en el bloqueo de la adecuada irrigación sanguínea al sitio de implantación o la decidualización del tejido materno.

Localización endometrial de los agentes vasoactivos

Los sitios de implantación son visibles 20 a 24 horas antes que cualquier otra evidencia morfológica de la implantación de los blastocistos (Psychoyos, 1973). Hemos especulado con un aumento de síntesis de PGE y de actividad de la NOS en el sitio de implantación con respecto a los intersitios. De esa manera, estos agentes tendrían su efecto localizado en el aumento del flujo vascular y la decidualización en zonas precisas del endometrio.

Los resultados hallados no fueron los esperados, ya que la PGE se encuentra incrementada en mayor medida en los intersitios que en los sitios de implantación, y la NOS no parece estar diferencialmente localizada en el endometrio.

Nuestros resultados son contrarios a lo que muestran Kennedy y col. (Kennedy,

1977) quienes reportan una mayor generación de PGE en los sitios de implantación en ratas, lo mismo que comunican otros autores en ratón (Yang y col., 1997) y en conejas (Hoffman y col., 1984) donde es mayor la síntesis endometrial de PGE, $\text{PGF}_{2\alpha}$ y PGI_2 en los sitios de implantación.

Sin embargo, una menor actividad contráctil en los sitios de implantación que en los intersitios en la rata, según lo que reportan Sterin A.B.F y col (1991), podría indicar que una menor producción uterina de PGE en el sitio de implantación se corresponde con la menor actividad contráctil local que permita allí la ubicación del embrión. Además, recordemos que en el momento en que se inicia la implantación embrionaria (en la noche del día 5 de preñez) la producción uterina de PGE y $\text{PGF}_{2\alpha}$ retorna a valores pre-implantatorios, es decir disminuye con respecto a la mañana del mismo día. Cabe especular entonces que en el momento y lugar precisos en que se inicia el proceso implantatorio, la producción endometrial de estos dos prostanoïdes debe disminuir para permitir allí la nidación.

El proceso implantatorio embrionario en la patología diabética de tipo no-insulino-dependiente se encuentra "compensatoriamente regulado"

Hemos demostrado que el NO y la PGE juegan un papel crucial durante la implantación embrionaria en la rata. En el útero de ratas sanas, estos compuestos vasoactivos aumentan durante los días peri-implantatorios, probablemente como consecuencia del incremento del estradiol plasmático en el día 4 (Malathy y col., 1986; Watson y col., 1975).

La PGE y el NO están relacionados con el incremento en la permeabilidad vascular, la vasodilatación y el incremento del flujo sanguíneo en el útero, fenómenos que ocurren durante la implantación de los embriones en el lumen (Weitlauf, 1994; Yee y col., 1993; Psychoyos, 1973; Kennedy, 1977).

La vasodilatación y el aumento del flujo sanguíneo son respuestas vasculares tempranas características de la hiperglucemia (Wentzel y col., 1995; Williamson y col., 1993), asociadas con los cambios metabólicos que resultan en la producción aumentada de radicales derivados del O_2 , como el anión superóxido (O_2^-), el NO (Schonfelder y col., 1996) y radicales hidroxilo ($OH^\bullet$) (Eriksson y Hakan Borg, 1993; Williamson y col., 1993).

Por ello analizamos la actividad de la NOS y la producción uterina de PGE durante el período peri-implantatorio de gestación en un modelo de rata con diabetes no-insulino-dependiente, compatible con el estado gestante.

Si bien se ha descripto retardo en el crecimiento fetal (Wentzel y col., 1995; Vercheval y col., 1990; Pampfer y col., 1990) y mayor incidencia de defectos congénitos (Pedersen y Molsted-Pedersen, 1981; Pampfer y col., 1994; Eriksson y Hakan Borg, 1993), tanto en pacientes humanos diabéticos como en diabetes inducida experimentalmente en animales, la influencia de la diabetes materna sobre el desarrollo temprano y la implantación embrionaria ha sido poco evaluado.

Demostramos que la actividad de la NOS en el útero está incrementada en este modelo de diabetes durante la preñez temprana. Además, el perfil temporal de su actividad es diferente a los animales control (luego de un incremento al comienzo de la implantación, en las ratas diabéticas, en el día 6 de preñez la actividad no retorna a los valores pre-implantatorios).

Nuestros resultados coinciden con antecedentes que reportan que el NO se encuentra incrementado en la patología diabética en diferentes tejidos animales (Williamson y col., 1993) y en placentas humanas (Schonfelder y col., 1996).

El incremento en la producción de NO asociado con la pseudohipoxia hiperglucémica en la diabetes podría ser iniciada por un incremento del Ca^{2+} intracelular. Por ejemplo, un incremento en la formación de O_2^- (Ikebuchi y col., 1991), podría activar la isoforma constitutiva de la NOS en tejidos de animales

diabéticos, a través de la activación de la movilización intracelular de Ca^{2+} (Williamson y col., 1993).

Tanto en suero materno y fetal como en placentas de ratas diabéticas, el contenido de L-arginina es similar o menor que en animales sanos (Copely y col., 1990). Sin embargo, la diabetes ha sido asociada con una activación del transportador de L-arginina en las células endoteliales humanas, que resulta en una activación de la síntesis de NO (Sobrevia y col., 1995). Por lo cual, no se puede descartar que el incremento en la actividad de la NOS en los úteros diabéticos se deba a una concentración endógena elevada de arginina.

Por otro lado, la producción uterina de PGE está incrementada en estos animales diabéticos y permanece alta luego de la implantación. La falta de un decaimiento post-implantatorio en la síntesis de PGE observado en ratas diabéticas no está causada por los embriones, ya que bloqueando su descenso al útero por ligadura oviductal no se previene.

Trabajos previos de nuestro laboratorio y otros, han documentado extensamente que la patología diabética está asociada con un incremento en la producción de diversos eicosanoides en diferentes sistemas de rata tales como ovocitos (Jawerbaum y col., 1996a), útero (Jawerbaum y col., 1994; Chartrel y col., 1989), embriones de 10 días (Jawerbaum y col., 1994), placenta y amnios (Jawerbaum y col., 1997b).

El incremento en la síntesis de PGE en el tejido uterino diabético podría ser un efecto secundario al incremento en la producción de NO, ya que la síntesis de PGs está bajo regulación positiva por NO en diversos sistemas, tales como en una línea celular de macrófagos de ratón (Salvemini y col., 1993), ovocitos (Jawerbaum y col., 1997a), útero (Franchi y col., 1994), riñón (Salvemini y col., 1995) e hipotálamo de rata (Rettori y col., 1992) y como mostramos anteriormente, durante la implantación embrionaria en ratas sanas.

Dado que el NO y la PGE ejercen una influencia positiva sobre el metabolismo de la glucosa en el útero aislado de rata (González y col., 1996; González y col., 1995), y sobre el proceso de vasodilatación en el útero (Förstermann y col., 1994; Yee y col., 1993), el incremento de ambas sustancias podría ser un efecto "compensatorio" en esta patología diabética.

La patología NIDD induce diversas alteraciones reproductivas en la rata, tales como un disminuido número de ovocitos en estro (Jawerbaum y col., 1996a), menor número y metabolismo alterado en embriones implantados en día 10 de gestación (Jawerbaum y col., 1994), y un trabajo de parto retrasado y prolongado en el tiempo (Jawerbaum y col., 1996b).

En el presente trabajo, mostramos que tanto la "tasa" como el "tiempo de inicio de la implantación" no están alterados. El menor número de embriones implantados observados en las ratas diabéticas puede atribuirse a una disminución en el número de mórulas pre-implantatorias más que a anomalías en el proceso de implantación en sí.

Este análisis se puede completar con trabajos previos del laboratorio (Jawerbaum y col., 1996a) donde el número de ovocitos ovulados en estro, en animales controles ($13,83 \pm 0,65$ $n=12$) difiere significativamente del número de ovocitos en animales diabéticos ($11,63 \pm 0,62$ $n=12$) ($p<0,05$). Si comparamos estos resultados con los mostrados en la presente tesis, en el grupo diabético, el número de mórulas del día 4 es significativamente menor ($8,27 \pm 1,85$ $n=9$) en relación al número de ovocitos ($p<0,05$), mientras que dentro del grupo control no hay diferencias. Debemos decir entonces, que la alteración diabética afecta el número de ovocitos, y además el desarrollo desde ovocito a mórula.

Por otro lado, sabiendo que el número de embriones implantados en el día 10 en el grupo control es de ($12,4 \pm 0,5$ $n=10$) y en el grupo diabético de ($8,57 \pm 0,92$ $n=10$) ($p<0,01$) (Jawerbaum y col., 1994), podríamos especular que durante el período post-implantatorio no se produce una nueva pérdida embrionaria, ya que

esos datos no difieren significativamente del número de sitios de implantación hallado en el día 5 de gestación.

Ha sido reportado en diferentes modelos experimentales de diabetes que el desarrollo embrionario de rata durante el período pre-implantatorio está alterado (Vercheval y col., 1990; Eriksson y Hakan Borg, 1993). Pampfer y col. (1990) atribuyen el menor número de embriones implantados en día 6 en un grupo de ratas diabéticas tipo I a que sus blastocistos de 5 días presentan una mayor pérdida celular en el macizo interno que en el trofoectodermo, lo cual sería incompatible con la organogénesis post-implantatoria.

Esto concuerda con los resultados que encontramos en nuestro trabajo, donde el proceso implantatorio per se parece no estar afectado en la diabetes.

De Hertogh y col. (1989) han reportado que los sitios de implantación embrionaria tanto en ratas control como diabéticas tienen menor nivel de receptores a estrógenos y mayores a progesterona que los intersitios, y que si bien esta distribución de los receptores endometriales está preservada en la patología diabética, su contenido tisular es inferior al de las ratas control. También en esta patología los niveles plasmáticos de estradiol son menores (De Hertogh y col., 1989), lo cual determina una menor acción estrogénica endometrial en el animal diabético. Los autores atribuyen la reducción de un 20% en la tasa de implantación embrionaria a estos desórdenes hormonales, pero determinando la "tasa de implantación" como el número de sitios de implantación, sin evaluar el número de embriones pre-implantatorios disponibles para anidar.

Es posible que en nuestro sistema, un ambiente hormonal alterado afecte el proceso ovulatorio y el desarrollo embrionario temprano.

Niveles anormales de glucosa, aminoácidos (Copely y col., 1990; Mallof y Boyd, 1986), triglicéridos y radicales libres del oxígeno (Eriksson y Hakan Borg, 1993) y NO (Schonfelder y col., 1996) pueden generar complicaciones vasculares y

circulatorias en la madre diabética, en la circulación feto-placentar y además ser embriotóxicos y dismorfogénicos para sus embriones (Vercheval y col., 1990; Pampfer y col., 1990; Wentzel y col., 1995).

Eriksson y Hakan Borg (1993) señalan que el proceso teratogénico en la gestación diabética dependería de la producción incrementada de radicales libres del O₂ debido a desórdenes metabólicos alterados en la madre.

Además, la hipoinsulinemia podría ser la causa de las deficiencias en el desarrollo embrionario ya que la insulina es mitogénica (Pampfer y col., 1994).

En este modelo de NIDD hemos reportado anteriormente que la producción de PGE y la actividad de la NOS están elevadas en los embriones de 10 días, y se han descrito también alteraciones metabólicas en dichos embriones (Jawerbaum y col., 1994). Entonces, la producción uterina elevada de NO y PGE podría afectar el desarrollo embrionario pre y post-implantatorio, disminuyendo así la viabilidad fetal.

En nuestro trabajo, la administración de insulina a animales diabéticos no revierte las alteraciones en la producción de PGs ni la actividad de la NOS en el útero, si bien retorna la glucemia a valores normales. Este hecho nos hace suponer que las alteraciones encontradas en la patología diabética no se deben exclusivamente a la hiperglucemia, sino a otros efectos de la enfermedad en el tejido materno o en sus embriones. Podríamos suponer que esas alteraciones involucren pasos posteriores a la unión de la insulina a su receptor, o bien, alteraciones mediadas por daños sistémicos diversos, como perturbaciones vasculares preestablecidas al tratamiento con insulina (cabe recordar que en este modelo, la diabetes se induce en neonatos).

En conclusión, estos resultados muestran que la tasa de implantación no está alterada en esta patología diabética, probablemente debido a un mecanismo

“compensatorio” que provee un incremento prolongado en los niveles de NO y PGE. Ambos compuestos resultan necesarios para la implantación embrionaria, permitiendo a los embriones posicionarse adecuadamente dentro del lumen uterino, a pesar de encontrarse en un ambiente metabólico adverso, lo cual repercute en su desarrollo previo y posterior.

Conclusión final

Proponemos que la implantación embrionaria en la rata resulta de una combinación de la acción de los esteroides ováricos y de agentes vasoactivos locales maternos o derivados del embrión.

Hemos demostrado que existe un incremento simultáneo en la actividad uterina de la enzima PLA₂ y en los niveles de PGE y PGF_{2α} liberados por el tejido uterino en el momento en que se inicia la implantación embrionaria.

Demostramos también, que existe un sistema nitridérgico incrementado durante la implantación embrionaria y bajo regulación estrogénica, que modula la producción uterina de PGs en la rata, según los niveles endógenos de NO y la presencia de los embriones en el útero.

Considerando que tanto el NO como las PGs tienen efectos vasoactivos y participan en procesos inflamatorios y de remodelado tisular, estas sustancias podrían actuar simultáneamente y producir una sumatoria de distintos mediadores en forma sinérgica o de cascada durante la implantación de los embriones.

Utilizando inhibidores de la enzima NOS, como el L-NAME, el bloqueo de la implantación no es completo, por lo que otros mediadores deben actuar simultáneamente, tal podría ser el caso de las PGs uterinas.

La producción uterina de PGE y PGF_{2α} depende tanto de la producción uterina de NO como de la presencia de los embriones en el lumen uterino durante la implantación.

Por su parte, la generación local de NO es un paso necesario para el proceso implantatorio embrionario, ya que regula mecanismos involucrados en la transformación tisular, la adecuada irrigación sanguínea al sitio de implantación y/o la decidualización endometrial. El incremento en la producción uterina de NO depende fundamentalmente de la influencia hormonal materna, siendo los estrógenos los responsables del incremento en la actividad de las isoformas Ca²⁺-

independiente y Ca^{2+} -dependiente de la NOS durante el inicio del proceso implantatorio embrionario, ya que ese incremento se inhibe mediante el tratamiento del animal con un antagonista de estradiol, el Tamoxifeno.

La ausencia de localización endometrial de la enzima NOS nos hace pensar que los procesos localizados en el sitio de implantación, podrían ser mayormente desencadenados por el embrión, probablemente bajo regulación materna. Sería interesante evaluar en el futuro, el efecto del NO uterino sobre otras sustancias liberadas por el embrión, que puedan generar la localización de la respuesta vascular. Por su parte, una menor producción uterina de PGE en el sitio de implantación podría corresponderse con la menor actividad contráctil local que permita allí la ubicación del embrión.

En nuestro sistema, la PGE, $\text{PGF}_{2\alpha}$ y el PAF de origen uterino o embrionario, activan a la enzima NOS según sus niveles endógenos. A su vez, la modulación ejercida por el PAF y el $\text{IFN}\alpha$ sobre la síntesis de PGs uterinas muestran la importancia de señales embrionarias necesarias para el reconocimiento materno de la preñez, que conduce a cambios hormonales responsables de iniciar la transformación tisular en el proceso implantatorio embrionario.

En el modelo de diabetes no-insulino-dependiente, la actividad de la NOS y la producción uterina de PGE (necesarias para que el proceso implantatorio ocurra) están aumentadas. Sin embargo, este aumento no altera el desarrollo normal del proceso implantatorio y quizás aún, resulte un mecanismo compensatorio de desórdenes metabólicos propios de dicha patología, ya que todos los embriones pre-implantatorios disponibles inician el proceso implantatorio en el momento adecuado.

REFERENCIAS

Biology of the uterus (1989). Segunda Edición de R.M. Wynn and W.P. Jollie (New York: Plenum Publishing Corporation).

Uterine Function: Molecular and cellular aspects (1990). Editado por M.E. Carsten and J.D. Miller (New York: Plenum Press).

Acker, G., Hecquet, F., Etienne, A., Braquet, P., and 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.

Angle, M.J., Jones, M.A., Mc Manus, L.M., Pinckard, R.N., and Harper, M.J.K. (1988). Platelet-activating factor in the rabbit uterus during early pregnancy. J. Reprod. Fert. 83, 711-722.

Battye, K.M., O'Neill, C., and Evans, G. (1992). Evidence that platelet-activating factor suppresses uterine oxytocin-induced 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin $F_{2\alpha}$ release and phosphatidylinositol hydrolysis in the ewe. Biol. Reprod. 47, 213-219.

Battye, K.M., Parkinson, T.J., Jenner, L.J., Evans, G., O'Neill, C., and Lamming, G.E. (1993). Potential synergism between platelet-activating factor and α 1-recombinant interferon in promoting luteal maintenance in cyclic ewes. J. Reprod. Fert. 97, 21-26.

Behrman, H.R. and Romero, R.J. (1992). Prostaglandins and prostaglandin-like products in reproduction: eicosanoids, peroxides, and oxygen radicals. In Reproductive Endocrinology. pp. 238-272.

Blankenship, T.N. and Given, R.L. (1992). Penetration of the uterine epithelial basement membrane during blastocyst implantation in the mouse. *Anat. Rec.* 233 (2) Jun, 196-204.

Bonello, N., McKie, K., Jasper, M., and rew, L., Ross, N., Braybon, E., Brannstrom, M., and Norman, R.J. (1996). Inhibition of nitric oxide:effects on interleukin-1 beta-enhanced ovulation rate, steroid hormones, and ovarian leukocyte distribution at ovulation in the rat. *Biol. Reprod.* 54 (2), 436-445.

Bonney, R.C., Qizilbash, S.T., and Franks, S. (1987). Endometrial phospholipase A2 enzymes and their regulation by steroid hormones. *J. Steroid Biochem.* 27 (4-6), 1057-1064.

Bredt, D.S. and Snyder, S.H. (1989). Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Nov.* 86, 9030-9033.

Buchanan, T.A. (1991). Glucose metabolism during pregnancy: normal physiology and implications for diabetes mellitus. *Isr. J. Med. Sci* 27, 432

Buhimschi, I., Ali, M., Jain, V., Chwalisz, K., and Garfield, R.E. (1996). Differential regulation of nitric oxide in the rat uterus and cervix during pregnancy and labour. *Human Reprod* 11 (8), 1755-1766.

Burgess, K.M., Ralph, M.M., Jenkin, G., and Thorburn, G.D. (1990). Effect of oxytocin and estradiol on uterine Prostaglandin release in nonpregnant and early-pregnant ewes. *Biol. Reprod.* 42(5-6), 822-833.

Chang, J., Musser, J.H., and Mc Gregor, H. (1987). Phospholipase A2: function

and pharmacological regulation. *Biochem. Pharmacol.* 36(15), 2429-2436.

Chartrel, N., Clabaut, M., Boismare, F., and Schrub, J.C. (1989). Increase in uterine Prostaglandin E₂, F₂alpha, prostacyclin and stability in thromboxane A₂ production during late pregnancy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Prostaglandins* 37, 695-706.

Chaud, M., Franchi, A., Beron de Estrada, M., and Gimeno, M.A.F. (1997). Role of nitric oxide on oxytocin-evoked contractions and Prostaglandin synthesis in isolated pregnant rat uterus. *Prost. Leuk and Essential Fatty Acids* 57, 323-329.

Chaves, M.C., Ribeiro, R.A., and Rao, V.S. (1993). Possible involvement of nitric oxide in estrogen-induced uterine edema in the immature rat. *Braz. J. Med. Biol. Res.* AUGUST 26 (8), 853-857.

Chieri, R.A., Pivetta, O.H., and Folgias, V.G. (1969). Altered ovulation pattern in experimental diabetes. *Fertil. Steril.* 20, 661-666.

Closa, D., Hotter, G., León, O., Roselló-Catafau, J., and Gelpi, E. (1991). Aspectos metodológicos de la determinación de fosfolipasa A₂ en páncreas de rata. *Química Analítica* 10 (3), 221-225.

Copely, A.D., Hendrich, C.E., and Porterfield, S.P. (1990). Distribution of free amino acids in streptozotocin-induced diabetic pregnant rats, their placentae and fetuses. *Horm. Metabol. Res.* 22, 65-70.

Cox, C., Cheng, H.C., and Dey, S.K. (1982). Phospholipase A₂ activity in the rat uterus during early pregnancy. *Prost. Leuk. and Med.* 8, 375-381.

Danet-Desnoyers, G., Meyer, M.D., Gross, T.S., Johnson, J.W., and Thatcher,

- W.W. (1995). Regulation of endometrial Prostaglandin synthesis during early pregnancy in cattle: effects of phospholipases and calcium in vitro. *Prostaglandins* 50, 313-330.
- De Hertogh, R., Verheyden, I., Glorieux, B., and Ekka, E. (1989). Oestrogen and progesterone receptors in endometrium and myometrium at the time of blastocyst implantation in pregnant diabetic rats. *Diabetologia* 32, 568-572.
- Dey, S.K., Hoversly, R.C., and Johnson, D.C. (1982). Phospholipase A2 activity in the rat uterus: Modulation by steroid hormones. *Prostaglandins* 23, 619-630.
- Diket, A.L., Pierce, M.R., Munshi, U.K., Volker, C.A., Eloby-Childress, S., Greenberg, S.S., Xiao-Jing Zhang, Clark, D.A., and Miller, M.J.S. (1994). Nitric oxide inhibition causes intrauterine growth retardation and hind-limb disruptions in rats. *Am. J. Obstet. Gynecol* 171 (5), 1243-1250.
- Ding, A.H., Nathan, C.F., and Stuehr, D.J. (1988). Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J. Immunology* 141, 2407-2412.
- Dong, Y.L., Gangula, P.R.R., and Yallampalli, C. (1996). Nitric oxide synthase isoforms in the rat uterus: differential regulation during pregnancy and labour. *J. Reprod. Fert.* 107, 249-254.
- Downing, I. and Poyser, N.L. (1983). Estimation of phospholipase A2 activity in guinea-pig endometrium on days 7 and 16 of the estrous cycle. *Prost. Leuk. and Med.* 12, 107-117.
- Efendic, S., Luft, R., and Wajngot, A. (1984). Aspects of the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocrine Reviews* 5, 410

El-Banna, A.A. (1980). The degenerative effect on rabbit implantation sites by indomethacin. I. Timing of indomethacin action, possible effect of uterine proteins and the effect of replacement doses of PGF₂α. *Prostaglandins* 20, 587-599.

Eriksson, U.J., Borg, H., Forsberg, H., and Styrrud, J. (1991). Diabetic embryopathy. Studies with animal and in vitro models. *Diabetes* 40, 94-98.

Eriksson, U.J. and Hakan Borg, L.A. (1993). Diabetes and embryonic malformations. Role of substrate-induced free-oxygen radical production for dysmorphogenesis in cultured rat embryos. *Diabetes* 42, 411-419.

Evans, C.H. (1995). Nitric oxide: what role does it play in inflammation and tissue destruction? In *Inflammation: Mechanisms and Therapeutics*. N.S.e.a. Doherty, ed. (Basel: Birkhauser Verlag), pp. 107-116.

Faletti, A., Viggiano, J.M., and Gimeno, M.A.F. (1995). Beta-endorphin inhibits Prostaglandin synthesis in rat ovaries and blocks induced ovulation. *Prostaglandin* 49, 93-103.

Fenwick, L., Jones, R.L., Naylor, B., Poyser, N.L., and Wilson, N.H. (1977). Production of Prostaglandins by the pseudopregnant rat uterus, in vitro, and the effect of tamoxifen with the identification of 6-keto-Prostaglandin F₁α as a major product. *Br. J. Pharmacol.* 59, 191-199.

Figuerola, J.P. and Massmann, G.A. (1995). Estrogen increases nitric oxide synthase activity in the uterus of nonpregnant sheep. *Am. J. Obstet. Gynecol* November 173 (5), 1539-1545.

Förstermann, U., Closs, E.I., Pollock, J.S., Nakane, M., Schwarz, P., Gath, I., and

Kleinert, H. (1994). Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 23 (6) 2nd part June, 1121-1131.

Franchi, A., Ogy o, D., Pérez Martínez, S., Chaud, M., Rettori, V., and Gimeno, M.A.F. (1996). Acción de la progesterona sobre la actividad de la NO Sintasa Ca-dependiente en el útero de rata. 46, 30(Abstract)

Franchi, A.M., Chaud, M., Rettori, V., Suburo, A., McCann, S.M., and Gimeno, M. (1994). Role of nitric oxide in eicosanoid synthesis and uterine motility in estrogen-treated rat uteri. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA January* 91, 539-543.

Frank, G.R., Brar, A.K., Cedars, M.I., and Hy werger, S. (1994). Prostaglandin E2 enhances human endometrial stromal cell differentiation. *Endocrinology* 134 (1), 258-263.

Fuhrmann, K., Reiher, H., Semmler, K., Fisher, F., Fisher, M., and Glockner, E. (1983). Prevention of congenital malformations in infants of insulin-dependent diabetic mothers. *Diab Care* 6, 219-223.

Gadsby, J.E., Heap, R.B., and Burton, R.D. (1980). Oestrogen production by blastocyst and early embryonic tissue of various species. *J. Reprod. Fertil.* 60, 417

Garris, D.R., West, R.L., and Pekala, P.H. (1986). Ultrastructural and metabolic changes associated with reproductive tract atrophy and adiposity in diabetic female mice. *Anat. Rec.* 216, 359-366.

Gimeno, A.L., Gimeno, M.A.F., Sterin-Speziale, N., Franchi, A.M., and González, E.T. (1982). Ovarian hormones, Prostaglandin generation and uterine contractions of castrated rats. *Rec. Adv. Fert. Res. part A*, 193-208.

Glaser, K.B., Mobilio, D., Chang, J.Y., and Senko, N. (1993). Phospholipase A2 enzymes: regulation and inhibition. *TIPS Reviews* 14, 92-98.

Goetz, R.M., Morano, I., Calovini, T., Studer, R., and Holtz, J. (1994). Increased expression of endothelial constitutive nitric oxide synthase in rat aorta during pregnancy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205 (1) November, 905-910.

Goldman, A.S., Baker, L., Piddington, R., Marx, B., Herold, R., and Egler, J. (1985). Hyperglycemia-induced teratogenesis is mediated by a functional deficiency of arachidonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 8227-8231.

González, E.T., Jawerbaum, A., Novaro, V., Faletti, A., and Gimeno, M.A.F. (1995). The role of nitric oxide in the metabolism of labeled glucose in isolated rat uterus. Influence of 17beta-estradiol. *Prostaglandins* 50, 225-235.

González, E.T., Jawerbaum, A., Novaro, V., and Gimeno, M.A.F. (1996). Prostanoid modulation of glucose transport in isolated diabetic rat uterus. *Prost. Leuk. and Essential Fatty Acids* 54, 293-296.

Guillomot, M., Fléchon, J.E., and Leroy, F. (1993). Blastocyst development and implantation. In *Reproduction in Mammals and Man*. M.C.L. C.Thibault, ed. (Paris: R.H.F.Hunter, Ellipses), pp. 388-410.

Haddad, E.K., Duclos, A.J., and Baines, M.G. (1995). Early embryo loss is associated with local production of nitric oxide by decidual mononuclear cells. *J. Exper. Med.* 4 Oct. 1143-1151.

Harper, M.J.K. and Walpole, A.L. (1967). A new derivative of triphenylethylene: effect on implantation and mode of action in rats. *J. Reprod. Fert.* 13, 101-119.

Hayashi, T., Yamada, K., Esaki, T., Kuzuya, M., Satake, S., Ishikawa, T., Hidaka, H., and Iguchi, A. (1995). Estrogen increases endothelial nitric oxide by a receptor-mediated system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214 (3) Sept, 847-855.

Heap, R.B., Flint, A.P., and Gadsby, J.E. (1979). Role of embryonic signals in the establishment of pregnancy. *Br. Med. Bull.* 35 (2), 129-135.

Helmer, S.D., Gross, T.S., Newton, G.R., Hansen, P.J., and Thatcher, W.W. (1989). Bovine trophoblast protein-1 complex alters endometrial protein and Prostaglandin secretion and induces an intracellular inhibitor of Prostaglandin synthesis in vitro. *J. Reprod. Fert.* 87(2), 421-430.

Hewitt, K., Beer, A.E., and Grinnell, F. (1979). Disappearance of anionic sites from the surface of the rat endometrial epithelium at the time of blastocyst implantation. *Biol. Reprod.* 21, 691-707.

Hodgen, G.D. and Itskovitz, J. (1988). Recognition and maintenance of pregnancy. In *The Physiology of Reproduction*. E.Knobel and J.Neill and col. ed. (New York: Raven Press, Ltd.), pp. 1995-2021.

Hoffman, L.H., Davenport, G.R., and Brash, A.R. (1984). Endometrial Prostaglandin and phospholipase activity related to implantation in rabbits: effects of dexamethasone. *Biol. Reprod.* 30, 544-555.

Hofman, G.E., Rao, C.V., De Leon, F.D., Toledo, A.A., and Sanfilippo, J.S. (1985). Human endometrial Prostaglandin E2 binding sites and their profiles during the menstrual cycle and in pathological states. *Am. J. Obstet. Gynecol* 151, 369-375.

- Huang, J., Roby, K.F., Pace, J.L., and and col. (1995). Cellular localization and hormonal regulation of inducible nitric oxide synthase in cycling mouse uterus. *J. Leukocyt. Biol.* 57, 27-35.
- Ikebuchi, Y., Masumoto, N., Tasaka, K., Koike, K., and Kasahara, K. (1991). Superoxide anion increases intracellular pH, intracellular free calcium, and arachidonate release in human anmion cells. *J. Biol. Chem.* 266, 13233-13237.
- Izumi, T., Honda, Z., Mutoh, H., Kume, K., and Shimizu, T. (1995). Regulation and signal transduction of PAF receptor. *Adv. Prost. Throm. Leuk. Research* 23, 461-466.
- Jaing, Y., Singh, A.K., Kannan, M.S., Johnson, D.E., and Shew, R.L. (1996). Isolation of nitric oxide synthase in the rat uterus. *Life Sciences* 58 (12), 1009-1014.
- Jawerbaum, A., Roselló-Catafau, J., González, E.T., Novaro, V., Gómez, G., Gelpi, E., Gimeno, A.L., and Gimeno, M.A.F. (1994). Glucose metabolism, triglyceride and glycogen levels, as well as eicosanoid production in isolated uterine strips and in embryos in a rat model of non-insulin-dependent diabetes mellitus during pregnancy. *Prostaglandins* 47, 81-95.
- Jawerbaum, A., González, E.T., Faletti, A., Novaro, V., Vitullo, A., and Gimeno, M.A.F. (1996a). Altered prostanoid production by cumulus-oocyte complexes in a rat model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Prostaglandins* 52, 209-219.
- Jawerbaum, A., Roselló-Catafau, J., González, E.T., Novaro, V., Gómez, G., Gelpi, E., and Gimeno, M.A.F. (1996b). Eicosanoid production, metabolism and contractile activity in the isolated uterus from non-insulin-dependent dibetic rats

during late pregnancy. *Prostaglandins* 51, 307-320.

Jawerbaum, A., González, E.T., Faletti, A., Novaro, V., and Gimeno, M.A.F. (1997a). Nitric oxide mediates human chorionic gonadotrophin-induced Prostaglandin E generation in rat oocyte-cumulus complexes. *Reprod. Fertil. Dev.* 9, 391-394.

Jawerbaum, A., Roselló-Catafau, J., González, E.T., Novaro, V., Gómez, G., Gelpi, E., and Gimeno, M.A.F. (1997b). Eicosanoid production by placental and amnion tissues from control and non-insulin-dependent diabetic rats. Influence of oxytocin in the incubating medium. *Prost. Leuk and Essential Fatty Acids* 56, 425-429.

Kaley, G. and Koller, A. (1995). Prostaglandin in-Nitric oxide interactions in the microcirculation. *Adv. Prost. Throm. Leuk. Research* 23, 485-490.

Kennedy, T.G., Keys, J.L., and King, G.J. (1986). Endometrial Prostaglandin E2 binding sites in the pig: characterization and changes during the estrous cycle and early pregnancy. *Biol. Reprod.* 35, 624-632.

Kennedy, T.G. (1977). Evidence for a role for Prostaglandins in the initiation of blastocyst implantation in the rat. *Biol. Reprod.* 16, 286-291.

Kennedy, T.G. (1979). Prostaglandins and increased endometrial vascular permeability resulting from the application of an artificial stimulus to the uterus of the rat sensitized for the decidual cell reaction. *Biol. Reprod.* 20, 560-566.

Kennedy, T.G., Martel, D., and Psychoyos, A. (1983). Endometrial Prostaglandin E2 binding: characterization in rats sensitized for the decidual cell reaction and changes during pseudopregnancy. *Biol. Reprod.* 29, 556-564.

Kennedy, T.G. and Lukash, L.A. (1982). Induction of decidualization in rats by the intrauterine infusion of Prostaglandins. *Biol. Reprod.* 27, 253-260.

Kennedy, T.G. and Zamecnik, J. (1978). The concentration of 6-keto-Prostaglandin F_{1α} is markedly elevated at the site of blastocyst implantation in the rat. *Prostaglandins* 16 (4), October, 599-605.

Kenneth, K.W. (1996). Inducible Cyclooxygenase and Nitric Oxide Synthase. In *Vascular Biology Research Center and Division of Hematology. Advances in Pharmacology*, volume 33. The university of Texas Health Science Center at Houston, ed. (Houston, Texas 77025: Department of Internal Medicine), pp. 179-206.

Kergoat, M., Guerre-Milo, M., Lavau, M., and Portha, B. (1991). Increased insulin action in rats with mild insulin deficiency induced by neonatal streptozotocin. *Am. J. Physiol.* 260, E561-E567.

Kirchick, H.J., Keyes, P.L., and Frye, B.E. (1978). Etiology of anovulation in the immature alloxan-diabetic rat treated with PMSG: Absence of the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 109, 316-318.

Knowles, R.G., Salter, M., Brooks, S.L., and Moncada, S. (1990). Anti-inflammatory glucocorticoids inhibit the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the lung, liver and aorta of the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Nov. 15; 172 (3), 1042-1048.

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

- Kudolo, G.B., Kasamo, M., and Harper, M.J.K. (1991). Autoradiographic localization of platelet-activating factor (PAF) binding sites in the rabbit endometrium during the peri-implantation period. *Cell Tissue Res.* 265, 231-241.
- Lees, C., Campbell, S., Jauniaux, E., Brown, R., Ramsay, B., Gibb, D., Moncada, S., and Marin, J.F. (1994). Arrest of preterm labour and prolongation of gestation with glyceryl trinitrate, a nitric oxide donor. *Lancet* 343, 1325-1326.
- Logeat, F., Sartor, P., Thu Vu Hai, M., and Milgrom, E. (1980). Local effect of the blastocyst on estrogen and progesterone receptors in the rat endometrium. *Science* 207 (7), March, 1083-1085.
- Loza Arredondo, M.C. (1991). Requerimientos hormonales para la implantacion del blastocisto. *Gin. Obst. Mex.* 59 (Diciembre), 347-352.
- Magness, R.R., Rosenfeld, C.R., Hassan, A., and Shaul, P.W. (1996). Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. I. Effects of ANG II on PGI₂ and NO in pregnancy. *Am. J. Physiol.* 270, H1914-H1923.
- Magness, R.R., Shaw, C.E., Phernetton, T.M., Zheng, J., and Bird, I.M. (1997). Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. II. Pregnancy effects on NO synthase expression. *Am. J. Physiol.* 272, H1730-H1740.
- Malathy, P.V., Cheng, H.C., and Dey, S.K. (1986). Production of leukotrienes and Prostaglandins in the rat uterus during periimplantation period. *Prostaglandins* 32 (4), 605-614.
- Mallof, B.L. and Boyd, B.K. (1986). Physiologic and cellular insulin action in a glucose-intolerant model of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes in rats. *Diabetologia* 29, 295-300.

Melin, B., Caron, M., Cherqui, G., Blivet, M.J., Bailbe, D., Picard, J., Capeau, J., and Portha, B. (1990). Increased insulin action in cultured hepatocytes from rats with diabetes induced by neonatal streptozotocin. *Endocrinology* 1693-1701.

Metzger, B. (1991). Summary and recommendations of the third international workshop conference on gestational diabetes mellitus. *Diabetes* 40, 201

Milano, S., Arcoleo, F., Dieli, M., D'Agostino, R., D'Agostino, P., De Nucci, G., and Cillari, E. (1995). Prostaglandin in E2 regulates inducible nitric oxide synthase in the murine macrophage cell line J774. *Prostaglandins* 49, 105-115.

Miller, M.J.S., Voelker, C.A., Olister, S., Thompson, J.H., Zhang, X.J., Rivera, D., Eloby-Childress, S., Liu, X., Clark, D.A., and Pierce, M.R. (1996). Fetal growth retardation in rats may result from apoptosis: role of peroxynitrite. *Free Rad. Biol. Med.* 21 (5), 619-629.

Minhas, B.S., Ripps, B.A., Zhu, Y.P., Kim, H.N., Burwinkel, T.H., and Gleicher, N. (1996). Platelet activating factor and conception. *AJRI* 35, 267-271.

Misko, T.P., Moore, W.M., Kasten, T.P., Nickols, G.A., Corbertt, J.A., Tilton, R.G., McDaniel, M.L., Williamson, J.R., and Currie, M.G. (1993). Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *EJP* 233, 119-125.

Mitchell, S.N. and Smith, S.K. (1992). The effect of progesterone and human interferon α -2 on the release of PGF $_2\alpha$ and PGE from epithelial cells of human proliferative endometrium. *Prostaglandins* 44, 457-470.

Moley, K.H., Chi, M.M., Manchester, J.K., McDougal, D.B., and Lowry, O.H. (1996). Alterations of intraembryonic metabolites in preimplantation mouse

embryos exposed to elevated concentrations of glucose: a metabolic explanation for the developmental retardation seen in preimplantation embryos from diabetic animals. *Biol. Reprod.* **54**, 1209-1216.

Moncada, S., Palmer, R.M.J., and Higgs, E.A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**, 109-142.

Moncada, S. and Palmer, R.M.J. (1990). The L-arginine: nitric oxide pathway in the vessel wall. Nitric Oxide from L-arginine: A bioregulatory system 19(Abstract)

Moorhead, C.S., Lawhun, M., and Nieder, G.L. (1995). Localization of NADPH diaphorase in the mouse uterus during the first half of pregnancy and during an artificially induced decidual cell reaction. *J. Histochem. Cytochem.* **10**, October, 1053-1060.

Motta, A., Franchi, A.M., and Gimeno, M.A.F. (1995). Role of interferon-alfa in arachidonic acid metabolism by the rat uteri from spayed animals: Effect of 17beta- estradiol. *Prost. Leuk and Essential Fatty Acids* **53**, 267-271.

Mustafa, S.B., Howard, K.M., and Olson, M.S. (1996). Platelet-activating factor augments lipopolysaccharide-induced nitric oxide formation by rat Kupffer Cells. *Hepatology* **23**, 1622-1630.

Nathan, C. (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB* **6 September**, 3051-3064.

National Diabetes Data Group (1979). Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* **28**, December,

Natuzzi, E.S., Ursell, P.C., Harrison, M., Buscher, C., and Riemer, R.K. (1993).

Nitric Oxide synthase activity in the pregnant uterus decreases at parturition.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 194 (1) July, 1-8.

Norman, J.E. and Cameron, I.T. (1996). Nitric oxide in the human uterus. *Reviews of Reproduction* 1, 61-68.

Novy, M.J. and Liggins, G.C. (1980). Rol de las prostaglandinas en control fisiológico del parto. *Seminarios Perinatología* 4, 45-66.

O'Neill, C. (1985). Examination of the causes of early pregnancy-associated thrombocytopenia in mice. *J. Reprod. Fert.* 73, 567-577.

O'Neill, C., Ryan, J.P., Collier, M., Saunders, D.M., Ammit, A.J., and Pike, I.L. (1989). Supplementation of IVF culture media with platelet activating factor (PAF) increased the pregnancy rate following embryo transfer. *Lancet* ii, 769-772.

O'Neill, C. (1995). Platelet-activating Factor-antagonists reduce implantation in mice at low doses only. *Reprod. Fert. Dev.* 7, 51-57.

O'Sullivan, J., Charles, D., Mahan, C., and Dy row, R. (1973). Gestational diabetes and perinatal mortality rate. *Am. J. Obstet. Gynecol* 116, 901-904.

Palmer, R.M.J., and rews. T., Foxwell, N.A., and Moncada, S. (1992). Glucocorticoids do not affect the induction of a novel calcium-dependent nitric oxide synthase in rabbit chondrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188, 209-215.

Pampfer, S., De Hertogh, R., Vy erheyden, I., Michiels, B., and Vercheval, M. (1990). Decreased inner cell mass proportion in blastocysts from diabetic rats. *Diabetes* 39, 471-476.

Pampfer, S., Wu, Y.D., Verheyden, I., and De Hertogh, R. (1994). In vitro study of the carry-over effect associated with early diabetic embryopathy in the rat. *Diabetologia* 37, 855-862.

Patterson, J.S. (1981). Clinical aspects and development of antioestrogen therapy: a review of the endocrine effects of tamoxifen in animals and man. *J. Endocr.* 89, 67-75.

Pedersen, J.F. and Molsted-Pedersen, L. (1981). Early growth delay detected by ultrasound marks increased risk for congenital malformation in diabetic pregnancy. *Br. Med. J.* 283, 269-271.

Phillips, C.A. and Poyser, N.L. (1981). Studies on the involvement of Prostaglandins in implantation in the rat. *J. Reprod. Fert.* 62, 73-81.

Phillips, C.A. and Poyser, N.L. (1992). Studies on the involvement of Prostaglandins in implantation in the rat. *Prost. Leuk. and Ess. Fatty Acids* 46, 163-165.

Piacentini, M. and Autuori, F. (1994). Immunohistochemical localization of tissue transglutaminase and Bcl-2 in rat uterine tissues during embryo implantation and post-partum involution. *Differentiation* 57 (1) Jun. 51-61.

Portha, B., Picon, L., and Rosselin, G. (1979). Chemical diabetes in the adult rat as the spontaneous evolution of neonatal diabetes. *Diabetologia* 17, 371-377.

Psychoyos, A. (1973). Endocrine control of egg implantation. In *Hy book of Physiology*. R.O. Greep, E.G. Astwood, and S.R. Geiger, eds. (Washington: American Physiological Society), pp. 187

Radomski, M.W., Jenkins, D.C., Holmes, L., and Moncada, S. (1991). Human colorectal adenocarcinoma cells: differential nitric oxide synthesis determines their ability to aggregate platelets. *Cancer Res.* 51, 6073-6078.

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

Rettori, V., Gimeno, M., Lyson, K., and McCann, S.M. (1992). Nitric oxide mediates norepinephrine-induced Prostaglandin E2 release from the hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 11543-11546.

Rosenfeld, C.R., Cox, B.E., Roy, T., and Magness, R.R. (1996). Nitric oxide contributes to estrogen-induced vasodilation of the ovine uterine circulation. *J. Clin. Invest.* 98, 2158-2166.

Saksena, S.K., Lau, I.F., and Chang, M.C. (1976). Relationship between oestrogen, Prostaglandin F2 α and histamine in delayed implantation in the mouse. *Acta Endocrinologica* 81 (4), 801-807.

Salamonsen, L.A. (1991). Effect of platelet activating factor on Prostaglandin release from ovine endometrial cells in culture. *Prost. Leuk. and Essential Fatty Acids* 44, 67-70.

Salamonsen, L.A., Cherny, R.A., and Findlay, J.K. (1992). Studies in vitro of effects of steroid hormones and the blastocyst on endometrial function in the sheep. *Reprod. Fert. Dev.* 4, 275-281.

Salter, M., Knowles, R.G., and Moncada, S. (1991). Widespread tissue

distribution, species distribution and changes in activity of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent nitric oxide synthases. *FEBS* 291 (1) October, 145-149.

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

Salvemini, D., Seibert, K., Masferrer, J.L., Settle, S.L., Misko, T.P., Currie, M.G., and Needleman, P. (1995). Nitric oxide and the cyclooxygenase pathway. *Adv. Prost. Throm. Leuk. Research* 23, 491-493.

Sautebin, L., Ialenti, A., Iannaro, A., and Di Rosa, M. (1995). Modulation by nitric oxide of Prostaglandin biosynthesis in the rat. *British J. Pharmacol.* 114, 323-328.

Schini, V.B., Catovsky, S., Schray-Utz, B., Busse, R., and Vanhoutte, P.M. (1994). Insulin-like growth factor I inhibits induction of Nitric Oxide Synthase in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 74, 24-32.

Schonfelder, G., John, M., Hopp, H., Fuhr, N., Van der Giet, M., and Paul, M. (1996). Expression of inducible nitric oxide synthase in placenta of women with gestational diabetes. *FASEB J.* 10, 777-784.

Shaikh, A.A. (1971). Estrone and estradiol levels in the ovarian venous blood from rats during the estrous cycle and pregnancy. *Biol. Reprod.* 5, 297-307.

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

Shukovski, L. and Tsafiriri, A. (1994). The involvement of nitric oxide in the

ovulatory process in the rat. *Endocrinology* 135 (5), 2287-2290.

Singer, D.B., Widness, J.A., Liu, C.T., and Ellis, R.A. (1984). Placentas in pregnancies complicated by maternal diabetes. *Surv. Synth. Pathol. Res.* 3, 333-341.

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

Smith, S.K. and Kelly, R.W. (1988a). Prostaglandin- and steroid-induced endometrial changes in early human pregnancy. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 36, 143-154.

Smith, S.K. and Kelly, R.W. (1988b). Effect of platelet-activating factor on the release of PGF-2 α and PGE-2 by separated cells of human endometrium. *J. Reprod. Fert.* 82, 271-276.

Sobrevia, L., Cesare, P., Yudilevich, D.L., and Mann, G.E. (1995). Diabetes-induced activation of system γ^+ and nitric oxide synthase in human endothelial cells: association with membrane hyperpolarization. *J. Physiol. Lond.* 489, 183-192.

Sterin, A.B.F., Linares, J.A., and Goldraij, A. (1991). Spontaneous activity in vitro of the uterine horns of unilaterally pregnant rats. Relations with glycogen and triglycerides levels. *Archives Internationales de Physiologie* 99 *Bioch. et Biophys.* 141-143.

Strauss, J.F. and Gurside, E. (1992). The endometrium: regulation and dysfunction. In *Reproductive Endocrinology*. pp. 309-356.

- Suburo, A.M., Chaud, M., Franchi, A., Polak, J.M., and Gimeno, 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.
- Tasikiran, D., Stefanovic-Racic, M., Georgescu, H., and Evans, C. (1994). Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200, 142-148.
- Tawfik, O.W., Sagrillo, C., Johnson, D.C., and Dey, S.K. (1987). Decidualization in the rat: role of leukotrienes and Prostaglandins. *Prost. Leuk. and Med.* 29, 221-227.
- Triadou, N., Portha, B., Picon, L., and Rossellin, G. (1982). Experimental chemical diabetes and pregnancy in the rat. Evolution of glucose tolerance and insulin response. *Diabetes* 31, 75-79.
- Van Buren, G.A., Yang, D., and Clark, K.E. (1992). Estrogen-induced uterine vasodilatation is antagonized by L-nitroarginine methyl ester, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Am J Obstet Gynecol* 167 (3) Sept. 828-833.
- Van Den Bosch, H., Aarsman, A.J., Van Schaik, R.H.N., Schalkwijk, C.G., Neijs, F.W., and Sturk, A. (1990). Structural and enzymological properties of cellular phospholipases A2. *Fatty Acid Metabolism* 18, 781-785.
- Vane, J.R., Mitchell, J.A., Appleton, I., Tomlinson, A., Bishop-Bailey, D., Croxall, J., and Willoughby, D.A. (1994). Inducible isoforms of cyclooxygenase and NO synthase in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 2046-2050.
- Vercheval, M., De Hertogh, R., Pampfer, S., Vy erheyden, I., Michiels, B., De

Bernardi, P., and De Meyer, R. (1990). Experimental diabetes impairs rat embryo development during the preimplantation period. *Diabetologia* 33, 187-191.

Vomachka, M.S. and Johnson, D.C. (1982). Ovulation, ovarian 17 alpha-hydroxylase activity, and serum concentrations of luteinizing hormone, estradiol, and progesterone in immature rats with diabetes mellitus induced by streptozotocin. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 171, 207-213.

Ward, K., Johnston, C., Beard, J., Benedetti, T., Halter, J., and Porte, D. (1985). Insulin resistance and impaired insulin secretion in subjects with histories of gestational diabetes mellitus. *Diabetes* 34, 861-869.

Watson, J., and erson, F.B., Alam, M., O'Grady, J.E., and Heald, P.J. (1975). Plasma hormones and pituitary luteinizing hormone in the rat during the early stages of pregnancy and after post-coital treatment with tamoxifen (ICI 46,474). *J. Endocr.* 65, 7-17.

Watson, J. and Howson, J.W.H. (1977). Inhibition of tamoxifen of the stimulatory action of FSH on oestradiol-17 β synthesis by rat ovaries in vitro. *J. Reprod. Fert.* 49, 375-376.

Weiner, C.P., Knowles, R.G., and Moncada, S. (1994a). Induction of nitric oxide synthases early in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 171 (3) Sept. 838-843.

Weiner, C.P., Knowles, R.G., Nelson, S.E., and Stegink, L.D. (1994b). Pregnancy increases Guanosine 3',5'-Monophosphate in the myometrium independent of nitric oxide synthesis. *Endocrinology* 135 (6), 2473-2478.

Weiner, C.P., Lizasoain, I., Baylis, S.A., Knowles, R.G., Charles, I.G., and Moncada, S. (1994c). Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by

sex hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(11), 5212-5216.

Weitlauf, H.M. (1994). Biology of Implantation. In *The Physiology of Reproduction*, Second Edition. E. Knobil and J.D. Neill, eds. (New York: Raven Press, LTd.), pp. 391-440.

Welsh, N. and Hellerstrom, C. (1990). In vitro restoration of insulin production in islets from adult rats treated neonatally with streptozotocin. *Endocrinology* 126, 1842-1848.

Wentzel, P., Jansson, L., and Eriksson, U.J. (1995). Diabetes in pregnancy: uterine blood flow and embryonic development in the rat. *Pediatric Research* 38, 598-606.

Williamson, J.R., Chang, K., Frangos, M., Hasan, K.S., Ido, Y., Kawamura, T., Nyengaard, J.R., Van den Enden, M., Kilo, C., and Tilton, R.G. (1993). Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes* 42, 801-813.

Wood, G.W., De, M., and Sanford, T.H. (1992). Production of interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in response to estrogen and progesterone during the periimplantation period of pregnancy. *J. Cell Biochem Suppl.* 16B, 291

Yallampalli, C., Garfield, R.E., and Byam-Smith, M. (1993). Nitric Oxide inhibits uterine contractility during pregnancy but not during delivery. *Endocrinology* 133 (4), 1899-1902.

Yallampalli, C., Byam-Smith, M., Nelson, S.O., and Garfield, R.E. (1994). Steroid hormones modulate the production of nitric oxide and cGMP in the rat uterus. *Endocrinology* 134, 1971-1974.

Yang, Z.M., Das, S.K., Wang, J., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., and Dey, S.K. (1997). Potential sites of Prostaglandin actions in the periimplantation mouse uterus: Differential expression and regulation of Prostaglandin receptor genes. *Biol. Reprod.* 56, 368-379.

Yee, G.M., Squires, P.M., Cejic, S.S., and Kennedy, T.G. (1993). Lipid mediators of implantation and decidualization. *Journal of Lipid Mediators* 6, 525-534.

Yen, S.S.C. (1992). Endocrine-metabolic adaptations in pregnancy. In *Reproductive Endocrinology*. pp. 936-981.