

Tesis de Posgrado

Rol del óxido nítrico (NO) en la reabsorción embrionaria inducida por LPS

Ogando, Diego G.

2002

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:

Ogando, Diego G.. (2002). Rol del óxido nítrico (NO) en la reabsorción embrionaria inducida por LPS. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3521_Ogando.pdf

Cita tipo Chicago:

Ogando, Diego G.. "Rol del óxido nítrico (NO) en la reabsorción embrionaria inducida por LPS". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3521_Ogando.pdf

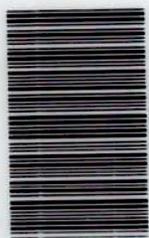
EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



TES03521

TESIS
CS. BIOLÓGICAS
3521
Ogando
Diego G.

Biblioteca FCEyN • UBA

03521

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Ciencias Exactas y Naturales

Deficiencia de Nítrico en la Reabsorción Embrionaria Inducida por LPS”

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

Autor: Lic. Diego G. Ogando
Directora: Dra. Ana María Franchi
Consejera de estudios: Dra. Graciela Guerrero



Laboratorio de Fisiopatología de la Preñez y el Parto
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)

CONICET
2002

M35-21

**“Rol del óxido nítrico (NO) en la reabsorción
embrionaria inducida por LPS”**

**“Role of nitric oxide (NO) in LPS-induced
embryonic resorption”**

- **Agradecimientos**

- Quiero agradecer a Ana, que me demuestra lo que es aplicar la sabiduría y el coraje en el trabajo y la vida cotidiana.
- A Mariana por ser un ejemplo profesional y de persona, y por su gran ayuda.
- A María Laura por su gran personalidad y calidez, y por su gran ayuda.
- A Maki por su gran compañerismo y apoyo.
- A Rami por su contención y aliento y por su gran ayuda
- A Dante por su ayuda con las técnicas inmunohistoquímicas.
- A Valeria por su apoyo y conocimientos.
- A Sara Orrea y su equipo por su ayuda con la histología.
- A Alicia Motta, Alejandra y Teresita, por las horas de trabajo compartidas.
- A Julio por ser una excelente persona.
- A Ana Inés, Patricia, Isabel y Noemí por su gran ayuda.
- A Rita, Estela, Karpluk y Carlitos por su gran ayuda.
- A todo el personal del CEFYBO.
- A mi Facultad, de la cual estoy muy orgulloso.
- A mis padres que me enseñaron el valor del trabajo duro en la sombra.
- A Marta y a Ricardo por su gran apoyo incondicional
- A Naty mi compañera en la vida.
- A Delfi, lo mejor que hice.

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

Ogando DG, Paz D, Cella M and Franchi AM

Increased production of nitric oxide plays a fundamental role in lipopolysaccharide induced embryonic resorption in mouse. (2002, aceptado para su publicación en *Reproduction*)

RESUMEN

El óxido nítrico (NO) cumple importantes funciones durante la preñez (implantación, decidualización, vasodilatación y relajación miometrial). Sin embargo, en altas concentraciones como las encontradas en los casos de sepsis, el NO tiene efectos tóxicos dado su carácter de radical libre. El objetivo de este trabajo es caracterizar la producción del NO en útero y decidua en la reabsorción embrionaria inducida por lipopolisacárido (LPS) y determinar cuáles son las isoformas de la óxido nítrico sintasa (NOS) implicadas en dicho mecanismo. Se ha observado que el LPS produce un 100% de reabsorción embrionaria a las 24 horas, con una expulsión del feto a las 48 hs. El LPS incrementó la producción de NO en decidua y útero con un máximo en su producción a las 6 horas. Este incremento se debe a la inducción de la expresión de la isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa en decidua y útero, y de la isoforma neuronal (nNOS) solamente en decidua que fue detectada por western blot e inmunohistoquímica. El LPS aumentó la expresión de iNOS en decidua y células miometriales y la expresión de nNOS en células de la decidua. El LPS produjo, además, la fibrinólisis y la infiltración de macrófagos iNOS y CD14(receptor de LPS) positivos. Por otro lado, el LPS indujo la expresión de CD14 en las glándulas endometriales que podrían amplificar la respuesta inflamatoria. La Aminoguanidina (AG), un inhibidor de la actividad de la isoforma iNOS, revirtió la reabsorción embrionaria inducida por LPS. Este hecho podría explicarse por una inhibición en la producción de NO, pero también podría deberse a una inhibición de la infiltración celular y de

la fibrinólisis. El tratamiento con LPS produjo un aumento en el daño oxidativo de la decidua debido al anión peroxinitrito, evidenciado por la nitración de las tirosinas proteicas, hecho que también fue revertido por AG. A su vez, se cuantificó un aumento en la síntesis de prostaglandinas en decidua y útero debido al LPS, pero la AG sólo revirtió el efecto en útero. Estos resultados demuestran que el NO cumple un papel fundamental en la reabsorción embrionaria inducida por LPS.

Palabras claves: LPS, óxido nítrico, NO sintasas, reabsorción embrionaria, CD14, prostaglandinas, peroxinitrito.

Summary

Nitric oxide (NO) fulfills important functions during pregnancy: implantation, decidualization, vasodilatation and myometrial relaxation. However, in high concentrations such as the ones that are produced in sepsis, it has toxic effects since it is a free radical. The purpose of this work is to characterize the uterine and decidual NO production in the lipopolysaccharide (LPS) induced embryonic resorption and to determine which isoforms of the nitric oxide synthases (NOS) take part in it. It has been observed that LPS produced 100% embryonic resorption at 24h, with the complete fetus expulsions at 48 h. LPS increased NO decidual and uterine production - having its maximum production at 6 h. This increase is due to induction of expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) isoform in decidua and uterus, and neuronal nitric oxide synthase (nNOS) isoform only in decidua detected by western blot and immunohistochemistry. LPS increased the iNOS expression in decidual and myometrial cells and the nNOS expression in decidual cells. LPS also caused fibrinolysis and infiltration of mesometrial decidua by positive iNOS and CD14 (LPS receptor) macrophages. Also, LPS induced the CD14 expression in endometrial glands, that could amplify the inflammatory response.

Aminoguanidine (AG), an inhibitor of iNOS activity, totally reversed the LPS-induced embryonic resorption. This could be explained by an inhibition of the increase in the NO production but also by an inhibition of the cellular infiltration and fibrinolysis.

LPS caused an increase in the oxidative damage of the decidua due to the peroxynitrite anion. This was evidenced by nitration of tyrosine proteins which was also reversed by AG. At the same time, an increase in the synthesis of prostaglandins was quantified in uterus and decidua by LPS, but in this case, AG only reversed the effect in uterus.

These results show that NO fulfills a fundamental role in LPS induced embryonic resorption.

Key words: LPS, nitric oxide, nitric oxide synthases, embryonic resorption, CD14, prostaglandins, peroxynitrite

Abreviaturas

AA:	Ácido araquidónico
AG:	Aminoguanidina
AGEPI:	Ácidos grasos esenciales poliinsaturados
AMPc:	Adenosín monofosfato cíclico
ARDS:	Síndrome de distress respiratorio agudo
ATP:	Adenosín trifosfato
BH4:	Tetrahidrobiopterina
BPI:	Proteína bactercida por incremento de la permeabilidad
CAM:	Calmodulina
cDNA:	Ácido desoxirribonucleico copia
CO:	Monóxido de carbono
COX:	Ciclooxigenasa
CPR:	Citocromo P450 reductasa
DGC:	Digliceridocinas
DGL:	Digliceridolipasas
DIC:	Coagulación intravascular diseminada
DIC:	Coagulación intravascular diseminada
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
EGF:	Factor de crecimiento epidermal
eNOS:	NO sintasa epitelial
FAD:	Flavina adenina dinucleótido
FMN:	Flavina mononucleótido
GADPH:	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
GC:	Guanilato ciclasa
GMPc:	Guanosín monofosfato cíclico
GSH:	Glutación
H2O2:	Peróxido de hidrógeno
HDL:	Lipoproteína de alta densidad

HHT:	Ácido hidroxihexadecatrienoico
HPETEs:	hidroperóxidos
IL:	Interleuquina
IL1-R:	Receptor de interleuquina 1
INF:	Interferón
iNOS:	NO sintasa inducible
LA:	Ácido linoleico
LAA:	Ácido alfa linoleico
LBP:	Proteína de unión al LPS
LGL:	linfocitos grandes granulares
L-NAME:	L-arginina-metil-ester
L-NMMA:	L-monometil-L-arginina
LPS:	Lipopolisacáridos
LXs:	Leucotrienos
MDA:	Malondialdehído
MMP-2:	Metaloproteasa 2
MMPs:	Metaloproteasas
MOF/MODS:	Falla o disfunción múltiple de órganos
MPO:	Mieloperoxidasa
NADH:	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
NADPH:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
NK:	Natural killer
NMDA:	Ácido n-metil-D-aspártico
nNOS:	NO sintasa neuronal
NO:	Óxido nítrico
NOSs:	Óxido nítrico sintasas
PAF:	Factor activador de plaquetas
PAF:	Factor activador de plaquetas
PGD:	Prostaglandina D
PGE ₂ :	Prostaglandina E ₂
PGH:	Sintetasa de Prostaglandina H

PGI ₂ :	Prostaciclina
PGs:	Prostaglandinas
PI-PLC:	Fosfoinositol-fosfolipasa C
PKC:	Proteína quinasa C
PLA ₂ :	Fosfolipasa A ₂
RNA _m :	Ácido ribonucleico mensajero
RNOX:	Especies reactivas derivadas del NO y el oxígeno
ROS:	Especies reactivas del oxígeno
RSNO:	S-nitrosotioles
SIRS:	Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica
SIRS:	Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica
SOD:	Super óxido dismutasa
TGF:	Factor de crecimiento transformante
Th1:	Linfocito T helper de tipo 1
Th2:	Linfocito T helper de tipo 2
TNF:	Factor de necrosis tumoral
TXA ₂ :	Tromboxano A ₂
TXs:	Tromboxanos

INDICE

Introducción	1
1. Oxido nítrico	1
1.1. Biosíntesis	1
1.2. Isoformas de la NOS y su regulación	5
1.2.1. nNOS	5
1.2.2. iNOS	7
1.2.3. eNOS	9
1.3. Funciones	12
1.3.1. Funciones regulatorias	14
1.3.2. Funciones citotóxicas	15
1.4. Rol del NO en la inflamación	19
1.4.1. Rol regulatorio	19
1.4.2. Rol citotóxico	22
1.5. Rol del NO en la gestación	23
1.5.1. Implantación	24
1.5.2. Mantenimiento del flujo útero-placentario	25
1.5.3. Control de la contractilidad uterina	26
1.5.4. Control de las infecciones	27
1.6. Reabsorción embrionaria inducida por LPS	28
2. LPS y su mecanismo de acción	30
2.1. Respuesta inflamatoria	30
2.2. Mecanismos dependientes e independientes del oxígeno	32
2.2.1. Mecanismos independientes del oxígeno	33
2.2.2. Mecanismos dependientes del oxígeno	34
2.2.3. Mecanismos antioxidantes	36
2.3. Patologías asociadas a la respuesta inflamatoria aguda	37
2.4. Papel del LPS en el shock séptico	37

2.4.1.Shock séptico	37
2.4.2.Shock séptico inducido por LPS	38
2.5.Transporte y receptores de LPS	42
3. Sistema Reproductor	45
3.1.Anatomía	45
3.2.Histología	45
3.3.Fisiología	46
3.4.Decidualización	47
4. Prostaglandinas	48
4.1.Ciclooxigenasa	51
Hipótesis de trabajo	53
Hipótesis general	54
Objetivos	54
Materiales	56
1. Drogas y químicos	56
2. Animales de laboratorio	56
Métodos	56
1. Experimentos	56
1.1.Experimento 1: Efecto de AG en la reabsorción embrionaria inducida por LPS	57
1.2.Experimento 2: Efecto de LPS en la producción de NO3 +NO2	58
1.3.Experimento 3: Histología, inmunodetección de las isoformas de la NOS, CD14 y Nitrotirosina, medición de la actividad NOS, medición de la producción de prostaglandinas	58

2. Técnicas	59
2.1.Cultivo de sitios de implantación	59
2.2.Medición de NO ₃ +NO ₂	59
2.3.Medición de la actividad NOS	60
2.4.Western Blot	61
2.5.Inmunohistoquímica	62
2.6.RIA de Prostaglandinas	63
2.7.Estadística	64
Resultados	65

1. Establecimiento de un modelo de reabsorción embrionaria inducida por LPS	65
1.1 Estudios histológicos	67
2. Efecto de LPS en la producción de NO ₃ +NO ₂	69
3. Efecto de AG en la reabsorción embrionaria inducida por LPS	71
4. Estudio histológico de los distintos tratamientos	72
5. Inmunodetección de las isoformas de la NOS	76
5.1 Detección de las isoformas 6h post-inyección de LPS	76
5.2.Detección de las isoformas a las 24h post-inyección de LPS	84
6. Efecto de LPS y AG sobre la actividad NOS	95
7. Efecto de LPS y AG sobre la liberación de prostaglandinas	97
7.1 Decidua	97
7.2 Útero	98
8. Efecto de LPS y AG sobre la nitración proteica	101
9. Inmunodetección de CD14	105

Discusión	109
<hr/>	
Conclusiones	120
<hr/>	
Bibliografía	121



Introducción

Introducción

1. Oxido Nítrico

El óxido nítrico (NO) es una molécula inestable y multifuncional que media numerosos procesos fisiológicos como la neurotransmisión, la regulación inmune, la motilidad del músculo liso, etc.

1.1. Biosíntesis de NO

El óxido nítrico (NO) es sintetizado por una familia de isoenzimas, óxido nítrico sintasas (NOSs), que catalizan la oxidación de la L-arginina a NO y L-citrulina. (Figura 1).

Hasta el momento en mamíferos se han clonado tres isoenzimas denominadas: isoformas 1, 2 y 3. Todas las isoformas pertenecen a la familia de los citocromos P-450 (White y Marletta, 1992) pero se caracterizan por no pertenecer a la familia de las proteínas integrales de membrana y por contener los dominios hemo y reductasa en el mismo polipéptido.

Todas las NO sintasas utilizan L-arginina como sustrato, con oxígeno molecular y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en forma reducida (NADPH) como co-sustratos (Kwon y col., 1990). La síntesis de NO representa la oxidación de cinco electrones del grupo guanidino-nitrógeno de la L-arginina dando como producto NO y L-citrulina en concentraciones equimolares (Figura 1). La conversión de L-arginina a NO es específica ya que un gran número de análogos de este aminoácido, incluyendo su D-enantiómero, no actúan como sustratos.

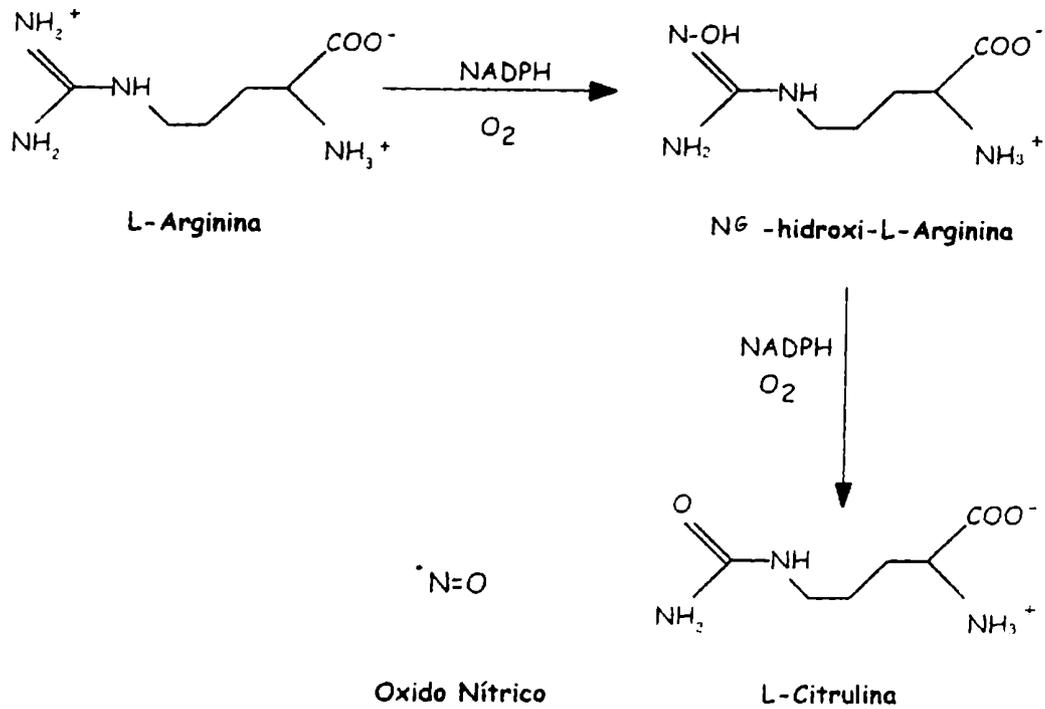


Figura 1. Biosíntesis de Oxido Nítrico. Los dos pasos son catalizados por la enzima NO sintasa dependiente de FAD y FMN.

El oxígeno molecular es incorporado al grupo ureído de la L-citrulina y al NO en sí mismo. Posteriormente se forman nitritos y nitratos, productos de la oxidación del NO:



Las tres isoformas son productos de genes separados que poseen 50 % de homología (Nathan y Xie 1994). Sin embargo, todas las isoformas se activan cuando se unen y forman homodímeros. Poseen un dominio carboxi-terminal con actividad reductasa homólogo al dominio del citocromo P-450 y un dominio amino-terminal con actividad oxigenasa que contiene el grupo prostético hemo; entre ambos dominios hay un sitio de unión para CAM (Su y col., 1995) (Figura 2). El dominio oxigenasa para cada isoforma contiene tetrahidrobiopterina (BH₄) la cual es requerida para la eficiente producción de NO y para el mantenimiento de una conformación estable del transporte de electrones, requerimiento necesario para promover la homodimerización. (Cho y col., 1995; Ghosh y col., 1996). Más aún, el grupo prostético hemo es requerido para la unión de BH₄ y para la dimerización de la enzima (Klatt y col. 1996).

La secuencia aminoacídica de NOS contiene secuencias consenso con sitios de unión a NADPH, FAD, FMN, calmodulina (CAM) así como también, sitios de fosforilación de la proteína. Esto indica que la actividad catalítica de la NOS es altamente regulable por diversos cofactores: tetrahidrobiopterina (H4B), flavina adenina dinucleótido (FAD) y flavina mononucleótido (FMN) (Stuehr y col., 1991). De un modo semejante al de la enzima citocromo P450 reductasa (CPR), el NADPH reduce inicialmente al FAD, que a su vez reduce al FMN. El FAD y el FMN

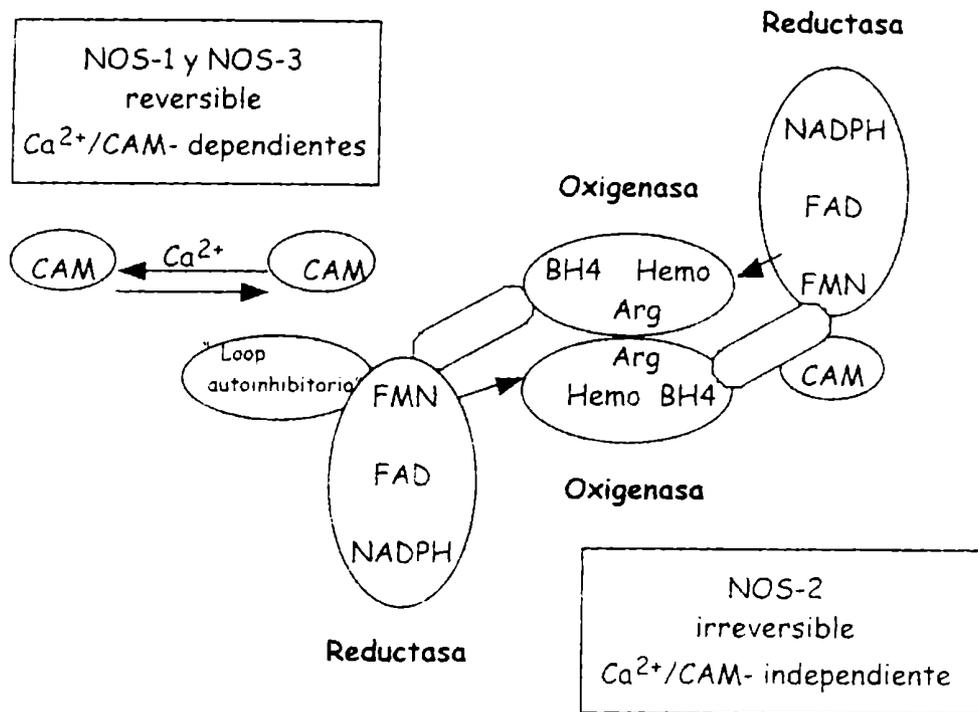


Figura 2. Ensamblaje del dímero de NO sintasa. El dímero es estabilizado por la asociación de los dominios oxigenasa de cada monómero de NOS. Cada dominio de oxigenasa contiene sitios para arginina (Arg), BH₄ y hemo. El dominio reductasa contiene sitios de unión para NADPH, FAD, FMN, pero no participa en la dimerización. La transferencia electrónica entre dominios (flechas) es regulada por la unión de calmodulina (CAM).

se hallan fuertemente unidos a una molécula de proteína mientras que el NADPH es un sustrato estequiométrico de la reacción.

Cabe destacar que se han descrito NO sintasas en invertebrados tal como artrópodos (insectos y crustáceos), gasterópodos y peces, sugiriendo que la vía de regulación por NO es uno de los sistemas regulatorios más antiguos en la fisiología animal (Moncada, 1992).

1.2. Isoformas de la NOS y su regulación.

La regulación de la síntesis de NO es importante, ya que una vez producido no puede ser almacenado ni activado. Es por eso que las tres isoformas descritas están altamente reguladas. Las NOS pueden ser reguladas a diferentes niveles, ya sea, a través de mecanismos pre y post-transcripcionales o a través de mecanismos pre y post-traduccionales. Algunos de los factores involucrados en esa regulación son el Ca^{2+} , la calmodulina (CAM), las fosforilaciones y los agentes supresores de la síntesis de NO como el monóxido de carbono (CO), citoquinas y hormonas. por otro lado, la L-arginina es el único dador fisiológico de nitrógeno para la reacción de catalización de NOS; por lo tanto, una adecuada síntesis de este sustrato, así como también, su transporte dentro de la célula juegan un papel importante en la generación de NO. A continuación se resumirá algunos de los mecanismos y agentes que regulan cada una de las tres isoformas descritas hasta el momento.

1.2.1. nNOS (NOS 1)

La NO sintasa neuronal (nNOS) también es llamada NO sintasa constitutiva

(cNOS), "brain" NO sintasa (bNOS) ó NO sintasa tipo 1 (NOS 1) (Tabla 1). Esta isoforma fue designada como NOS tipo 1, dado que la purificación de la forma neuronal a partir de cerebelo de rata como el clonado de su cDNA fueron los primeros en publicarse.

La NOS neuronal fue originalmente purificada a partir de la fracción soluble del tejido cerebelar (Schmidt y col., 1991) aunque estudios recientes indican que esta forma está predominantemente asociada a la membrana dentro del retículo endoplasmático y membranas sinápticas en neuronas y asociada al sarcolema de células musculares (Kobzik y col., 1994). La enzima purificada es un homodímero y cada subunidad posee una masa molecular aparente de 150-160 kDa.

Esta isoforma se encuentra descrita en diversos tejidos y órganos como cerebro, estómago (Schmidt y col., 1992), bronquios, glándulas adrenales (Dun y col., 1993), en algunos órganos del tracto genital masculino (Burnet y col., 1995) y tejidos reproductivos femeninos (Gardfield y col., 1997).

Esta isoenzima aparece altamente conservada entre especies (93%) y conserva un 50% de homología con las otras dos isoformas. En humanos se localizó la nNOS en el cromosoma 12 (Xu y col., 1993a).

Esta isoforma es Ca^{2+} -calmodulina dependiente; la concentración de calcio requerida para que esta enzima se active oscila entre 200-400 nM. La unión de la molécula de calmodulina (CAM) regula dos funciones de NOS: la transferencia de electrones y la activación del oxígeno (Bredt y Snyder 1994). Sin embargo, la unión de L-arginina no es afectada por Ca^{2+} o CAM. En el cerebro, el aminoácido glutamato actúa sobre el receptor NMDA disparando el influjo de Ca^{2+} , el cual se une a CAM y activa a la NOS-1 (Bredt y Snyder 1994). Esta forma de activación

permite la activación de NO en pocos segundos. La isoforma es fosforilada por proteína quinasa dependiente de GMP cíclico (GMPc) y de AMPc, por proteína quinasa C (PKC) y por una proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} /CAM (Bredt y col., 1992). Estas fosforilaciones reducen significativamente la actividad catalítica de la NOS (Dawson y col., 1993). Esto provee múltiples niveles de regulación de la enzima. Por ejemplo, Ca^{2+} /CAM activa directamente a la NOS, y, a través de las fosforilaciones mediadas por la quinasa dependiente de Ca^{2+} /CAM se inhibe la actividad enzimática. Por otro lado el NO estimula a la guanilato ciclasa (GC) que forma GMPc, el cual vía una proteína quinasa dependiente de GMPc inhibe a la NOS. Entonces la forma activa de la NOS-1 es no fosforilada.

Por otro lado, Rengasamy y Johns (1994) observaron que el NO puede regular su propia síntesis, a través de una retroalimentación negativa sobre la NOS.

Se ha observado que la expresión de la nNOS es capaz de regularse en algunos sistemas, por esta razón el nombre de NO constitutiva se ha dejado de usar. Por ejemplo en músculo esquelético el estradiol aumenta la síntesis de RNAm de nNOS (Weiner y col., 1994).

1.2.2. iNOS (NOS-2)

La NO sintasa inducible (iNOS) se la conoce también como NOS 2 o como NO sintasa de macrófagos (Mac NOS), ya que primeramente se describió en estas células (Tabla 1). La NOS-2 posee una masa molecular de 125-135 kDa, y en su forma nativa es considerada una proteína citosólica (Nathan 1992) aunque dependiendo de la especie y del tipo celular en cuestión puede ser particulada (Vodovotz y col. 1995).

La NOS-2 se ha descrito en macrófagos murinos (Xie y col., 1992), células del músculo liso (Nunokawa y col., 1993), hepatocitos (Geller y col., 1993), células tumorales y en células epiteliales (Moncada y col., 1991; Forstermann y col., 1994). Conserva un 50 % de homología con las demás isoformas y se la ha localizado en el centrómero del cromosoma 17 (Xu y col., 1993b).

La iNOS es Ca^{2+} -calmodulina independiente ya que su actividad no es bloqueada por inhibidores de CAM. Sin embargo, en la secuencia aminoacídica de esta isoforma existe un sitio de unión a CAM (Xie y col., 1992). La CAM está fuertemente unida a la isoforma inducible y esta unión no es afectada por la presencia de Ca^{2+} . Por la resistencia de esta isoforma a la activación por Ca^{2+} , la CAM ha sido considerada como una subunidad de la iNOS (Bredt y Snyder 1994).

La expresión de la iNOS puede ser inducida por productos bacterianos (LPS y ácido lipoteico), citoquinas (TNF-K, INF-3, IL-1K, IL-12, IL-6, IL-2) y mediadores inflamatorios como el factor activador de plaquetas (PAF) (Lowestein y col., 1993).

La caracterización de la región promotora del gen de la NOS-2 revela un patrón de regulación complejo. Existen dos sitios regulatorios "río arriba" de la secuencia TATA box; el primer sitio (corresponde a la región -48 a -209) responde a LPS mientras que el segundo sitio (-913 a -1029) responde a IFN-3. Este último sitio no regula directamente la expresión de la iNOS sino que potencia la inducción por LPS (Lowestein y col., 1993). Este tipo de organización de los enhancers puede ser muy importante en un proceso inflamatorio. De esta manera el LPS liberado por bacterias gram negativas estimula a los macrófagos. El IFN-3 producido por los linfocitos infiltrados aumenta la respuesta de los macrófagos al LPS. Así, la máxima producción de NO está restringida a aquellas células (macrófagos) que

deben matar al invasor, minimizando daños en tejidos adyacentes (Bredt y Snyder 1994).

A diferencia de las otras dos isoformas, cuya liberación de NO es de corta duración, una vez que la NOS-2 es inducida por citoquinas la liberación puede continuar durante varios días. Otros autores proponen que esta isoforma puede estar sujeta a una regulación a nivel transcripcional. Vodovotz y col. (1993) demuestran que el factor de crecimiento transformante beta (TGF-2) suprime la expresión de NOS-2 disminuyendo la estabilidad y la traducción del RNA mensajero. Por otro lado, Di Rosa y col. (1990) encuentran que la inducción de la iNOS puede ser bloqueada por glucocorticoides mientras que Ding y col. (1990) demuestran un efecto inhibitorio de IL-4, IL-8 e IL-10.

La progesterona es capaz de inducir la expresión de iNOS en útero de rata Dong y col., 1996).

1.2.3. eNOS (NOS-3)

La NOS-3 se expresa en células endoteliales y también se la conoce como NOS endotelial (eNOS) (Tabla 1). Su masa molecular es de 135 kDa (Pollock y col., 1991) al igual que la NOS-1 su actividad catalítica depende de Ca^{2+} -calmodulina (Forstermann y col., 1991).

La NOS-3 es una proteína asociada a la membrana de las células endoteliales (Pollock y col., 1991). El clonado del cDNA de la NOS-3 bovina y humana revelaron la presencia de una secuencia consenso para miristilación en la glicina aminoterminal (Sessa y col., 1992), responsable del anclaje de esta enzima a la membrana (Forstermann y col., 1991). Esta isoforma puede convertirse en enzima

citoplasmática si ocurre una sustitución aminoacídica en el sitio aceptor del ácido mirístico (Sessa y col., 1993).

La NOS-3 fue encontrada originalmente en el endotelio de vasos sanguíneos, pulmón, hígado (Springall y col., 1992) y riñón (Tracey y col., 1994). Posee un 50-60% de homología con las otras dos isoenzimas y en humanos se localiza en el cromosoma 7 (Marsden y col., 1993).

Esta isoforma al igual que la NOS-1, está por Ca^{2+} /CAM (Forsterman y col., 1991). En los vasos sanguíneos la acetilcolina actúa sobre el receptor muscarínico de las células endoteliales activando el ciclo de los fosfoinosítidos con un consecuente aumento de Ca^{2+} intracelular, el cual activaría a la NOS-3 (Bredt y Snyder 1994).

La fosforilación de esta isoforma regula tanto la actividad enzimática como la distribución subcelular de la enzima. Michel y col. (1993) encontraron que la NOS-3 es rápidamente desfosforilada en células endoteliales intactas en respuesta a bradiquinina y que esta fosforilación permite la translocación de la enzima de fracciones microsomales a las citoplasmáticas. Dado que la forma soluble es catalíticamente inactiva, no se producirá NO dentro de la célula endotelial, mientras, que la forma no fosforilada localizada en la membrana plasmática, puede presumiblemente generar NO el cual es liberado al espacio extracelular.

Recientemente se encontró que TNF- α aislado o en combinación con la IL-1 inhibe a la NOS-3 tanto a nivel transcripcional como traduccional (Forstermann y col., 1994).

Finalmente cabe agregar que tanto esta isoforma como las otras dos isoformas están reguladas negativamente por monóxido de carbono (Nathan 1992).

Se ha observado que el estradiol induce la síntesis de RNAm de eNOS en

músculo esquelético. La progesterona es capaz de inducir la expresión de eNOS en útero de rata (Dong y col., 1996).

	NOS-1	NOS-2	NOS-3
Nombre original	NOS neuronal (nNOS)	NOS inducible (iNOS)	NOS endotelial (eNOS)
Localización subcelular	soluble y particulada	soluble y particulada	particulada
Peso molecular (kDa)	150-160	~130	135-140
Estructura	Homodímero	Homodímero	Homodímero
Dependencia de Ca ²⁺	Sí, reversible	No (parcial)	Sí, reversible
Dependencia de CAM	Sí, reversible	Sí, pegada fuertemente	Sí, reversible
FAD, FMN, hemo	Sí	Sí	Sí
Actividad específica ^(a)	100-1000	400-1500	100-500
Localización tisular	Sistema nervioso central y periférico, células epiteliales de bronquios, Útero y estómago	Macrófagos y células del músculo liso hepatocitos, condrocitos, células epiteliales	Células endoteliales Plaquetas
Acción fisiológica	Neurotransmisor, mediador del acoplamiento entre el metabolismo y el flujo sanguíneo cerebral	Shock circulatorio inflamación Participación en procesos reproductivos (ovulación, implantación embrionaria, luteólisis, etc	Regulación de la presión arterial, distribución del flujo sanguíneo en los órganos, inhibición de la adhesión y activación de las plaquetas granulocitos y PMN

^(a) Expresada en nmoles/citrulina/min/mg proteína

Tabla 1. Características de las isoformas de la NOS.

1.3. Funciones del NO

Inicialmente se creía que el NO alcanza sus blancos intracelulares difundiendo libremente a través de las membranas de las células. Sin embargo este concepto fue rechazado dado que su vida media es muy corta (30 segundos) y además porque posee una alta reactividad con el anión superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) y con el hierro. El NO en presencia de O_2 reacciona con los grupos tioles de las proteínas formando compuestos S-nitrosilados, alcanzando una forma estable y biológicamente activa (Stamler y col., 1992). De hecho se ha demostrado que el NO circula unido como S-nitroso a la albúmina y posee actividad biológica idéntica a la del propio NO tanto in vitro como in vivo (Keaney y col., 1993).

El NO media múltiples efectos biológicos. Las funciones del NO pueden dividirse en 2 tipos:

- 1) Funciones regulatorias
- 2) Funciones citotóxicas (Figura 3).

Esta división entre funciones regulatorias asociadas a un nivel bajo o moderado de NO y funciones citotóxicas asociadas a un nivel elevado del mismo, no refleja estrictamente lo que ocurre en los sistemas in vivo pero permite un análisis más racional de los efectos del NO. En definitiva, las diversas funciones del NO en las células dependen de su concentración, del estado redox celular, de la abundancia de metales y tioles, así como también de la presencia de otros blancos nucleofílicos. (Kelly y col., 1996).

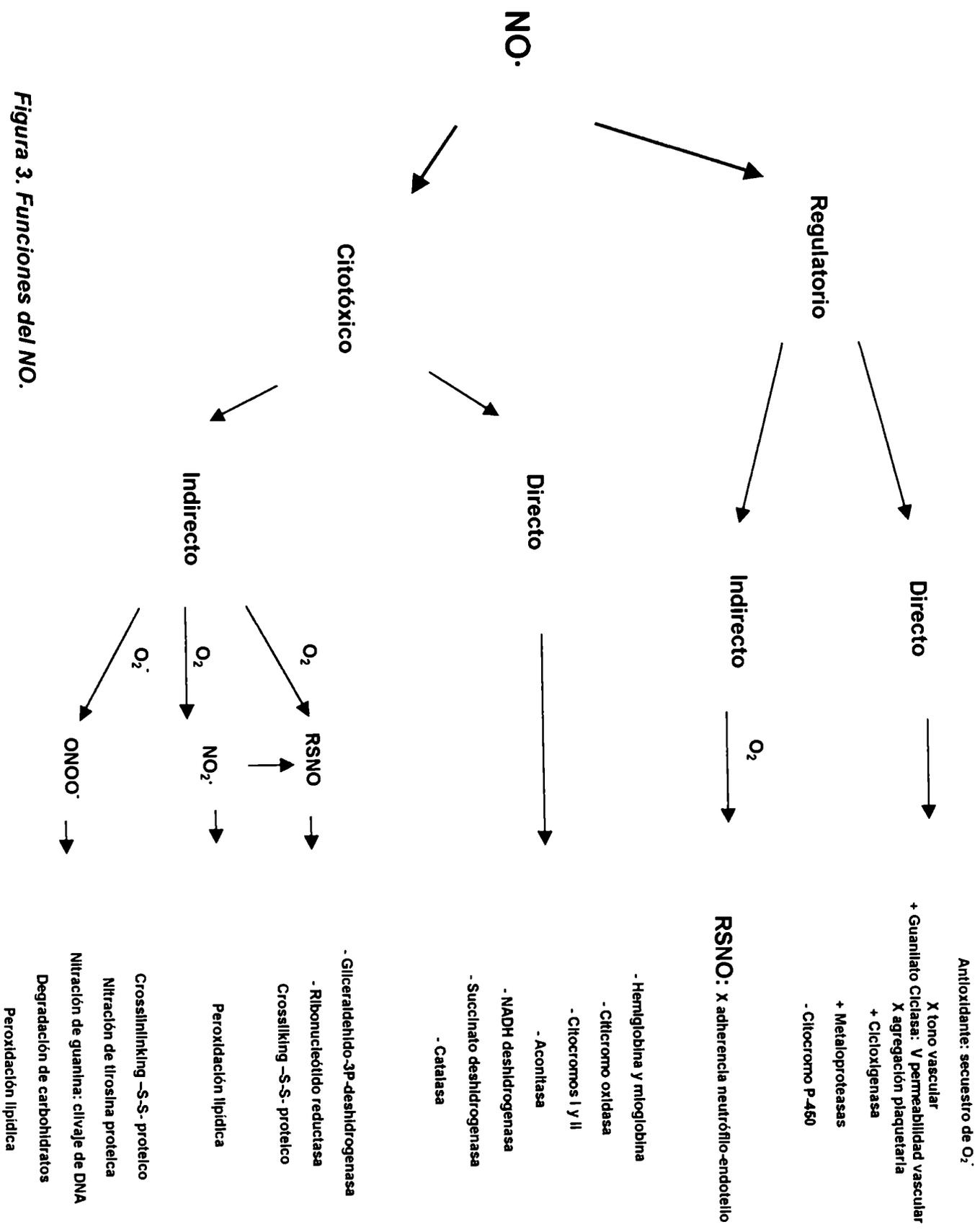


Figura 3. Funciones del NO·.

1.3.1. Funciones regulatorias del NO.

El NO actúa como segundo mensajero regulando la actividad de distintas enzimas y/o teniendo efecto antioxidante. En este caso el NO actúa principalmente en forma directa sobre distintas blancos enzimas o moléculas. Hay también reportado un efecto indirecto. Este rol se asocia con niveles bajos o moderados de NO y por producción de este gas por las 3 isoformas (Grisham y col., 1999). En esta situación el efecto citotóxico del NO está regulado por enzimas antioxidantes y por glutatión (GSH).

Cuando las concentraciones de radicales libres como por ejemplo el $\bullet\text{O}_2^-$ son bajas el NO puede actuar como molécula secuestradora, previniendo la citotoxicidad celular (Cook y Tsao., 1993). Por lo tanto en condiciones no inflamatorias, el NO puede actuar como antioxidante.

El NO se une al hierro (Fe) del grupo hemo de diferentes hemoproteínas, regulando su actividad:

- Guanilato ciclasa: el NO se une al grupo hemo presente en el sitio activo de esta enzima y aumenta su catálisis. La guanilato ciclasa es tal vez el blanco más importante del NO en la regulación de los procesos fisiológicos. La generación de GMPc media la relajación del músculo liso y por lo tanto tiene efecto vasodilatador, aumenta la permeabilidad vascular, inhibe el crecimiento de las células de músculo liso e inhibe la agregación plaquetaria (Moncada y col., 1991).
- Ciclooxygenasa: Múltiples trabajos han demostrado que el NO es capaz de activar directamente a la COX. Estudios realizados en nuestro laboratorio indican que el NO estimula la motilidad uterina vía PGE2 (Franchi y col., 1994).

Resultados de nuestro laboratorio también indican que el aumento en la síntesis de prostaglandinas inducido por IL-1 e EGF es mediado por NO en útero de rata (Franchi y col., 1998; Ribeiro y col., 1999; Farina y col., 2000). Este es un mecanismo a través del cual el NO puede amplificar el proceso inflamatorio.

- **Metaloproteasas:** Se ha demostrado que el NO estimula la actividad de la MMP-2 (Metaloproteasa-2) (Trachman y col., 1996). Esta proteasa degrada el colágeno de la matriz extracelular. Por lo tanto el NO es capaz de regular la degradación de la matriz extracelular. Este es otro punto donde el NO puede controlar los procesos inflamatorios o aquellos que requieren rearrreglos de tejidos.
- **Citocromo P-450:** El NO se une al grupo hemo de esta enzima y la inhibe. Por lo tanto el NO regula la síntesis de progesterona ya que esta enzima es clave en la vía de síntesis de este esteroide (Wink y col., 1997)

Se ha reportado también un efecto regulatorio indirecto del NO. En este caso el NO reacciona con el O₂ para formar RSNO en los grupos tioles (-SH) de las proteínas. El RSNO inhibe la adherencia de los neutrófilos al endotelio (Grisham y col., 1998).

1.3.2. Funciones citotóxicas del NO.

El NO producido por los macrófagos en la inflamación cumple un claro rol citotóxico. Los macrófagos activados en la inflamación producen elevados niveles de NO el cual es citotóxico para bacterias, hongos, virus, parásitos intracelulares y células tumorales. El rol citotóxico del NO se asocia a la producción de NO por macrófagos, los cuales expresan la isoforma iNOS. En esta situación el NO actúa en forma directa sobre

ciertas enzimas inhibiéndolas ó en forma indirecta, pues reacciona con el $\bullet\text{O}_2^-$ para formar peroxinitrito (ONOO^-), y con el O_2 para formar dióxido de nitrógeno ($\text{NO}_2\bullet$) y S-nitrosotioles (RSNO) (Grisham y col., 1999). Estos tres RNOX (especies reactivas derivadas del NO y el oxígeno) son poderosos oxidantes y poco sensibles a la acción de las enzimas antioxidantes como la SOD. Todos ellos tienen efectos citotóxicos sobre los patógenos como: modificación oxidativa de las proteínas, peroxidación lipídica de las membranas, lesiones en el DNA (Grisham y col., 1999). Sin embargo si la inflamación no es controlada estos mismos oxidantes producen daño a las células del huésped llevándolas a la muerte por apoptosis o necrosis. El $\bullet\text{O}_2^-$ es producido por la enzima NADPH oxidasa la cual se encuentra en vacuolas de macrófagos y es activada en la inflamación (Cotran y col., 1999). Los neutrófilos expresan esta enzima en mayor proporción, pero expresan bajos niveles de la iNOS. Se piensa que ambas células son capaces de producir RNOX aunque los macrófagos lo harían en una proporción mayor.

- Efectos citotóxicos directos:

El NO en altas concentraciones se puede unir al grupo hemo de enzimas claves del metabolismo celular y llevar a la célula a la muerte ya sea por apoptosis o necrosis (Grisham y col., 1999).

- Hemoglobina y mioglobina (hemoproteína): El NO puede competir con el O_2 por el Fe^{3+} presente en el grupo hemo de estas proteínas y por lo tanto favorecer la hipoxia.
- Catalasa (hemoproteína): El NO inhibe a la catalasa. La catalasa es una enzima

antioxidante que descompone el H_2O_2 a $O_2 + H_2O$. Este es otro mecanismo por el cual el NO exacerba los procesos oxidativos.

- Citocromo oxidasa y citocromo I y II (hemoproteínas): El NO los inhibe en forma directa por lo tanto interfiere con la respiración mitocondrial.
- Aconitasa, NADH deshidrogenasa, Succinato deshidrogenasa (proteína con grupo S-Fe): por lo tanto el NO en altas concentraciones interfiere con la glicólisis y la síntesis de aminoácidos.

- Efectos citotóxicos indirectos:

El NO reacciona con el O_2 para formar dióxido de nitrógeno (NO_2^\bullet), trióxido de dinitrógeno (N_2O_3) y S-nitrosotioles (RSNO) (Grisham y col., 1999)

El NO reacciona con el $\bullet O_2^-$ para formar peroxinitrito ($ONOO^-$).

- RSNO:

El NO reacciona con el O_2 para formar RSNO en los grupos tioles (-SH) de las proteínas. El NO_2^\bullet y el N_2O_3 actúan también formando RSNO. Esto determina la inactivación de las proteínas:

Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH): la inactivación de esta enzima inhibe la glicólisis.

Ribonucleótido reductasa: esta inhibición es muy relevante ya que esta enzima es clave para la síntesis de DNA.

Formación de crosslinking S-S intra-proteico e Inter.-proteico.

- NO_2^\bullet :

Además de formar RSNO, induce la peroxidación lipídica.

- ONOO^- :

Esta molécula es un poderoso oxidante capaz de oxidar tioles y por lo tanto formar puentes S-S intra-proteico e Inter.-proteico, producir nitración de los residuos de tirosina de las proteínas, producir nitración de guanosina lo cual lleva al clivaje del DNA, degradar carbohidratos e inducir peroxidación lipídica.

La modificación de las proteínas (producida por estos poderosos oxidantes) estimula su degradación por el complejo multicatalítico del proteosoma.

Peroxidación lipídica:

Fuertes oxidantes como el ONOO^- , H_2O_2 e hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) promueven la peroxidación lipídica de las membranas celulares. El proceso comienza cuando estos oxidantes atacan los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados de las membranas lipídicas dando como resultado la formación de radical lipídico peroxilo ($\text{LOO}\cdot$). Este radical es altamente inestable y reactivo, y en presencia de O_2 cataliza una reacción en cadena llamada propagación que lleva a la formación de nuevos radicales $\text{LOO}\cdot$ y por lo tanto un extensivo daño oxidativo en las membranas. El proceso sigue hasta que en una reacción favorable llamada terminación el radical $\text{LOO}\cdot$ es inactivado a LOOH por un antioxidante. El principal antioxidante presente en las membranas biológicas es la vitamina E (Cotran., 1999).

Nitrotirosina:

Se ha demostrado *in vivo* e *in vitro* que el ONOO^- nitra los residuos de nitrotirosina proteicos formando 3-nitrotirosina. La nitración de cierto residuos de tirosina puede alterar procesos celulares como la fosforilación proteica por tirosina kinasas

involucrados en transducción de señales (Herce-Pagliai y col., 1998).

1.4. Rol del NO en la inflamación.

1.4.1. Rol regulatorio.

En los procesos inflamatorios, la histamina y la trombina se unen a sus receptores específicos en la célula endotelial y median la apertura de canales de Ca^{2+} . Así, la actividad de la eNOS se dispara gracias al efecto modulador del complejo Ca^{2+} / CAM y el NO producido difunde a las células circundantes. El NO en la célula endotelial conduce a un aumento en la permeabilidad vascular con la consiguiente formación de edema (Figura 4). En las células de músculo liso, el NO activa a la GC conduciendo a un marcado aumento de GMPc: la dilatación de las fibras musculares ocurre luego por un mecanismo que involucra la fosforilación de la cadena liviana de la miosina por una proteína quinasa dependiente de GMPc (Schultz y Triggle, 1994).

En condiciones normales el NO tiene efecto antitrombótico y participa en el control de la hemostasia (mantenimiento de la sangre en estado fluído). En la inflamación, la trombina produce en las plaquetas un aumento del calcio intracelular con la consiguiente activación de eNOS y la activación de la GC, lo cual conduce a la inhibición de la agregación plaquetaria (Figura 4) (Schmidt y Walter, 1994). El NO que llega a las plaquetas desde las células endoteliales adyacentes también tiene el mismo efecto.

La trombina también activa a otras moléculas que inhiben la agregación plaquetaria como la prostaciclina (PGI_2) y a moléculas que activan la agregación plaquetaria como el tromboxano A₂ (TXA_2) (Cotran y col., 1999). Por supuesto que en la inflamación los

efectos agregantes priman ya que la inflamación se asocia activación de la coagulación.

Por lo tanto el NO cumpliría el rol de regular este proceso.

En cambio, en condiciones normales no inflamatorias, el NO estaría regulando la agregación espontánea de las plaquetas, y el tono vascular, ya que la eNOS se expresa en forma constitutiva en las células endoteliales (Pollock y col., 1991).

El NO producido por el endotelio tanto en condiciones inflamatorias como no inflamatorias, inhibe la adherencia de los leucocitos a la célula endotelial. Se ha demostrado que los grupos -SH son esenciales para la adhesión leucocito-endotelio. El NO en presencia de O₂ forma S-nitrosotioles (RSNO) en la proteínas del endotelio y por lo tanto inhibe la adherencia de los leucocitos (Grisham y col., 1998). Por lo tanto el NO en condiciones normales o inflamatorias reduce el reclutamiento de leucocitos como mecanismo compensatorio.

Distinto es el panorama en condiciones patológicas donde la inflamación no es controlada (shock séptico). En este caso el NO producido en este caso por la iNOS de los macrófagos que están migrando a los tejidos producen injuria vascular lo cual aumenta notablemente la adhesión de los leucocitos al endotelio (Baatz y Pleyer, 2001).

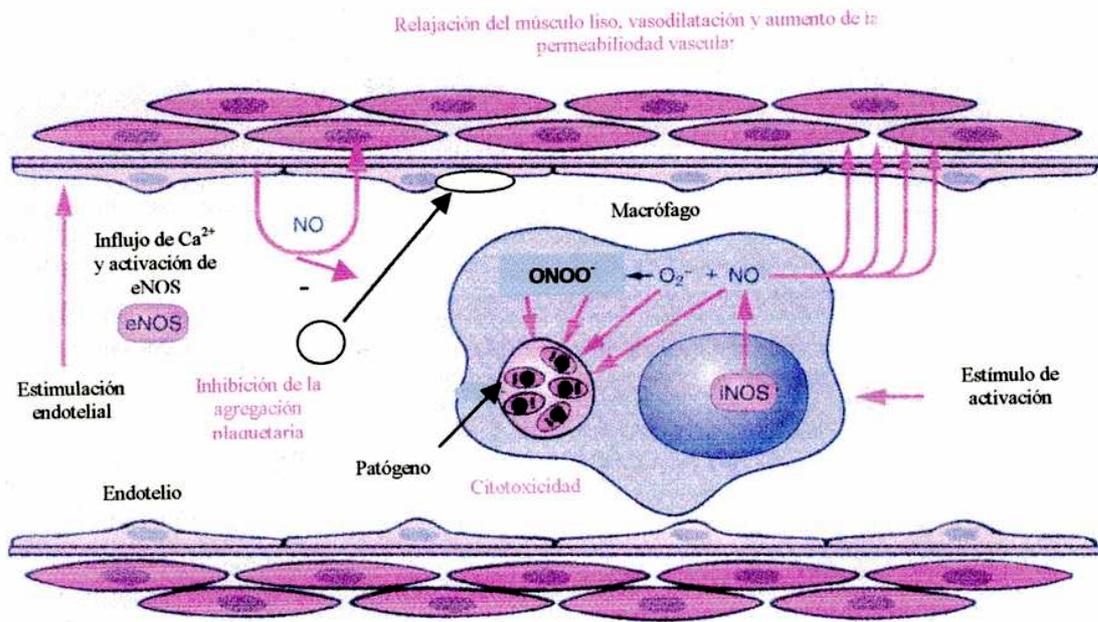


Figura 4. Rol regulador y citotóxico del NO en la inflamación.

1.4.2. Rol citotóxico.

El rol del NO en la inflamación es el más estudiado. Como se mencionó arriba el NO tiene funciones regulatorias durante la inflamación: produce vasodilatación, aumenta la permeabilidad vascular e inhibe la agregación plaquetaria. Estas funciones se asocian a la activación de la eNOS en las células endoteliales y las plaquetas.

Los macrófagos en la inflamación producen altos niveles de NO. La enzima responsable es la iNOS.

La síntesis de NO por los macrófagos tiene efecto citotóxico sobre los patógenos: bacterias, hongos, virus y parásitos intracelulares (Figura 4) ; pero también puede tener efecto citotóxico sobre las células del huésped (Liew, 1994). Como se mencionó anteriormente el efecto citotóxico es producido directamente por el NO o por la combinación de este con el O_2 y el $\bullet O_2^-$ para formar los RNOX ($NO_2\bullet$, $RSNO$, $ONOO^-$) los cuales son poderosos oxidantes (Grisham y col., 1999).

El NO es producido en macrófagos por la iNOS, la cual se localiza en el citosol.

El $\bullet O_2^-$ es producido por la enzima NADPH oxidasa la cual se encuentra en vacuolas de macrófagos y es activada en la inflamación (Cotran y col., 1999).

Los neutrófilos expresan esta enzima en mucho mayor proporción, pero expresan bajos niveles de la iNOS. Se piensa que ambas células son capaces de producir RNOX aunque los macrófagos lo harían en una proporción mucho mayor (Schmidt y Walter, 1994).

La expresión de iNOS en macrófagos es estimulada por LPS, ácido lipoteico, TNF, IFN-gamma, IL-1alpha, IL-1beta, IL-6, IL-2 y el factor activador de plaquetas (PAF) (Lowestein y col., 1993).

La máxima producción de iNOS por macrófagos se observa entre las 4-6hs tanto *in vivo* como *in vitro*, tiempo que coincide con la máxima de expresión de las citoquinas proinflamatorias IFN- γ y TNF- α en la inflamación (Liew, 1994). TNF es producido por los mismos macrófagos, pero IFN es producido por los linfocitos infiltrados. La presencia de ambas citoquinas es necesaria para una apropiada producción de NO (Bredt y Snyder, 1994).

Las citoquinas IL-10, IL-4 y TGF- β son capaces de inhibir la expresión de iNOS (Oswald, 1992). Estas citoquinas se producen más tarde en la inflamación como mecanismo regulatorio.

1.5. Rol del NO en la gestación.

El NO participa en múltiples procesos durante la gestación: implantación, decidualización, mantenimiento del flujo útero-placentario y control de la contractilidad uterina (Chwalisz et al., 1999, Chwalisz and Garfield, 2000; Sladek et al, 1997).

En estos procesos el NO tiene función regulatoria y actúa como segundo mensajero regulando la actividad de distintas enzimas y/o teniendo efecto antioxidante (ver sección 2.2.3).

Sin embargo el NO participa también como molécula citotóxica durante la gestación en los procesos de control de la invasión del trofoblasto y control de las infecciones (Hunt, 1994). Esta función citotóxica está regulada por mecanismos antioxidantes.

Pero, si la infección no es controlada, el NO puede tener efecto citotóxico contra el embrión y la madre (Haddad y col., 1995).

A continuación se dará una breve introducción a los procesos que tienen lugar en la

preñez temprana y al rol del NO en ellos.

1.5.1. Implantación.

Para el éxito de la implantación del blastocisto es necesario que haya una sincronía entre el desarrollo embrionario y la cascada de eventos celulares y moleculares que ocurren durante el período peri-implantatorio del ciclo (Bierer y col., 1994). En roedores durante la preñez temprana, el endometrio sufre un proceso de diferenciación y se convierte en decidua. Este proceso recibe el nombre de decidualización. La decidua es un tejido muy vascularizado, y está formado por células multinucleadas.

Estas células deciduales encapsulan al embrión en crecimiento. Las células deciduales cumplen roles claves como proveer de nutrientes al embrión y controlar la invasión del trofoblasto (Parr, 1989).

El proceso de decidualización se produce en respuesta al blastocisto o a estímulos artificiales y es siempre precedido por un aumento de la permeabilidad vascular (Psychoyos, 1973).

Inhibidores de la NOS administrados en el período peri-implantatorio son capaces de impedir la implantación a través de una inhibición en el proceso de decidualización (Chwalisz y col., 1999). Por lo tanto el NO cumple un rol clave en este proceso. El rol del NO estaría asociado a la vasodilatación de las arterias deciduales, lo cual contribuiría con la reacción decidual.

El NO es capaz también de aumentar la actividad de las metaloproteasas (MMPs), las cuales degradan el colágeno (Trachtman y col., 1996). Estas enzimas parecen cumplir un rol importante durante la invasión del trofoblasto, ya que para ello se necesita

degradar la matriz extracelular (Alexander y col., 1996). Por lo tanto el NO podría también estar activando a las MMPs en la implantación.

Adicionalmente, también se ha sugerido que el NO podría actuar estimulando la síntesis de prostaglandinas en el endometrio (Novaro y col., 1997). Se sabe que las prostaglandinas, en especial PGE₂, cumplen un rol fundamental en la implantación ya que incrementan la permeabilidad vascular. El sistema IL-1 cumple un rol clave en la implantación. Mientras IL-1 β es producido por el embrión, el IL-1R (receptor de IL-1) es expresado por el endometrio (Simon y col., 1993). Esta citoquina podría ser capaz de inducir iNOS y COX-2 en el endometrio e iniciar el aumento en permeabilidad vascular, la decidualización, y la remodelación de la matriz extracelular durante el proceso implantatorio (Novaro y col., 1997).

Se ha observado que la actividad de las NOS en endometrio aumenta en el período peri-implantatorio (Novaro y col., 1997). También se ha observado la presencia de las 3 isoformas iNOS, eNOS y nNOS en este tejido, pero sólo iNOS y eNOS aumentan significativamente su expresión durante el período peri-implantatorio (Purcell y col., 1999). Se sabe que la progesterona cumple un rol clave en el proceso de decidualización (Chwalisz y col., 1999). La progesterona es capaz de inducir la expresión de iNOS y eNOS en el útero de rata (Dong y col., 1996).

1.5.2. Mantenimiento del flujo útero- placentario.

Se ha observado actividad de la NOS en placentas humanas de primer, segundo y tercer trimestre (Sladek y col., 1997). La isoforma eNOS es expresada por el sinciotrofoblasto de la placenta (Conrad y col., 1995). Se ha localizado también la

isoforma eNOS en los vasos de la placenta: cordón umbilical, placa coriónica y arteriolas de las vellosidades coriónicas (Sladek y col., 1997). La función del NO producido por estos tejidos tendría la función de limitar la agregación plaquetaria en la interfase entre la circulación materna y fetal, y regular el flujo utero-placentar (Sladek y col., 1997).

Algunos hallazgos parecen confirmar estos roles. La administración de L-NAME a ratas preñadas produce hipertensión y reduce en un 40 % el peso de las crías nacidas (Chwalisz y col., 1999).

En la patología de la preeclampsia (hipertensión inducida por el embarazo) se observa también menor peso al nacer (Norman y col., 1996). En las placentas de madres con pre-eclampsia se observa menor actividad de la NOS (Morris y col., 1995).

1.5.3. Control de la contractilidad uterina.

El NO es un poderoso relajante del músculo liso miometrial (Izumi y Garfield 1995). Durante la gestación, la actividad de la NOS uterina está incrementada (Farina y col., 2001). Se ha postulado que el NO cumple el rol clave en regular la contractilidad uterina. El NO o dadores de NO como el nitroprusiato de sodio (SNP) inhiben las contracciones espontáneas a término (Yallampalli y col., 1993). Se ha observado también que el L-NMMA aumenta la contractilidad *in vitro* (Franchi y col., 1994). El mismo efecto tienen la L-arginina y el GMPc (Buhimschi y col., 1994). Por lo tanto el efecto inhibitorio de NO sobre la contractilidad uterina estaría mediado por GMPc. La actividad NOS está incrementada durante la preñez y disminuye al término. El NO parece cumplir un rol clave en el mantenimiento de la quiescencia uterina. Se ha observado un aumento en la expresión de las isoformas iNOS y eNOS durante la

gestación en rata. Estas enzimas disminuyen hacia el final de la preñez, coincidiendo su decrecimiento con los momentos previos al parto (Farina y col., 2001).

1.5.4. Control de las infecciones.

El NO participa en el control de las infecciones y en la prevención de un excesivo crecimiento del trofoblasto durante la preñez (Hunt, 1994). Por lo tanto también cumple un rol citotóxico.

Durante la preñez, y como mecanismo de tolerancia al embrión alogeneico, la madre desarrolla una respuesta inmune de tipo Th2 con características especiales (Thellin y col., 2000) junto con un detrimento de las respuestas tipo Th1.

Efectivamente la preñez está asociada a una elevada sensibilidad a patógenos intracelulares como algunas bacterias, virus y parásitos. Para una correcta eliminación de estos patógenos es necesaria una respuesta Th1 (Thellin., 2000). La infección intrauterina, produce alta mortalidad en animales preñados, pero no presenta los mismos efectos en animales no preñados (Nowicki y col.,1997). Esto indica también que los microorganismos han desarrollado un trofismo especial hacia la unidad feto-placentaria.

Los sitios de implantación poseen una numerosa población de macrófagos y células LGL (Hunt, 1994). Ambas células tienen funciones inmunomoduladoras pero también tienen la capacidad de matar patógenos y controlar el crecimiento del trofoblasto. Ambas células expresan la iNOS producen NO y RNOX (Hunt, 1994).

El NO parece cumplir un rol clave en el control de las infecciones durante la preñez, ya que la utilización de inhibidores de la NOS en ratas preñadas con infección intrauterina

aumenta notablemente la mortalidad materna (Nowicki y col., 1997).

La reabsorción embrionaria producida por infección o aborto séptico es un mecanismo de defensa para la madre. El sentido biológico del disparo de la reabsorción embrionaria es impedir que el patógeno alcance al embrión, ya que este posee un sistema inmunológico inmaduro y puede convertirse en un foco para la proliferación del microorganismo. De esta forma se interrumpe la preñez y se preserva a la madre para otras gestaciones (Cavanagh y col., 1982).

1.6. Reabsorción embrionaria inducida por LPS.

Un modelo utilizado para estudiar el mecanismo del aborto séptico es la reabsorción inducida por LPS (Gendron y col., 1990). LPS es capaz de reproducir la mayor parte de los efectos sistémicos y celulares de la sepsis (ver sección 2.4).

Dosis relativamente bajas de LPS que no comprometen la supervivencia de la madre producen altos porcentajes de reabsorción (Gendron y col., 1990). El mecanismo de la reabsorción embrionaria parece ser similar al MOF/MODS (ver sección 2.4) salvo que en este caso la destrucción tisular se limita solo a la decidua y el embrión, y no al resto de los tejidos maternos.

Esta alta sensibilidad de los sitios de implantación durante la preñez temprana a las moléculas inflamatorias parece deberse a:

a) El alto número de macrófagos y células LGL (linfocitos grandes granulares) presentes en los sitios de implantación. Estas células parecen ser importantes en la protección contra las infecciones y en el control de la invasión del trofoblasto. Estas células son capaces de producir gran variedad de citoquinas, ROS, proteasas y

eicosanoides, y pueden eliminar bacterias y virus (Hunt y col., 1994). Ambas células expresan iNOS y producen NO y RNOX (Hunt y col., 1997). Este NO es citotóxico para el patógeno, pero también puede serlo para el embrión y la decidua. Por lo tanto puede estar involucrado en el proceso de reabsorción.

b) La activa formación de vasos por angiogénesis en la decidua. Los vasos poseen un delgado endotelio que no es continuo, y por lo tanto se forman lagunas sanguíneas en la decidua. La sangre por lo tanto está en contacto directo con las células deciduales y el trofoblasto. De hecho hay mecanismos que controlan la activación del complemento y la cascada de coagulación (Xu y col., 2000). El endotelio de los vasos puede activarse y sufrir injuria fácilmente. El NO puede estar involucrado en la injuria del endotelio de los vasos deciduales, y parece cumplir ese rol en los alveolos pulmonares durante la sepsis (Ware y col., 2000).

Inductores de la actividad de los macrófagos como TNF-K e IFN-3 están involucrados en el mecanismo de reabsorción embrionaria inducida por LPS (Gendron y col., 1990; Haddad y col., 1997). Estas mismas citoquinas están también involucradas en la reabsorción embrionaria en el modelo murino de aborto recurrente (cruza CBA x DBA) (Duclos y col., 1996; Haddad y col., 1997).

Estas citoquinas inducen la expresión de la iNOS en macrófagos. En el modelo murino de aborto recurrente se ha observado la infiltración temprana de los sitios de implantación por macrófagos y células NK expresando la iNOS (Haddad y col., 1995). En este mismo modelo la AG revierte parcialmente la reabsorción espontánea (Haddad y col., 1995).

Estos hallazgos nos llevaron a plantear la hipótesis de que el NO participa en el

proceso de reabsorción embrionaria inducida por LPS. Esta tesis se intenta probar esa hipótesis.

2. LPS y su mecanismo de acción.

El LPS (lipopolisacárido) es un constituyente de la pared externa de la mayoría de las bacterias Gram-negativas. Esta macromolécula está formada por 4 regiones distintas:

- el polímero de oligosacáridos (antígeno O),
- el corazón externo,
- el corazón interno (KDO) y
- el componente lipídico (lípidos A).

El lípidos A es responsable de la mayoría de las acciones biológicas del LPS.

2.1. Respuesta inflamatoria.

El LPS se libera a la circulación y en los tejidos cuando la pared celular de las bacterias es degradada en la respuesta inflamatoria.

En una infección localizada, el LPS y otras toxinas bacterianas dispararán una respuesta inflamatoria aguda (respuesta inmune innata) en el sitio del foco infeccioso (Figura 5) (Roitt y col., 2001)

La sepsis o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) ocurre cuando una infección localizada (absceso, peritonitis, neumonía, etc) se expande al torrente sanguíneo (Karima y col., 1999).

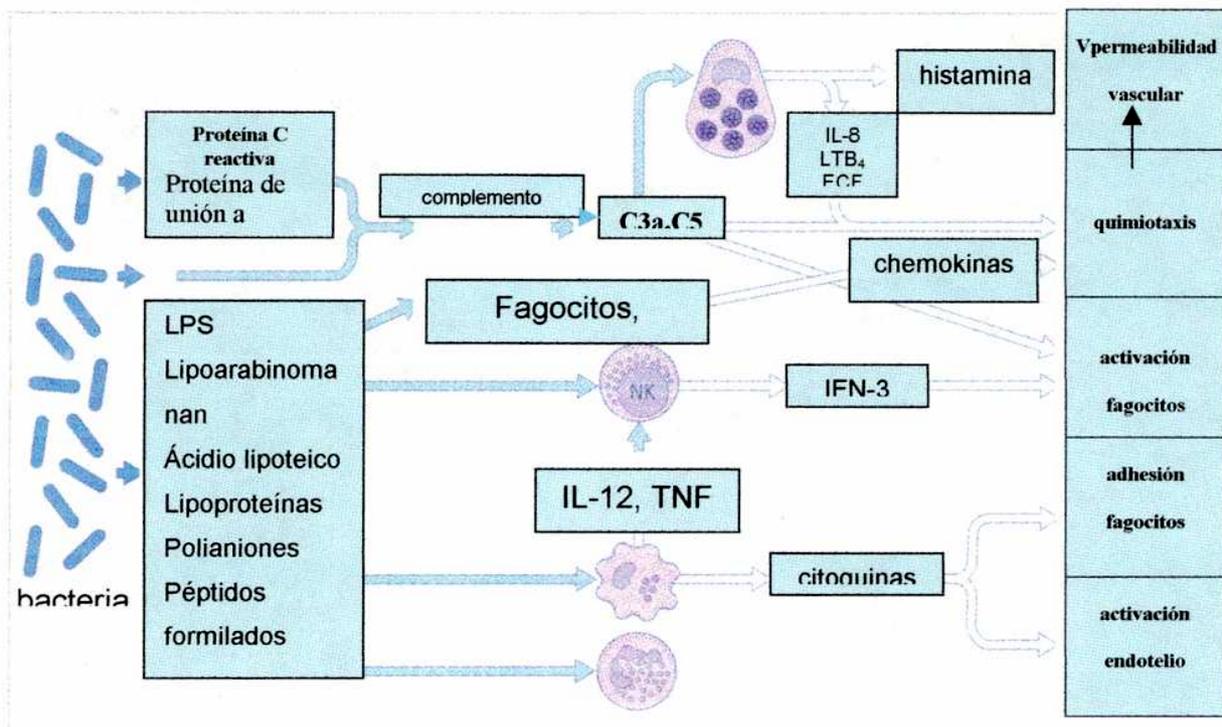


Figura 5. Inflamación aguda producida por productos bacterianos. Patrones conservados de los patógenos son reconocidos por moléculas presentes en el suero y por receptores celulares. Este reconocimiento activa la vía alterna del complemento con la subsecuente liberación de C3a y C5a, activación de neutrófilos, macrófagos y células NK, liberación de citoquinas y chemoquinas, degranulación de mastocitos, vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, adhesión de leucocitos y fibrina a las células endoteliales. Estos mecanismos, más la injuria tisular producida por la bacteria, activa el sistema de coagulación y la formación de fibrina, lo cual limita la invasión bacteriana.

La respuesta inflamatoria aguda tiene roles cruciales (Roitt y col., 2001)

- Destruir completamente al agente infeccioso o contener la infección previa activación de la respuesta adaptativa
- Controlar la activación de la respuesta adaptativa y modelar el tipo de respuesta.

Los aspectos beneficiosos de la respuesta inflamatoria aguda son (Cotran y col., 1999):

- Control o contención de la infección.
- Dilución de toxinas: transporte por órganos linfáticos.
- Acceso al foco infeccioso de proteínas de fase aguda y anticuerpos con función neutralizante y opsonizante.
- Infiltración del foco en una primera etapa por neutrófilos en una primera etapa y luego por macrófagos del foco infeccioso que destruyen los patógenos a través de mecanismos dependientes e independientes del oxígeno.
- Activación del complemento con la formación del complejo de ataque lítico y las poderosas anafilotoxinas C3a y C5a que activan a los mastocitos y son agentes quimiotácticos para neutrófilos y macrófagos.
- Activación de la cascada de coagulación. La fibrina atrapa a los microorganismos y facilita su fagocitosis.
- Drenaje de antígenos a órganos linfáticos secundarios para estimular la respuesta inmune adaptativa.

2.2. Mecanismos dependientes e independientes de oxígeno.

Durante la inflamación aguda, los neutrófilos y los macrófagos destruyen a los patógenos a través de mecanismos dependientes e independientes del oxígeno (Cotran y col., 1999). Muchas de las proteínas y enzimas involucradas se encuentran preformadas (antes de la inflamación) en gránulos de neutrófilos y macrófagos. Otras se sintetizan de novo (Cotran y col., 1999).

2.2.1. Mecanismos independientes del oxígeno.

Los mecanismos independientes de oxígeno están representados por proteínas con acción bactericida o bacteriostática (BPI, lisozima, lactoferrina, proteína básica mayor e hidrolasas ácidas) y por enzimas que degradan la matriz extracelular (elastasa, catepsina-G, proteinasa-3 y metaloproteasas). La actividad de las proteasas es controlada por inhibidores endógenos para disminuir el daño sobre el huésped.

2.2.2. Mecanismos dependientes del oxígeno.

Los mecanismos dependientes de oxígeno (Figura 6) están representados por las especies reactivas del oxígeno (ROS), el óxido nítrico (NO) y las especies reactivas del NO y el oxígeno (RNOX).

- **ROS:** El LPS y otras toxinas, la fagocitosis, los agentes quimiotácticos y los complejos inmunes estimulan en los neutrófilos y macrófagos la producción de ROS.

El oxígeno es reducido a anión superóxido (O_2^-) por la NADPH oxidasa que está presente en neutrófilos y macrófagos. La NADPH oxidasa es un complejo multiproteico formado por al menos siete 7 proteínas. En los neutrófilos no activados, algunos los

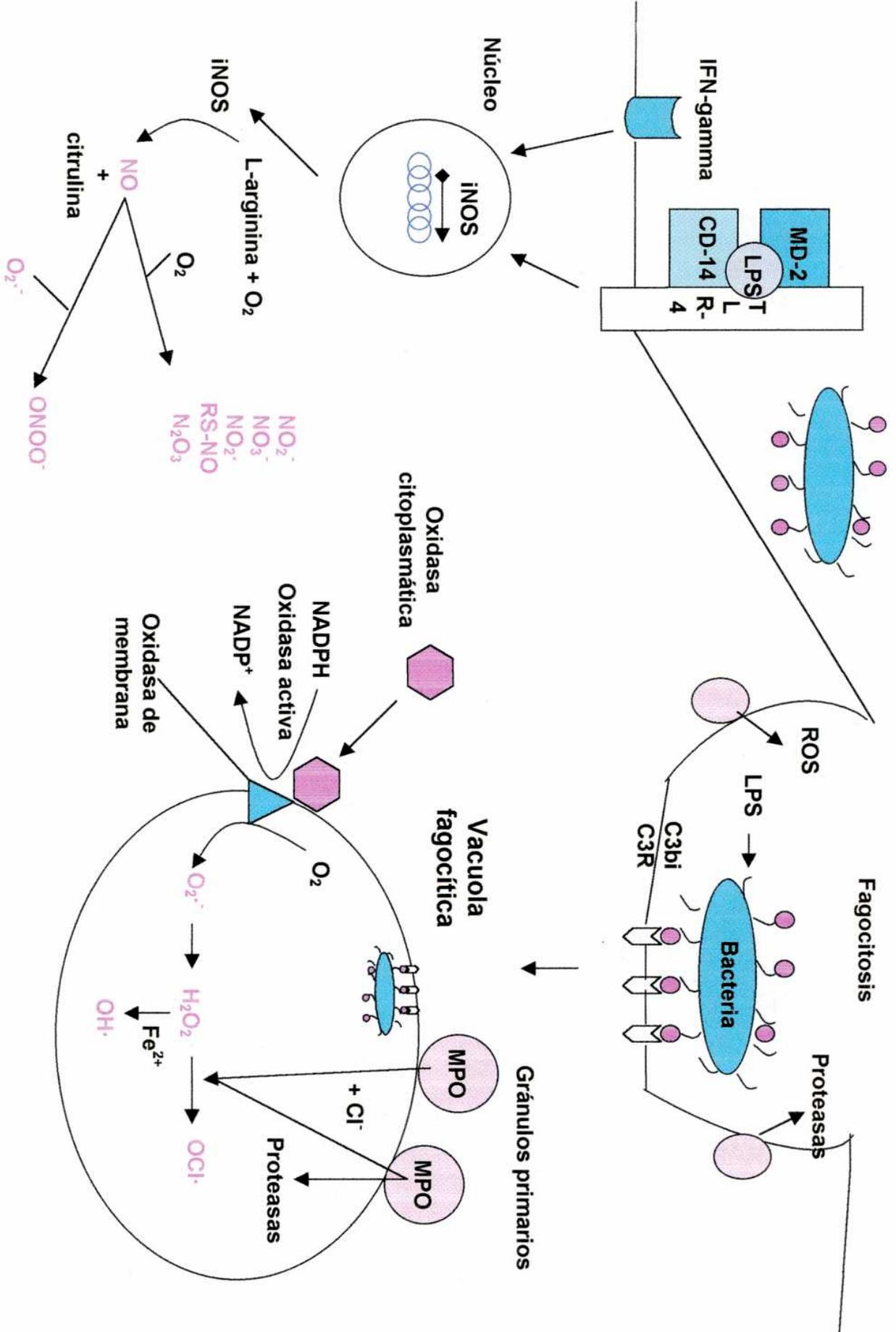


Figura 6. Mecanismos bactericidas dependientes del oxígeno

componentes del complejo están algunos en la membrana plasmática y otros en el citoplasma. Cuando el neutrófilo se activa, los componentes citosólicos se translocan a la membrana plasmática o la membrana del fagosoma formando el complejo enzimático activo.

El anión superóxido (O_2^-) formado se convierte en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por dismutación espontánea en el agua. Las cantidades de H_2O_2 producidos dentro del fagosoma son insuficientes para matar efectivamente a los microorganismos. Los gránulos de neutrófilos y en menor medida de macrófagos contienen a la enzima mieloperoxidasa (MPO), la cual en presencia de un halógeno como el cloruro (Cl^-), convierte al H_2O_2 en hipoclorito (OCl^-). El OCl^- destruye a los patógenos por halogenación (el halógeno se une covalentemente a los componentes celulares) o por oxidación de proteínas y lípidos.

El H_2O_2 también puede ser reducido a radical hidroxilo (OH^\bullet) el cual es altamente reactivo. Esta es la reacción de Fenton y es catalizada por Cu^{2+}/Fe^{2+} .

- **NO**: Los macrófagos y en menor medida los neutrófilos sintetizan NO cuando son estimulados por LPS, ácido lipoteico, TNF, INF-gamma, IL-1alpha, IL-1beta, IL-6, IL-2 y el factor activador de plaquetas (PAF). Todos estas citoquinas y mediadores inducen la expresión de iNOS en macrófagos. El NO en altas concentraciones inhibe directamente a hemoproteínas y a proteínas claves del metabolismo celular como los citocromos, hemoglobina y mioglobina, aconitasa, etc. Además el NO reacciona con el O_2 para formar RNOX (especies reactivas derivadas del NO y el oxígeno) que son poderosos oxidantes y poco sensibles a la acción de las enzimas antioxidantes como la SOD. Todos ellos tienen efectos citotóxicos sobre los patógenos como: modificación oxidativa

de las proteínas, peroxidación lipídica de las membranas, lesiones en el DNA. Sin embargo si la inflamación no es controlada estos mismos oxidantes reaccionan con las células del huésped, produciendo daño oxidativo de las células del huésped.

2.2.3. Mecanismos antioxidantes.

Las células tienen mecanismos antioxidantes que remueven los radicales libres y minimizan la injuria tisular. Estos mecanismos incluyen (Cotran y col., 1999):

- **Antioxidantes:** bloquean la iniciación de la formación de radicales libres o secuestran radicales libres. De este tipo son las vitaminas liposolubles E y A, así como el ácido ascórbico y el glutatión (GSH) en el citosol.
- **Proteínas que unen y transportan hierro:** El hierro y el cobre pueden catalizar la formación de radicales libres del oxígeno por la reacción de Fenton. Los niveles de hierro son minimizados por la unión a proteínas de acumulación y transporte (transferrina, ferritina, lactoferrina y ceruloplasmina); y por lo tanto se disminuye la formación de OH^\bullet .
- **Enzimas que secuestran radicales y los inactivan:**

Catalasa: presente en peroxisomas, y descompone el H_2O_2 ($2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$).

Superóxido dismutasa: está presente en muchos tipos celulares y transforma el O_2^- en H_2O_2 ($2 \text{O}_2^- + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$).

Glutatión peroxidasa: protege contra la injuria tisular catalizando la ruptura de radicales libres ($\text{H}_2\text{O}_2 + 2 \text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + 2 \text{H}_2\text{O}$; ó $2 \text{OH}^\bullet + 2 \text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + 2 \text{H}_2\text{O}$). La relación intracelular de glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) es un reflejo del estado oxidativo de la célula y la capacidad de la célula para detoxificar las

especies reactivas del oxígeno.

2.3. Patologías asociadas a un efecto perjudicial de la respuesta inflamatoria aguda.

La respuesta inflamatoria aguda puede tener efectos deletéreos para el huésped (tabla 2). Estos efectos se deben principalmente a la acción citotóxica de los leucocitos activados que durante la quimiotaxis y la fagocitosis, pueden liberar especies reactivas del oxígeno y proteasas al medio extracelular causando daño tisular. También es importante como mecanismo patológico la coagulación intravascular que produce necrosis hipóxica del tejido. Entre las patologías asociadas a un efecto perjudicial de la respuesta inflamatoria aguda se pueden mencionar (Cotran y col., 1999; Karima y col., 1999):

- Asma y shock anafiláctico: activación de la respuesta inflamatoria frente a antígenos ambientales inocuos.
- Obstrucción de las vías aéreas por edema: epiglotis aguda.
- Patologías asociadas a la sepsis: shock séptico, síndrome de distress respiratorio agudo (ARDS), múltiple falla o disfunción de órganos (MOF/MODS), coagulación intravascular diseminada (DIC).
- Patologías de la preñez asociadas a infección y sepsis: muerte de la madre gestante por shock séptico, aborto séptico o reabsorción embrionaria, feto muerto retenido, parto pretérmino, retardo del crecimiento intrauterino.

2.4. Papel del LPS en el shock séptico.

2.4.1. Shock séptico.

La sepsis ocurre cuando una infección localizada (absceso, peritonitis, neumonía, etc) se expande al torrente sanguíneo.

Un 20-50 % de los pacientes sépticos entran en shock séptico. El shock séptico también es llamado síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS).

La sepsis tiene una tasa de mortalidad de un 20-40%. Una vez que el paciente entra en shock séptico la tasa de mortalidad aumenta a un 60-70%. Los primeros síntomas del shock séptico son: vasodilatación sistémica refractaria y disminución de la contractilidad del miocardio (Karima y col., 1999).

Más tardíamente se produce la falla o disfunción múltiple de órganos MOF/MODS donde numerosos órganos son afectados: pulmones, riñones, hígado, sistema cardiovascular, sistema nervioso central y sistema de coagulación. La disfunción del pulmón es llamada injuria aguda de pulmón o síndrome de distress respiratorio agudo (ARDS), y la alteración en la coagulación es llamada coagulación intravascular diseminada (DIC) (Karima y col., 1999).

2.4.2. Shock séptico inducido por LPS.

La mayor parte de los efectos sistémicos y celulares de la sepsis pueden reproducirse en modelos animales mediante la inyección de LPS.

Dependiendo de la dosis el LPS puede solo producir una inflamación local moderada o producir efectos sistémicos reversibles o a altas dosis ocasionar el shock séptico y MOF/MODS (Figura 7) (Karima y col., 1994; Cotran y col., 1999; Roitt y col., 2001):

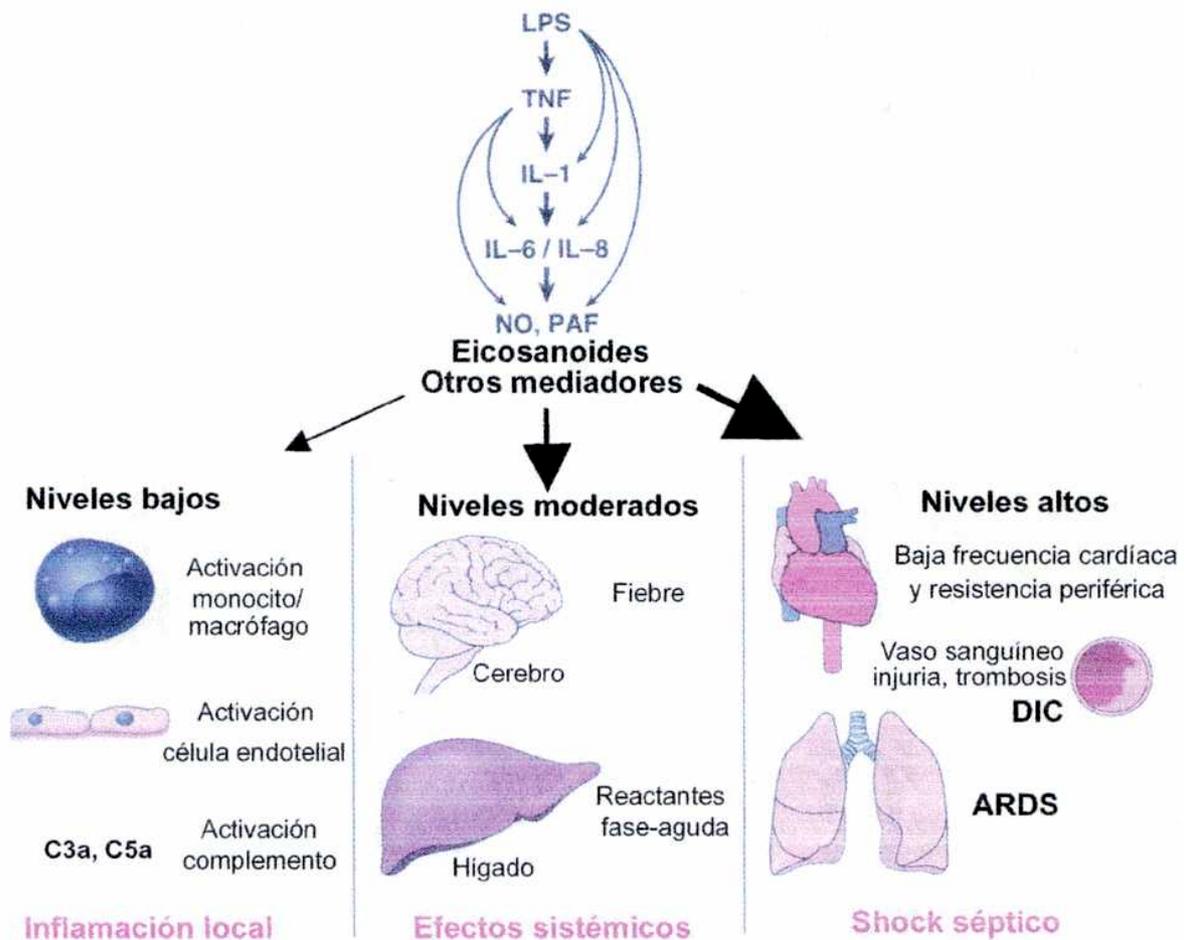


Figura 7. Efecto de LPS y las moléculas mediadoras inducidas. El LPS inicia una cascada de citoquinas, a la vez estas citoquinas se regulan entre sí. Las moléculas mediadoras inducidas como NO, PAF, eicosanoides, citoquinas chemokinas y otras cumple un rol clave en los efectos iniciados por el LPS en la inflamación. A bajos niveles de estos mediadores, solo se observa inflamación local. Con niveles moderados se observan efectos sistémicos además de los locales. Con altos niveles se observa el síndrome del shock séptico. DIC: coagulación intravascular diseminada; ARDS: síndrome del distress respiratorio en adultos.

- LPS en bajas dosis: activa a macrófagos residentes del tejido y también a las células endoteliales. Los macrófagos responden al LPS con la producción de TNF, el cual a su vez induce la síntesis de TNF en la misma célula. TNF e IL-1 actúa sobre la célula endotelial para activar la producción de IL-6 e IL-8 y aumentar la expresión de moléculas de adhesión. Por lo tanto aumenta la infiltración de leucocitos principalmente neutrófilos característicos de la primera etapa de la inflamación aguda. El LPS es capaz de activar directamente la vía alterna del complemento mediante la unión a C3b. De esta forma se generan las poderosas anafilotoxinas (C3a y C5a) las cuales estimulan la liberación de histamina por mastocitos, y son poderosos agentes quimiotácticos para neutrófilos, monocitos, eosinófilos y basófilos. Estas células infiltran con el objetivo de realizar el clearance de la toxina.
- LPS en dosis moderadas: produce una mayor activación de la cascada de citoquinas y aumentan también en forma significativa las moléculas efectoras inducidas por citoquinas: NO, PAF y eicosanoides. Se observan los efectos sistémicos producidos por TNF, IL-1 e IL-6: fiebre y producción hepática de proteínas de fase aguda.
- LPS en dosis elevadas: se observa la misma cascada de citoquinas y efectores circulatorios pero en altos niveles. Uno de los eventos tempranos que llevarán al shock endotóxico y el MOF/MODS es el daño endotelial producido por los leucocitos. Este daño endotelial es producido por el NO y especies reactivas del oxígeno (ROS) liberadas por los leucocitos adheridos al endotelio activado. La injuria endotelial dispara la cascada de coagulación y la coagulación intravascular diseminada (DIC). Una vez que los leucocitos ingresan al tejido liberan proteasas, NO y ROS los cuales producen destrucción tisular y por lo tanto el MOF/MODS (Figura 8).

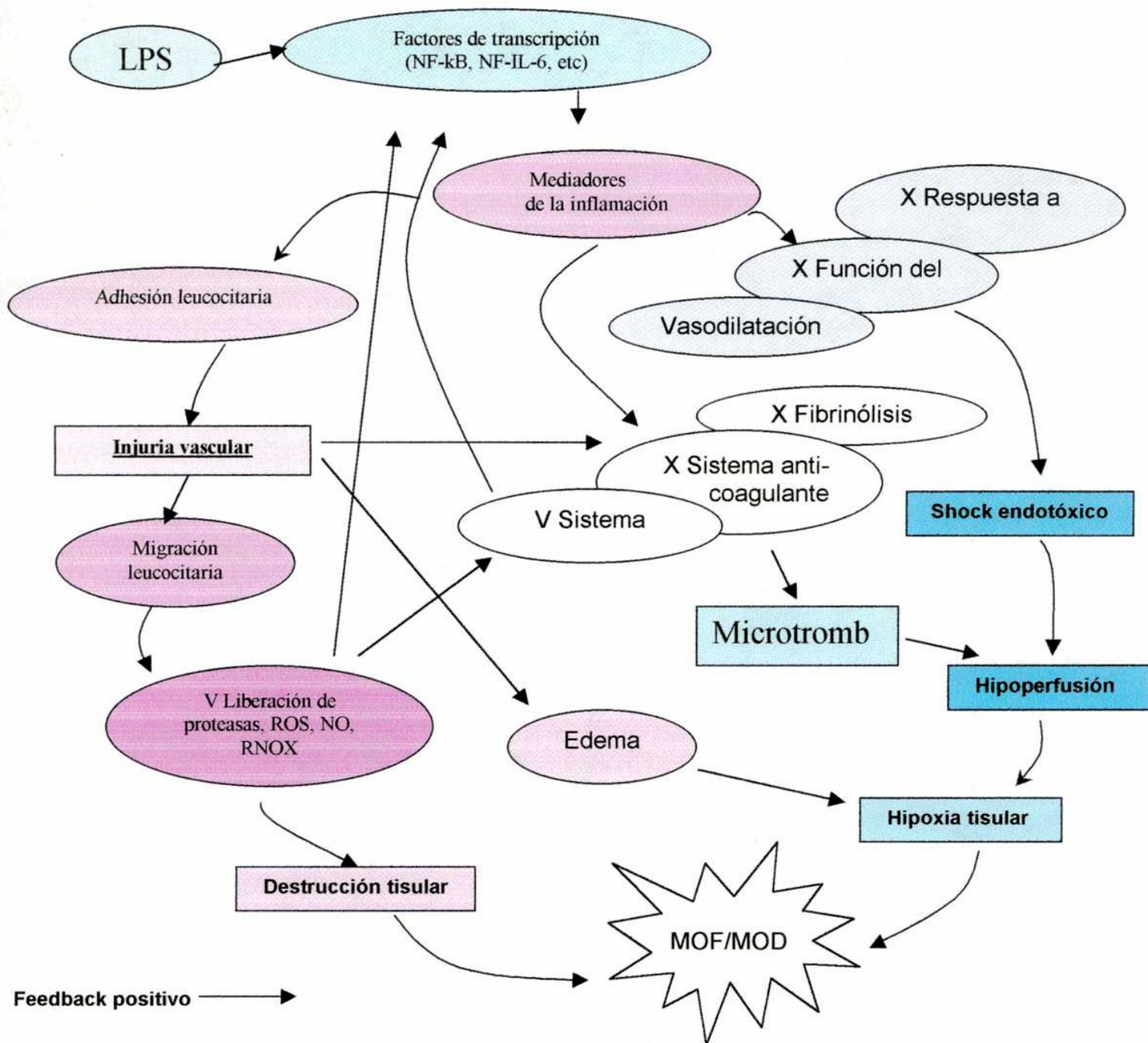


Figura 8. Desarrollo del síndrome de disfunción múltiple/ falla múltiple de órganos (MOF/MODS) disparado por LPS. (a) El shock endotóxico y (b) la alteración de la microcirculación por activación del sistema de coagulación produce (c) hipoperfusión tisular y (d) subsecuentemente hipoxia tisular. Como resultado de la injuria vascular inducida por leucocitos y la migración leucocitaria a través de la pared vascular, estos liberan proteasas, especies reactivas del oxígeno (ROS), óxido nítrico (NO) y especies reactivas del óxido nítrico y el oxígeno (RNOX). DIC: coagulación intravascular diseminada.

2. 5. Transporte y receptores de LPS.

El LPS viaja en plasma unido a la lipoproteína de alta densidad: HDL (Karima y col., 1994). La proteína de unión al LPS (LBP) transfiere el LPS a CD14 (receptor de LPS). CD14 se expresa en monocitos, macrófagos y neutrófilos. Los macrófagos y neutrófilos en respuesta a LPS liberan CD14 soluble. El complejo LBP-LPS-CD14 hace que células que no expresan CD14, como por ejemplo las células endoteliales puedan responder a LPS (Figura 9).

El LPS se une a un complejo receptor formado por CD14, TLR-4 y MD-2 (Figura 10) (Underhill y col., 2002). Este complejo es capaz de transducir la señal para la síntesis de gran cantidad de compuestos inflamatorios como citoquinas: TNF-, IL-1, IL-6, IL-8; y los mediadores: NO, PAF, prostaglandinas, leucotrienos, endoperóxidos, etc.

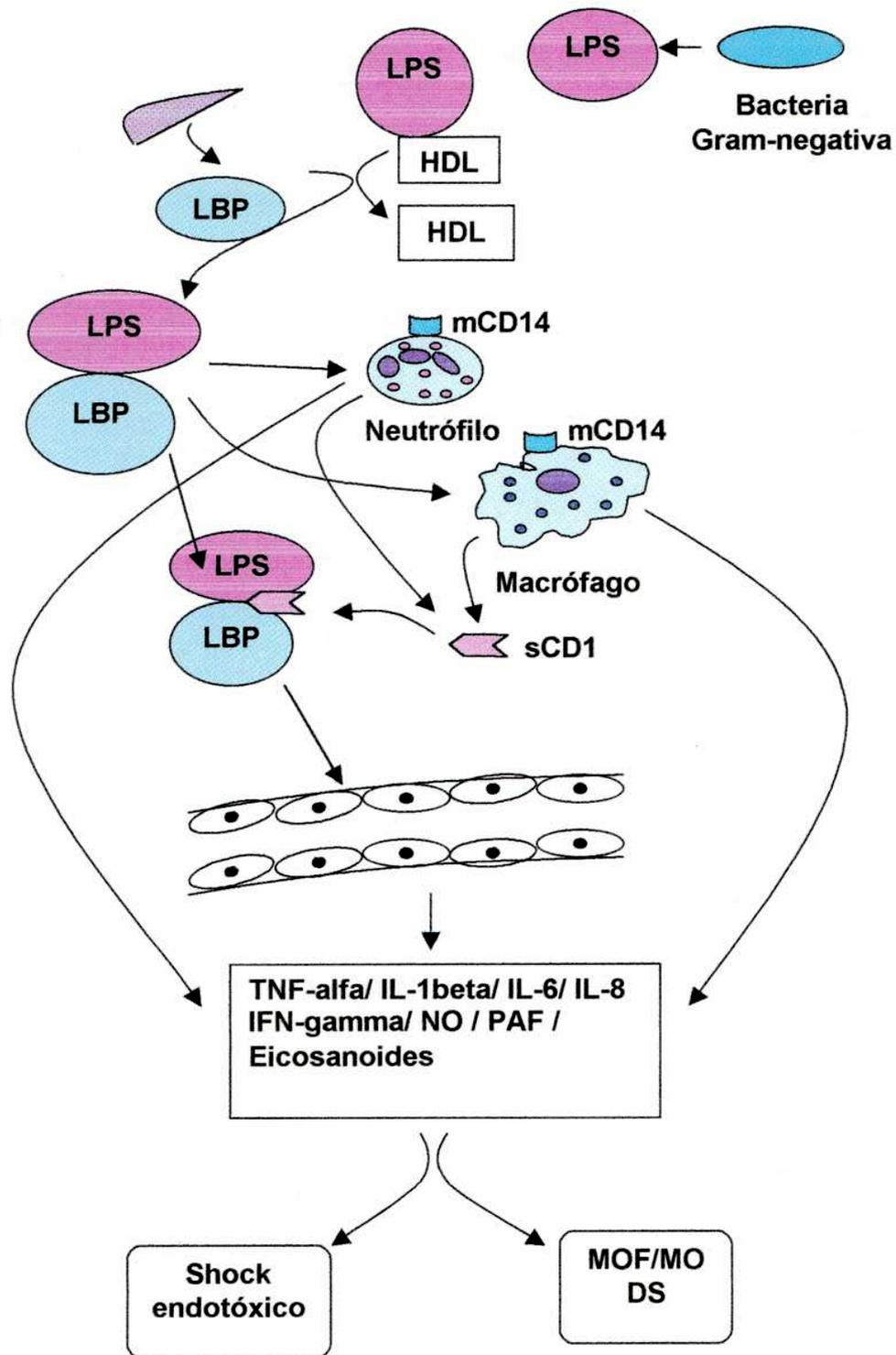


Figura 9. LPS y shock séptico

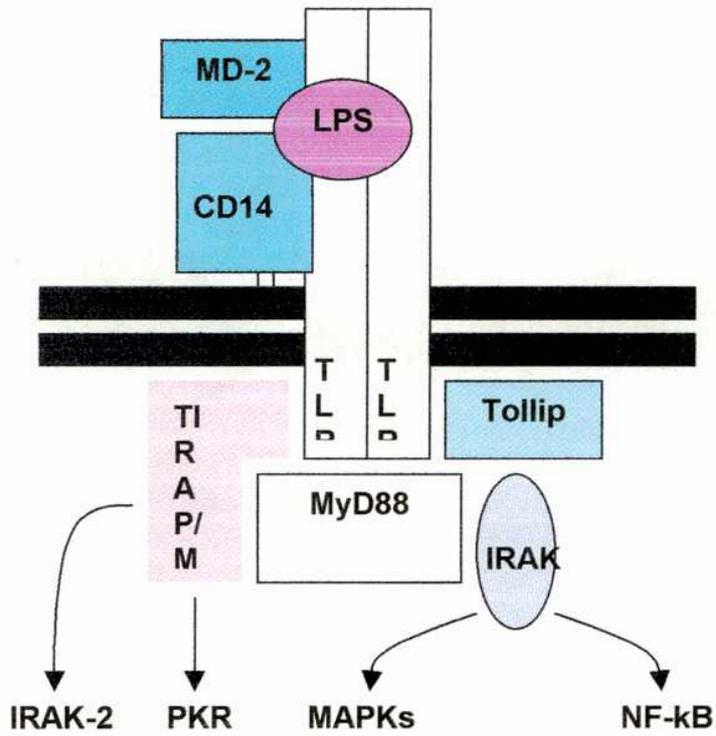


Figura 10. Receptor de LPS. El dominio extracelular de TLR-4 se asocia con MD-2 y CD-14, mientras que el dominio intracelular forma un complejo de señalización que incluye a MyD88, Tollip, IRAK y TIRAP/MAL. Este complejo puede activar a distintas vías como IRAK-2, PKR, MAPKs y NF-kB.

3. Sistema Reproductor.

3.1. Anatomía.

El útero del ratón, al igual que el de los restantes roedores es de tipo dúplex. Otros autores proponen para el mismo la denominación de "bicorne" (Neal y col., 1943)

Aunque los cuernos uterinos parecen estar unidos se mantienen separados y cada uno de ellos desemboca por sus respectivos conductos cervicales en el extremo superior de la vagina.

Cada oviducto tiene una de sus terminaciones abierta sobre el ovario y la otra en el cuerno uterino correspondiente.

Existen dos tipos de fibras nerviosas en el útero, las colinérgicas y las adrenérgicas.

Ambas se hallan alrededor de los vasos sanguíneos y en el miometrio. Las colinérgicas son más abundantes en el cervix que en el cuerpo uterino (Coupland, 1962) y las adrenérgicas se encuentran en los plexos nerviosos perivasculares fundamentalmente en el cervix (Adham y col., 1969).

Las fibras nerviosas post-sinápticas del plexo hipogástrico constituyen el componente nervioso simpático y las que provienen del plexo sacro integran el parasimpático (Mustonen y col., 1971).

Los dos plexos forman el ganglio de Frankenhauser en la región paracervical del útero.

3.2. Histología.

El útero está constituido por tres capas de tejido diferentes: la externa o serosa, la media muscular o miometrio y la interna, mucosa o endometrio. (Ham y col., 1970).

La serosa es la cubierta peritoneal del útero. Está constituida por una capa de células

mesoteliales sostenidas por tejido conectivo que se continúa con el peritoneo.

El miometrio está formado por músculo liso cuyas células se denominan fibras. Son alargadas, de extremos afilados y en su citoplasma se encuentran dos componentes fundamentales: el sarcoplasma y las miofibrillas. El núcleo celular es más bien excéntrico. Estas células musculares están dispuestas en paquetes rodeadas por fibras de colágeno. La capa longitudinal es la externa y la circular la interna y entre ambas hay una capa bien definida de tejido conectivo. Los paquetes de la capa externa son más compactos que los de la interna. El tejido conectivo está formado por fibroblastos y fibras de colágeno (Ham y col., 1970). El endometrio está formado por epitelio cilíndrico simple y una gruesa lámina propia. Hay algunos paquetes de células ciliadas entre las cilíndricas simples. La lámina propia suele denominarse estroma endométrico. En el estroma se hallan incluidas las glándulas tubulares simples, cuyos conductos, atravesando la superficie epitelial, se abren en la luz del útero y cuyas porciones más profundas casi alcanzan al miometrio.

3.3. Fisiología.

Los músculos lisos viscerales se dividen en dos grupos, dependiendo ello de sus características electrofisiológicas. (Bozler y col., 1941). Aquellos que poseen actividad espontánea se denominan "unitarios" y esta actividad se inicia en una zona específica del tejido llamado "marcapasos". Los que carecen de esta actividad son los llamados "multiunitarios", se caracterizan por tener fibras organizadas en unidades motoras y son activados por el nervio motor extrínseco (Eccles y col., 1937).

Las contracciones de estos músculos son coordinadas y reguladas por mediación

nerviosa, aunque no necesariamente son iniciadas por el impulso nerviosos. Además responden al estiramiento desarrollando una tensión activa. (Burnstock, 1960).

3.4. Decidualización.

En ratas y ratones, el estroma endometrial sufre profundos cambios en respuesta a la implantación del embrión, para formar la decidua. Al igual que en las demás especies de mamíferos estudiadas la implantación en los roedores es precedida por un aumento de la permeabilidad de los capilares del endometrio en los sitios donde se encuentran presentes los blastocitos y de la actividad de la fosfatasa alcalina. Esta permeabilidad aumentada es esencial para la subsiguiente formación de tejido decidual.

La decidualización produce un aumento en el tamaño y el peso del útero. Este crecimiento, no sólo es producto de la proliferación y diferenciación de las células del estroma endometrial sino que también es causado por la infiltración del endometrio por una variedad de células de la médula ósea y el "hinchamiento" del tejido causado por el aumento localizado de la permeabilidad vascular y el desarrollo del edema tisular. Entonces, luego de la adhesión del embrión al epitelio uterino, el embrión queda incluido en un masa engrosada de tejido decidual, llamados nidos, que están separadas unos de otros por tejido endometrial no transformado. La formación de la decidua es una parte importante del proceso de implantación, y aunque la función de este tejido no ha sido determinado con certeza, se cree que es un componente crítico de la respuesta de la madre al embrión.

Aunque el estroma uterino compromete a varios tipos celulares que probablemente tienen distintas funciones en la decidualización (Padykula y col., 1981), la mayoría de

los estudios morfológicos y autoradiográficos sostienen el concepto de que los elementos del estroma tipo fibroblastos son las que darán lugar a las células deciduales definitivas (Kleinfeld y col., 1983).

Las otras células del estroma, durante la decidualización, son infiltradas por dos tipos de leucocitos: macrófagos y linfocitos grandes granulados (LGL). Estas células tienen su origen en médula ósea y se acumulan en el endometrio aparentemente en respuesta a estrógeno y progesterona.

4. Prostaglandinas.

Las prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TXs) y leucotrienos (LTs) se denominan genéricamente eicosanoides (palabra derivada del griego eicosa = 20). Son ácidos grasos de 20-C sintetizados por las células animales a partir de ácidos grasos esenciales poliinsaturados (AGEPI) de la familia del ácido linoleico (LA), del alfa-linoleico (LAA), ó del ácido araquidónico (AA).

Los AGEPI pueden ser metabolizados por dos vías (Figura 11):

- Vía metabólica cíclica: origina la formación de PGs y TXs (prostanoides ó eicosanoides cíclicos)
- Vía metabólica lineal: - leucotrienos, lipoxinas y HPETEs a partir de la lipoxigenasa.
 - epóxidos si la reacción es catalizada por epoxigenasas como la citocromo P-450.

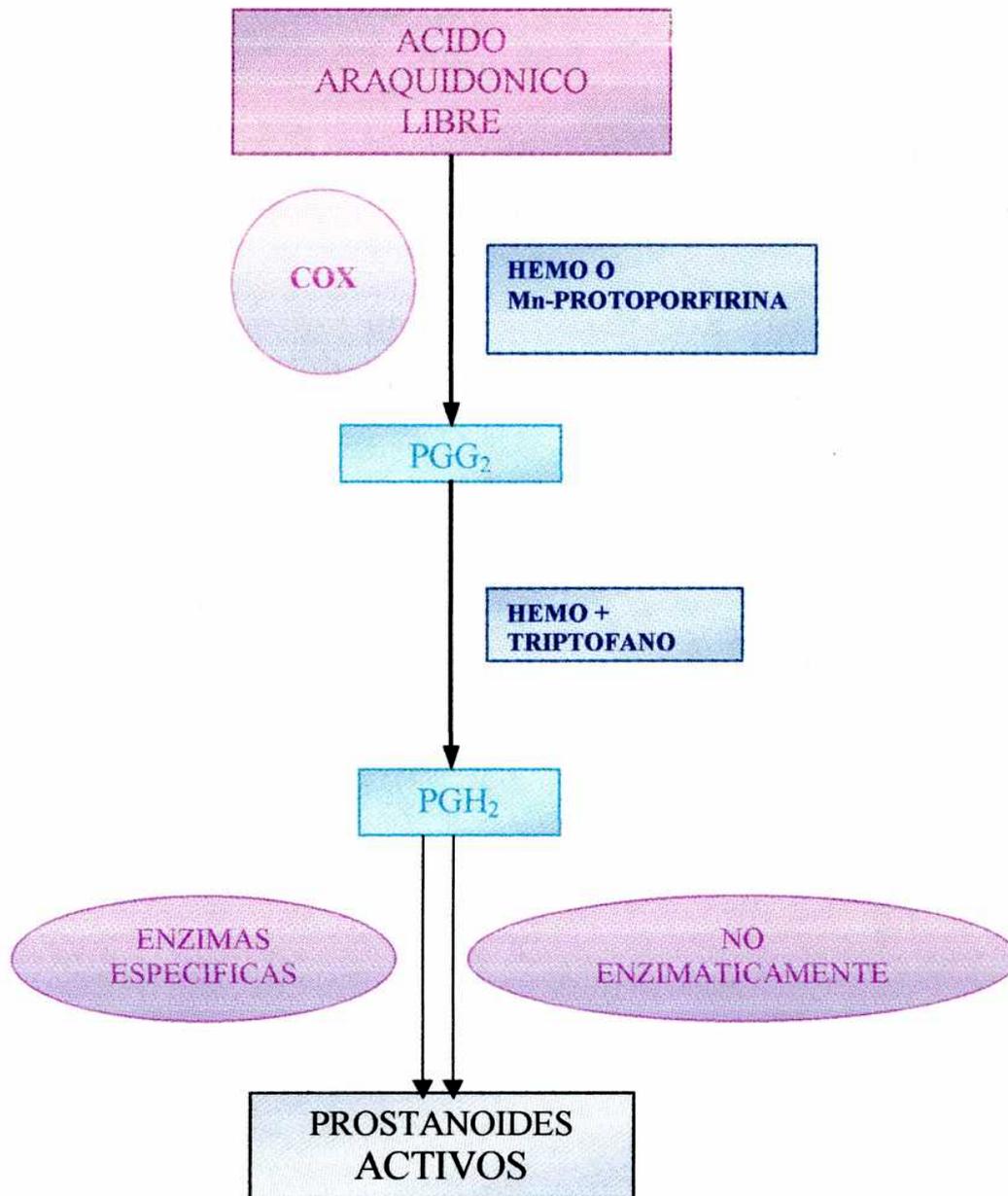


Figura 11. Síntesis de prostaglandians

Las prostaglandinas poseen el esqueleto básico del ácido prostanoico, molécula hipotética de 20 átomos de carbono formando un anillo ciclopentano dos cadenas laterales. Las distintas sustituciones del ciclopentano permite que las prostaglandinas se identifiquen con letras del alfabeto: A, B, C, D, F, G y H.

Durante el curso de reacciones específicas que ocurren en las células de los mamíferos, los precursores lipídicos que normalmente permanecen almacenados en estructuras celulares membranosas, pueden liberarse ante estímulos apropiados y sufrir entonces complejos procesos de metabolismo oxidativo que originan los mediadores lipídicos, biológicamente activos.

Para la liberación del ácido araquidónico pueden plantearse tres mecanismos principales que intervienen en la liberación de AA:

- 1- asociado con PLA₂ (fosfolipasa A₂), que libera araquidonato y deja un residuo de lisofosfolípido.
- 2- implica la acción secuencial de una PI-PLC (fosfoinositol-fosfolipasa C) más digliceridolipasas (DGL) que genera AA y mono-acil-glicerol.
- 3- intervención de PI -PLC específica más DGL y digliceridocinas (DGC), fosfato inorgánico y ATP (Gimeno y col. 1985).

Una vez liberados, los ácidos grasos pueden sufrir distintos procesos: beta-oxidación, elongación de la cadena, reincorporación de los ácidos grasos a los fosfolípidos, autooxidación (formación de hidroperóxidos de ácidos grasos insaturados) ó entrar en una cascada de reacciones en la cual el ácido araquidónico libre es metabolizado principalmente por dos vías : Cíclica ó Lineal

Las prostaglandinas y los tromboxanos se sintetizan por la vía cíclica.

41. La ciclooxigenasa.

La PGH (sintetasa de prostaglandina H) ó ciclooxigenasa (COX) es una glicoproteína bifuncional que cataliza la biosíntesis de PGH_2 , un precursor de prostaglandinas, prostaciclina (PGI_2) y tromboxano A_2 .

Esta enzima se encuentra ampliamente distribuida en células y tejidos de mamíferos (menos en eritrocitos y linfocitos) y se encarga de las transformaciones de los ácidos grasos por la llamada vía metabólica cíclica. Existe como homodímero, cada subunidad con un peso molecular de 70 kDa. Posee dos actividades enzimáticas:

- ciclooxigenasa la cual adiciona oxígeno al AA para formar PGG_2 ;
- peroxidasa la cual reduce PGG_2 a PGH_2 .

Ambas actividades enzimáticas requieren hemo (Keneth y col.).

Aunque la distribución de la COX es muy amplia, la transformación enzimática de los endoperóxidos en prostanoides varía considerablemente en los distintos tejidos y tipos celulares. PGH_2 es susceptible de numerosas transformaciones enzimáticas y químicas siendo sustrato de enzimas específicas de distintos tejidos, formándose los productos característicos de cada uno de ellos. (Gimeno y col.)

La COX, reporta dos isoformas: (Lin y col. 1989, Tsai y col.1990)

- 1) constitutiva (COX-1).
- 2) inducible (COX-2). Se expresa en células endoteliales y macrófagos luego de la estimulación con LPS o algunas citoquinas (Salvemini y col. 1993)

Los endoperóxidos lábiles, específicamente el PGH₂, son rápidamente transformados en prostanoïdes con competencia biológica, por la acción de enzimas citoplasmáticas específicas, o por un mecanismo no enzimático.

- PGF_{2α} se sintetiza por reducción de PGH₂ y , en ciertos tejidos, PGE₂ también puede ser convertida en PGF_{2α} por la 9-ceto-reductasa, en una reacción reversible.
- PGE₂ se forma a partir de la prostaglandina E sintetasa, una enzima unida a membrana, en dos pasos: - isomerización del endoperóxido
- reducción
- PGD se forma a partir de la prostaglandina D sintetasa, una enzima citosólica. Dos ó tres proteínas catalizan la conversión. La principal enzima implicada es la 11-cetoisomerasa. Ambas enzimas requieren glutatión como cofactor.

HIPOTESIS DE TRABAJO:

El conocimiento actual acerca de la preñez y la reabsorción embrionaria nos permite detallar los antecedentes más destacados como punto de partida para elaborar la hipótesis de trabajo.

- Las infecciones bacterianas constituyen una reconocida causa de la pérdida fetal tanto en animales como en humanos.
- En los mamíferos, la sobrevivencia del feto está influenciada por el sistema inmune materno.
- Se ha utilizado la cruce de ratones CBA/J con DBA/2, con alta reabsorción espontánea, para estudiar la pérdida embrionaria temprana (Clark D A, McDermott MR, Szewczuk MR Cell. Immunol. 52, 106, 1980).
- La tasa de reabsorción puede ser incrementada si los ratones preñados son tratados RNAs doble cadena que inducen la producción de interferón y aumentan la actividad de las células NK y macrófagos (de Fougerolles AR, Baines MG. J Reprod Immunol. 19, 28, 1989).
- Las células NK y los macrófagos infiltran los embriones reabsorbidos antes de su pérdida (Gendrom RL, Baines MG. Cell. Immunol 113: 261, 1988)

- El NO producido por la iNOS de los macrófagos es capaz de mediar el daño a los embriones en crecimiento (Haddad EK, Duclos AJ and Baines MG. J.Exp.Med 182: 1143, 1995)
- El LPS es capaz de disparar señales para la inducción de los macrófagos (Ding AH, Nathan CF and Stuehr DJ. J.Immunol 141: 2407,1988) y de aumentar la producción de NO en diversos tejidos (Moncada S; Palmer RMJ and Higgs EA. Pharmacological Reviews 43: 109, 1991)

En este contexto, la hipótesis y los objetivos de este trabajo se circunscriben a:

Hipotesis general: El óxido nítrico participa de la reabsorción embrionaria inducida por LPS en ratón.

Objetivos

- 1) Establecer un modelo de reabsorción embrionaria en ratón inducido por LPS.
- 2) Estudiar si el NO está involucrado en este modelo.
- 3) Determinar que isoformas de la NOSintasa participan en la reabsorción embrionaria inducida por LPS.

- 4) Investigar la posible interacción entre el NO y las PGs como posible mecanismo de acción en la reabsorción embrionaria inducida por LPS.

- 5) Investigar si la nitración proteica participa en la reabsorción embrionaria inducida por LPS.



Materiales y Métodos

Materiales

1. Drogas y químicos

Los siguientes reactivos: LPS de *Escherichia coli* 05: B55, Aminoguanidina, Nitrato Reductasa, Lactato Deshidrogenasa, anticuerpos secundarios conjugados a Fosfatasa Alcalina, membranas de nitrocelulosa y PMYR fueron comprados a Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). La (¹⁴C)-arginina fue suministrada por Amersham Corporation (Arlington Heights, IL, USA). La resina de intercambio catiónico Dowex AG 50W-X8 fue obtenida de Laboratorios Bio-Rad (Tecnolab SA, Buenos Aires). Los reactivos para western blot fueron suministradas por Sigma y Bio-Rad. El anticuerpo anti-iNOS fue obtenido de Santa Cruz Biotechnology (California, USA). Los anticuerpos anti-eNOS y anti-nNOS y los controles positivos para las isoformas de la NOS fueron obtenidos de BD Transduction Laboratories (USA); El kit CSA/HRP y los sueros pre-inmunes para inmunohistoquímica fueron comprados a DAKO Corporation (California, USA). Todos los otros reactivos fueron de grado analítico.

2. Animales

Hembras BALB/c vírgenes de 8 a 12 semanas de edad fueron apareadas con machos BALB/c fértiles de de 8 a 24 semanas de edad. El día en que se encontró tapón vaginal fue designado día 0 de preñez. Los animales se mantuvieron bajo un régimen de 12 hs luz/ 12 hs oscuridad, temperatura constante, alimento y agua *ad libitum*. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical.

Materiales

1. Experimentos

Se realizó la siguiente serie de experimentos:

1.1. Experimento 1: Efecto de AG en la reabsorción embrionaria inducida por LPS

Las hembras preñadas fueron divididas en 4 grupos:

Control: hembras que sólo fueron inyectadas con vehículo (PBS)

intraperitoneal (i.p.) en los días 6 y 7 de preñez.

AG: hembras que fueron inyectadas con AG 6 mg/ratón i.p. en el día 6 (9 A.M.) de preñez. En el día 7 (9 A.M.) fueron inyectadas con AG 6 mg/ratón i.p., y 4 hs más tarde se les administró otra dosis de AG 6 mg/ ratón i.p..

LPS: hembras que fueron inyectadas con PBS i.p. en el día 6 (9 A.M.) de preñez. En el día 7 (9 A.M.) fueron inyectadas con LPS 0.5 ug/g i.p. y 4 hs más tarde fueron inyectadas con PBS i.p.

LPS+AG: hembras que fueron inyectadas con AG 6 mg/ratón i.p. en el día 6 (9 A.M.) de preñez. En el día 7 (9 A.M.) fueron inyectadas con LPS 0.5 ug/g i.p. + AG 6 mg/ratón i.p., y 4 hs más tarde se les administró otra dosis de AG 6 mg/ ratón i.p..

Los animales fueron sacrificados en los días 8 y 12 de preñez y el porcentaje de reabsorción embrionaria fue calculado de la fórmula:

$$100 \times \text{embriones reabsorbidos} / (\text{embriones viables} + \text{embriones reabsorbidos})$$

Se utilizaron 8 animales por grupo (n=8) en este experimento.

1.2. Experimento 2: Efecto de LPS en la producción de $\text{NO}_3 + \text{NO}_2$

Hembras en el día 7 de preñez fueron inyectadas con vehículo (PBS) ó LPS 0.5 ug/g. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical a las 0, 2, 6, 12 y 24hs post-inyección. En cada sitio de implantación se separó útero de decidua. Los úteros y deciduas se incubaron 24hs para la medición de NO como $\text{NO}_3 + \text{NO}_2$ en el sobrenadante. Se utilizaron 6 animales (n=6) para cada uno de los puntos temporales indicados en este experimento.

1.3. Experimento 3: Histología, inmunodetección de las isoformas de la NOS, CD14 y Nitrotirosina, medición de la actividad NOS, medición de la producción de prostaglandinas

Las hembras preñadas fueron divididas en los mismos 4 grupos que se describen en el *Experimento 1*, pero en este caso los animales fueron sacrificados 6 hs luego de la inyección de LPS. En cada sitio de implantación, se separó útero de decidua y fueron inmediatamente congelados a -70°C . Estos tejidos fueron utilizados para medir la actividad de la NOS, liberación de prostaglandinas y para la detección de iNOS, eNOS, nNOS, CD14 y Nitrotirosina por western blot. Sitios de implantación frescos recién removidos de los mismos animales fueron fijados en paraformaldehído 4% para la detección de iNOS, eNOS, nNOS, CD14 y Nitrotirosina por inmunohistoquímica y para la tinción con hematoxilina-eosina.

Se utilizaron 6 animales (n=6) por grupo en este experimento.

Se estudió el efecto de AG sobre la infiltración leucocitaria inducida por LPS. Para ello, en secciones teñidas con hematoxilina de los 4 grupos, se calculó la densidad de

leucocitos contando en 10 campos (objetivo 1000 x) tomados de la decidua mesometrial de cada sitio de implantación. Se utilizaron 10 animales por tratamiento (n=10), y se seleccionaron al azar 3 sitio de implantación de cada animal para el estudio.

Además se realizó la tinción con hematoxilina-eosina de los sitios provenientes de animales tratados con LPS o vehículo (PBS) y sacrificados a las 24hs post-inyección.

Los granulocitos, macrófagos y células LGL fueron reconocidos por su morfología. Los macrófagos y granulocitos fueron CD14 positivos, mientras que la presencia de células LGL fue confirmada por tinción con PAS.

También se detectaron las isoformas de la NOS en provenientes de animales tratados con LPS o vehículo (PBS) y sacrificados a las 24hs post-inyección.

2. Técnicas

2.1. Cultivo de sitios de implantación

Los úteros y deciduas fueron pesados y cultivados individualmente en placas de 24 pozos conteniendo 330ul de DMEM (GIBCO) suplementado con 10% de FCS (GIBCO) y antibióticos (Penicilina G 20 U/ml, Estreptomina 20ug/ml, Amphotericina B 50 ng/ml, GIBCO). Los explantes fueron cultivados 24 hs en estufa gaseada (5% CO₂) a 37°C. Se recuperaron los sobrenadantes para la medición de NO₃+NO₂.

2.2. Medición de NO₃ +NO₂

El NO producido por los tejidos se acumula como nitrato (NO₃⁻) y nitrito (NO₂⁻) en el sobrenadante de cultivo. El reactivo de Greiss reacciona solo con el nitrito, por lo tanto

para estimar la producción total de NO es necesario reducir el nitrato a nitrito utilizando Nitrato Reductasa enzima dependiente de NADPH. Luego hay que oxidar el NADPH utilizando Lactato Deshidrogenasa pues inhibe la reacción de Greiss.

Se utilizó la técnica descrita por Grisham y col (Grisham et al., 1996).

Brevemente: 100 ul de sobrenadante se incubaron con 5 ul de NADPH 2 mM y 5 ul de Nitrato Reductasa de *Aspergillus* 10 UI/ml en agitación constante y temperatura ambiente por 30 min. . Luego se agregaron 10 ul de Ácido pirúvico 100 mM y 10 ul de Lactato Deshidrogenasa 1000 U/ml y se incubó 10 min en agitación constante. Se agregaron 50 ul de Ácido Sulfanílico (10 mg/ml) y se incubó 10 min a temperatura ambiente y agitación constante. Se agregaron 50 ul de Naftil-etilendiamina (NEDA) (1mg/ml) y se incubó 5 min en oscuridad y agitación constante. El producto coloreado se leyó a 540 nm, y se le restó la absorción inespecífica a 670 nm. La concentración de NO_3+NO_2 se deduce de una curva standard de nitrato. Se expresan los resultados como: $\mu\text{M}/100$ mg de peso húmedo.

2.3. Medición de la actividad NOS

Se midió la actividad Oxido Nítrico Sintetasa (NOS) mediante una modificación del método de Bredt y Snyder (1989), que mide la conversión de (^{14}C)-arginina en (^{14}C)-citrulina, ya que la citrulina permanece en la muestra mientras que las cantidades equimolares de NO son rápidamente destruidas. Se midió la actividad NOS total sin discriminar entre las distintas isoformas ya que se utilizó exceso de Ca^{2+} .

Brevemente: Los tejidos se incubaron a 37°C en buffer conteniendo Hepes 20 mM, 10 μM (^{14}C)-arginina (0.3 uCi), valina 25 mM, DTT 1 mM, Cl_2Ca 0.45 mM y 1 mM

NADPH. La valina inhibe la conversión de L-arginina en L-citrulina por las arginasas, lo cual aumenta la especificidad del ensayo. Luego de 15 min de incubación las muestras fueron homogenizadas. Las muestras se centrifugaron por 10 min a 3000 g y luego fueron aplicadas sobre 1 ml de columna DOWEX AG50W-X8 (Na⁺form) y la (14C)-citrulina fue eluida con 3 ml de agua destilada. La radioactividad fue medida en contador de centelleo líquido. La actividad enzimática es reportada en pmol (14C)-citrulline (15 min)⁻¹ (100 mg)⁻¹ peso húmedo.

2.4. Western blot

Las muestras se homogenizaron en homogenizador Ultra-Turrax a 4°C en 4 volúmenes de Tris Buffer 20 mM ph 7.4 conteniendo: aprotinina 2 ug/ml, leupeptina 50 ug/ml, benzamidina 1 mg/ml, ácido caproico 1 mg/ml, Soybean Tripsinogen Inhibitor 0.1 mg/ml y EDTA 1 mM. Luego se sonicaron las muestras. Luego se centrifugó a 3000 rpm por 10 min para precipitar restos de tejido, se recuperaron los sobrenadantes y se guardaron a -70 C hasta uso. Cada punto representa material de un pool de 6 animales. Se sembraron también controles positivos. Membrana de célula endotelial humana fue usada para la eNOS, lisado de cerebelo de rata fue usado para la nNOS, lisado de macrófagos de ratón fue usado para la iNOS (BD Transduction Laboratories, USA). Se midió la concentración proteica por Bradford. Se sembraron en cada carril 100 ug de proteína; para ello se midió la concentración proteica de las muestras por método de Bradford. Previamente se reducen las muestras agregando 5% 2-Mercaptoetanol y calentando a 100 °C por 5 min. Se corrieron las muestras en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Se corrió a 30V en gel concentrador 4% y a

100V en gel separador 7.5%. Luego se electrotransfirió a 100V, 1.5 hs a 4°C.

Se bloquearon los sitios inespecíficos incubando 1 h en agitación constante con leche descremada 5% en TTBS. Se escurrió la solución de bloqueo y se agregó el primer anticuerpo: iNOS(1:250 en TBS) policlonal rabbit Santa Cruz Biotechnology, eNOS y nNOS (1:1000 en TBS) monoclonales BD Transduction Laboratories. Se incubó OVN a 4°C. Se realizaron 3 lavados de 10 min con TTBS. Se agregó el 2° anticuerpo: anti-mouse (1:10000) ó anti-rabbit (1:20000) conjugado a Fosfatasa Alcalina (SIGMA). Se incubó 1h a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 10 min con TTBS. Se reveló utilizando BCIP/NBT(SIGMA) en oscuridad y agitación por 10 min. Se corta la reacción con agua destilada.

Para la detección de CD-14 se utilizó la técnica de western blot por quimioluminiscencia. Para ello utilizó anti-CD14 (1:1000 en TBS) policlonal rabbit Santa Cruz Biotechnology. Se utilizó como segundo anticuerpo anti-rabbit acoplado a Peroxidasa (1: 40000). Se reveló utilizando los reactivos 1 y 2 de quimioluminiscencia.

Se mide el RF de la banda y se calcula el peso molecular utilizando los standards de peso molecular. Se midió la intensidad de la banda (Píxeles²). Estos análisis se realizaron con el programa SIGMAGEL. (SIGMA).

2.5. Inmunohistoquímica

Se diseccionaron los úteros, se los cortó en trozos de 2-3 sitios de implantación y se los fijó en solución de paraformaldehído 4% OVN a 4°C. Se deshidrataron los tejidos en gradiente creciente de alcoholes y se los incluyó en parafina. Se realizaron cortes de 4µM con micrótopo. Se seleccionaron los cortes que pasan por el centro del sitio de

implantación. Se montaron los cortes en portaobjetos silarizados. Para la realización de la técnica se utilizó el kit CSA/HRP (DAKO, USA). Brevemente. Se incubaron los cortes con Peróxido de Hidrógeno 0.5% en agua destilada por 15 min. Luego se incubó con Buffer de Bloqueo 50 min. Se escurrió y se agregó el anticuerpo primario: iNOS y CD14 policlonales conejo Santa Cruz Biotechnology (1:200 en TBS), eNOS y nNOS monoclonales Transduction Laboratories (1:1000 en TBS).

Para detectar el daño oxidativo producido por el anión peroxinitrito se realizó una inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo anti-nitrotirosina (SIGMA; 1:1000).

Se incubó 24hs a 4°C. Se llevó a temperatura ambiente durante 30 min. Se agregó el anticuerpo secundario: anti-rabbit link o anti-mouse link biotinilados y se incubó 15 min. Se adicionó el complejo Streptoavidina-biotina y se incubó 15 min. Se agregó el reactivo de amplificación Biotinil-tiramida y se incubó 15 min. Se agregó Streptoavidina – Peroxidasa y se incubó 15 min. Luego de cada incubación se realizaron 3 lavados de 5 min en TTBS. Se aplicó la diaminobenzidina y se corta la reacción con agua destilada cuando se obtiene marca deseada (5 min).

Se realizó una coloración con hematoxilina durante 15 segundos. Se deshidrató y se montó en PMYR. Como control negativo se incubaron secciones sin anticuerpo primario o con IgG de conejo y ratón no inmunizado.

2.6. RIA de Prostaglandinas

La síntesis de PGE₂ y PGF_{2 α} en úteros y decidua se determina por la técnica de radioinmunoanálisis (RIA) con anticuerpo específico.

Los tejidos se colocan en 2 ml de medio Krebs-Ringer-Bicarbonato, se pesan y se incuban durante 1hs a 37°C en atmósfera de carbógeno. El pH del medio se mantuvo en 7.4 con gaseado constante de carbógeno.

Luego se acidifica con 3 gotas de HCl 1N y se adiciona 1 ml acetato de etilo a cada muestra. De esta forma se extraen las prostaglandinas a la fase orgánica. Se realizan dos lavados mediante el agregado de 1 ml de acetato de etilo. Posteriormente el extracto se seca en estufa de vacío y las muestras se guardan a 4°C hasta su posterior utilización.

Se realiza una curva con el standard específico de cada PGs. Se utilizan 100ul de muestra para su cuantificación incubando 30 minutos con el antisuero específico de cada prostanoide y una hora más con la PG tritiada correspondiente. La separación se realiza por el agregado de carbón-dextran. Se vuelca el sobrenadante de estos tubos en los viales ya preparados con líquido de centelleo y se cuenta la radioactividad en contador de centelleo Beckman. Los resultados se expresan como pg Pgs / mg de peso húmedo.

2.7. Estadística

La significación estadística fue determinada por análisis de la varianza (ANOVA), seguido de comparaciones múltiples por el test de Student-Newman-Keuls. Las diferencias con $p < 0.05$ fueron consideradas significativas. Los resultados fueron expresados como la media \pm el error estándar de la media (SEM).



Resultados

Resultados:

1. Establecimiento de un modelo de reabsorción embrionaria inducida por LPS

Para establecer un modelo de reabsorción embrionaria murino se estudió el efecto del tratamiento con LPS (0,5 ug/g) en animales preñados de 7 días.

Hembras Balb/c fueron apareadas con machos de la misma cepa. Se designó día 0 de preñez al día en que se encontró tapón vaginal.

La inyección i.p. de LPS (0.5 ug/g) a hembras en el día 7 de preñez produjo a las 24 hs un 100 % de reabsorción embrionaria (Tabla 1).

Estos resultados mostraron que los sitios de implantación al día 7 de preñez son extremadamente reactivos frente al LPS, ya que una dosis de LPS (0.5 ug/g) que no compromete la vida de la madre es capaz de desencadenar la reabsorción. Esta dosis produce efectos sistémicos en la madre (diarrea, piloerección, postura agachada) pero en ningún caso fue mortal, y el efecto de LPS sobre las madres desapareció 24 hs luego del tratamiento.

La totalidad de los sitios de implantación fueron expulsados por la madre en el día 9 de gestación (48 hs post-inyección de LPS). No se observó evidencia alguna de gestación en estos animales en el día 12 de gestación (Tabla 1).

Tratamiento	N° animales que expulsan embriones el día 9	N° sitios de implantación	Porcentaje reabsorción
Control †: día 8 n=12	-	11 ± 1	0
AG †: día 8 n=12	-	10.0 ± 0.6	0
LPS †: día 8 n=12	-	9.9 ± 0.4	100 (c)
LPS+AG †: día 8 n=12	-	10.4 ± 0.6	41.6±14.1 (d)
Control †: día 12 n=12	0	11.4 ± 0.2	10.8 ± 2.3
AG †: día 12 n=12	0	11.0 ± 0.9	7.5 ± 2.1
LPS †: día 12 n=12	12	0 (a)	100 (e)
LPS+AG †: día 12 n=8	5	6.6 ± 1.7 (b)	51.9±14.0 (f)

Tabla 1. Efecto de AG sobre la reabsorción embrionaria inducida por LPS. Hembras Balb/c preñadas fueron inyectadas con PBS, AG, LPS ó LPS+AG y sacrificadas el día 8 ó 12 de preñez (ver Experimento 1 de Materiales y Métodos). Se evaluó e porcentaje de reabsorción como: 100 X embriones reabsorbidos / (embriones viables + embriones reabsorbidos).

a: p<0.001 vs Control día 12; b: p<0.001 vs LPS día 12; c: p<0.001 vs Control día 8; d: p<0.001 vs LPS día 8; e: p<0.001 vs Control día 12; f: p<0.001 vs LPS día 12.

1.1 Estudios histológicos

Se realizaron cortes histológicos de los sitios provenientes de animales controles preñados de 8 días y en los tratados con LPS a las 24 hs post-inyección. Los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina para observar la morfología.

En los animales control en el día 8 de preñez se observó el embrión, el trofoblasto y la decidua con abundantes lagunas (Figura 1.a).

En los animales tratados con LPS el día 7 de preñez se observó, al día 8, que la decidua cercana al embrión estaba totalmente necrosada detectándose sólo restos celulares (Figura 1b y c). Esta zona de la decidua está unida al útero por una pequeña porción de tejido, y es expulsada en el día 9 (Figura 1b). Se observó también otra zona de la decidua, unida al útero, que está altamente infiltrada por granulocitos y células LGL (Figura 1d). Los granulocitos y las células LGL probablemente dirijan la expulsión de la decidua necrosada, la fibrinólisis y la regeneración del tejido.

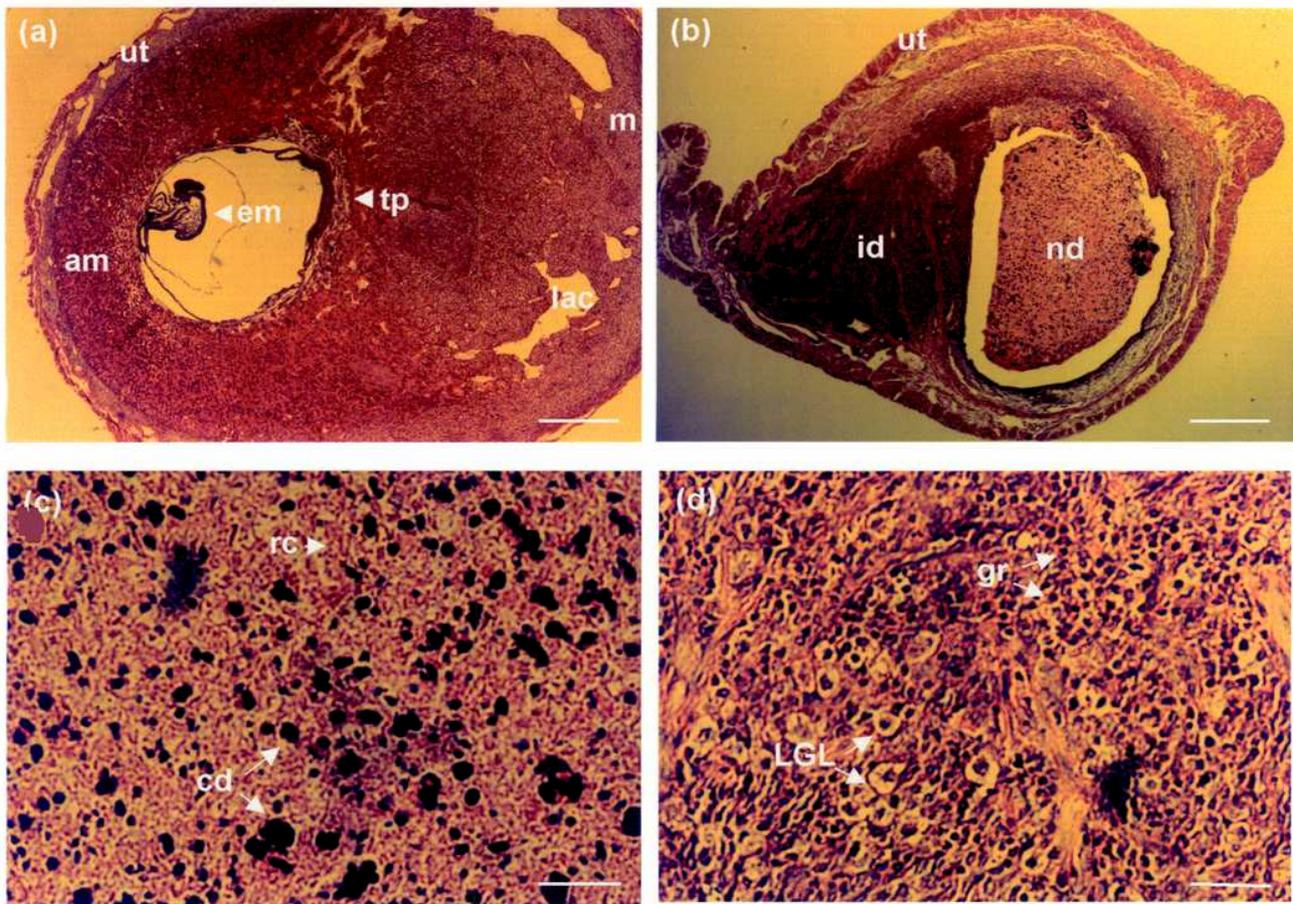


Figura 1. Efecto de LPS en los sitios de implantación a las 24 hs. El protocolo corresponde al Experimento 3 de Materiales y Métodos. Hembras BALB/c fueron inyectadas con LPS 0.5 ug/g ó PBS y sacrificadas 24 hs más tarde. Cortes de los sitios de implantación fueron teñidos con hematoxilina-eosina. En los animales control **(a)** (día 8 de preñez) se observa el embrión, trofoblasto y abundantes lagunas deciduales. En los animales tratados con LPS **(b)** se observa un avanzado grado de reabsorción. En la decidua de los animales tratados con LPS se distinguen 2 zonas: una decidua necrótica **(c)** donde sólo se observan restos celulares, y una decidua altamente infiltrada por granulocitos y células LGL **(d)** que permanece pegada al útero. ut: útero, em: embrión, m: decidua mesometrial, am: decidua antimesometrial, nd: decidua necrótica, id: decidua infiltrada, cb: restos celulares, gr: granulocitos, LGL: Linfocitos Grandes Granulares. Las barras de escala representan 380 μ m (a,b) y 50 μ m (c,d).

2. Efecto de LPS en la producción de NO₃+NO₂

Se caracterizó la producción de NO de los úteros y deciduas de los animales control (preñados de 7 días) y los animales inyectados con LPS. Para ello los tejidos fueron cultivados por 24 hs en DMEM + SFB 10%. En los sobrenadantes se midió la producción de NO como NO₂+NO₃ mediante reactivo de Greiss.

En la decidua de los animales control se observó una baja producción de NO a las 0 y 2 hs post-inyección de vehículo (PBS) (Figura 2.a). La producción de NO aumentó a las 6 hs y permaneció elevada aún a las 24 hs post-inyección ($p < 0.05$) (Figura 2.a). Esto sugiere la posible existencia de un incremento fisiológico de la producción de NO durante el día 7 de preñez.

En la decidua, el LPS produjo un aumento significativo en la producción de NO a las 2 ($p < 0.05$), 6 ($p < 0.05$) y 12 hs ($p < 0.05$) post-inyección (Figura 2.a), siendo máxima a las 6 hs. Sin embargo, a las 24 hs post-inyección de LPS, la producción de NO fue indetectable y por lo tanto menor que el control ($p < 0.05$). Esto podría deberse a la necrosis total del tejido (Figura 1b y c).

En los animales control no se observaron variaciones en la producción uterina de NO durante los días 7 y 8 de preñez (Figura 2b). El LPS produjo un aumento significativo en la producción uterina de NO a las 6 ($p < 0.05$), 12 ($p < 0.05$) y 24 hs ($p < 0.05$) post-inyección, siendo máxima a las 6 hs (Figura 2b).

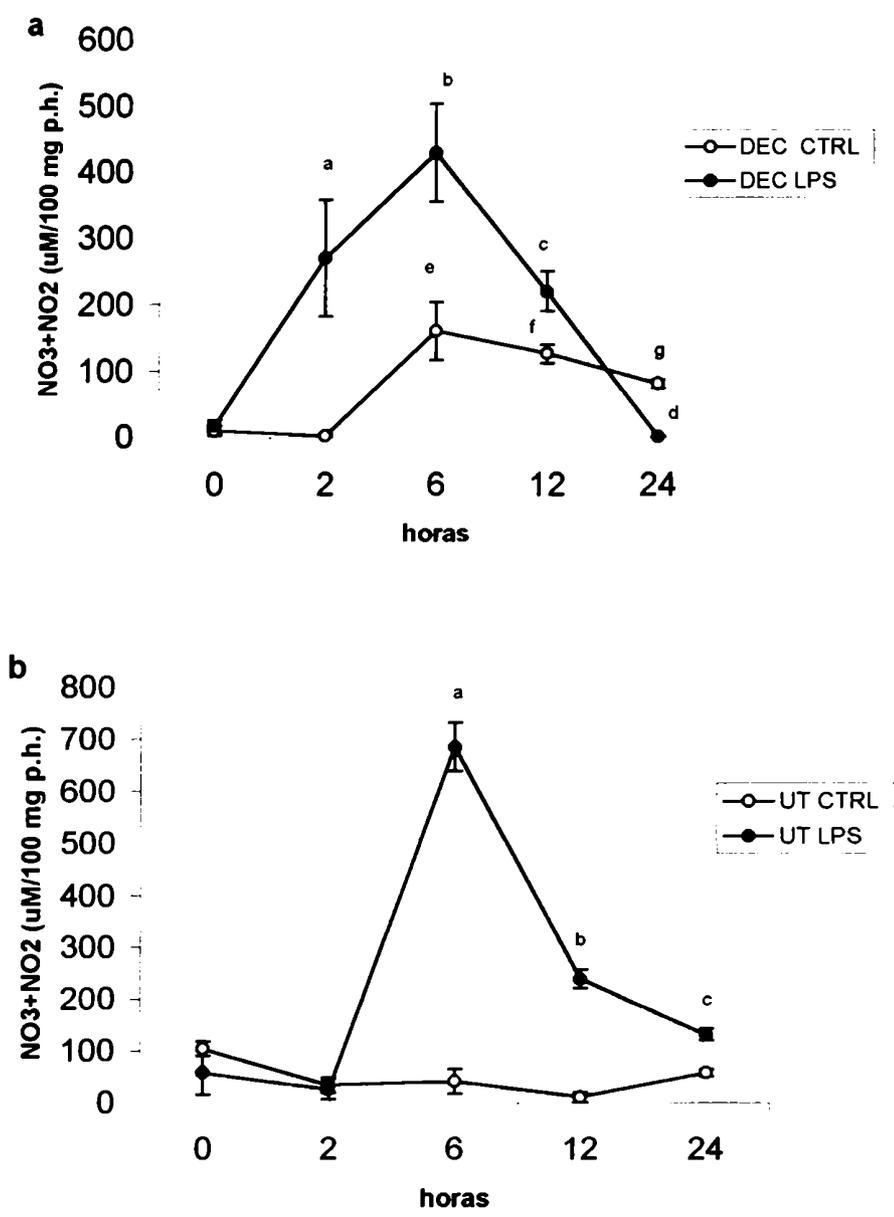


Figura 2. Curva temporal de producción de NO₃+NO₂ en explantes de decidua **(a)** y útero **(b)** de animales de animales inyectados con PBS (○; n = 6) or LPS (●; n = 6). Los valores son expresados como media ± SEM (n=6). El protocolo corresponde al Experimento 2 de Materiales y Métodos. Hembras Balb/c fueron sacrificadas a distintos tiempos luego de la inyección de LPS o PBS. En cada sitio de implantación se separó útero de decidua y se los incubó 24 hs. En los sobrenadantes se determinó la concentración de NO₃+NO₂ por Greiss. **(a)** a,b,c,d: p<0.05 vs DEC CTRL. e,f,g: p<0.05 vs DEC CTRL 0 hs. **(b)** a,b,c: p<0.05 vs UT CTRL.

3. Efecto de AG en la reabsorción embrionaria inducida por LPS

El LPS aumenta la producción de NO en este modelo de reabsorción embrionaria tanto en decidua como en útero (Figura 1). El NO producido puede jugar un rol citotóxico importante en la reabsorción embrionaria, como ya se ha descrito en otros tejidos. Para probar esta hipótesis se estudió el efecto de AG, inhibidor de la enzima iNOS, sobre la reabsorción.

La AG, administrada en tres dosis de 6mg/ratón, inhibió parcialmente la reabsorción embrionaria inducida por LPS estudiada en los días 8 y 12 de preñez (Día 8 LPS: 100% vs LPS+AG: $41.6 \pm 14.1\%$, $p < 0.001$; Día 12 LPS: 100% vs LPS + AG: $51.9 \pm 14.0\%$; $p < 0.001$) (Tabla 1). Esto sugiere la participación del NO en el proceso de reabsorción embrionaria inducido por LPS.

La morfología de los embriones que fueron rescatados de la reabsorción es normal, y también el peso de sus placentas (no mostrado). Las hembras tratadas con LPS y AG continúan con su preñez, el parto se produce igual que en los animales controles, a los 19 días de preñez. Se produce el nacimiento de un número menor de crías vivas con peso igual a los controles.

En los animales controles se observó una reabsorción embrionaria de 12%, cuando se los estudia el día 12 de preñez. La AG, en los animales control, no tuvo efecto sobre el porcentaje de reabsorción embrionaria o el número de sitios de implantación (Tabla 1). Tampoco tuvo efecto alguno sobre el tamaño y la morfología de los embriones o el peso de la placenta (no mostrado). Todas estas hembras parieron fetos normales y vivos.

4. Estudio histológico de los distintos tratamientos

Con el objetivo de establecer si al tiempo de máxima producción de NO (6hs post inyección de LPS) hay alguna diferencia histológica en los tratamientos estudiados se realizó un análisis histológico con hematoxilina-eosina.

En los animales control se observaron grandes lagunas en la decidua mesometrial (Figura 3a y c).

El LPS produjo a las 6 hs post-inyección alta fibrinólisis (degradación de la matriz extracelular) e infiltración leucocitaria de la decidua mesometrial (Figura 3e y g). Los elementos infiltrados fueron identificados como macrófagos, granulocitos y linfocitos por sus características morfológicas. Los macrófagos y neutrófilos también fueron identificados por ser CD14 positivos (Figura 18 d inserto).

Los leucocitos totales infiltrados fueron contados en la decidua mesometrial (Tabla 2), el tratamiento con LPS produjo un dramático incremento de la infiltración leucocitaria de la decidua.

La administración de AG inhibió significativamente la infiltración leucocitaria inducida por LPS ($p < 0.05$) (Tabla 2, Figura 3 f y h), lo cual podría explicar, al menos en parte, el efecto inhibitorio de AG sobre la reabsorción embrionaria.

En los animales controles se observaron escasos leucocitos, sólo estaban presentes en las lagunas sanguíneas deciduales. La AG en estos animales no modificó el número de leucocitos infiltrados, ni produjo ningún cambio morfológico apreciable (Figura 3b y d).

Figura 3. Histología de los distintos tratamientos. El protocolo corresponde al Experimento 3 de Materiales y Métodos. Hembras BAL/c en los días 6-7 de preñez son inyectadas con LPS, AG, LPS+AG o PBS y sacrificadas 6 hs luego de la inyección de LPS. Los sitios de implantación son fijados, cortados y teñidos con hematoxilina-eosina. (a) Observación a bajo aumento de un sitio control. Se detectan grandes lagunas en la decidua mesometrial. (b) Observación a bajo aumento de un sitio del tratamiento AG, la morfología es similar al control. (c) y (d) son detalles de las lagunas deciduales de los animales control y AG respectivamente. (e,g) El LPS produce alta fibrinólisis e infiltración de la decidua mesometrial. Los infiltrados fueron identificados como granulocitos y macrófagos. (f,h) Se muestra un sitio donde la AG inhibió la infiltración y la fibrinólisis inducida por LPS. m: decidua mesometrial, am: decidua antimesometrial, lac: laguna, rc: glóbulo rojo, fib: fibrinólisis, gr: granulocito, mac: macrófago. Las barras de escala representan 200 um (a,b), 100 um (c,d), 160 um (e,f) y 80 um (g,h).

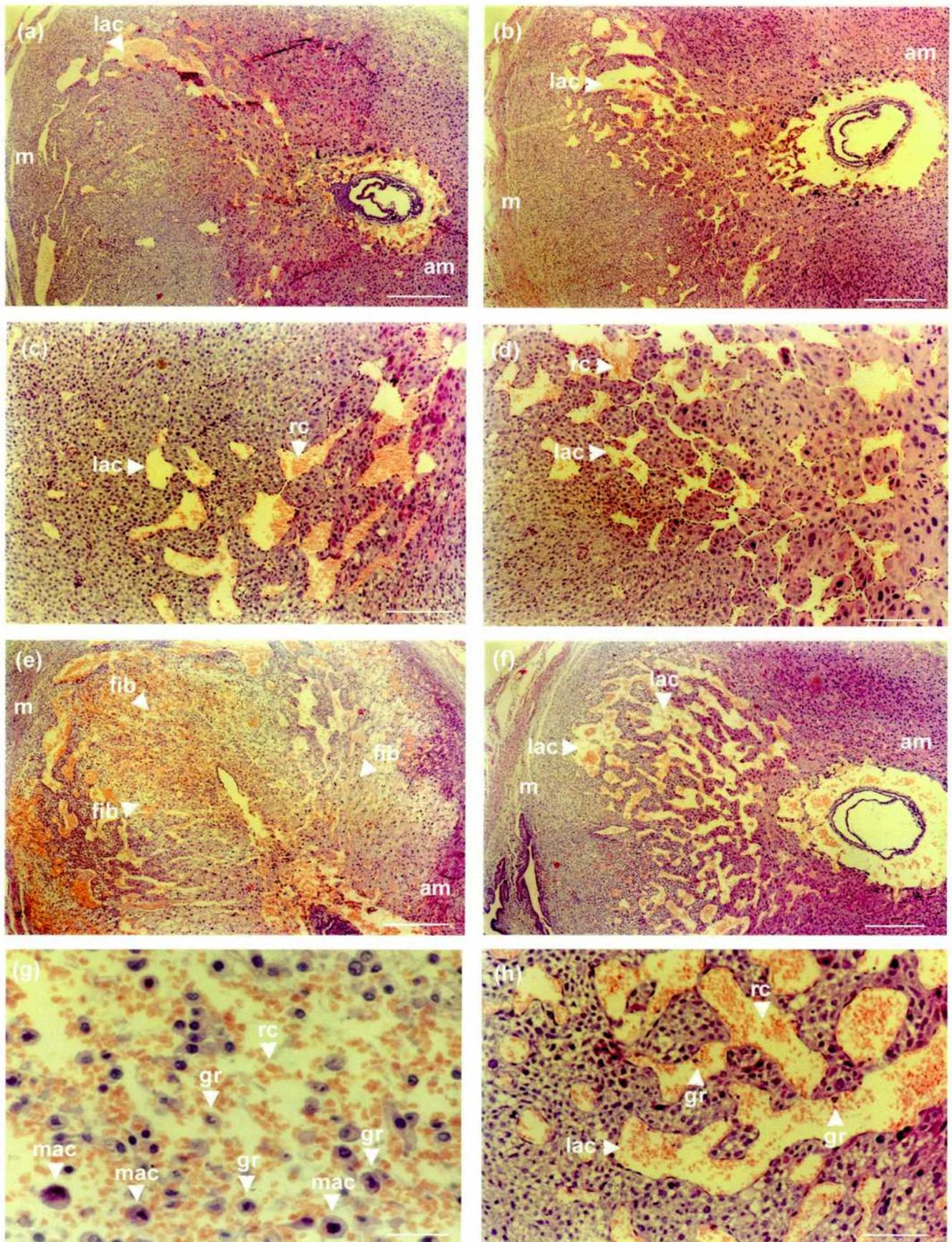


Figura 3

Tratamiento	Nº sitios de implantación analizados	Nº leucocitos/campo
Control n=10	30	6.1 ± 1.8
AG n=10	30	5.8 ± 1.5
LPS n=10	30	71.8 ± 9.3 (a)
LPS+AG n=10	30	31.7 ± 12.8 (b)

Tabla 2. Efecto de AG en la infiltración leucocitaria inducida por LPS

Hembras Balb/c preñadas fueron inyectadas con PBS, AG, LPS ó LPS+AG y sacrificadas 6 hs luego de la inyección de LPS. Los sitios de implantación fueron fijados, cortados y teñidos con hematoxilina-eosina (ver Experimento 3 de Materiales y Métodos). Se calculó la densidad de leucocitos contando en 10 campos (objetivo 1000 x) tomados de la decidua mesometrial de cada sitio de implantación. Se utilizaron 10 animales por tratamiento (n=10), y se seleccionaron al azar 3 sitios de implantación de cada animal para el estudio.

a: $p < 0.01$ vs Control; b: $p < 0.05$ vs LPS

5. Inmunodetección de las isoformas de la NOS

5.1 Detección de las isoformas a las 6h post-inyección de LPS

Los resultados sugieren un papel del NO en la reabsorción embrionaria producida por LPS. Por lo tanto fue de interés estudiar las isoformas de la NOS involucradas en este proceso.

Se trabajo con los animales preñados 7 días, 6 hs después de la administración de LPS, momento de máxima producción de NO.

Se detectó por la técnica western blot, que el LPS produjo un considerable aumento en la expresión de la isoforma iNOS tanto en útero como en decidua ($p < 0.05$) (Figura 4a y b).

Sorprendentemente, el LPS también aumentó la expresión de la isoforma nNOS en decidua ($p < 0.05$). En útero no se observaron cambios en la expresión de la isoforma nNOS (Figura 4c y d).

El LPS no fue capaz de modificar la expresión de la isoforma eNOS ni en útero ni en decidua (Figura 4e y f).

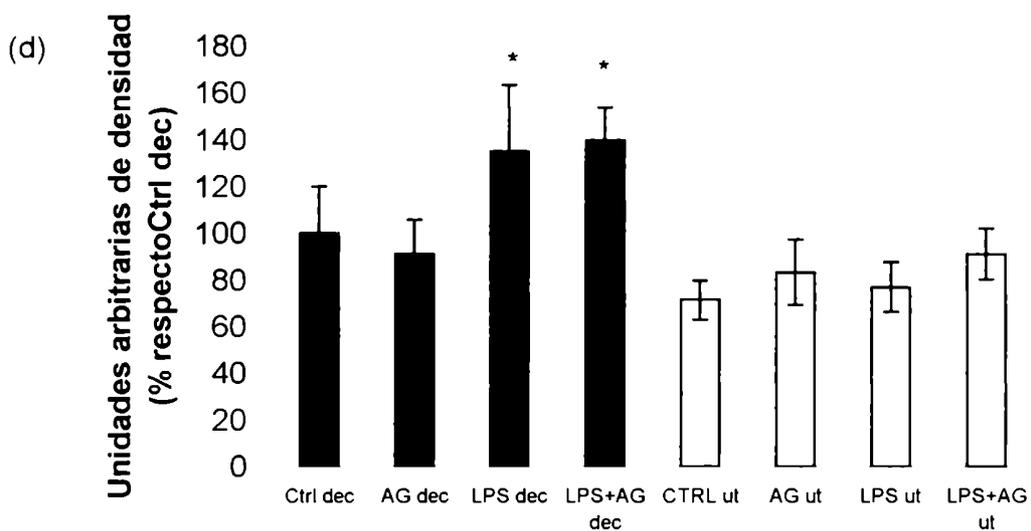
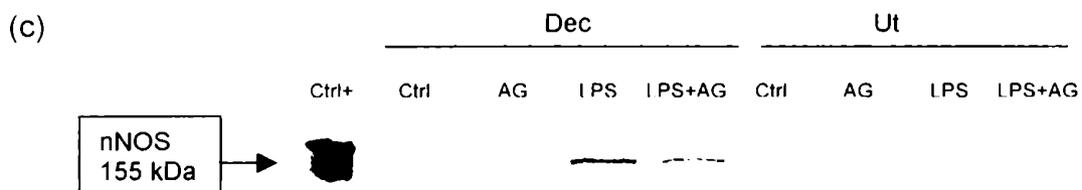
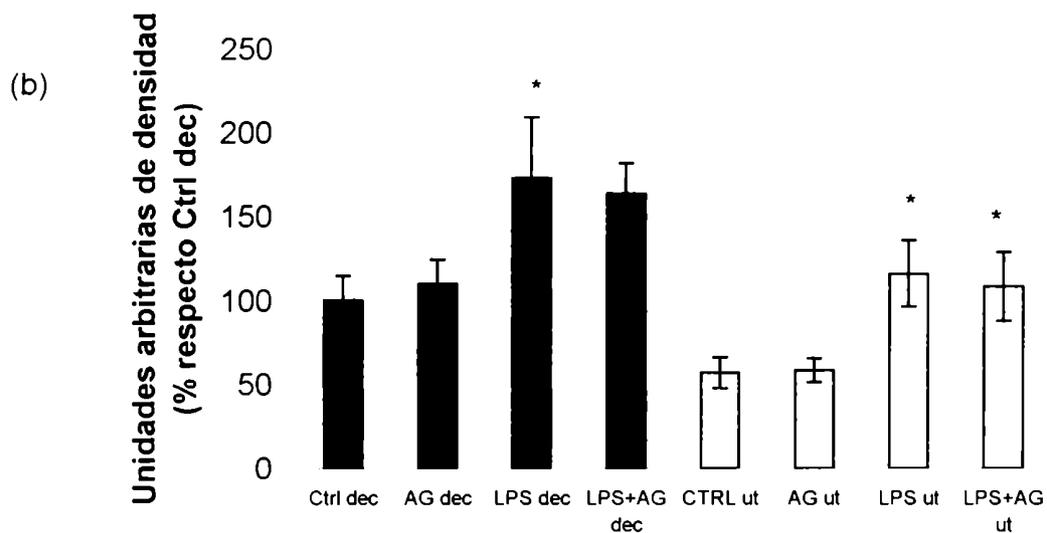
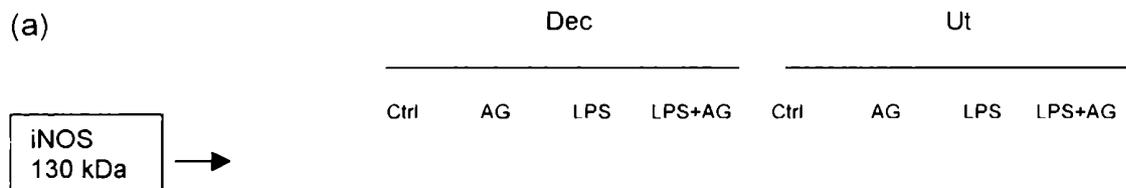
El tratamiento con AG no afectó la expresión de ninguna de las isoformas de la NOS en los animales control (Figuras 4b, d y f). La AG tampoco fue capaz de modificar la expresión de la NOS en los animales tratados con LPS en ninguno de los tejidos estudiados. Esto indica que la inhibición de la infiltración y la fibrinólisis producida por AG no es acompañada por una inhibición en la expresión de las isoformas de la NOS.

La localización de las isoformas de la NOS en útero y decidua se realizó por medio de la técnica de inmunohistoquímica, utilizando anticuerpos específicos. Como, por western blot, no se observó modificaciones en la expresión de las isoformas de la NOS con el tratamiento con AG, no se realizó inmunohistoquímica de los tratamientos AG y LPS+AG. Solamente se procesó por inmunohistoquímica a los tratamientos control y LPS.

En los animales control (día 7 de preñez) se observó una leve marca para la isoforma iNOS en las células deciduales y en las células miometriales (Figura 5a, c y e). El LPS produjo un considerable aumento en la expresión de la isoforma iNOS en células de la decidua antimesometrial (Figura 5b y d) y en células miometriales (Figura 5f). Se observó también en la decidua mesometrial una elevada fibrinólisis e infiltración por macrófagos y granulocitos que mostraron marca positiva para iNOS (Figura 5h).

Los animales control (día 7 de preñez) mostraron marca moderada para la isoforma nNOS en las células deciduales. La marca fue mínima en útero (Figura 6e y g). El LPS provocó un marcado aumento en la expresión de la isoforma nNOS en las células deciduales pero no en útero (Figura 6f y h). Esta observación concuerda con los resultados obtenidos por la técnica de western blot.

Se detectó la presencia de la isoforma eNOS en el endotelio de las lagunas deciduales y de los vasos sanguíneos uterinos; tanto en los animales control como los tratados con LPS (Figura 6a y b). No se encontraron diferencias en la marca para eNOS entre los animales control y los inyectados con LPS (Figura 6c y d) ni en útero ni en decidua. Nuevamente este resultado concuerda con lo encontrado en los estudios por la técnica de western blot.



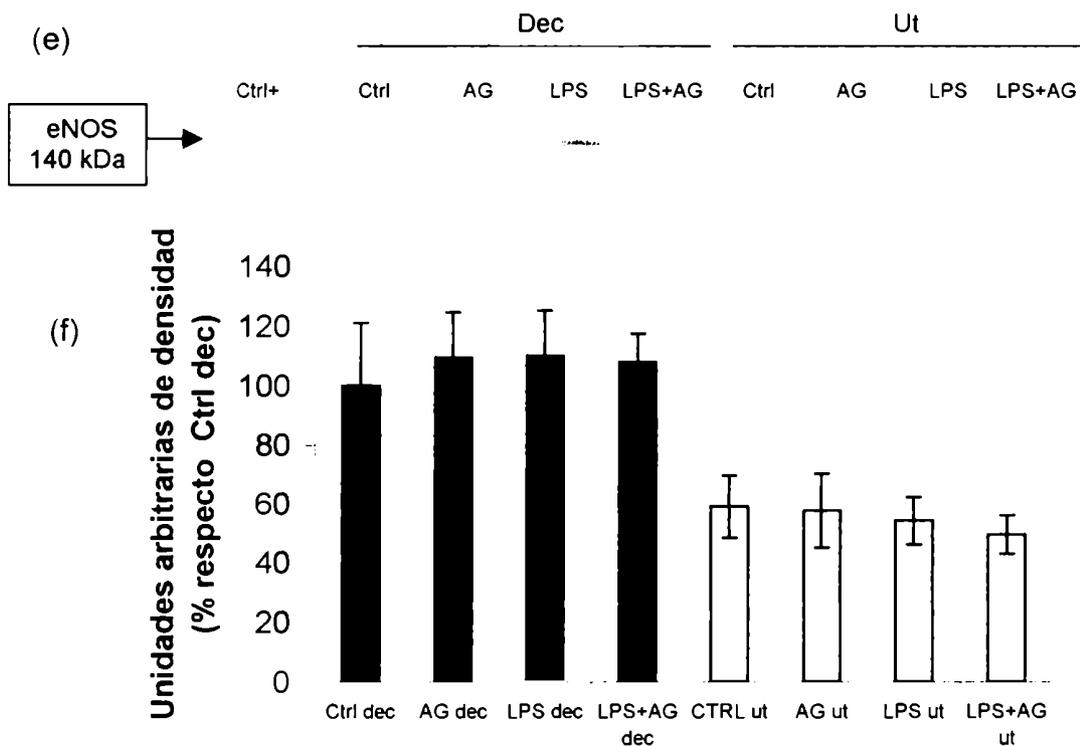


Figura 4. Detección de las isoformas iNOS (a), nNOS (c) y eNOS (e) por western blot. El protocolo corresponde al Experimento 3 de Materiales y Métodos. Hembras BAL/c en los días 6-7 de preñez son inyectadas con LPS, AG, LPS+AG o PBS y sacrificadas 6 hs luego de la inyección de LPS. Homogenatos de decidua y útero de los distintos tratamientos fueron procesados por esta técnica. Cada punto representa un pool de 6 animales. Controles positivos: lisado de macrófago murino para iNOS, lisado de pituitaria de rata para nNOS y lisado de células endoteliales humanas para eNOS. El análisis densitométrico de las bandas obtenidas para iNOS (b), nNOS (d) y eNOS (f) se realizó con el programa Sigma Gel. Se graficaron como unidades densitométricas arbitrarias respecto al tratamiento Ctrl dec. Cada barra corresponde a la media de 3 pools distintos de 6 animales cada uno. * $p < 0.05$ vs Ctrl.

Figura 5. Inmunolocalización de iNOS en sitios de implantación murinos de animales control e inyectados con LPS. Hembras BALB/c en el día 7 de preñez son inyectadas con LPS 0.5 ug/g sacrificadas 6 hs más tarde (Experimento 3 de Materiales y Métodos). Las secciones fueron procesadas por la técnica de inmunoperoxidasa utilizando anticuerpo anti-iNOS. (a) En la decidua se observa marca moderada para iNOS. (b) En la decidua de los animales tratados con LPS se observa una fuerte y localizada marca para iNOS. (c) y (d) Detalles de la marca en la decidua de los tratamientos control y LPS respectivamente. (e) En el útero de los animales control, se observa marca para iNOS en las células miometriales. (f) El LPS aumenta la marca de iNOS en células miometriales. (g) En los animales control la marca para iNOS en la decidua mesometrial es débil. (h) LPS produce alta fibrinólisis e infiltración de la decidua mesometrial por macrófagos y granulocitos iNOS positivos. dc: célula decidual, m: decidua mesometrial, am: decidua antimesometrial, mc: célula miometrial, ma: macrófago, gr: granulocito. Las barras de escala representan 200um (a,b), 100 um (c,d,e,f) y 40 um (g,h).

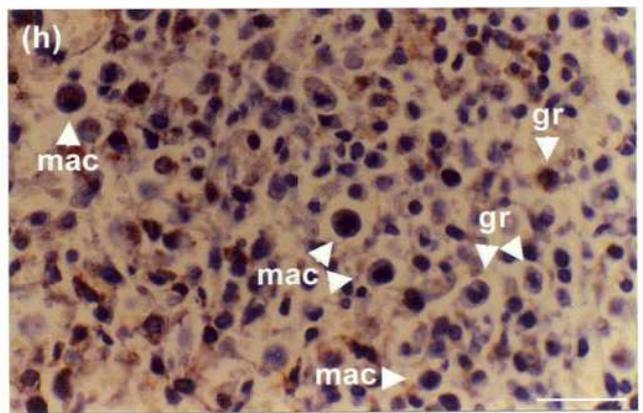
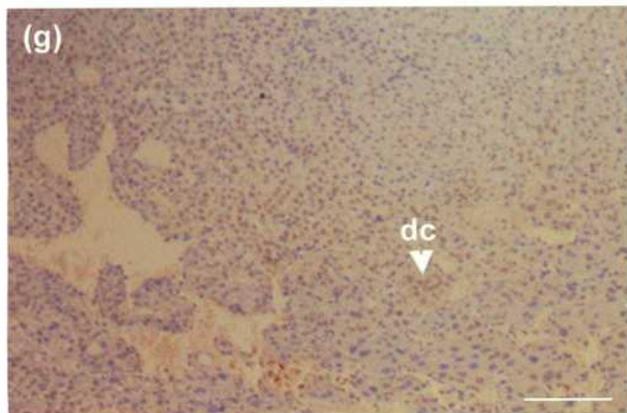
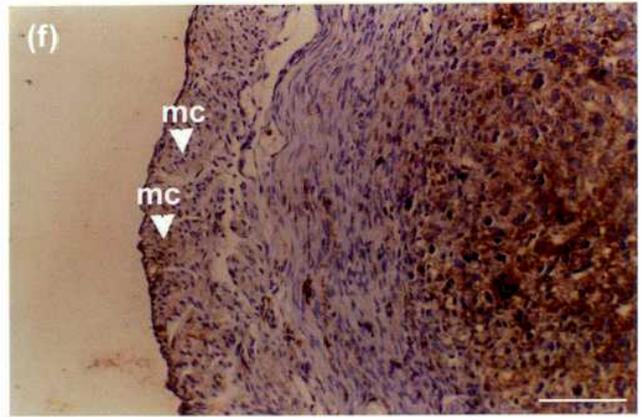
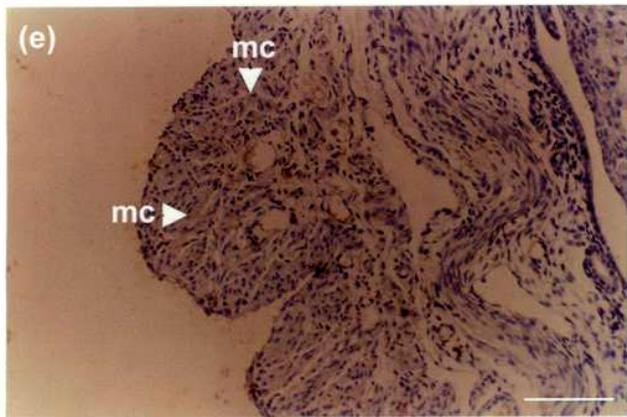
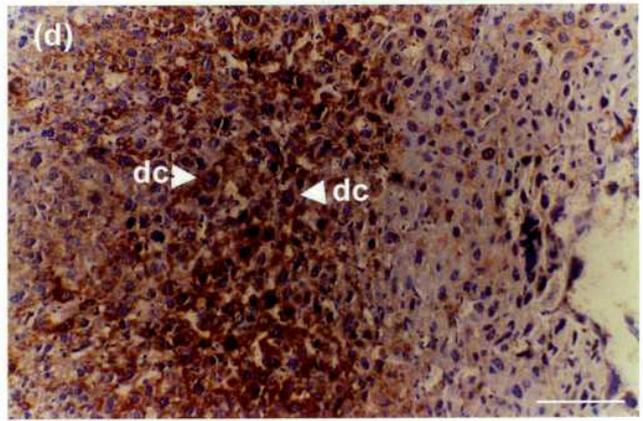
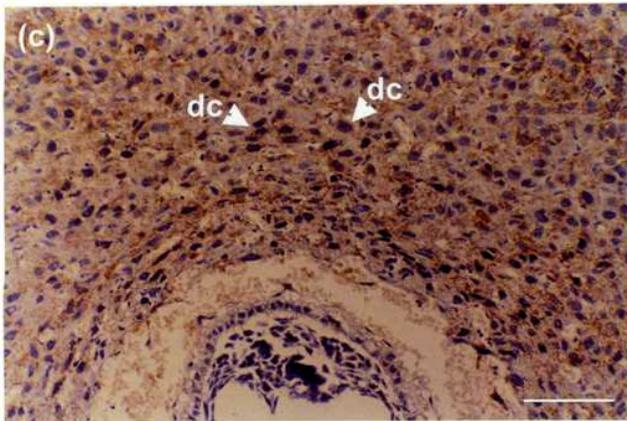
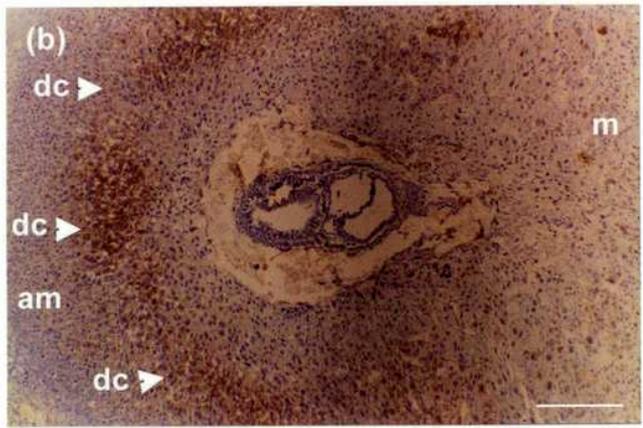
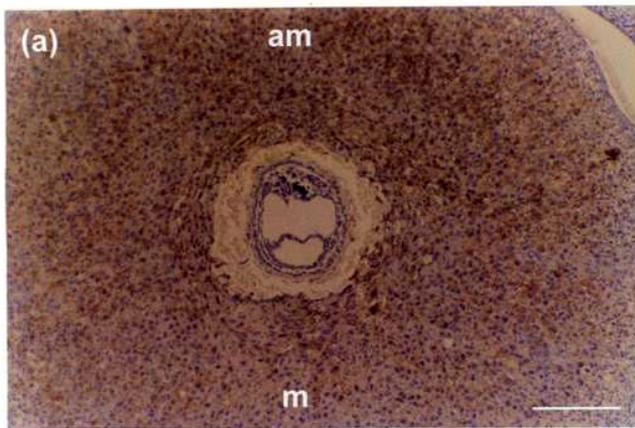


Figura 5

Figura 6. Inmunolocalización de eNOS y nNOS en sitios de implantación murinos de animales control e inyectados con LPS. Hembras BALB/c en el día 7 de preñez son inyectadas con LPS 0.5 ug/g sacrificadas 6 hs más tarde (Experimento 3 de Materiales y Métodos). Las secciones fueron procesadas por la técnica de inmunoperoxidasa utilizando anticuerpos anti-eNOS o anti-nNOS. En (a) y (b) se observa la localización de eNOS en células endoteliales de arterias deciduales de los tratamientos control y LPS respectivamente. (c) y (d) son detalles de la marca para eNOS en las arterias deciduales de animales control respectivamente, mostrando que no hay diferencias entre tratamientos. (e) Se observa marca moderada para nNOS en decidua y útero control. (f) Se detecta intensa marca para nNOS en la decidua, pero no en útero, del tratamiento LPS. (g) En los animales control eNOS se localiza en células deciduales preferentemente. (h) LPS aumenta la expresión de nNOS en células deciduales, pero no afecta la expresión uterina. da: arterias deciduales, m: decidua mesometrial, am: decidua antimesometrial, dc: célula decidua, mc: célula miometrial. Las barras de escala representan 200 um (a,b,e,f) y 100 um (c,d,g,h).

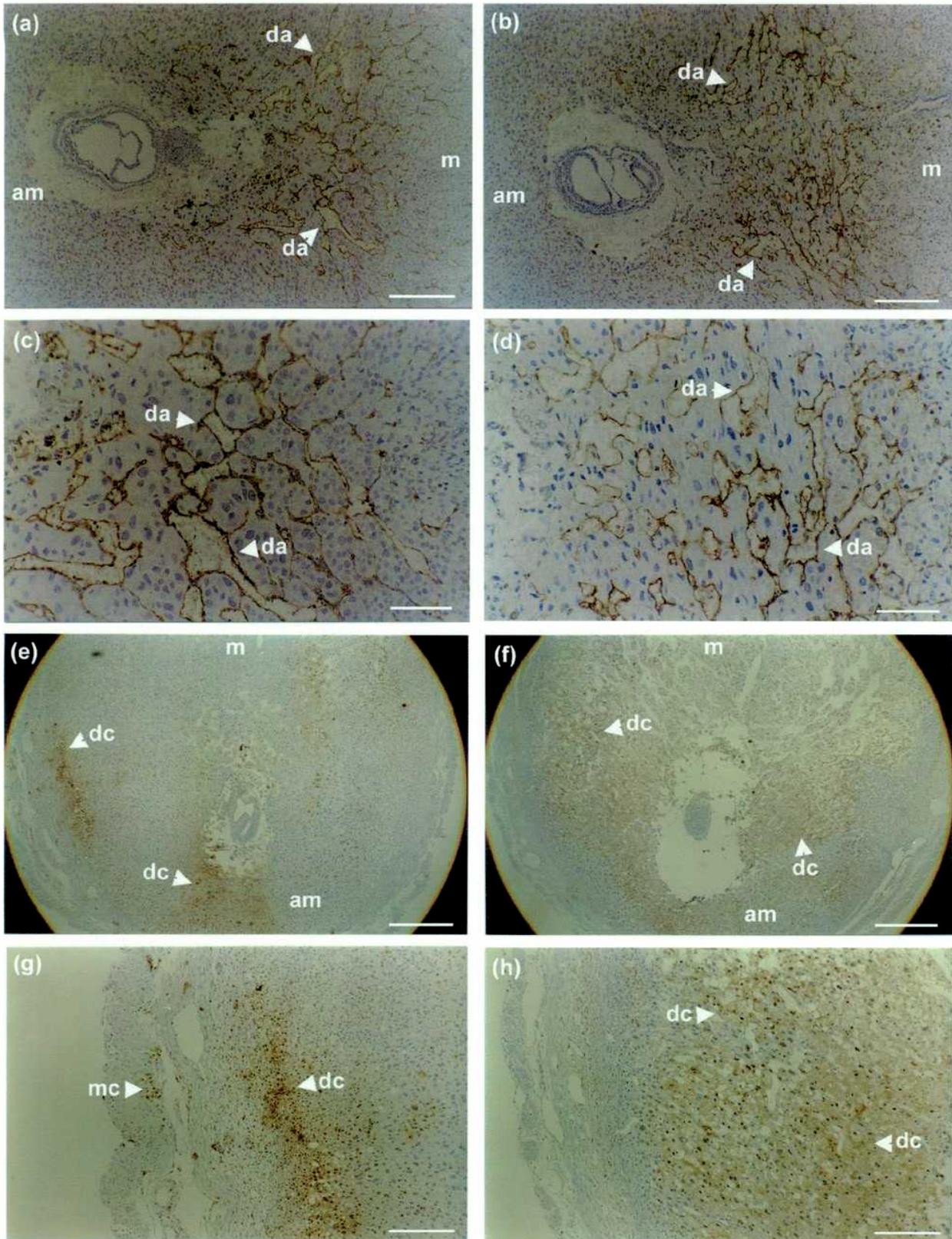


Figura 6

5.2 Detección de las isoformas a las 24h post-inyección de LPS

También se realizaron los estudios de inmunohistoquímica y western blot para detectar las isoformas iNOS y eNOS presentes a las 24 hs post inyección de LPS en los animales preñados de 7 días y en los animales controles.

Por la técnica de western blot se detectó la presencia de las isoformas iNOS y eNOS (Figura 7) en las deciduas control. En deciduas reabsorbidas, provenientes de los animales tratados con LPS, no se detectó por western blot ninguna de las dos isoformas (Figura 7), lo cual parece deberse a la necrosis total del tejido observada en los cortes teñidos con hematoxilina-eosina(Figura 1d). Esto coincide con la ausencia de producción de NO por la decidua 24 hs luego de la inyección de LPS (Figura 2a).

En los úteros de los animales control y los animales tratados con LPS se encontró, por western blot, tanto la isoforma iNOS como la eNOS (Figura 7). El LPS parece inducir levemente la expresión uterina de iNOS, pero esto no fue cuantificado. El LPS parece no afectar la expresión uterina de eNOS (Figura 7). El aumento en la expresión uterina de iNOS podría justificar la mayor producción de NO a las 24 hs de los animales tratados con LPS (Figura 2b). Cuando se realizó la tinción de los cortes uterinos de animales tratados con LPS, se observó que a las 24 hs post-inyección hay infiltración pero no necrosis tisular como sí existía en las deciduas. Este resultado es concordante con el hecho que los úteros siguen produciendo NO y que existe expresión para las isoformas de la NOS estudiadas.

También se localizaron por inmunohistoquímica las isoformas de la NOS presentes en a las 24hs post inyección de vehículo y LPS.

En los cortes de animales controles se observó marca para la isoforma iNOS en algunas células del embrión, en el trofoblasto, en músculo liso circular y longitudinal del miometrio, en glándulas endometriales, células deciduales, vasos de miometrio y decidua, y en células LGL (Figura 8a-d).

En los sitios provenientes de ratones preñados controles se observó marca para eNOS en trofoblasto, glándulas de la decidua, vasos de la decidua y miometrio, células de la decidua y endotelio de las lagunas sanguíneas deciduales (Figura 9 a-d).

En los sitios reabsorbidos de los animales tratados con LPS se encontró marca para la isoforma iNOS en células de músculo liso del miometrio, en granulocitos infiltrados en miometrio, vasos de miometrio y decidua y en glándulas y algunas células de la decidua (Figura 10 a-d). El miometrio de los sitios reabsorbidos tuvo una marca elevada de iNOS respecto al control. Además, los abundantes granulocitos y células LGL de la decidua infiltrada están marcados para iNOS (Figura 10b). Esto explicaría la alta producción de NO de los úteros de los sitios reabsorbidos a las 24 hs post-inyección (Figura 2b). Esta zona de decidua infiltrada queda unida al útero cuando separamos útero de decidua para realizar las distintas técnicas.

En la decidua necrótica sólo se encontró marca para iNOS en algunos granulocitos infiltrados (Figura 10d).

En los sitios reabsorbidos de animales tratados con LPS se observó marca para la isoforma eNOS en células de la decidua, vasos de miometrio y decidua, y en endotelio de las lagunas deciduales (Figura 11a-c). No parece existir diferencias entre la marca observada para la isoforma eNOS entre los animales controles preñados de 7 días y los

tratados con LPS. En la decidua necrótica no hay prácticamente marca para eNOS (Figura 11d).

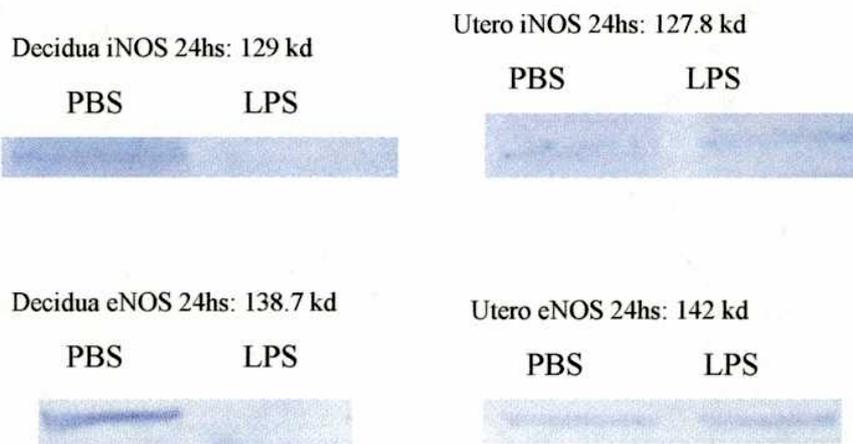


Figura 7. Niveles de iNOS y eNOS a las 24hs post-inyección de LPS

El protocolo corresponde al Experimento 3 de Materiales y Métodos. Hembras BALB/c en los días 6-7 de preñez son inyectadas con LPS o PBS y sacrificadas 24 hs luego de la inyección de LPS. Homogenatos de decidua y útero de los distintos tratamientos fueron procesados por esta técnica. Cada punto representa un pool de 6 animales

Figura 8. Inmunolocalización de iNOS en sitios de implantación en el día 8 de gestación. Hembras BALB/c en el día 7 de preñez son inyectadas con PBS y sacrificadas 24 hs más tarde (Experimento 3 de Materiales y Métodos). Las secciones fueron procesadas por la técnica de inmunoperoxidasa utilizando anticuerpo anti-iNOS.

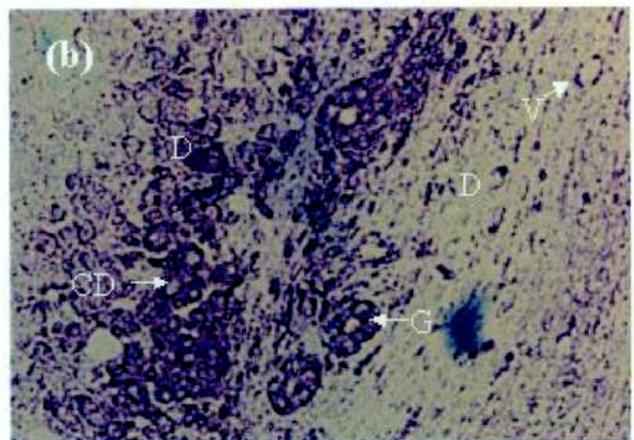
(a) En el trofoblasto y el embrión se observa marca para iNOS. (b) Se observa marca para iNOS en células deciduales, glándulas endometriales y vasos deciduales. (c) Se observa marca en músculo liso circular y longitudinal del miometrio. (d) Se observan células LGL deciduales marcadas para iNOS. T: trofoblasto, emb: embrión, D: decidua, V: vasos, MC: músculo circular, ML: músculo longitudinal, CM: célula muscular.

Fig 8. Sitios normales. Inmunomarcación: iNOS

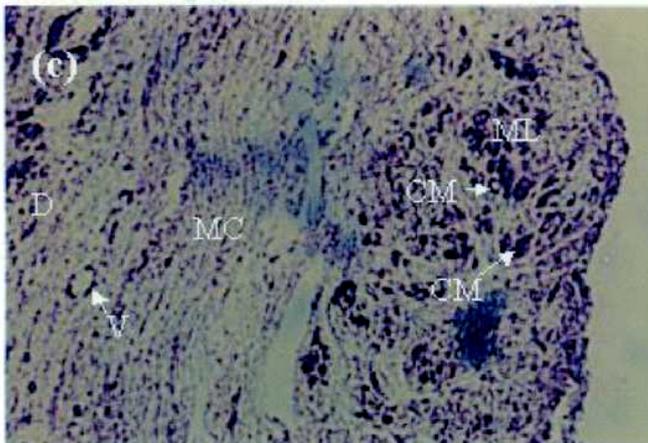
Detalle embrión y trofoblasto



Detalle decidua



Detalle miometrio



Detalle células LGL decidual

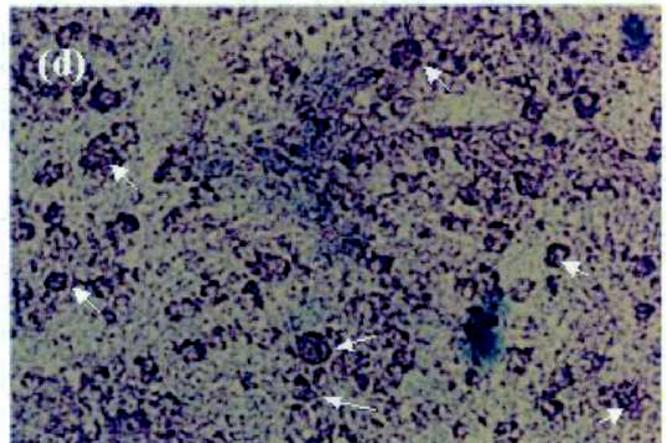
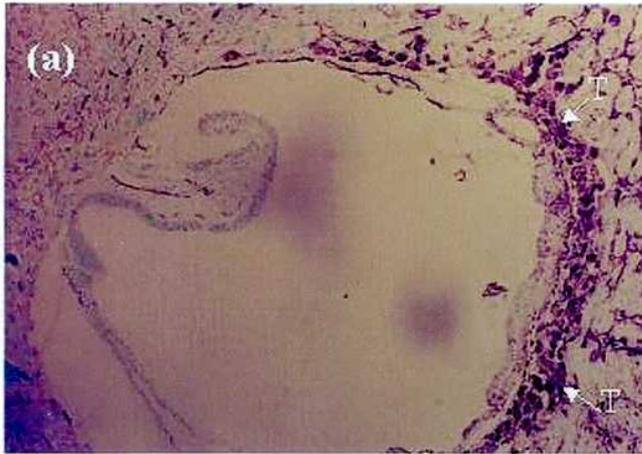


Figura 9. Inmunolocalización de eNOS en sitios de implantación en el día 8 de gestación. Hembras BALB/c en el día 7 de preñez son inyectadas con PBS y sacrificadas 24 hs más tarde (Experimento 3 de Materiales y Métodos). Las secciones fueron procesadas por la técnica de inmunoperoxidasa utilizando anticuerpo anti-eNOS.

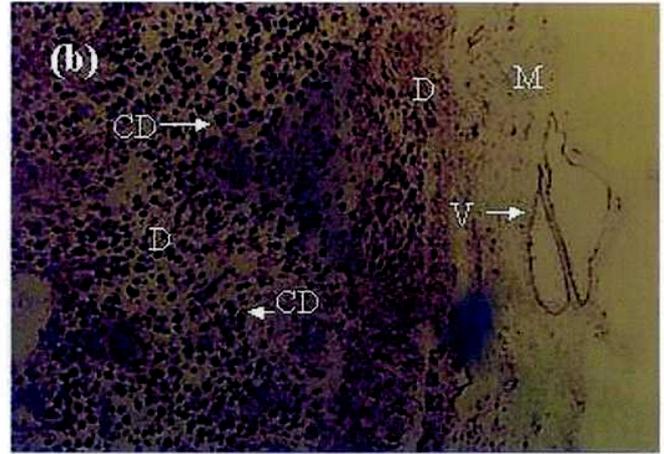
(a) En el trofoblasto se observa marca para eNOS. (b) Se observa marca para eNOS en decidua y vasos del miometrio. (c) Se observa marca para eNOS en el endotelio de las lagunas deciduales. (d) Se observa marca en células deciduales, glándulas endometriales y vasos del miometrio. T: trofoblasto, D: decidua, CD: células deciduales, V: vasos, M: miometrio, EL: endotelio de lagunas deciduales, L: laguna, G: glándula endometrial.

Fig 9. Sitios normales. Inmunomarcación: eNOS

Detalle embrión y trofoblasto



Detalle decidua y miometrio



Detalle lagunas deciduales



Detalle endometrio y miometrio

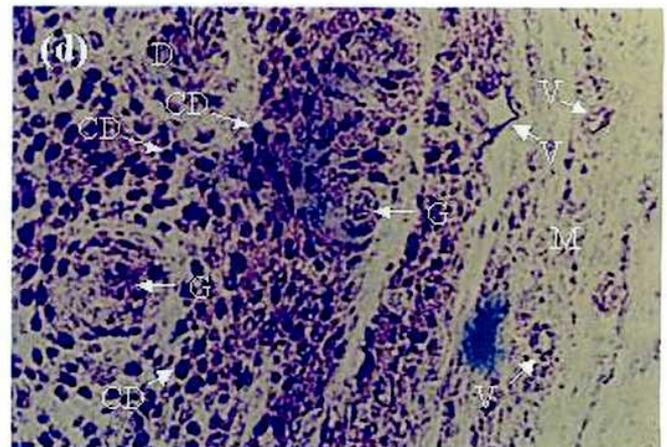


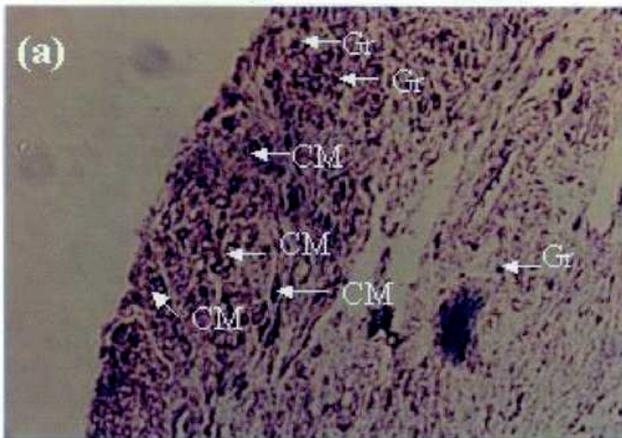
Figura 10 . Inmunolocalización de iNOS en sitios de implantación 24hs post-inyección de LPS. Hembras BALB/c en el día 7 de preñez son inyectadas con LPS y sacrificadas 24 hs más tarde (Experimento 3 de Materiales y Métodos). Las secciones fueron procesadas por la técnica de inmunoperoxidasa utilizando anticuerpo anti-iNOS.

(a) Se observa elevada marca para iNOS en células miometriales y granulocitos infiltrados. (b) Se observan abundantes granulocitos y células LGL marcadas para iNOS en la decidua infiltrada que queda pegada al útero. (c) Se observa marca células deciduales, glándulas endometriales y vasos del miometrio. (d) La marca para iNOS es inexistente en la decidua necrosada, solo se ven algunos granulocitos iNOS positivos.

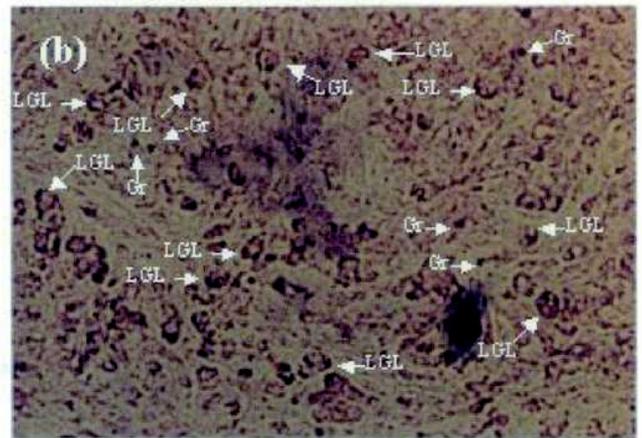
CM: célula muscular, Gr: granulocito, V: vasos, CD: células deciduales, G: glándulas endometriales.

Fig 10. Sitios reabsorbidos. Inmunomarcación: iNOS

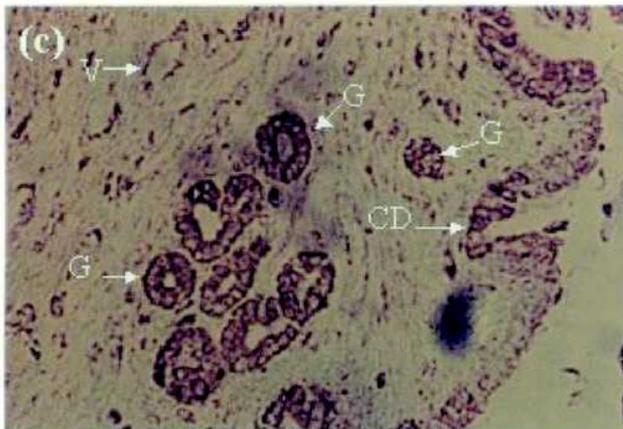
Detalle miometrio



Detalle decidua infiltrada



Detalle glándulas endometriales



Detalle decidua necrótica

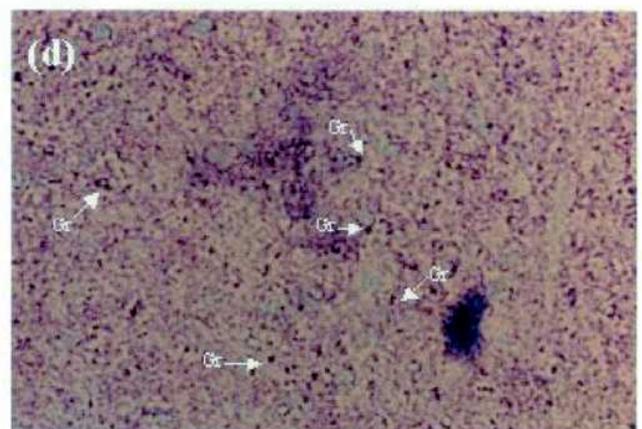
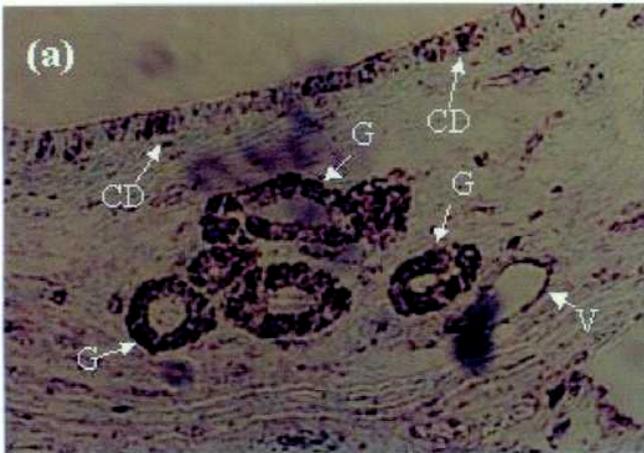


Figura 11. Inmunolocalización de eNOS en sitios de implantación 24hs post-inyección de LPS. Hembras BALB/c en el día 7 de preñez son inyectadas con LPS y sacrificadas 24 hs más tarde (Experimento 3 de Materiales y Métodos). Las secciones fueron procesadas por la técnica de inmunoperoxidasa utilizando anticuerpo anti-eNOS.

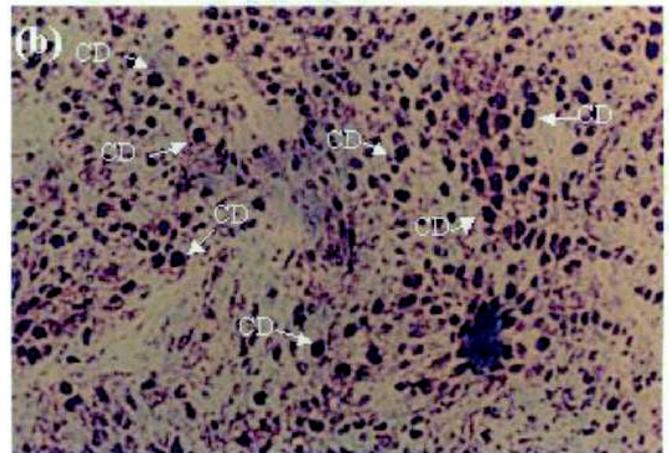
(a) Se observa marca para eNOS en células deciduales, glándulas endometriales y vasos del miometrio. (b) Se detecta eNOS en las células deciduales. (c) Se localiza eNOS en el endotelio de las lagunas deciduales. (d) No se observa marca para eNOS en la decidua necrótica. , CD: células deciduales, G: glándulas endometriales, V: vasos, EL: endotelio de las lagunas deciduales, L: laguna decidual.

Fig 11. Sitios Reabsorbidos. Inmunomarcación: eNOS

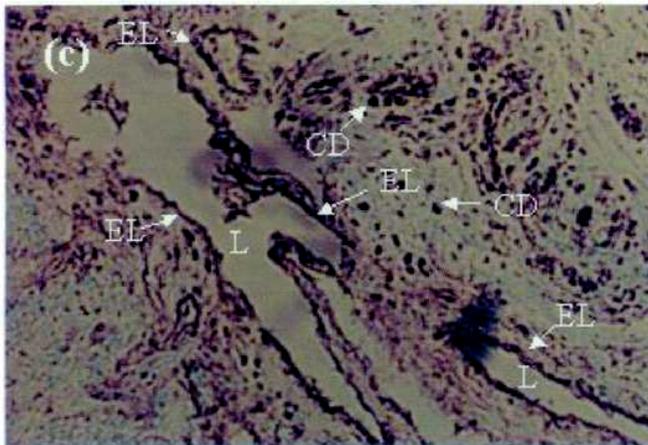
Detalle glándulas endometriales



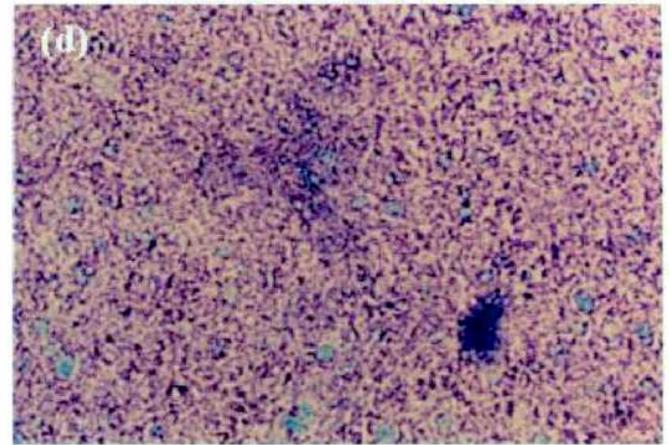
Detalle decidua infiltrada



Detalle vasos deciduales



Detalle decidua necrótica



6. Efecto de LPS y AG sobre la actividad NOS

Con el objetivo de comprobar si el tratamiento de AG inhibe la actividad de la NOS in vivo, se procedió a medir esta actividad, por la técnica de Bredt y Snyder, en los 4 grupos experimentales estudiados a las 6 hs post-inyección de LPS.

El LPS aumenta significativamente la actividad de la NOS en decidua ($p < 0.001$) y útero ($p < 0.001$) (Figura 12). La AG, inhibidor de la iNOS, bloqueó totalmente en útero el efecto del LPS ($p < 0.001$) (Figura 12b), hecho que concuerda con que sólo se ve afectada en este tejido, por el tratamiento con LPS, la expresión de la isoforma iNOS (Figuras 4 y 5).

En la decidua, el tratamiento con AG, inhibió parcialmente el incremento de la actividad de la NOS producido por LPS ($p < 0.01$) (Figura 12a). Esto puede ser explicado por los resultados que mostraron que en decidua el LPS aumenta la expresión de iNOS y nNOS (Figuras 4, 5 y 6), y la actividad nNOS no es afectada por AG.

No hay diferencias en la actividad NOS decidual y uterina entre los animales control y los tratados con AG, aunque en útero parece haber una tendencia inhibitoria no significativa (Figura 12a y b), que coincide con la importante expresión basal de iNOS en el útero encontrada tanto por la técnica de western blot como por inmunohistoquímica.

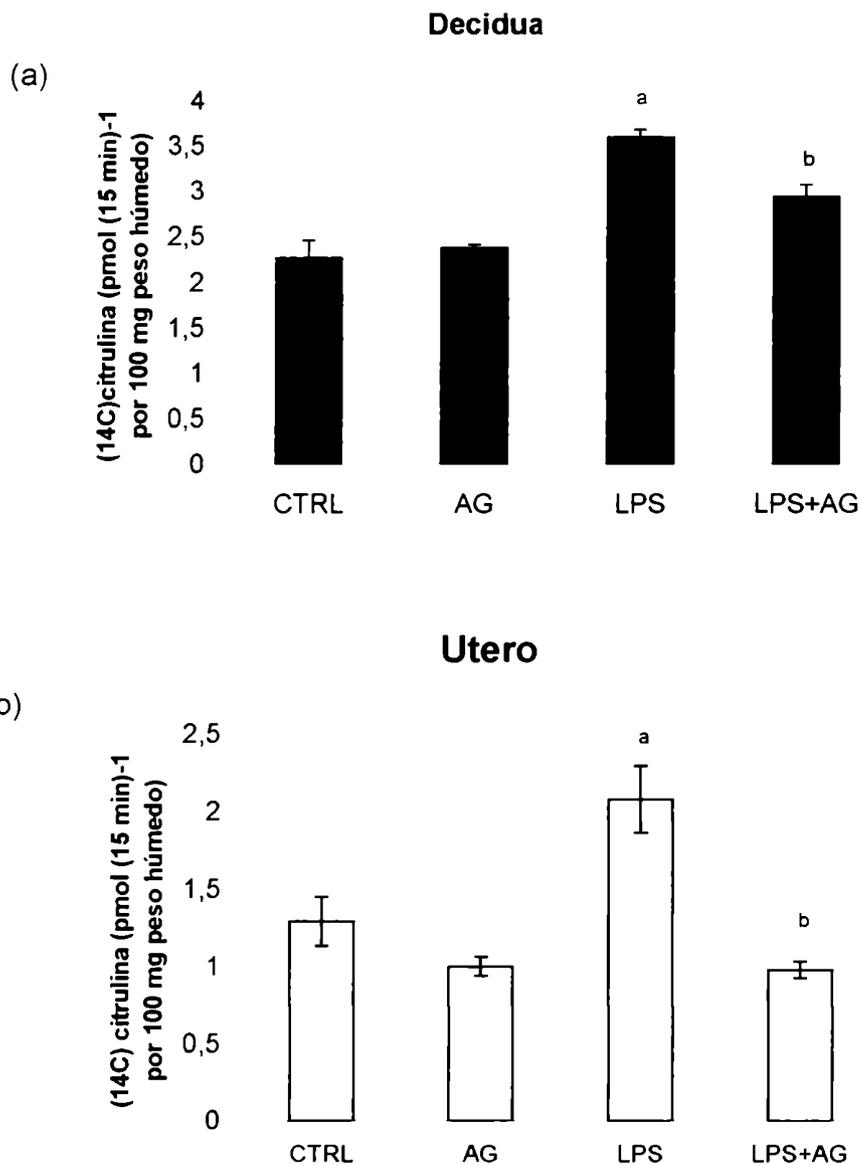


Figura 12. Efecto de los distintos tratamientos sobre la actividad NOS decidual (a) y uterina (b). El protocolo corresponde al Experimento 3 de Materiales y Métodos. Hembras BAL/c en los días 6-7 de preñez son inyectadas con LPS, AG, LPS+AG o PBS y sacrificadas 6 hs luego de la inyección de LPS. Los valores corresponden a la media \pm SEM (n=6). (a) a: $p < 0.001$ vs control, b: $p < 0.01$ vs LPS. (b) a: $p < 0.001$ vs control, b: $p < 0.001$ vs LPS.

7. Efecto de LPS y AG sobre la liberación de prostaglandinas

Se ha observado que el NO regula en distintos tejidos la producción de prostaglandinas. Dependiendo del tipo celular y de las condiciones experimentales puede ya sea inhibir, no afectar o estimular la producción de prostaglandinas.

Para comprobar si las Pgs estaban involucradas en este modelo de reabsorción embrionaria inducida por LPS, se cuantificó la producción de prostaglandinas por RIA (PGF2alfa y PGE2) por decidua y útero de los 4 tratamientos estudiados.

7.1 Decidua:

El LPS aumentó significativamente la producción decidual de PGF2alfa ($p < 0.01$) y PGE2 ($p < 0.05$) (Figuras 13a y 14a), lo cual concuerda con el probado papel de estas dos prostaglandinas en el mecanismo abortivo. Sin embargo para ambos eicosanoides, la AG no revirtió el aumento de la producción prostaglandinas estimulada por LPS (Figuras 13a y 14a). Por lo tanto estos resultados sugieren que el LPS aumenta la producción de prostaglandinas en la decidua por un mecanismo independiente del NO sintetizada por la iNOS.

La AG aumenta en decidua la producción de PGF2alfa ($p < 0.05$) y PGE2 ($p < 0.05$) respecto al control (Figuras 13a y 14a). Esto sugiere que en la decidua el NO está regulando en forma negativa los niveles basales de prostaglandinas, hecho que hemos observado en oviducto de rata (Perez Martinez, 2000).

7.2 Utero:

El LPS aumentó significativamente la producción uterina de PGF2alfa ($p < 0.01$) y PGE2 ($p < 0.05$) (Figuras 13b y 14b), es decir que en ambos tejidos estudiados observamos el mismo efecto de LPS sobre la síntesis de PGs.

Sin embargo, en útero, la AG, inhibidor de la iNOS, fue capaz de suprimir el aumento de la síntesis de PGS debido al LPS (Figuras 13b y 14b). Estos resultados indicarían que el NO sintetizado por la isoforma iNOS estaría incrementando la síntesis de PGs uterinas.

La AG no fue capaz de modificar la producción de PGs de los úteros provenientes de animales controles preñados de 7 días (Figuras 13b y 14b).

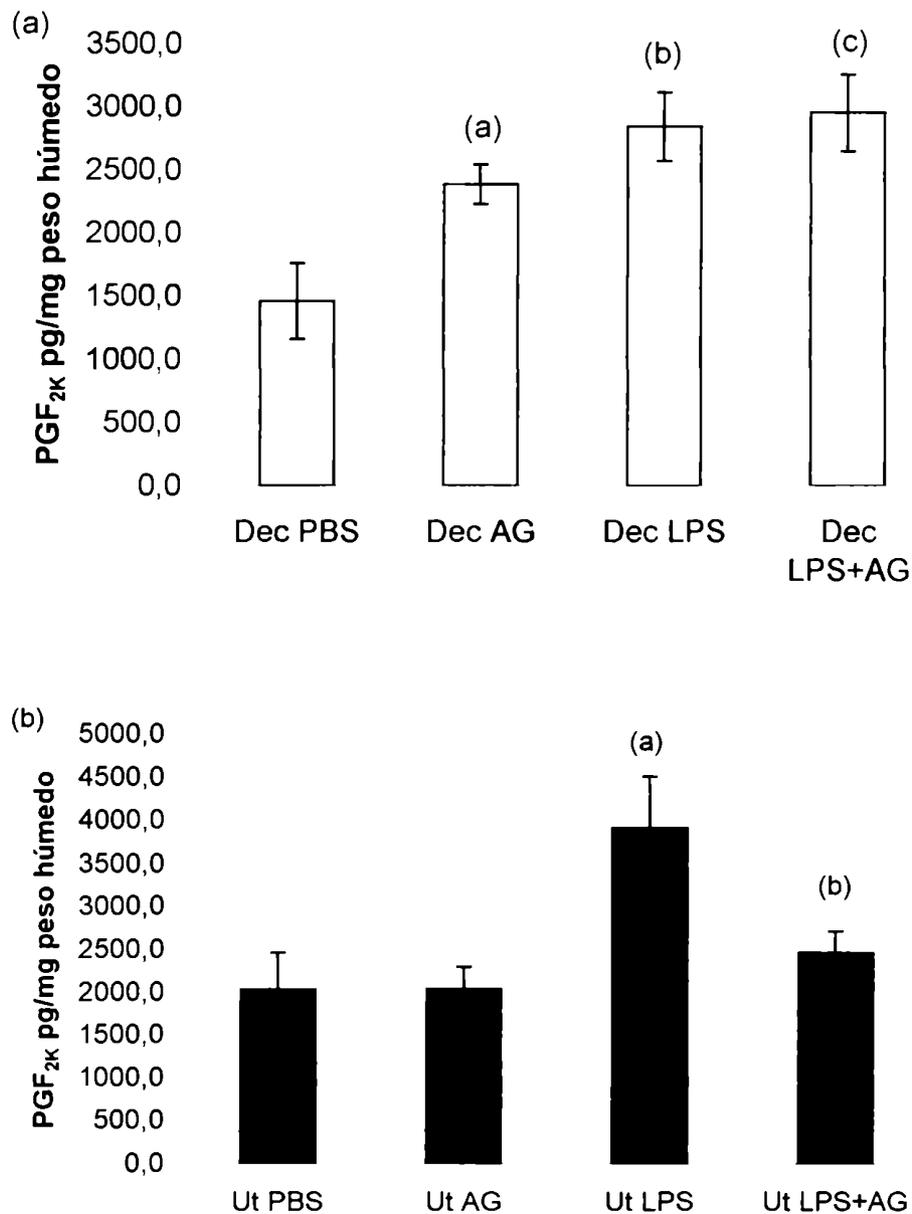


Figura 13. Efecto de LPS y AG sobre la producción decidual (a) y uterina (b) de PGF_{2K}. El protocolo corresponde al Experimento 3 de Materiales y Métodos. Hembras BAL/c en los días 6-7 de preñez son inyectadas con LPS, AG, LPS+AG o PBS y sacrificadas 6 hs luego de la inyección de LPS. Se midió la concentración de PGF_{2K} por RIA. El Los valores corresponden a la media \pm SEM (n=6). **(a)** a: $p < 0.05$ vs control, b: $p < 0.01$ vs control, c: $p < 0.001$ vs control. **(b)** a: $p < 0.01$ vs control, b: $p < 0.01$ vs LPS.

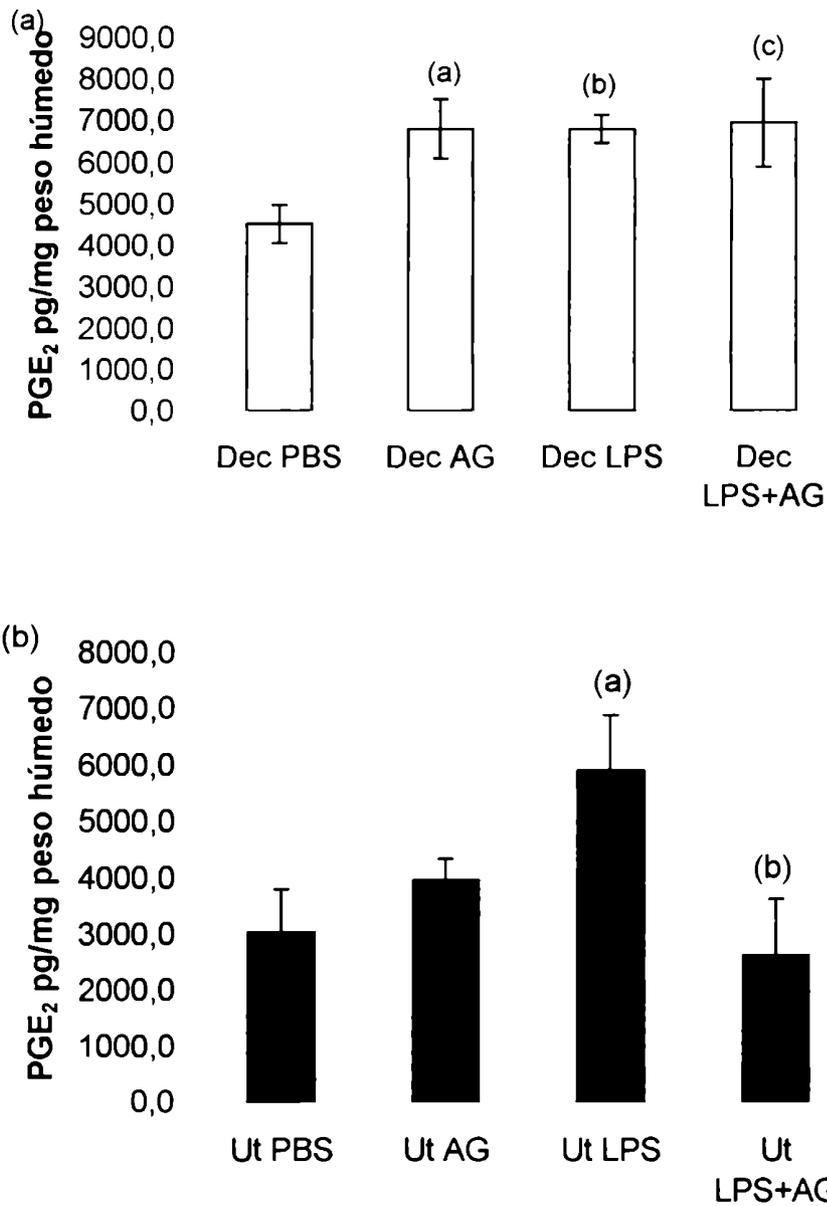


Figura 14. Efecto de LPS y AG sobre la producción decidual (a) y uterina (b) de PGE₂. El protocolo corresponde al Experimento 3 de Materiales y Métodos. Hembras BAL/c en los días 6-7 de preñez son inyectadas con LPS, AG, LPS+AG o PBS y sacrificadas 6 hs luego de la inyección de LPS. Se midió la concentración de PGE₂ por RIA. El Los valores corresponden a la media \pm SEM (n=6). **(a)** a: $p < 0.05$ vs control, b: $p < 0.05$ vs control, $p < 0.05$ vs control. **(b)** a: $p < 0.05$ vs control, b: $p < 0.01$ vs LPS.

8. Efecto del LPS y AG sobre la nitración proteica.

El LPS indujo en decidua la nitración de las proteínas en tirosina (Figura 15) detectado por western blot. Esto se evidenció, como un cambio en el patrón de bandas de proteínas conteniendo nitrotirosina (Figura 15). Se observaron en decidua 5 bandas (15, 30, 50, 70 y 110 kDa) que muestran más reactividad al anticuerpo en las muestras provenientes de animales tratados con LPS que en los animales controles preñados de 7 días.

La AG inhibió la nitración en tirosina inducida por LPS, pues disminuyó la reactividad de las bandas de 15, 30, 50, 70 y 110 kDa, las cuales habían aumentado por LPS (Figura 15). Estos resultados sugieren que en la decidua el NO producido por la iNOS, participa en la formación de peroxinitritos y la consecuente nitración en tirosina.

En cambio en útero el tratamiento con LPS no produjo cambios en la reactividad de las bandas respecto al control, lo que sugeriría que el LPS no estaría induciendo la nitración en tirosina en útero.

El tratamiento con AG de los animales preñados de 7 días no tuvo efecto sobre el patrón de bandas de proteínas conteniendo nitrotirosina.

Se observó por inmunohistoquímica que el LPS produjo un abrupto aumento en la marca para nitrotirosina en la decidua. Sin embargo, coincidiendo con lo observado por la técnica de western blot, en útero no se detectó un efecto importante en la marcación para nitrotirosina (Figura 16c,d).

La AG disminuyó la nitración en tirosina inducida por LPS, lo cual se evidencia por una disminución en la marca en decidua (Figura 16 e,f). En la figura 16 (e,f) se observa un sitio de implantación donde la disminución de la marca para nitrotirosina es muy

evidente. Sin embargo también se observaron algunos sitios (30% de los cortes estudiados) donde la disminución de la marca para nitrotirosina respecto a LPS es menos notable.

Los resultados de la inmunohistoquímica y del western blot coinciden y nos llevan a concluir que el NO producido por la iNOS, participa en la nitración proteica en tirosina en la decidua inducida por LPS.

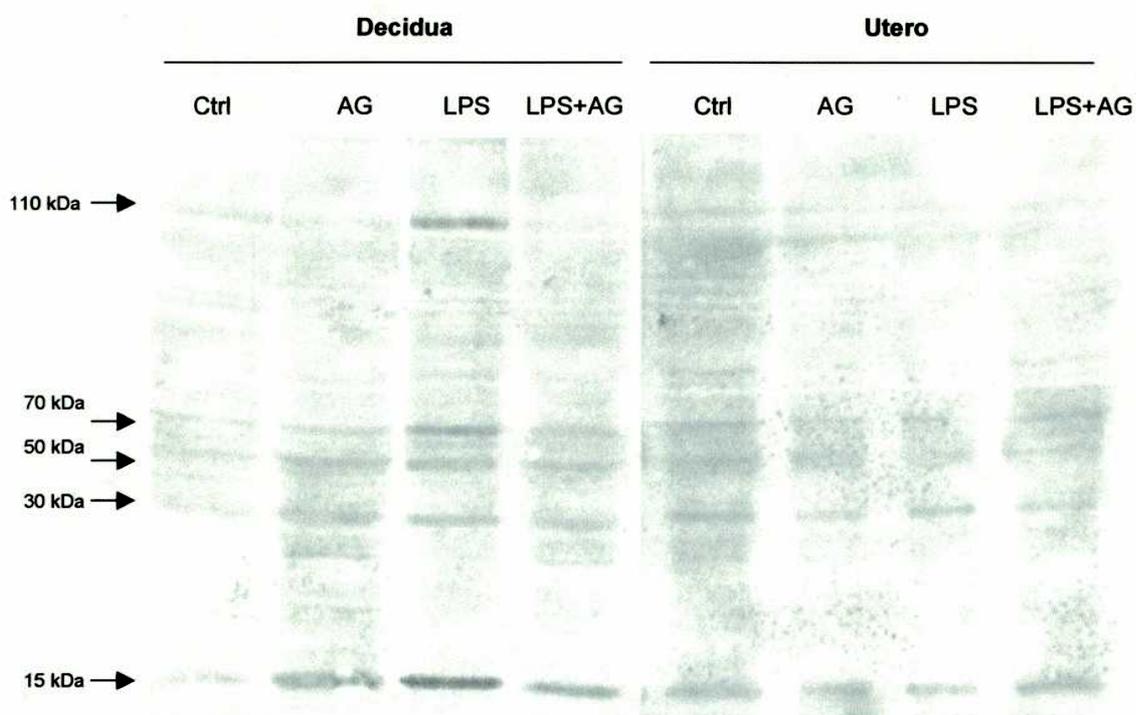


Figura 15. Detección de nitrotirosina proteica por western blot. El protocolo corresponde al Experimento 3 de Materiales y Métodos. Hembras BAL/c en los días 6-7 de preñez son inyectadas con LPS, AG, LPS+AG o PBS y sacrificadas 6 hs luego de la inyección de LPS. Homogenatos de decidua y útero de los distintos tratamientos fueron procesados por esta técnica. Cada punto representa un pool de 6 animales.

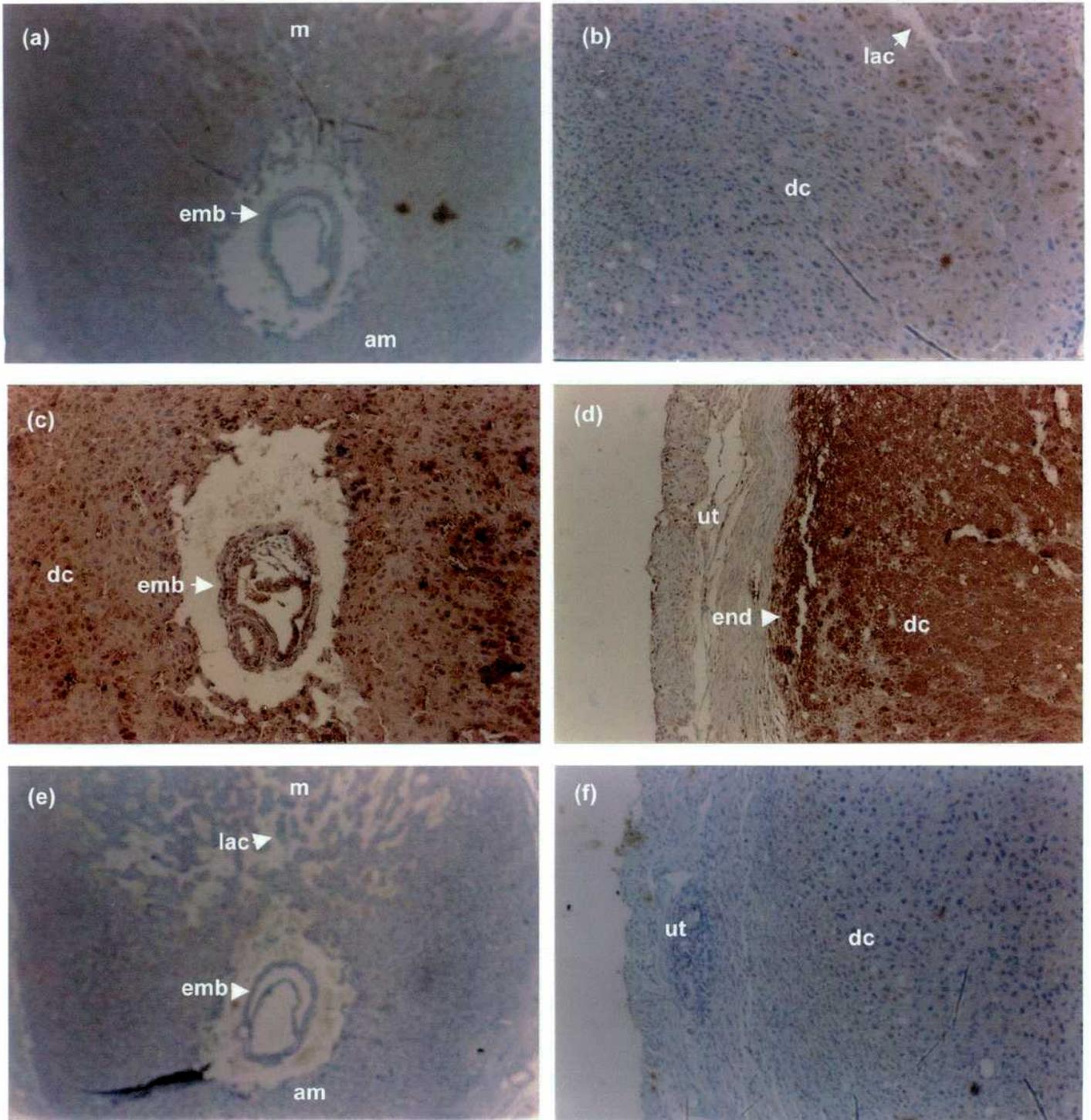


Figura 16. Inmunolocalización de nitrotirosina en sitios de implantación murinos

de animales control e inyectados con LPS. Hembras BALB/c en el día 7 de preñez son inyectadas con LPS 0.5 ug/g sacrificadas 6 hs más tarde (Experimento 3 de Materiales y Métodos). Las secciones fueron procesadas por la técnica de inmunoperoxidasa utilizando anticuerpo anti-nitrotirosina. **(a)** y **(b)** Muestran débil marca para nitrotirosina en sitios de implantación control. **(c)** y **(d)** Muestran un abrupto aumento de la nitración en tirosina en decidua y embrión en sitios provenientes de animales inyectados con LPS. **(e)** y **(f)** Muestran que la AG inhibe el aumento en la nitración de tirosina estimulado por LPS. m: decidua mesometrial, am: decidua antimesometrial, dc: célula decidual, emb: embrión, lac: lagunas deciduales, end: endometrio. Las barras de escala representan 200 um (a,c,f), 100 um (b,d,f).

9. Inmunodetección de CD14

La respuesta a LPS de la decidua y el útero sugieren la posible expresión del receptor CD14 en estos tejidos.

Se estudió en los sitios de implantación de los 4 tratamientos (a las 6 hs post-inyección de LPS) la expresión de CD14 (receptor de LPS) por western blot.

La expresión de CD14 fue alta en la decidua de los animales controles (Figura 17). Esta alta expresión puede explicar la elevada sensibilidad de la decidua al LPS. El tratamiento de los animales con AG no afectó la expresión de los receptores CD14. Tampoco fue modificada por el tratamiento con LPS (Figura 17a y b).

La expresión de CD14 en útero de animales controles preñados de siete días fue baja y el LPS fue capaz de inducir la expresión de sus receptores significativamente ($p < 0.05$) (Figura 17a y b). Este aumento en la expresión de los receptores CD14 inducido por LPS podría estar relacionado con una amplificación de la respuesta inflamatoria. La AG no modificó la expresión de los receptores CD14 en los animales tratados con LPS (Figura 17).

Como no se observaron diferencias en la expresión de CD14 entre los tratamientos control y AG, o entre los tratamientos LPS y LPS+AG (Figura 17), no se realizó inmunohistoquímica de los tratamientos AG y LPS+AG. Sólo se hizo inmunohistoquímica de los tratamientos control y LPS.

En los animales control (día 7 de preñez) se observa una leve marca para CD14 en las células deciduales, las glándulas endometriales y las células miometriales (Figura 18a y

c). El LPS produce un considerable aumento en la expresión de CD14 sólo en las glándulas endometriales (Figura 18 b y d).

La alta expresión de CD14 detectada en el útero por western blot, puede deberse a que mediante la técnica de disección utilizada, el endometrio queda unido al útero cuando se extrae la decidua. En el endometrio no decidualizado se encuentran las glándulas endometriales.

La leve marca de CD14 en decidua observada por inmunohistoquímica no concuerda con los elevados niveles detectados por western blot. Esto puede deberse a la menor sensibilidad de la inmunohistoquímica comparada con la técnica de western blot.

En los animales tratados con LPS se observó en la decidua mesometrial, abundantes leucocitos infiltrados con marca positiva para CD14, lo cual los identifica como macrófagos y granulocitos (Figura 18d inserto).

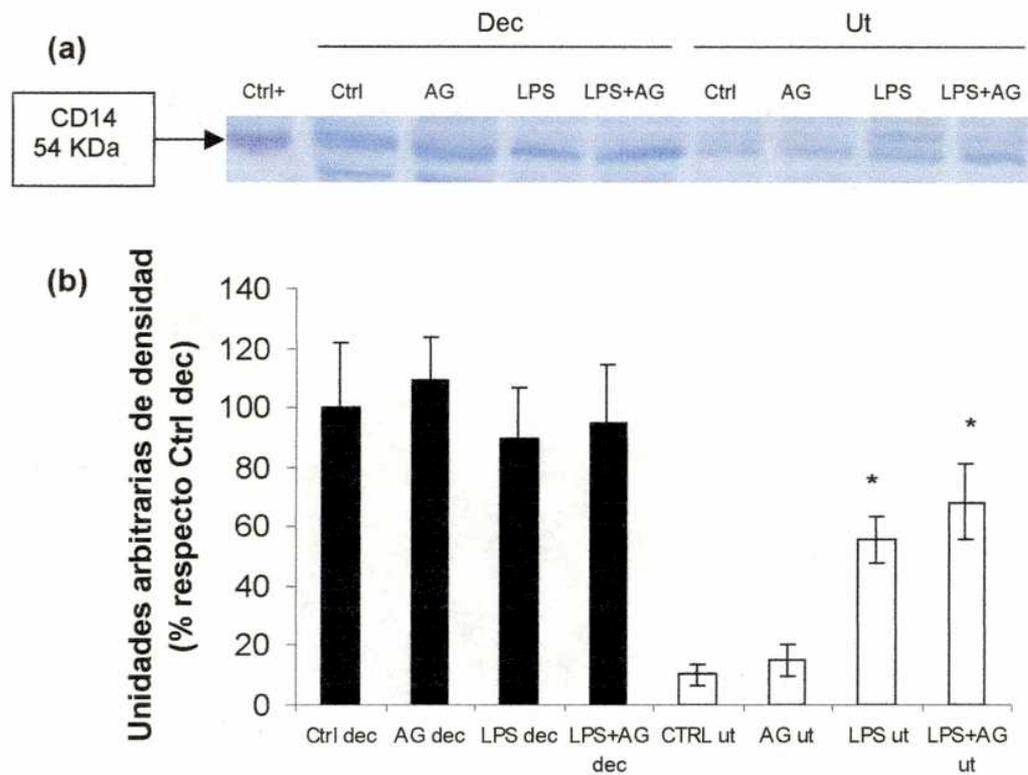


Figura 17. Detección de CD14 por western blot. El protocolo corresponde al Experimento 3 de Materiales y Métodos. Hembras BAL/c en los días 6-7 de preñez son inyectadas con LPS, AG, LPS+AG o PBS y sacrificadas 6 hs luego de la inyección de LPS. Homogenatos de decidua y útero de los distintos tratamientos fueron procesados por esta técnica. Cada punto representa un pool de 6 animales. Control positivos: lisado de macrófago murino. El análisis densitométrico de las bandas obtenidas se realizó con el programa Sigma Gel. Se graficaron como unidades densitométricas arbitrarias respecto al tratamiento Ctrl dec. Cada barra corresponde a la media de 3 pools distintos de 6 animales cada uno. * $p < 0.05$ vs Ctrl.

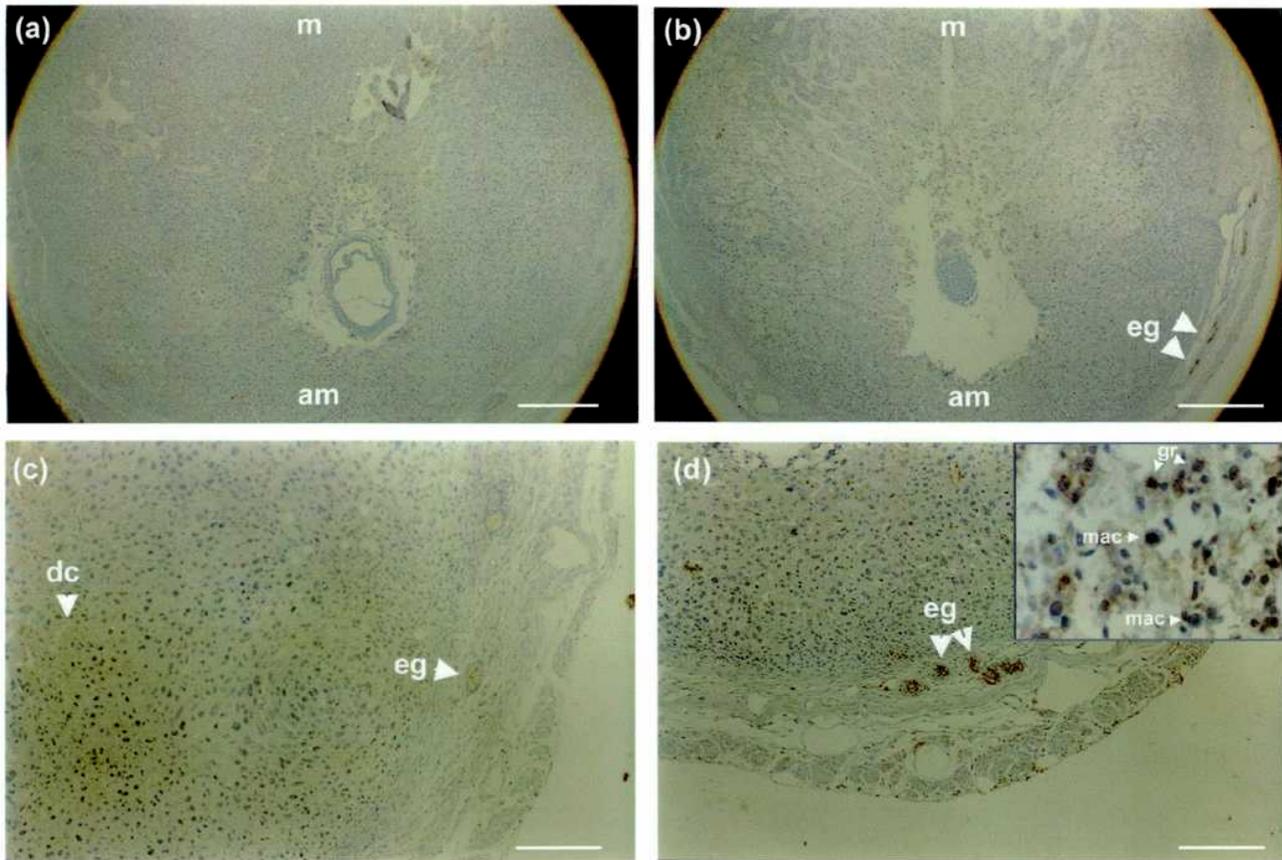


Figura18 Inmunolocalización de eNOS y nNOS en sitios de implantación murinos de animales control e inyectados con LPS. Hembras BALB/c en el día 7 de preñez son inyectadas con LPS 0.5 ug/g sacrificadas 6 hs más tarde (Experimento 3 de Materiales y Métodos). Las secciones fueron procesadas por la técnica de inmunoperoxidasa utilizando anticuerpo anti-CD14. **(a)** y **(c)** son observaciones a bajo y alto aumento respectivamente donde se muestra débil marca para CD14 en células deciduales y glándulas endometriales de ratón control. **(b)** y **(d)** son observaciones a bajo y alto aumento respectivamente donde se detecta fuerte marca para CD14 en glándulas endometriales de animales inyectados con LPS. **(d inset)** Se observa infiltración de la decidua mesometrial por macrófagos y granulocitos CD14 positivos. m: decidua mesometrial, am: decidua antimesometrial, eg: glándula endometrial, dc: célula decidual, mac: macrófago, gr: granulocito. Las barras de escala representan 200 um (a,b), 100 um (c,d) y 40 um (d, inset).



Discusión

Discusión

Este trabajo permitió establecer un modelo de reabsorción embrionaria murino inducido por LPS. En este modelo, LPS en dosis de 0.5 ug/g i.p. administrado en el día 7 de preñez produjo 100% de reabsorción embrionaria a las 24hs, con expulsión de los embriones el día 9. El LPS produjo efectos sistémicos en la madre como: diarrea, piloerección y postura agachada, pero no fue fatal en ningún caso. Veinticuatro horas después del tratamiento con LPS las hembras ya no presentaban efectos sistémicos. Gendron y col. han encontrado que el LPS en dosis de 0.005 ug/g intra-venoso (dosis 100 veces menor que la utilizada en el presente trabajo) administrado en el día 7 de preñez produce 100% de reabsorción en la cruce CFW/SW x DBA sin efectos sistémicos en la madre (Gendron y col., 1990). Las diferencias con nuestro modelo están en la cepa de ratones utilizada y en la vía de administración del LPS.

EL hecho de que el LPS produzca reabsorción embrionaria a dosis que no son letales demuestra la elevada sensibilidad de la decidua, el trofoblasto y el embrión a las moléculas pro-inflamatorias como el LPS. Dosis veinte veces más elevadas que las utilizadas en este modelo son necesarias para producir shock séptico en ratas y ratones adultos (Karima y col, 1999). La evidencia presentada en este trabajo indica que el *conceptus* (unidad embrión-placenta) del ratón normal es extremadamente sensible al LPS durante la preñez temprana. El tratamiento con LPS en estadios más tardíos de la preñez no es capaz de producir reabsorción y en la preñez tardía, hemos observado en nuestro laboratorio (datos no publicados) provoca retardo de crecimiento y parto prematuro.

Se observó que el LPS produce necrosis total del embrión y la mayor parte de la decidua a las 24 hs post-inyección. Estos resultados coinciden con los hallados por Gendron y col que observa hemorragia y destrucción completa del contenido uterino 24hs luego del tratamiento con LPS en la craza murina CFW/SW x DBA (Gendron y col., 1990).

En nuestro modelo la decidua necrosada es expulsada por la madre el día 9. Sin embargo se observa una zona de la decidua que no ha sido totalmente necrosada y permanece pegada al útero. Esta zona está altamente infiltrada por granulocitos y células LGL. Estas células infiltradas probablemente dirigen la expulsión de la decidua necrosada, la fibrinólisis y la regeneración del tejido. Se ha reportado en humanos que las células LGL dirigen la pérdida de la placenta luego del parto (Hunt 1994).

En cruza murinas que presentan naturalmente una alta tasa de reabsorción embrionaria como la de CBA/J x DBA/2 se observó una producción aumentada de NO por las células mononucleares de la decidua (Haddad y col, 1995). Los macrófagos y las células NK tienen una importante participación en el mecanismo de la reabsorción embrionaria en esta craza por ello este fenómeno fue relacionado con una activación de la inmunidad innata (Haddad y col, 1995).

El LPS produce en distintos modelos y en diversos tejidos aumento en la producción de NO y la infiltración de macrófagos (Salter y col., 1991) por ello decidimos estudiar la posible participación del NO en el modelo de reabsorción embrionaria inducido por LPS desarrollado en este trabajo.

En los animales control, se observó producción basal de NO tanto en útero como en decidua en el día 7 de preñez. Además se observó un aumento en la producción

decidual de NO durante el transcurso del día 7. Hunt y col. han observado un aumento en el número de macrófagos y células LGL iNOS positivas durante el día 7 de preñez, lo cual puede explicar el incremento en la producción de NO observado en el presente estudio durante el día 7 (Hunt y col., 1997).

Cuando estudiamos por western blot e inmunohistoquímica la presencia de las isoformas de las NOS, encontramos que las isoformas iNOS, eNOS y nNOS estaban presentes en útero durante el día 7 y 8 de preñez normal en ratón.

La expresión uterina de la isoforma iNOS está asociada con el mantenimiento de la quiescencia uterina (Dong y col., 1996; Farina y col., 2001), algunos estudios han involucrado al NO junto al GMPc en la inhibición de la contractilidad uterina durante la preñez tanto en humanos como en roedores (Izumi y col, 1995; Buhimischi y col, 1995).

Otros investigadores han mostrado un aumento de la expresión del RNAm de la iNOS en el útero de rata durante la preñez tardía (Alí y col, 1997; Dong y col, 1998).

La isoforma iNOS es expresada en forma moderada en la decidua así como en células miometriales. Otros autores han reportado la expresión de iNOS en decidua durante la preñez temprana (Purcell y col., 1999; Chwalisz y Garfield, 2000). Esta expresión parece ser extremadamente relevante en los procesos de implantación y decidualización ya que la AG, inhibidor de la iNOS, sinergiza con los antiprogestágenos en la inhibición del establecimiento de la preñez (Chwalisz y col., 1999; Novaro y col, 1997).

Se observó expresión de eNOS en el endotelio de las lagunas deciduales y en los vasos endometriales y uterinos. La expresión de eNOS en los vasos deciduales ha sido también reportada por otros autores (Purcell y col., 1999). La expresión de eNOS puede

ser muy importante para la vasodilatación y la inhibición de la agregación plaquetaria en los vasos deciduales, ya que estos vasos cumplen la importante función de nutrir al conceptus.

La expresión de la isoforma eNOS en el útero durante la preñez fue observada en roedores (Farina y col, 2001; Dong y col, 1996) y su expresión se mantiene hasta el parto.

La isoforma nNOS se expresa en las células deciduales, y en menor proporción en las células uterinas. Otros autores también reportaron esta isoforma en la decidua y el miometrio durante la preñez temprana (Purcell y col., 1999). La baja expresión de nNOS en útero y decidua concuerda con resultados de otros autores (Dong y col., 1996; Farina y col., 2001). La baja expresión de la isoforma nNOS durante la preñez puede deberse a la degeneración de las fibras nerviosas uterinas durante la preñez (Stjernquist, 1994).

La reabsorción embrionaria producida por el tratamiento con LPS se vio acompañada por un incremento en la producción decidua y uterina de NO, la cual alcanza su máximo a las 6 hs post-inyección. Se ha reportado también en otros tejidos que la producción máxima de NO ocurre 6 hs luego de la inyección de LPS (Salter y col., 1991).

La producción decidua de NO a las 24 hs post-inyección de LPS es indetectable y por lo tanto menor que en el control, lo cual puede deberse a la necrosis total de la decidua, observada en los cortes teñidos con hematoxilina-eosina. El útero, en cambio, sigue produciendo NO, en cantidades mayores a lo sintetizado por úteros de animales controles, 24 hs después del tratamiento con LPS, y no presenta necrosis en los

estudios histológicos realizados. Estos resultados nos sugieren una mayor sensibilidad de la decidua al tratamiento con LPS.

En el presente trabajo observamos que el incremento en la producción de NO, a las 6hs de la administración de LPS, es acompañado por un aumento en la expresión de la isoforma iNOS en decidua y útero.

Se observó por inmunohistoquímica que el LPS aumenta la expresión de iNOS en las células deciduales y produce infiltración de la decidua mesometrial por macrófagos y granulocitos iNOS positivos. Estos infiltrados son también CD14 positivos. Estos leucocitos infiltrados serían responsables de la elevada fibrinólisis observada en la decidua mesometrial.

Otros autores (Chen y col., 2001; Acarin y col., 2002; Greenacre y col., 2002) han involucrado también a macrófagos y granulocitos expresando la isoforma iNOS en el mecanismo de daño tisular en distintos modelos de inflamación.

El LPS aumentó la expresión de iNOS en células miometriales, lo cual también fue reportado por otros autores en rata y cerdo (Nakaya y col., 1996, Jana y col., 2001).

Se observó que el LPS aumentó la expresión de nNOS en decidua pero no en útero.

Esto sugiere que la isoforma nNOS puede ser inducida bajo ciertas condiciones.

Se ha demostrado un aumento en la expresión de nNOS en cervix durante el parto, lo cual no ocurre en útero (Buhimschi y col; 1996). En nuestro laboratorio se ha demostrado que el LPS, en una dosis diez veces mayor que la utilizada en este modelo, aumenta la expresión de nNOS en útero de rata no preñada (Cella y col., 2001).

El LPS no produce variaciones en los niveles de expresión ni en la localización de la isoforma eNOS.

Nuestros resultados muestran que tanto la decidua como el útero son capaces de responder al tratamiento con LPS, por lo que el siguiente paso fue investigar la posible existencia de los receptores a esta toxina.

Se observó elevada expresión de CD14, receptor de LPS, en decidua y glándulas endometriales de animales controles, preñados de 7 días. Por lo tanto, estas células son capaces de responder al LPS.

Fearn y col encontraron que el útero de ratón expresa receptores CD14 (Fearn y col., 1995).

La marca para la expresión de CD14 fue mucho más importante en la decidua que en el útero. Esto podría explicar la elevada sensibilidad de la decidua al LPS.

Se ha demostrado *in vitro* que las células deciduales responden al LPS a través del receptor CD14 (Arntzen y col., 1999).

En útero se observó que el tratamiento con LPS produjo un aumento en la expresión de los receptores CD14, en coincidencia con lo hallado por otros investigadores (Fearn, 1995). Este incremento está relacionado con una mayor expresión de CD14 en las glándulas endometriales. Esto puede estar relacionado con una amplificación de la respuesta inflamatoria. Recientemente, Jiang y col. han observado una inducción de la expresión de CD14 en células hepáticas de rata durante el shock endotóxico (Jiang y col., 2001).

En la decidua mesometrial de los animales inyectados con LPS se observaron infiltrados marcados para CD14, lo cual los identifica como macrófagos y granulocitos.

El NO producido por macrófagos, granulocitos y las células propias del tejido, puede ser un poderoso agente citotóxico contra las bacterias y otros patógenos, pero también para las células del huésped. Para comprobar la hipótesis de que el NO es importante en el mecanismo patológico de la reabsorción embrionaria inducida por LPS, se probó el efecto de un inhibidor de la isoforma iNOS, la AG. Si el NO tuviera un papel indispensable en el modelo de reabsorción embrionaria inducido por LPS, la reabsorción debería revertirse por el uso de un inhibidor de la NOS.

La administración de AG inhibió en forma significativa la reabsorción embrionaria inducida por LPS estudiada en los días 8 y 12 de preñez. La morfología de los embriones que fueron rescatados de la reabsorción es normal, y también el peso de sus placentas. Las hembras tratadas con LPS y AG continúan con su preñez, el parto se produce igual que en los animales controles, a los 19 días de preñez. Nace un número menor de crías vivas con peso igual a los controles.

La AG en las dosis utilizadas, no sólo revirtió significativamente la reabsorción embrionaria, sino que inhibió la actividad NOS estimulada por LPS tanto en decidua como en útero. La actividad de la NOS en útero volvió a los valores controles con el tratamiento con AG, a diferencia de la decidua, donde el efecto del LPS fue sólo parcialmente revertido. Esto puede ser explicado por el hecho de que la actividad nNOS no es afectada por la AG, inhibidor específico de la iNOS, y su expresión es aumentada por LPS sólo en decidua, mientras que LPS aumenta la expresión de iNOS tanto en útero como en decidua. En coincidencia con esto, en nuestro laboratorio demostramos que en útero de rata la actividad de la NOS incrementada por el tratamiento *in vivo* con LPS, sólo es bloqueada parcialmente por la preincubación de los tejidos con AG y que

en los úteros de estos animales se encuentra inducida las isoformas iNOS y nNOS (Cella, 2001).

El efecto de la AG revirtiendo la reabsorción embrionaria y normalizando la actividad de la NOS sugieren que el NO participa en el proceso de reabsorción embrionaria inducido por LPS.

La AG inhibió significativamente, la infiltración leucocitaria inducida por LPS, lo cual también contribuiría a su efecto inhibitorio sobre la reabsorción.

Los cortes histológicos muestran que la fibrinólisis también fue inhibida por AG, ya que la matriz extracelular está menos dañada.

La inhibición de la infiltración inducida por AG no es acompañada por una menor expresión de iNOS, nNOS, eNOS y CD14, ya que no se observaron variaciones en la intensidad de las bandas en el western blot. Hecho que coincide con los estudios que muestran que esta droga es capaz de inhibir la actividad de la iNOS y no su expresión (Misko y col., 1993).

El mecanismo de inhibición de la infiltración podría ser el siguiente: una menor producción de NO, como la observada en la reversión de la reabsorción embrionaria por AG, causaría un menor daño tisular y por lo tanto menor reclutamiento de leucocitos, como se demuestra en los cortes histológicos donde los animales tratados con AG muestran una disminución de alrededor del 50% de la infiltración leucocitaria producida por el LPS. Esta menor infiltración leucocitaria cortaría los circuitos de feedback positivo de la inflamación aguda. Baatz y col., han encontrado que la AG inhibe la infiltración leucocitaria del iris en la uveítis inducida por LPS. Se ha reportado que los inhibidores

de la iNOS son capaces de inhibir la infiltración de leucocitaria en otros modelos de inflamación (Chen y col., 2001; Grencrache y col., 2002).

Otro mecanismo posible que estaría afectado por la inhibición de la producción de NO es la síntesis de otros mediadores de la inflamación como las prostaglandinas. En muchos tejidos la síntesis de prostaglandinas parece estar regulada por NO (Salvemini y col., 1993; Franchi y col., 1994; Ribeiro y col., 1999). Esta regulación también se observa en el útero de rata preñada (Farina y col., 2000) y en placenta humana a término (Nervegna y col., 1999).

En el presente trabajo se observó que el LPS aumenta la producción decidual y uterina de PGF2alfa y PGE2. Esto coincide con el reconocido papel de estas prostaglandinas en el mecanismo de aborto (Sharknes and Harper., 1972).

La AG inhibió el aumento en la producción de PGF2alfa y PGE2 inducido por LPS en útero pero no en decidua. Esto indicaría que el NO está regulando en útero la producción de prostaglandinas estimulada por LPS, pero no tendría este efecto regulatorio en decidua.

En nuestro laboratorio hemos observado que la AG in vitro es capaz de inhibir el aumento de síntesis de PGs inducido por EGF en útero de rata estrogenizada (Ribeiro, 1999) y por IL1alfa en utero de rata estrogenizada (Franchi, 1998) y preñada de a término (Farina, 2000).

Estos hallazgos sugieren que las PGs estarían involucradas en el mecanismo de acción del NO en la reabsorción embrionaria inducida por LPS.

En los últimos años, los derivados tóxicos del NO, han sido propuestos como los causantes de los efectos deletéreos del NO más que el propio NO.

La interacción del NO con el anión superóxido produce el anión peroxinitrito, un oxidante de vida media relativamente larga, que es citotóxico porque inhibe el transporte de electrones en la mitocondria (Radi y col., 1995), oxida los grupos sulfhidrilos de las proteínas, inicia la peroxidación lipídica (Radi y col., 1991) y produce

la nitración de los amino ácidos aromáticos como la tirosina (Ischiropoulos y col., 1992) afectando los caminos de transducción de señales.

La formación de peroxinitritos (ONOO-) puede ser estimada por inmunohistoquímica usando el anticuerpo anti-nitrotirosina porque la nitrotirosina es el producto más importante del ataque del ONOO- a las proteínas (Radi et al., 1991), y ha sido usada como un marcador de la formación de ONOO- (Beckman et al., 1994).

Se estudió por western blot e inmunohistoquímica la presencia de nitrotirosina en decidua y útero. Se observó que el LPS aumentó notablemente la nitración proteica en decidua pero no en útero. La AG en la decidua revirtió la nitración en tirosina inducida por LPS. Esto nos llevan a concluir que el NO producido por la iNOS, participa en la nitración proteica en tirosina en la decidua inducida por LPS. Por lo tanto la inhibición de la nitración en tirosina, puede ser también uno de los mecanismos por los cuales la AG inhibe la reabsorción inducida por LPS.

El papel de la iNOS en la nitración proteica inducida por LPS también fue observada en otros tejidos (Strunk y col., 2001; Barreiro y col., 2002).

La AG no afectó el porcentaje de reabsorción ó el número de sitios de implantación respecto a los animales control cuando estos parámetros fueron observados en los días 8 y 12 de preñez. La aminoguanidina no afectó tampoco el tamaño y la morfología de los embriones, ni el peso de la placenta. Este grupo de animales tuvo partos a término con fetos normales y vivos.

En coincidencia con estos resultados, Chwalisz y col. han demostrado que el tratamiento de ratas en los días 6-8 de preñez con L-NAME (inhibidor inespecífico de NOS) o AG no tiene efecto significativo sobre la preñez (Chwalisz y col., 1999).

No se observaron diferencias en la actividad NOS entre los animales control y los tratados con AG, aunque en útero parece haber una tendencia inhibitoria no significativa. Esto puede deberse a que el útero es una de los pocos tejidos que

expresan niveles elevados de iNOS en forma basal (Buhimschi y col., 1996; Nakaya y col., 1996).

En los mamíferos, la supervivencia del feto puede estar influida por el sistema inmune materno. En humanos, la pérdida temprana del embrión puede definirse como las pérdidas ocurridas antes de la tercera semana de gestación. Es común que estas pérdidas pasen clínicamente inadvertidas. Los mecanismos de la pérdida embrionaria temprana no están aún dilucidados y la mayoría de los estudios sobre este tema se realizan en la cruce murina CBA/J x DBA/2 que presenta una alta tasa de reabsorción espontánea. Sin embargo, hace muchos años que las endotoxinas bacterianas son reconocidas como una de las causantes de la reabsorción embrionaria temprana.

En este trabajo se establece un modelo de reabsorción embrionaria murino inducido por LPS, que permite estudiar esta patología.

Además se demuestra que el NO está involucrado en el mecanismo asociado a la pérdida embrionaria temprana y que un inhibidor de la isoforma iNOS es capaz de reducir significativamente la pérdida inducida por LPS.



Conclusiones

CONCLUSIONES:

- La administración de LPS durante la preñez temprana induce reabsorción embrionaria, evidenciando que el conceptus del ratón es exquisitamente sensible al LPS
 - LPS induce la expresión de la isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa en decidua y útero, y de la isoforma neuronal solamente en decidua llevando a un aumento en la producción de NO.
 - El LPS produce fibrinólisis e infiltración de macrófagos y granulocitos iNOS y CD14 (receptor de LPS) positivos.
 - El LPS indujo la expresión de CD14 en las glándulas endometriales, lo cual podría amplificar la respuesta inflamatoria.
 - Se observó un aumento en la síntesis de prostaglandinas en decidua y útero debido al LPS que podría contribuir al proceso abortivo.
 - El tratamiento con LPS produjo un aumento en el daño oxidativo de la decidua debido al anión peroxinitrito, evidenciado por la nitración de las tirosinas proteicas.
 - La Aminoguanidina (AG), un inhibidor de la actividad de la isoforma iNOS, revirtió la reabsorción embrionaria inducida por LPS.
 - El efecto de la AG podría explicarse por una inhibición en la producción de NO.
 - La disminución de la producción de NO fue asociada a: una inhibición de la infiltración celular y de la fibrinólisis, a una menor síntesis de PGs uterinas y a una reducción de la nitración de las tirosinas proteicas deciduales.
- **EL NO PARTICIPA EN LA REABSORCION EMBRIONARIA INDUCIDA POR LPS.**



120




Referencias

Bibliografía

- **Acarin L, Peluffo H, Gonzalez B and Castellano B.** (2002). Expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 after excitotoxic damage to the immature rat brain. *Journal of Neuroscience Research* **68(6)**: 745-754.
- **Adham N and Schenk EA.** (1969). Autonomic innervation of the rat vagina, cervix, and uterus and its cyclic variation. *Am.J.Obstet. Gynecol.* **104 (4)**: 508-516.
- **Alexander CM, Hansel EJ, Behrendtsen O et al.** (1996). Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. *Development* **122 (6)**: 1723-1736.
- **Ali M, Buhimschi I, Chwalisz K and Garfield R.** (1997). Changes in expression of nitric oxide synthase isoforms in rat uterus and cervix during pregnancy and parturition. *Molecular Human Reproduction* **3**: 995-1003.
- **Ariel I, Hochberg A and Shochina M.** (1998). Endothelial nitric oxide synthase immunoreactivity in early gestation and in trophoblastic disease. *Journal of Clinical Pathology* **51(6)**: 427-431.
- **Arntzen KJ, Egeberg K, Rahimipour S, Vatten L and Austgulen R.** (1999). LPS mediated production of IL-1, PGE₂α from term decidua involves tumor necrosis factor and tumor necrosis factor receptor p55. *Journal of Reproductive Immunology* **45(2)**: 113-125.
- **Athanassakis I, Ainfantis I, Ranella A, Giouremou K and Vassiliadis S.**

- (1999). Inhibition of nitric oxide production rescues LPS-induced fetal abortion in mice. *Nitric Oxide* **3(3)**: 216-224.
- Baatz H and Pleyer U.** (2001). Modulation of leukocyte-endothelium interaction by nitric oxide synthase inhibitors: effects on leukocyte adhesion in endotoxin-induced uveitis. *Inflammation Research* **50(11)**: 534-543.
- **Barreiro E, Comtois AS, Gea J, Laubach VE and Hussain SN.** (2002). Protein tyrosine nitration in the ventilatory muscles: role of nitric oxide synthases. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **26(4)**:438-46.
 - **Beckman JS, Ye YZ, Anderson PG, Chen J, Accavitti MA, Tarpey MM and White R.** (1994). Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **375**: 81 -88.
- Beier HM, Hegele-Hartung C, Mootz U and Beier-Hellwing K.** (1994). Modification of endometrial cell biology using progesterone antagonist to manipulate the implantation window. *Hum. Reprod.* **(9)**: 98-115.
- **Bozler, E.** (1941). *Biol. Symposia* **3**: 95.
 - **Bradford M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 246-254.
 - **Bredt DS and Snyder SH.** (1989). Nitric oxide mediates glutamate linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA* **66**: 9030-9033.
 - **Bredt DS and Snyder SH.** (1994). Nitric Oxide: a physiologic messenger

molecule. *Annu. Rev. Biochem.* **61**: 175-195.

Bredt DS, Ferris CD and Snyder SH. (1992). Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase, identification of flavin and calmodulin binding sites *J. Biol. Chem.* **267 (16)**: 10976-10981.

- **Buhimschi I, Ali M, Jain V, Chwalisz K and Garfield RE.** (1996). Differential regulation of nitric oxide in the rat uterus and cervix during pregnancy and labour. *Human Reproduction* **11(8)**: 1755-1766.
- **Buhimschi I, Yallampalli C, Dong Y-L and Garfield R.** (1995). Involvement of a nitric oxide-cyclic guanosine pathway in control of human uterine contractility during pregnancy. *Am. J. of Obstet. Gynecol.* **172**: 1577-1584.
- **Burnett AL, Ricker DD, Chamnes SL, Maquire MP, Crone JK, Bredt DA, Snyder SH and Chang TSK.** (1995). Localization of nitric oxide synthase in the reproductive organs of male rat *Biol. Reprod.* **52**: 1-7.
- **Burnstock G and Prosser CL.** (1960). *Am.J.Physiol* 198: 921.
- **Cavanagh D, Knuppel RA, Shepherd JH, Anderson R and Rao PS.** (1982). Septic shock and the obstetrician/gynecologist. *South Med* **75 (7)**: 809-813.
- **Cella M, Ogando D, Farina M, Ribeiro ML and Franchi AM.** (2001). El lipopolisacárido aumenta la síntesis de óxido nítrico vía dos isoformas de la NOS: nNOS e iNOS en útero de rata ovariectomizada. *Reproducao & Climaterio* **16**: 15.
- **Chaouat G, Menu E, Clark DA, Dy M, Minkowski M and Wegmann TG.** (1990).

Control of fetal survival in CBA x DBA/2 mice by lymphokine therapy. *Journal of Reproduction and Fertility* **89**: 447-458.

- **Chen LW, Hsu CM, Wang JS, Chen HL and Chen JS.** (2001). Inhibition of inducible nitric oxide synthase (iNOS) prevents lung neutrophil deposition and damage in burned rats. *Shock* **15(2)**: 151-156.
- **Cho HJ, Martin E, Xie Q-W.** (1995). Inducible nitric oxide synthase identification of amino acid residues essential for dimerization and binding of tetrahydrobiopterin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 11514-18.
- **Chwalisz K and Garfield RE.** (2000), Role of nitric oxide in implantation and menstruation. *Human Reproduction* **15(3)**: 96-111.
- **Chwalisz K, Winterhager E, Thienel T and Garfield RE.** (1999). Synergistic role of nitric oxide and progesterone during the establishment of pregnancy in the rat. *Human Reproduction* **14(2)**: 542-552.
- **Conrad KP and Mosher MD.** (1995). Nitric oxide biosynthesis in normal and preeclamptic pregnancy-a preliminary report *J. Am. Soc. Nephrol.* **6**: 657.
- **Cooke JP and Tsao PS.** (1993). Cytoprotective effects of nitric oxide. *Circulation* **88**: 2451-54.
- **Cotran RS, Kumar V and Tucker C (Eds).** (1999). Pathologic Bases of Disease. *WB Saunders company*
- **Coupland RD.** (1962). *J. Obstet Gyneacol. Br. Commonew* **69**: 1041.
- **Dawson TM, Steiner SP, Dawson VL and Snyder SH.** (1993).
Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and

- protects against glutamate neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** (21): 9808-12.
- **Di Rosa M, Radomski R, Carnuccio R and Moncada S.** (1990). Glucocorticoids inhibits the induction of nitric oxide synthase in macrophages *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **172** (3): 1246-52.
 - **Ding A, Nathan C, Graycar J, Derynck R, Stuehr DJ and Srinivasan S.** (1990). Macrophage deactivation factor and transforming growth factors-2-1, -2 and -3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by interferon-gamma. *J. Immunol.* **145**: 940-944.
- Dong YL, Gangula PR and Yallampalli C.** (1996). Nitric oxide synthase isoforms in the rat uterus: differential regulation during pregnancy and labour. *Journal of Reproduction and Fertility* **107**: 249-254.
- **Dong YL, Fang L, Gangula PR and Yallampalli C.** (1998). Regulation of inducible nitric oxide synthase messenger ribonucleic acid expression in pregnant rat uterus. *Biology of Reproduction* **59** (4): 933-940.
 - **Duclos AJ, Haddad EK, Chalifour LE and Baines MG.** (1996). Embryo infiltration by maternal macrophages is associated with selective expression of proto-oncogenes in a murine model of spontaneous abortion. *Biology of Reproduction* **54**: 1088-1095.
 - **Dun NJ, Dun SL, Wu SY and Forstermann U.** (1993). Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat superior cervical ganglia and adrenal glands. *Neurosci. Lett.* **158**: 51-54.

- **Eccles JC, Magladery, JW.** (1937). *J Physiol (London)* **90**: 31.
 - **Farina M, Ribeiro ML and Franchi A.** (2001). Nitric oxide synthases in pregnant uterus *Reproduction* **121**: 403-407.
 - **Farina M, Ribeiro ML, Ogando D, Gimeno M and Franchi A.** (2000). IL-1alpha augments prostaglandin synthesis in pregnant rat uterus by a nitric oxide mediated mechanism. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **62 (4)**: 243-247.
- Fearn C, Kravchenko VV, Ulevitch RJ and Loskutoff DJ.** (1995). Murine CD14 gene expression in vivo: extramyeloid synthesis and regulation by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med* **181**: 857-866.
- **Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I and Kleinert H.** (1994). Nitric oxide synthase isoenzymes, characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* **23 (6 Pt 2)**: 1121-1131.
 - **Forstermann U, Schmidt HHW, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD and Nakane M.** (1991). Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification of different cell types. *Biochem. Pharmacol.* **42**: 1849-57.
 - **Franchi A, Ogando D, Farina M, Ribeiro ML and Gimeno M.** (1998). Effect of IL-1 alpha on prostaglandin synthesis of oestrogenized rat uterus is mediated by nitric oxide. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **58 (6)**: 413-416.

Franchi AM, Chaud M, Rettori V, Suburo A, McCann SM and Gimeno M.

- (1994). Role of nitric oxide in eicosanoid synthesis and uterine motility in estrogen-treated rat uteri. *Proc Natl Acad Sci USA* **91(2)**: 539-543.
- **Garfield RE, Buhimschi I, Buhimschi C, Ali M, Saade G, Shi L, Shao-Ouig S and Chwalisz K.** (1997). Regulation of uterine and cervical function by nitric oxide. In: "Nitric Oxide, Cytochromes P450, and sexual steroid hormones", (Eds.) Lancaster JR Jry Parkinson JF pp 141
 - **Geller DA, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Nussler AK, Di Silvio M, Wang SC, Nakayama KD, Simmons RL, Snyder SH and Billiar TR.** (1993). Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90 (8)**: 3491-95.
 - **Gendron RL, Nestel FP, Lapp WS and Baines MG.** (1990). Lipopolysaccharide induced fetal resorption in mice is associated with the intrauterine production of tumor necrosis factor alpha. *Journal of Reproduction and Fertility* **90**: 395-402.
 - **Ghosh DK, Abu-Soud HM and Stuehr DJ.** (1996). Domains of macrophage NO synthase have divergent roles in forming and stabilizing the active dimeric enzyme. *Biochemistry* **35 (5)**: 1444-49
 - **Gimeno A, Gimeno M, Lázzari M, Terraño A.** (1985). Prostaglandinas y compuestos relacionados. Ed. El Ateneo.
 - **Greenacre SA, Rocha FA, Rawlinton A, Meinerikandathevan S, Poston RN, Ruiz E, Halliwell B and Brain SD.** (2002). Protein nitration in cutaneous inflammation in the rat: essential role of inducible nitric oxide synthase and polymorphonuclear leukocytes. *British Journal of Pharmacology* **136 (7)**: 985-994.

- **Grisham MB, Granger DN, Neil D and Lefer DJ.** (1998). Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. *Free. Radic. Biol. Med.* **25**: 404-433.
- **Grisham MB, Johnson GG and Lancaster Jr JR.** (1996). Quantification of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Methods in Enzimology* **268**: 237-246.
- **Grisham MB, Jourd’heuil D and Wink DA.** (1999). Nitric Oxide I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *American Journal of Physiology* **276**: 315-321.
- **Haddad EK, Duclos AJ and Baines MG.** (1995). Early embryo loss is associated with local production of nitric oxide by decidual mononuclear cells. *Journal of Experimental Medicine* **182**: 1143-1151.
- **Haddad EK, Duclos AJ, Anteckka E, Lapp WS and Baines MG.** (1997). Role of interferon-gamma in the priming of decidual macrophages for nitric oxide production and early pregnancy loss. *Cellular immunology* **181**: 68-75.
- **Ham AW.** Tratado de Histología, Ed. Interamericana, México, 1970
- **Herce-Pagliai C, Kotecha S and Shuker DEG.** (1998). Analytical methods for 3-nitrotyrosine as a marker of exposure to reactive nitrogen species: a review. *Nitric Oxide* **2(5)**: 324-336.
- **Hunt JS.** (1994). Immunologically relevant cells in the uterus. *Biology of Reoroduction* **50**: 461-466.
- **Hunt JS, Miller L, Vassmer D and Croy BA.** (1997). Expression of inducible nitric oxide synthase gene in mouse uterine leukocytes and potential relationships

- with uterine function during pregnancy. *Biology of Reproduction* **57**: 827-836.
- **Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, Tsai M, Martin J, Smith C, Beckman JS.** (1992). Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys.* **298**: 431-437.
 - **Izumi H and Garfield RE.** (1995). Relaxant effects of nitric oxide and cyclic GMP on pregnant rat uterine longitudinal smooth muscle. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* **60**: 171-180.
 - **Jana B, Andrnowska A and Kucharsky J** (2001) Immunoreactivity of iNOS in porcine uterus after infusions of Escherichia coli endotoxin *Folia Histochemical Cytobiology* **39(2)** 177-178
 - **Jiang J, Xie G, Chen Y, Liu D, Qiu J, Zhou J, Zhu P and Wang Z.** (2001). Intra-hepatic expression of scavenger receptor and CD14 and their relationship with local inflammatory responses in endotoxemia in mice. *Shock* **16(1)**: 75-80.
 - **Karima R, Matsumoto S, Higashi H and Matsushima K.** (1999). The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Molecular Medicine Today*, March: 123-132.
 - **Katzung, BG.** (1992). Basic and clinical Pharmacology. Publisher: Appleton and Lange. 5th edition. **Chapter 18**: 263-277.
 - **Keaney JF Jr, Simon DI, Stamler JS.** (1993). NO forms an adduct with serum albumin that has endothelium-derived relaxing factor like properties. *J. Clin Invest.* **91**: 1582-1589.
- Kelly RA, Balligy J-L and Smith TN.** (1996). Nitric oxide and cardiac function.

Circ. Res. **79**: 363-380.

- **Klatt P, Pfeifer S and List BM.** (1996). Characterization of heme-dependent neuronal nitric oxide synthase reveals role for heme in subunit dimerization and binding of amino acid substance and tetrahydrobiopterin. *J. Biol. Chem.* **271**: 7336-42.
- **Kleinfeld RG, O'Shea JD.** (1983). Spatial and temporal patterns of deoxyribonucleic acid synthesis and mitosis in the endometrial stroma during decidualization in the pseudopregnant rat. *Biol Reprod. Apr*; **28 (3)**: 691-702.
- **Kobzik L, Reid MB, Bredt DS and Stamler JS.** (1994). Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* **372**: 546-8.
- **Kwon NS, Nathan CF, Gilker C, Griffith OW, Matthews DE and Stuehr DJ.** (1990). L-citrulline production from L-arginine by macrophage nitric oxide synthase. The ureido oxygen derives from dioxen. *J. Biol, Chem* **265**: 13442-45.
- **Lachman E, Pitsoe SB and Gaffin SL.** (1984). Anti-lipopolysachaccharide immunotherapy in management of septic shock of obstetric and gynaecological origin. *Lancet* **1(8384)**: 981-983
- **Liew FY.** (1994). Regulation of nitric oxide synthesis in infectious and autoimmune diseases. *Immunology Letters* **43**: 95-98.
- **Lim KJH, Odukoya OA, Li TC and Cooke ID.** (1996). Cytokines and immuno-endocrine factors in recurrent miscarriage. *Human Reproduction Update.* **2 (6)**: 469-481.

- Lin AH, Bienkowski MJ and Gorman RR.** (1989). Regulation of prostaglandin H synthase mRNA levels and prostaglandin biosynthesis by platelet-derived growth factor. *J. Biol. Chem.* **264 (29)**: 17379- 17383.
- **Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russel SW and Murphy WJ.** (1993). Macrophage NO synthase gene: Two upstream regions induction by interferon-3 and lipopolissacharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 9730-4.
- Marsden P, Heng H, Scherer S, Stewart R and Scappert K.** (1993). Chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J. Biol. Chem.* **268**: 17478-88.
- Michel T, Li GK and Busconi L.** (1993). Phosphorilation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 6252-56.
- Misko TP, Moore WM, Kasten TP, Nickols GA, Corbett JA, Tilton RG, McDaniel ML, Williamson JR and Currie MG.** (1993). Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *European Journal of Pharmacology* **233(1)**: 119-125.
- **Moncada S.** The 1991 Ulf Euler Lecture. The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta Physiol. Scand.* **145**: 201.
- Moncada S, Palmer RMJ and Higgs EA.** (1991). Nitric oxide: Physiology, Pathology and Pharmacology. *Pharmacological Reviews* **43 (2)**: 109-42.
- **Morris NH, Sooranna SR, Learmont JG, Poston L, Ramsey B, Peason JD and Steer PJ.** (1995). Nitric oxide synthase activities in placental tissue from

normotensive, preeclamptic, and growth retarded fetuses. *Br. J. Obstet. Gynecol.* **102**: 711-714.

Mustonen T, Teravainen H. (1971). Synaptic connections of the paracervical Frankenhauser ganglion of the rat uterus examined with the electron microscope after division of the sympathetic and sacral parasympathetic nerves. *Acta Physiol Scand. Jun*; **82(2)**: 264-7.

- **Nakaya Y, Yamamoto S, Hamada Y, Kamada M, Aono T and Niwa M.** (1996). Inducible nitric oxide synthase in uterine smooth muscle. *Life Science* **58(13)**: 249-255.
- **Nathan C.** (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**: 3051-3064.
- **Nathan C and Xie QW.** (1994). Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **269**: 13725-28.
- **Neal, HV, Rand HW.** (1943). In: Comparative anatomy, ed. Blakinston's son & Co, Inc. USA
- Nervegna C., Ogando D., Farina M., Ribeiro M.L., Gimeno M. and Franchi A.** (1999). Implications of prostaglandin in term and post-term labor. *Medical Science Research* **27 (1)**: 67-69.
- **Norman JE and Cameron IT.** (1996). Nitric oxide in the human uterus. *Reviews of Reproduction* **1**: 61-68.
- **Novaro V, Gonzalez E, Jawerbaum A et al.** (1997). Nitric oxide synthase regulation during embryonic implantation. *Reprod. Fert. Dev.* **9**: 557-564.

- **Nowicki B, Fang L, Shinghal J, Nowicki and Yallampalli C.** (1997). Lethal outcome of uterine infection in pregnant but not in non pregnant rats and increased death rate with inhibition of nitric oxide. *American Journal of Reproduction Immunology* **38(4)**: 309-312.
 - **Nunokawa Y, Ishida N and Tanaka S.** (1993). Cloning of inducible nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **191**: 89-94.
 - **Oswald IP, Gazzinelli RT, Sher A and James SL.** (1992). IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor-2 to inhibit macrophage cytotoxic activity. *Journal of Immunology* **148**: 3578-82.
- Padykula HA.** (1981). Shifts in uterine stromal cells populations during pregnancy and regresión. In: Glasser SR, Bullock Dw, eds. Cellular and Molecular Aspects of Implantation. New York, Plenum Press: 197-216.
- **Parr MB and Parr EL.** (1989). The implantation reaction. In Wynn RM and Jollie, WP (eds) *Biology of the uterus* 2nd edn. Plenum New York pp. 233-267
 - **Pollock JS, Forstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt H, Nakane M and Murad F.** (1991). Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88(23)**:10480-4.
- Psychoyos A.** (1973). Hormonal control of ovoimplantation. *Vitam. Horm.* **31**: 201-256.
- **Purcell TL, Given R, Chwalisz K and Garfield RE.** (1999). Nitric oxide synthase

distribution during implantation in the mouse. *Molecular Human Reproduction* **5(5)**: 467-475.

- **Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA.** (1991). Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys.* **288**: 481-487.
- **Radi R, Rodriguez M, Castro L, Telleri R.** (1994). Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* **308**: 89-95.
- **Radi RE, Beckman JS, Bush KM, and Freeman BA.** (1991) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. *J. Biol. Chem.* **266**: 4244 –4250.
- **Raghupathy R.** (1997). Th1-Type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunology Today* **18(10)**: 478-482.
- **Rengasamy A and Johns AR.** (1994). Regulation of nitric oxide synthase by nitric oxide. *Mol. Pharmacol.* **44**: 124-128.

Ribeiro ML, Perez Martinez S, Farina M, Ogando D, Gimeno M and Franchi AM. (1999). The effect of epidermal growth factor on prostaglandin synthesis of oestrogenized rat uterus is mediated by nitric oxide. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **61(6)**: 353-358.

- **Roitt I, Brostoff J and Male D (Eds).** (2001). *Immunology Harcourt Publishers.*
- **Salter M, Knowles RG and Moncada S.** (1991). Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent nitric oxide synthases. *Federation of European Biochemical Societies* **291(1)**: 145-149.

- **Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG and Needleman P.** (1993). Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* **90(15)**: 7240-7244.
- **Schmidt SH and Walter U.** (1994). NO at work. *CELL* **78**: 919-925.
- **Schmidt SHH, Gagne GD, Nakane M, Pollock JS, Miller MF and Murad F.** (1992). Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitriergic signal transduction. *J. Histochem. Cytochem* **40**: 1439-56.
- **Schmidt SHH, Pollock JS, Nakane M, Gorsky LD, Forstermann U and Murad F.** (1991). Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **88**: 365-369.
- **Schulz R and Triggle C.** (1994). Role of NO in vascular smooth muscle and cardiac muscle function. *TIPS* **15**: 255-259.
- **Sessa WC, Barber CM and Lynch K.** (1993). Mutation of N-myristoylation site converts endothelial cell nitric oxide synthase from a membrane to a cytosolic protein. *Circ. Res.* **72**: 921-924.
- **Sessa WC, Harrison JK, Barber CM, Zeng D, Durieux ME, D'Angelo DD, Lynch KR and Peach MJ.** (1992). Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **267**: 15274-76.
- **Sharknes RC and Harper JK** (1972). Relationship between endotoxin-induced abortion and the synthesis of prostaglandin F. *Prostaglandins.* **191**: 191-203.

- **Sladek SM, Magness RR and Kirk PC.** (1997). Nitric oxide and pregnancy. *American Journal of Physiology* **272**: 441-463.
- **Springall DR, Rivero-Moreno V, Buttery L, Suburo A, Bishop AE, Merret M, Moncada S and Polak JM.** (1992). Immunological detection of nitric oxide synthase (s) in human tissues using heterologous antibodies suggesting different isoforms. *Histochem* **98**: 259-266.
- **Stamler JS.** (1992). Redox signalling: nitrosylation and related interactions of nitric oxide. *Cell* **78**: 931-936.
- **Stjernquist M and Sjoberg NO.** (1994). Neurotransmitters in the myometrium. In *The Uterus* pp 193-229. Eds T Chard and JG Grudzinkas. Cambridge University Press, Cambridge.
- **Strunk V, Hahnenmp K, Schneuing M, Fisher LG, Rich GF.** (2001). Selective iNOS inhibition prevents hypotension in septic rats while preserving endothelium-dependent vasodilation. *Anesth Analg.* 2001. **92(3)**:681-7.
- **Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF and Nathan CF.** (1991). Purification and characterization of the cytokine induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD and FMN-containing flavoprotein. *Proc. Natl. Acad Sci USA* **88**: 7773-77.
- **Su Z, Blazing MA, Fan D and Geoge SE.** (1995). The calmodulin-nitric oxide synyhase interaction: critical role of the calmodulin latch domain in enzyme activation. *J. Biol. Chem.* **270**: 29117-22.
- **Thellin O, Coumans B, Zorzi W, Igout A and Heinen E.** (2000). Tolerance to

the feto-placental "graft": ten ways to support a child for nine months. *Current Opinion in Immunology* **12**: 731-737.

Tracey WR, Pollock JS, Murad F, Nakane M and Forstermann U. (1994).

Identification of an endothelial-like type III NO synthase in LLC-PK1 kidney epithelial cells. *Am. J. Physiol* **266**: C22-28

Trachtman H, Futterweit S, Garg P et al. (1996). Nitric oxide stimulates the activity of a 72-kDa neutral matrix metalloproteinase in cultured rat mesangial cells. *Biochem Biophys. Res. Comm.* **218**: 704-708.

- **Tsai AL, Sanduja R and Wu KK.** (1991). Evidence for two pools of prostaglandin H synthase in human endothelial cells. *Adv. Prostag. , Tromb. and Leukotr. Res.* **21**: 141-144.

Underhill DM and Ozinsky A. (2002). Toll-like receptors: key mediators of microbe detection *Current Opinion in Immunology* **14**: 103-110.

Vodovotz Y, Bogdan C, Paik J, Xie QW, and Nathan CF. (1993). Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor 2. *J. Exp. Med.* **178**: 605-613.

Vodovotz Y, Russel D, Xie QW, Bogden C and Nathan CF. (1995). Vesicle membrane association of nitric oxide synthase in primary mouse macrophages. *J. Immunol* **154**: 2914-25.

- **Wang YY, Tawfik O and Wood GW.** (1998). Endotoxin induced abortion in mice is mediated by activated fetal macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* **63(1)**: 40-50.

Ware LB and Matthay MA. (2000). The acute respiratory distress syndrome.

New England Journal of Medicine **342**: 1334-39.

Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG and Moncada S.

(1994). Induction of calcium-dependent nitric oxide synthase by sex hormones.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 5212-16.

– **White KA and Marletta MA.** (1992). Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. *Biochem* **314**: 6627-31.

– **Wink DA, Cook JA, Kim S, Vodovotz Y, Pacelli R, Kirshna MC, Russo A, Mitchell JB, Jourdeuil D, Miles AM and Grisham MB.** (1997). Superoxide modulates the oxidation and nitrosation of thiols by nitric oxide derived reactive intermediates. *J. Biol. Chem* **272**: 11147-51.

Wu KK. (1995). Inducible Cyclooxygenase and Nitric Oxide Synthase. *Advances in pharmacology* **33**: 179- 207.

– **Xie Q-W, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T and Nathan C.** (1992). Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* **256**: 225-228.

– **Xu C, Mao D, Holers VM, Palance B, Cheng AM, Molina H.** (2000). A critical role for murine complement regulator Crry in the fetomaternal tolerance. *Science* **287**: 498-501.

– **Xu WM, Charles IG, Moncada S, Gorman P, Liu L and Emson P.** (1993b). Chromosomal assignment of the inducible NOS gene and endothelial NOS gene to human chromosome 17p11-17a11 and chromosome 7, respectively. *Endothelium (Suppl.)* **1**: 54.

– **Xu WM, Gorman P, Sheer D and Emson P.** (1993a). Regional localization of the

gene coding for human brain nitric oxide synthase (NOS1) to 12q24.2--24.31 by immunofluorescent in situ hybridisation. *Cytogenet. Cell. Genet* **64**: 62-63.

Yallampalli C, Izumi H, Byam-Smith M and Garfield RE. (1994). An L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate system exists in the uterus and inhibits contractility during pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **170**: 175-185.

