

Efecto de los donadores de óxido nítrico en la inducción de la maduración cervical

GABRIEL ARTEAGA-TRONCOSO,^a MARCELA LÓPEZ-HURTADO,^a FERNANDO GUERRA-INFANTE^a

RESUMEN

Los nitratos orgánicos o ésteres del ácido nítrico, tales como el dinitrato de isosorbide, trinitrato de glicerilo y nitroprusiato de sodio, son una nueva clase de compuestos utilizados para inducir la maduración cervical. Su eficacia se basa en la capacidad que tienen para ser bioactivados en el sistema de óxido nítrico para relajar al músculo liso vascular. Los experimentos químicos han implicado tanto a las riboflavinas como a los tioles en la activación de los nitratos orgánicos. Aunque existe una gran cantidad de estudios biológicos que sugieren que el óxido nítrico puede formarse a partir de los nitratos orgánicos en el medio ambiente intracelular, el mecanismo químico de las células endoteliales de cuello uterino, mediante el cual ocurre, aún no se ha establecido. En este artículo se revisan las posibles interacciones entre los nitratos orgánicos, flavinas y tioles, como un medio para determinar el papel que pueden desempeñar estas especies bioquímicas en la producción de óxido nítrico y la maduración cervical.

PALABRAS GUÍA: Óxido nítrico, maduración cervical, inducción.

INTRODUCCIÓN

Las células endoteliales producen y liberan distintos agentes vasoactivos que regulan el tono del músculo liso vascular. Uno de estos agentes es la molécula lábil llamada, factor relajante derivado del endotelio (EDRF, por sus siglas en inglés)¹ y que ha sido identificado como óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés). Las evidencias bioquímicas demuestran que el endotelio vascular mantiene una cierta producción de NO en situación

basal, pero que bajo condiciones especiales, el NO actúa como un potente vasodilatador endógeno cuya vida media es muy corta. Las propiedades paramagnéticas de NO (como tener una cantidad impar de electrones) contribuyen a que tenga afinidad por el grupo hemo, lo que explica que NO se asocie a dicho grupo en la guanilato ciclasa (GC).² Dicha unión provoca un incremento substancial de la producción de Monofosfato de Guanocín cíclico (GMPC) en las células blanco del endotelio vascular.³ La vasorrelajación se produce a partir de la modulación del GMPC dependiente de las proteínas cinasas, de la fosforilación/defosforilación de las cadenas ligeras de miosina y del control de los canales iónicos K^+ Ca con la homeostasis del calcio intracelular.^{4,5}

Los donadores de óxido nítrico o compuestos orgánicos con grupo funcional éster, tales como

^a Departamento de Infectología e Inmunología, Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes (INPerIER), Secretaría de Salud.

Correspondencia:

Dr. Gabriel Arteaga. Depto. de Infectología e Inmunología, INPerIER. Montes Urales 800, Col. Lomas de Virreyes, C.P. 11000, México, D.F.

Recibido: 29 de abril de 2008.

Aceptado: 04 de mayo de 2008.



trinitrato de glicerilo (GTN, por sus siglas en inglés), dinitrato de isosorbide y el tetranitrato de pentaeritritol (PETN, por sus siglas en inglés), tienen propiedades farmacológicas similares y, al igual que la nitroglicerina, son con frecuencia prescritos en el tratamiento de una variedad de trastornos vasculares cardiacos. Los nitratos orgánicos son metabolizados reductivamente hasta liberar NO, el cual conduce la activación de la GC y la catálisis en la conversión del GTP a GMPc, el segundo mensajero implicado en mediación de NO.⁶ El incremento de los niveles de GMPc conduce a la relajación de la musculatura lisa como resultado del metabolismo de NO.⁷⁻⁹ Además, los nitratos orgánicos pueden participar en la ruta endógena de la producción de NO por las células endoteliales para mantener el tono vascular.¹⁰⁻¹² Esto ha conducido el interés por explorar la actividad metabólica de NO y el uso clínico de las drogas nitrovasodilatorias como potenciales inductores de la relajación endocervical.¹³ En esta revisión se pretende mostrar el efecto de las drogas donadoras de óxido nítrico en la actividad metabólica de la generación de NO, el cual puede servir de base para el entendimiento de la bioactivación/relajación que realizan las células endoteliales de la musculatura lisa del cérvix.

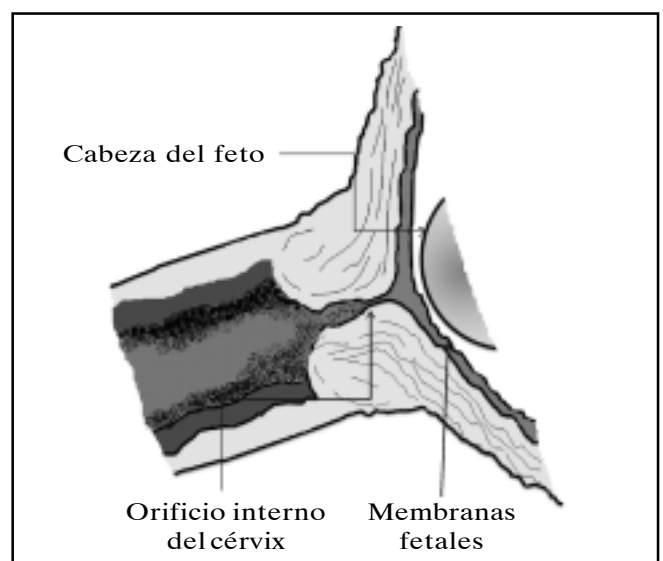
LA MADURACIÓN DEL CÉRVIX

El cérvix humano se compone de 10 a 15% de células de musculatura lisa y de 85 a 90% de tejido conectivo.¹⁴ El endotelio vascular presenta una fina capa de epitelio de forma columnar que recubre al canal del endocérvix y que contiene una gran cantidad de glándulas ramificadas; mientras que el estroma muestra una matriz extracelular, principalmente de proteínas de colágena de tipo I y III.^{15,16} Además, el colágeno de tipo IV está presente en las células musculares lisas y en las paredes de los vasos sanguíneos.¹⁷ Las fibras de colágeno proporcionan la rigidez que puede ser rápidamente substituida por colagenasas, aunque la fuente y el control de estas enzimas aún no han sido completamente entendidas.¹⁶ La matriz está compuesta por agua,

glicosaminoglicanos y protoglicosaminoglicanos, así como de sulfato de dermatan, ácido hialurónico y sulfato de heparan.¹⁵ La elastina y fibronectina se localizan entre las fibras de colágeno y forman una capa delgada de proteínas debajo del epitelio. La maduración cervical es el proceso que permite que el cuello uterino cambie de estructura y que se modifique de ser una estructura perfectamente cerrada para mantener un embarazo intrauterino, a un órgano compatible con la dilatación que facilite el paso del feto. Una disminución en el contenido de colágeno acompañado por un aumento de agua y ácido hialurónico, permite el ablandamiento del cuello uterino inmediatamente antes y durante el parto. Los cambios estructurales que muestra el cérvix durante el trabajo de parto aparecen en dos fases: 1) maduración, en donde se presenta la reorganización del colágeno, y 2) dilatación. La maduración cervical es la parte fundamental de la fase que condiciona el alumbramiento y ocurre

Figura 1.

El orificio interno del cérvix donde comienza la maduración cervical se localiza muy cerca de las membranas fetales. La rigidez del cuello del útero se debe en gran medida a la presencia de colágenos y, por lo tanto, éstos son susceptibles al ablandamiento por acción de las colagenasas I y III.



independientemente de las contracciones uterinas.^{15,18} El orificio interno del cérvix donde comienza el proceso de maduración se muestra en la figura 1. La dilatación cervical implica una reacción inflamatoria y la presencia de una compleja cascada de enzimas degradativas que acompañan al nuevo arreglo de proteínas de matriz extracelular y de glicoproteínas.^{15,19-21} La hiperplasia y la hipertrofia de los fibroblastos, así como la creciente hidratación del tejido de la región cervical, son los cambios anatómo-fisiológicos que ocurren al final de la gestación.¹⁵

ASPECTOS FISIOLÓGICOS DEL CONTROL DE LA DILATACIÓN CERVICAL

La maduración del cérvix comienza antes de la aparición de las contracciones y del trabajo de parto. La maduración cervical es el resultado de una serie de complejos procesos bioquímicos que termina con la reorganización y reestructuración de las moléculas de colágeno, lo que provoca que el cuello del útero se adelgace, suavice, relaje y dilate como respuesta del inicio de las contracciones uterinas.

En la última etapa del embarazo, las enzimas catabólicas inician la degradación del colágeno y de otras proteínas estructurales de matriz externa.^{15,16} El incremento en la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α , por sus siglas en inglés) y de interleucina 1 beta (IL-1 β), produce un aumento de la expresión de las moléculas de adhesión endotelial y extravasación de neutrófilos en el estroma del cuerpo cervical. También se ha observado que altas concentraciones de ácido hialurónico correlacionan con la inducción de IL-1 β y TNF- α .²² Un aumento en la concentración de IL-1 β se asocia con la expresión de los mensajeros para interleucina 6 (IL-6) en el cérvix. La IL-6 y la expresión del RNAm de interleucina 8 (IL-8) en la decidua del corion, así como la presencia de IL-1 β e IL-8 en el amnios, condicionan el inicio del trabajo de parto.^{23,24} Inclusive, la presencia de otras células positivas para IL-8 (localizadas en el cérvix humano) tales como las de origen estromal, macrófagos y granulocitos, pueden participar durante el trabajo de parto.^{23,25} Cabe señalar que los niveles de IL-8

de origen cervical se correlacionan con la liberación de colagenasas (metaloproteasas de matriz cervical-8), que son las enzimas que también modulan las proteínas de matriz extracelular.^{23,25-28} El aumento de la síntesis de IL-8 estimula la producción de progesterona (PG) y leucotrienos, lo que provoca la dilatación de los vasos sanguíneos del cérvix y favorece el reclutamiento de leucocitos.²² La presencia de las células polimorfonucleares activadas en fase de degranulación, siempre acompaña a la lisis de las proteínas de matriz extracelular.¹⁵ Después de la degranulación de los neutrófilos, las proteasas encuentran una red desestabilizada de fibras de colágeno. La acción de las enzimas sobre las células estromales tiene un tiempo limitado, el cual se controla por la concentración de proteínas inhibitorias de proteasas presentes en el tejido.²² La metaloproteasa de matriz 8 (MMP-8) parece correlacionar con la maduración cervical (localizada principalmente en el tejido estromal) a diferencia de las metaloproteasas de matriz 1 y 3.^{21,29} La utilización de interleucina 8 exógena ha sido exitosa para madurar farmacológicamente al cérvix de algunas especies animales.^{30,31}

Por otra parte, la PG parece estar implicada en el control de la maduración/dilatación cervical, sobre todo por los resultados obtenidos en animales y humanos utilizando anti-progestágenos.^{32,33} La retirada funcional de la progesterona condiciona y prepara el inicio del trabajo de parto, es decir, un cambio en la afinidad receptor-ligando de la PG y la disminución en la concentración de la misma en el miometrio y/o en el cérvix. Los resultados preliminares sostienen la hipótesis de que el retiro de la hormona puede tomar lugar en el miometrio humano, vía los cambios en la expresión de co-activadores de los receptores de progesterona,³⁴ o por la ruta de la expresión diferencial de las isoformas del receptor.^{35,36} Estos resultados soportan la idea de que la desaparición de progesterona puede ocurrir a través de receptores, facilitando así la respuesta de retroalimentación de la hormona a nivel de la hipófisis anterior.

Otros mediadores no hormonales que participan en la maduración/dilatación cervi-



cal incluyen las prostaglandinas, la IL-8^{15, 16} y las uterotoninas, como la oxitocina y la endotelina 1, y que son mediadores independientes de la progesterona. Quizás también la proteasa secretoria inhibitoria de leucocitos (SLPI: presente en el moco cervical durante la fase de maduración),³⁷ sea un poderoso inhibidor de la función de neutrófilos con efecto antagonista de la acción de IL-8.³⁸ Además, el factor activador de plaquetas (PAF, por sus siglas en inglés), que es una citocina pro-inflamatoria que acelera la colagenólisis por la vía de la inducción de la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1, por sus siglas en inglés) y que regula la sobre activación del linfocito T RANTES positivo.³⁹ Finalmente, varios neuropéptidos, como la sustancia P, capsaicina, neuroquinina A, el péptido relacionado al gen de calcitonina y la secretoneurina, son productos que pueden contribuir eficientemente en la maduración del cérvix.⁴⁰

EL ÓXIDO NÍTRICO ES ESTIMULADO EN EL CÉRVIX DURANTE EL TRABAJO DE PARTO

El NO representa el final de la ruta metabólica en la maduración del cérvix siendo acompañada por la biosíntesis de prostaglandinas. Se ha identificado en las secreciones vaginales de mujeres en trabajo de parto pretérmino una alta concentración de productos metabólicos del óxido nítrico (NOx).⁴¹ Aunque se desconoce la fuente de estos metabolitos, es posible que las células inflamatorias que infiltran al tejido, así como las células que están presentes en el cérvix pueden ser las responsables de la síntesis de NO. El NO puede inducir la muerte celular por apoptosis,^{19,42} pero también activar las MMPs.^{43,44} Es así que la sobreproducción de NO puede estar relacionada con la maduración del cérvix, fragilidad de las membranas y el subsecuente inicio de trabajo de parto prematuro.

La producción de NO endógeno ha sido detectada en el cérvix de diferentes especies siendo regulado negativamente durante la gestación y sobre regulado en la labor de parto. Los estudios realizados en animales

demuestran que NO se asocia con la inducción de la maduración cervical y con la elevación de la liberación de la molécula durante el trabajo de parto.^{45,46} El NO comparte con el TNF- α la habilidad para iniciar y/o bloquear el proceso de apoptosis dependiendo del ciclo celular y de múltiples factores que hasta el momento no han sido identificados.⁴² A pesar de que el NO es una sustancia apoptótica que puede desviar el ciclo celular también puede permitir la reorganización del colágeno.^{45,47}

Asimismo, el óxido nítrico, en armonía con PGE2, puede inducir la vasodilatación local, aumentar la infiltración vascular, la permeabilidad del leucocito y regular directamente la actividad y producción de MMPs.^{48,49} Aunque Ledingham y cols. demostraron que la secreción de MMP-2 y MMP-9 en fibroblastos de origen cervical no fueron reguladas por la sobre producción de NO.⁵⁰

SÍNTESIS DEL ÓXIDO NÍTRICO ENDÓGENO

El óxido nítrico endógeno es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina y esta síntesis es catalizada por la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS, por sus siglas en inglés) en presencia de oxígeno molecular, fosfato nicotinamida adenina dinucleótido (NADPH, por sus siglas en inglés) y varios co-factores tetrahidrobiopterinos. Además, la producción de NO intracelular es estimulada por la unión de calcio con la calmodulina en las células endoteliales. Las tres isoformas de la sintetasa de óxido nítrico (NOSn, NOSi y NOSe, por sus siglas en inglés) están presentes en el cérvix humano:⁵¹⁻⁵³

- La sintetasa de óxido nítrico neuronal (NOSn o NOS I), localizada en el estroma y las células epiteliales.⁵³
- La sintetasa inducible (NOSi o NOS II) presente en neuronas, endotelio vascular y macrófagos activados, así como en células epiteliales y el estroma de las células fusiformes del cérvix.
- La enzima endotelial (NOSe o NOS III), identificada en el endotelio vascular.⁵¹

Originalmente, la NOS fue descubierta como un activador enzimático que cataliza la síntesis del óxido nítrico a partir de L-arginina.⁵⁴ Bredt y cols. fueron los primeros investigadores en publicar el clonaje molecular de la NOS, señalando la existencia de tres sitios de unión para los co-factores oxidativos (NADPH, FAD, FMN), así como la secuencia consenso para un sitio de unión a la calmodulina.⁵⁵ La secuencia carboxi terminal de la NOS es semejante a la citocromo P-450 reductasa y, de hecho, la NOS en el cerebelo puede funcionar como una citocromo P-450 reductasa.⁵⁶ El ADN complementario de NOSe fue la última de las tres isoformas que fue clonada y es altamente homóloga a las otras dos.⁵⁷ En humanos, la NOSe es codificada por una sola copia del genoma localizado en el cromosoma 7q35-36.⁵⁸ El ADN genómico codifica para una proteína de 1294 aa con un peso molecular de 135 kDa y se expresa en las células endoteliales que limitan la vasculatura del tejido conectivo. La actividad química del NO producido por la vía de la NOS, radica en el hecho de activar la ruta de la guanilato ciclasa soluble (GCs), provoca el incremento en la síntesis del GMPc resultante a nivel intracelular, lo que a su vez induce la relajación de las células subendoteliales de la musculatura lisa, así como las venas en el cerebro y corazón, e inhibe la agregación y la adhesión plaquetaria.⁵⁹ Sólo la NOS tipo I y III se expresan constitutivamente dependiendo de los niveles de calcio y calmodulina; mientras que la formación de NOSi requiere la síntesis de *novo*, independientemente de los niveles de calcio y mediado por algunas citocinas (IFN- γ y TNF- α), de lipopolisacáridos bacterianos y de procesos de estrés oxidativo e inflamación.^{60,61}

El modelo de ratón transgénico para NOSe ha permitido explorar el papel de la enzima en la regulación de la presión sanguínea y su localización en los tejidos.⁶²⁻⁶⁴ Estos estudios muestran los sitios de sobreexpresión de NOSe en las células de la vasculatura lisa del corazón, pulmones y útero, con niveles de expresión más bajos en cerebro, cerebelo e hígado. Sin embargo, la producción de NO por la acción NOS en el endotelio de estos animales se observa claramente reducida cuando es

mediada por los vasodilatadores nitrogenados. Estos animales muestran un estado de hipotensión permanente, pero sin incremento en el volumen de orina excretado ni aumento de la frecuencia cardíaca.

Por el contrario, los ratones “*knock-out*” para el gen NOSe muestran el fenotipo de hipertensión con modificaciones en el comportamiento, anormalidad cardíaca a nivel de válvulas y resistencia a la insulina; además presentan alta sensibilidad a la acción contráctil inducida por agonistas β -adrenérgicos. A partir de estos estudios se ha propuesto el papel dual de la sintetasa de óxido nítrico endotelial, ya que se encuentra implicada no únicamente en la regulación de la presión arterial, sino también en la homeostasis de lípidos, glucosa y angiogénesis.⁶⁵⁻⁶⁷

LOS DONADORES DE ÓXIDO NÍTRICO Y LA MADURACIÓN DEL CÉRVIX

La nitroglicerina (GTN, por sus siglas en inglés) fue introducida como un agente terapéutico de la angina de pecho. Otros compuestos orgánicos con grupo funcional nitrato éster (-O-NO₂), como el dinitrato de isosorbide y el tetranitrato de pentaeritritol tienen propiedades farmacológicas similares y al igual que la GTN son prescritos en el tratamiento de una variedad de afectaciones cardíacas y vasculares.⁶⁸

Los nitratos orgánicos son reducidos hasta producir NO, los cuales conducen la activación de la guanilato ciclasa. La GC cataliza la conversión de GTP a GMPc e incrementa las concentraciones a nivel intracelular que conducen a la relajación de las células endoteliales de la musculatura lisa.^{7-9,69-71} Por lo tanto, la actividad de los nitratos éster está relacionada con el metabolismo de NO. Estos productos biorreactivos también pueden participar en la ruta endógena de la producción de NO para mantener el tono de la vasculatura lisa.¹⁰⁻¹²

Los estudios previos indican que la bioactivación de los nitratos éster a NO, puede ser un proceso enzimático que posiblemente involucra al sistema del citocromo P-450 y/o a los grupos tioles que requieren glutatona



(GSH) para la reducción.⁷²⁻⁷⁶ Además, la activación de los nitratos éster puede ser mediada por las flavoproteínas asociadas a la membrana celular.⁷⁷ Durante la intimidad química entre los grupos tioles y las flavinas (flavin mononucleótido, FMN; flavin adenina dinucleótido, FAD) es posible la catálisis de los nitratos éster por NAD(P)H para reducir a diferentes especies nitrogenadas, las cuales son precursoras de la formación de NO.⁷⁸

Los estudios químicos proveen la evidencia de que el nitrato éster orgánico puede ser reducido en presencia de nucleótidos pirimídicos y de flavinas a nitrito éster. A nivel bioquímico, es posible que este primer paso en la activación de los nitratos éster, sea capaz de integrar a las flavoproteínas transmembranales a manera de que la catalización potencialice los nitritos para la producción de NO. Sin embargo, debido a que los nitratos éster son más estables a la hidrólisis que los nitritos, el papel de los nitratos éster puede ser actuar a manera de “escudo protector” para el nitrito orgánico, hasta que éste sea introducido totalmente a la célula endotelial.^{79,80}

Después de ser formado, el nitrito éster se hidroliza para dar un hidrógeno, una molécula con grupo alcohol y el nitrito inorgánico, el cual reacciona con la GSH en presencia de la

glutaciona S-transferasa, para formar S-nitroglutaciona (GSNO). Esta posibilidad también integra la idea de que la glutaciona S-transferasa puede estar involucrada a través de su habilidad para catalizar la formación S-nitrosotioles a partir de GSH y de los nitritos éster endógenos. Basado en estas observaciones, la figura 2 resume el mecanismo posible de la bioactivación de los ésters orgánicos para inducir la relajación del cérvix, en las siguientes etapas:

- Captación de los nitratos éster por las células endoteliales de la musculatura lisa.
- Difusión de los compuestos estéricos dentro de la célula y reducción a nitritos orgánicos por la acción de algunas proteínas unidas a la membrana, tales como las flavoproteínas.
- Reacción entre la GSH y los nitritos éster para formar GSNO, catalizada por la GSH S-transferasa.
- Liberación mediada por GSNO de las moléculas de NO por una variedad de mecanismos bioquímicos aún no descritos a nivel cervical.^{81,82}

En modelos animales los medicamentos donadores de NO, resultan ser efectivos para inducir la maduración cervical.⁴⁵ Por su parte,

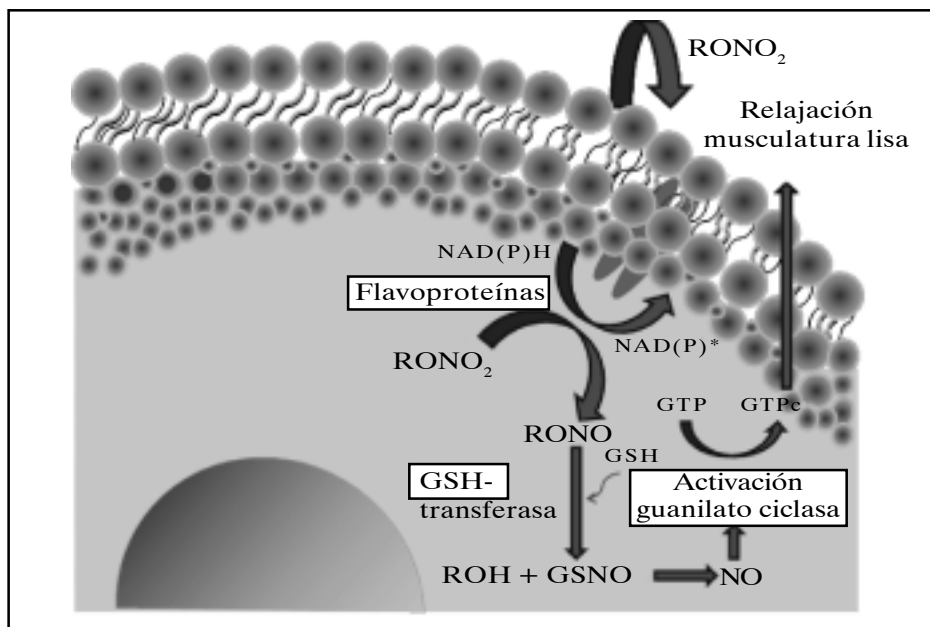


Figura 2.
Mecanismo propuesto en la bioreacción de los nitratos orgánicos hasta la reducción de NO y la inducción de la relajación.

los donadores de NO, como el mononitrato de isosorbide,^{48,83-87} nitroprusiato de sodio^{88,89} y trinitrato de glicerilo, cuando se aplican a mujeres por vía intravaginal o intracervical inducen la maduración del cérvix al final de la gestación.^{90,91} En general, los donadores de NO parecen ser menos efectivos para dilatar al cérvix que las PGs en gestaciones viables. Sin embargo, en gestaciones iniciales no viables, el dinitrato de isosorbide (IDN) resulta ser más efectivo y seguro que misoprostol para inducir la maduración cervical.¹³ El IDN, así como otros donadores de NO, son seguros y no muestran efectos adversos mayores en el feto y en la mujer.^{20,83,92-96}

CONCLUSIÓN

El uso terapéutico de las distintas drogas donadoras de óxido nítrico han mostrado tener una actividad efectiva para inducir la maduración del cérvix en las mujeres que así lo

requieren. Los nitratos estéricos pueden ser reducidos adecuadamente a nitritos en presencia de ciertas flavoproteínas de la membrana celular. La FMN y la FAD (formas químicas de flavoproteínas) son utilizadas por el sistema enzimático para catalizar la reducción del nitrato estérico NAD(P)H en la producción de diferentes especies de nitrógeno, las cuales son precursoras de la formación de NO. No obstante, que el óxido nítrico es un agente vasoactivo extremadamente potente que regula el tono de la vasculatura lisa, la baja producción metabólica de la molécula proveniente de los compuestos orgánicos con grupo funcional nitrato éster, permite que estos medicamentos puedan ser considerados en la terapéutica de la maduración cervical. Sin embargo, se requiere de mayor información en la literatura médica, antes de que pueda recomendarse su uso rutinario en los consultorios.

ABSTRACT

The organic nitrates or nitric acid esters, such as isosorbide dinitrate, glyceryl trinitrate and sodium nitroprusside, are a new class of compounds used to induce cervical ripening. Their effectiveness relies on their ability to be bioactivated to nitric oxide system for relaxing vascular smooth muscle. Biochemical assays have implicated both riboflavins and thiols in organic nitrate ester activation. Although there have been a lot of biological studies that suggest that nitric oxide can be formed from organic nitrate esters in intracellular environment, the chemical mechanism in endothelial cells from cervix by which this occurs has yet to be established. Thus, we reviewed the possible chemical interactions among organic nitrate esters, flavins, and thiols as a means of determine the role these species may play in nitric oxide production and cervical ripening.

KEYWORDS: Nitric oxide, cervical ripening, induction.

REFERENCIAS

1. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-6.
2. Ignarro LJ. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1990; 30: 535-60.
3. Craven PA, De Rubertis FR. Restoration of the responsiveness of purified guanylate cyclase to nitrosoguanidine, nitric oxide and related activators by heme and hemeproteins: Evidence for involvement of the paramagnetic nitrosyl heme complex in enzyme activation. *J Biol Chem* 1978; 253: 8433-43.



4. Rapaport RM, Draznin MB, Murad F. Endothelium-dependent vasodilator- and nitrovasodilator-induced relaxation may be mediated through cyclic GMP formation and cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Trans Ass Am Physicians* 1983; 96: 19-30.
5. Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 1991; 21: 361-74.
6. Ignarro LJ, Lippton H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL, Kadowitz PJ, Gruetter CA. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J Pharmacol Exp Ther* 1981; 218: 739-49.
7. Ignarro LJ. Heme-dependent activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide: Regulation of enzyme activity by porphyrins and metalloporphyrins. *Semin Hematol* 1989; 26: 63-76.
8. Schmidt HHHW, Lohman SM, Walter U. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1178: 153-75.
9. Murad F. Regulation of cytosolic guanylate cyclase by nitric oxide: the NO-cyclic GMP signal transduction system. *Adv Pharmacol* 1994; 26: 19-33.
10. Chung SJ, Fung HL. Identification of the subcellular site for nitroglycerin metabolism to nitric oxide in bovine coronary smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 253: 614-9.
11. Feelisch M, Kelm M. Biotransformation of organic nitrates to nitric oxide by vascular smooth muscle and endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 180: 286-93.
12. Michel T, Smith TW. Nitric oxide synthases and cardiovascular signaling. *Am J Cardiol* 1993; 72: 33C-8C.
13. Arteaga-Troncoso G, Villegas-Alvarado A, Belmont-Gomez A, Martinez-Herrera FJ, Villagarana-Zesati R, Guerra-Infante F. Intracervical application of the nitric oxide donor isosorbide dinitrate for induction of cervical ripening: a randomized controlled trial to determine clinical efficacy and safety prior to first trimester surgical evacuation of retained products of conception. *BJOG* 2005; 112: 1615-9.
14. Danforth DN. The morphology of the human cervix. *Clin Obstet Gynecol* 1983; 26: 7-13.
15. Leppert PC. Anatomy and physiology of cervical ripening. *Clin Obstet Gynecol* 1995; 38: 267-9.
16. Kelly RW. Inflammatory mediators and cervical ripening. *J Reprod Immunol* 2002; 57: 217-24.
17. Minamoto T, Arai K, Hirakawa S, Nagai Y. Immunohistochemical studies on collagen types in the uterine cervix in pregnant and nonpregnant states. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 156: 138-44.
18. Chwalisz K, Garfield RE. Role of nitric oxide in the uterus and cervix: implications for the management of labor. *J Perinat Med* 1998; 26: 448-57.
19. Leppert PC. Proliferation and apoptosis of fibroblasts and smooth muscle cells in rat uterine cervix throughout gestation and the effect of the antiprogesterone onapristone. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178: 713-25.
20. Maul H, Longo M, Saade GR, Garfield RE. Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery. *Curr Pharm Des* 2003; 9: 359-80.
21. Sennström MB, Brauner A, Byström B, Malmström A, Ekman G. Matrix metalloproteinase-8 correlates with the cervical ripening process in humans. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003; 82: 904-11.
22. Winkler M, Rath W. Changes in the cervical extracellular matrix during pregnancy and parturition. *J Perinat Med* 1999; 27: 45-60.
23. Osman I, Young A, Ledingham MA, Thomson AJ, Jordan F, Greer IA, Norman JE. Leukocyte density and pro-inflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term. *Mol Hum Reprod* 2003; 9: 41-5.
24. Sennström MB, Ekman G, Westergren-Thorsson G, Malmström A, Byström B,

- Endresen U, et al. Human cervical ripening, an inflammatory process mediated by cytokines. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 375-81.
25. Sakamoto Y, Moran P, Searle RF, Bulmer JN, Robson SC. Interleukin-8 is involved in cervical dilatation but not in prelabour cervical ripening. *Clin Exp Immunol* 2004; 138: 151-7.
 26. Osmers RG, Adelman-Grill BC, Rath W, Stuhlsatz HW, Tschesche H, Kuhn W. Biochemical events in cervical ripening dilatation during pregnancy and parturition. *J Obstet Gynecol* 1995; 21: 185-94.
 27. Osmers RG, Blaser J, Kuhn W, Tschesche H. Interleukin-8 synthesis and the onset of labor. *Obstet Gynecol* 1995; 86: 223-9.
 28. Sennström MB, Brauner A, Lu Y, Granström LM, Malmström AL, Ekman GE. Interleukin-8 is a mediator of the final cervical ripening in humans. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1997; 74: 89-92.
 29. Aronsson A, Ulfgrén AK, Stabi B, Stavreus-Evers A, Gemzell-Danielsson K. The effect of orally and vaginally administered misoprostol on inflammatory mediators and cervical ripening during early pregnancy. *Contraception* 2005; 72: 33-9.
 30. Garcia-Velasco JA, Arici A. Chemokines and human reproduction. *Fertil Steril* 1999; 71: 983-93.
 31. Chwalisz K, Benson M, Scholz P, Daum J, Beier HM, Hegele-Hartung C. Cervical ripening with the cytokines interleukin 8, interleukin 1 beta and tumour necrosis factor alpha in guinea-pigs. *Hum Reprod* 1994; 9: 2173-81.
 32. Garfield RE, Saade G, Buhimschi C, Buhimschi I, Shi L, Shi SQ, Chwalisz, K. Control and assessment of the uterus and cervix during pregnancy and labour. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 673-95.
 33. Neilson JP. Mifepristone for induction of labour. *Cochrane Database of Systematic Reviews*; 2004, p. 4.
 34. Condon JC, Jeyasuria P, Faust JM, Wilson JW, Mendelson CR. A decline in the levels of progesterone receptor coactivators in the pregnant uterus at term may antagonize progesterone receptor function and contribute to the initiation of parturition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 9518-23.
 35. Madsen G, Zakar T, Ku CY, Sanborn BM, Smith R, Mesiano S. Prostaglandins differentially modulate progesterone receptor-A and -B expression in human myometrial cells: evidence for prostaglandin-induced functional progesterone withdrawal. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1010-3.
 36. Stjernholm-Vladic Y, Stygar D, Månsson C, Masironi B, Åkerberg S, Wang H, Ekman-Ördeberg G, Sahlin L. Factors involved in the inflammatory events of cervical ripening in humans. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2: 74.
 37. Denison FC, Calder AA, Kelly RW. The action of prostaglandin E2 on the human cervix: stimulation of interleukin 8 and inhibition of secretory leukocyte protease inhibitor. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180: 614-20.
 38. Sallenave JM, Si Tahar M, Cox G, Chignard M, Gauldie J. Secretory leukocyte proteinase inhibitor is a major leukocyte elastase inhibitor in human neutrophils. *J Leukoc Biol* 1997; 61: 695-702.
 39. Sugano T, Narahara H, Nasu K, Arima K, Fujisawa K, Miyakawa I. Effects of platelet-activating factor on cytokine production by human uterine cervical fibroblasts. *Mol Hum Reprod* 2001; 7: 475-81.
 40. Collins JJ, Usip S, McCarson KE, Papka RE. Sensory nerves and neuropeptides in uterine cervical ripening. *Peptides* 2002; 23: 167-83.
 41. Nakatsuka M, Habara T, Kamada Y, Tada K, Kudo T. Elevation of total nitrite and nitrate concentration in vaginal secretions as a predictor of premature delivery. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182: 644-5.
 42. Brune B, von Knethen A, Sandau KB. Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur J Pharmacol* 1998; 351: 261-72.
 43. Yoshida M, Sagawa N, Itoh H, Yura S, Korita D, Kakui K, Hirota N, Sato T, Ito A, Fujii S. Nitric oxide increases matrix metalloproteinase-1 production in human



- uterine cervical fibroblast cells. *Mol Hum Reprod* 2001; 7: 979-85.
44. Biondi C, Pavan B, Lunghi L, Fiorini S, Vesce F. The role and modulation of the oxidative balance in pregnancy. *Curr Pharm Des* 2005; 11: 2075-89.
 45. Chwalisz K, Garfield RE. Regulation of the uterus and cervix during pregnancy and labor. Role of progesterone and nitric oxide. *Ann NY Acad Sci* 1997; 828: 238-53.
 46. Buhimschi I, Ali M, Jain V, Chwalisz K, Garfield RE. Differential regulation of nitric oxide in the rat uterus and cervix during pregnancy and labour. *Hum Reprod* 1996; 11: 1755-66.
 47. Leppert PC, Kokenyesi R, Klemenich CA, Fisher J. Further evidence of a decorin-collagen interaction in the disruption of cervical collagen fibers during rat gestation. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182: 805-11.
 48. Ekerhövd E, Weijdegard B, Brännström M, Mattsby-Baltzer I, Norström A. Nitric oxide induced cervical ripening in the human: Involvement of cyclic guanosine monophosphate, prostaglandin F(2 alpha), and prostaglandin E(2). *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186: 745-50.
 49. Maul H, Longo M, Saade GR, Garfield RE. The physiology of uterine contractions. *Clin Perinatol* 2003; 30: 665-76.
 50. Ledingham MA, Denison FC, Riley SC, Norman JE. Matrix metalloproteinases-2 and -9 and their inhibitors are produced by the human uterine cervix but their secretion is not regulated by nitric oxide donors. *Hum Reprod* 1999; 14: 2089-96.
 51. Tschugguel W, Schneeberger C, Lass H, Stonek F, Zaghulula MB, Czerwenka K, et al. Human cervical ripening is associated with an increase in cervical inducible nitric oxide synthase expression. *Biol Reprod* 1999; 60: 1367-72.
 52. Ledingham MA, Thomson AJ, Young A, Macara, LM, Greer IA, Norman JE. Changes in the expression of nitric oxide synthase in the human uterine cervix during pregnancy and parturition. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 1041-8.
 53. Bao S, Rai J, Schreiber J. Brain nitric oxide synthase expression is enhanced in the human cervix in labor. *J Soc Gynecol Investig* 2001; 8: 158-64.
 54. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333: 664-6.
 55. Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 1991; 351: 714-8.
 56. Klatt P, Heinzl B, John M, Kastner M, Bohme E, Mayer B. Ca²⁺/calmodulin-dependent cytochrome C reductase activity of brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1992; 267: 11374-8.
 57. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994; 78: 915-8.
 58. Marsden PA, Heng HHQ, Scherer SW. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial NO synthase. *J Biol Chem* 1993; 268: 17478-88.
 59. Kenneth KW. Regulation of endothelial nitric oxide synthase activity and gene expression. In: Chiueh CC, Hong JS, Kee LS (eds.). *Nitric Oxide. Novel actions, deleterious effects, and clinical potential.* *Annals New York Acad Sc* 962; 2002, p. 122-30,
 60. Ding Y, Vaziri ND. Calcium channel blockade enhances nitric oxide synthase expression by cultured endothelial cells. *Hypertension* 1998; 32: 718-23.
 61. Rodríguez-Mañas L, Sánchez-Rodríguez C, Vallejo S, El-Assar M, Peiró C, Azcutia V, Matesanz N, Sánchez-Ferrer CF, Nevado J. Pro-inflammatory effects of early non-enzymatic glycosylated proteins in human mesothelial cells vary with cell donor's age. *British J Pharmacology* 2006; 149: 979-87.
 62. Ohashi Y, Kawashima S, Hirata K, Yamashita T, Ishida T, Inoue N, et al. Hypotension and reduced nitric oxide-elicited vasorelaxation in transgenic mice over expressing endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 1998; 102: 2061-71.
 63. Bader M. Transgenic animal models for the functional analysis of vasoactive peptides. *Braz J Med Biol Res* 1998; 31: 1171-83.

64. Haperen RV, Cheng C, Mess BM, Van deel E, Waard M, Van Damme LCA, et al. Functional expression of endothelial nitric oxide synthase fused to green fluorescent protein in transgenic mice. *Am J Pathol* 2003; 163: 1677-86.
65. Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, et al. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 1995; 377: 239-42.
66. Shesely EG, Maeda N, Kim HS, Desai KM, Krege JH, Laubach VE, et al. Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 13176-81.
67. Albrerth E, Stegeman CA, Herringa P, Henning RH, Van Goor H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol* 2003; 199: 8-17.
68. Katzung BG Chatterjee K. Vasodilation and the treatment of angina pectoris. In: Katzung BG (ed.). *Basic and Clinical Pharmacology*. Appleton and Lange, Norwalk, CT; 1989, p. 1017.
69. Arnold WP, Mittal CK, Katsuki, S Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases 3',5'-monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 3203- 7.
70. Ignarro LJ, Barry BK, Gruetter DY, Ohlstein EH, Gruetter CA, Kadowitz PJ, Baricos WH. Selective alterations in responsiveness of guanylate cyclase to activation by nitroso compounds during enzyme purification. *Biochim Biophys Acta* 1981; 673: 394-407.
71. Kurz MA, Lamping KG, Bates JN, Eastham CL, Marcus ML, Harrison DG. Mechanisms responsible for the heterogeneous coronary microvascular response to nitroglycerin. *Circ Res* 1991; 68: 847-55.
72. Servent D, Delaforge M, Ducrocq C, Mansuy D, Lenfant M. Nitric oxide formation during microsomal hepatic denitration of glyceryl trinitrate: Involvement of cytochrome P-450. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 163: 1210-6.
73. Simon WC, Anderson DJ, Bennett BM. Inhibition of the pharmacological actions of glyceryl trinitrate after the electroporetic delivery of a glutathione S-transferase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 279: 1535-40.
74. Schroder H. Cytochrome P-450 mediates bioactivation of organic nitrates. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 262: 298-302.
75. Nigam R, Whiting T, Bennett BM. Effect of inhibitors of glutathione S-transferase on glyceryl trinitrate activity in isolated rat aorta. *Can J Physiol Pharmacol* 1993; 71: 179-84.
76. Nigam R, Anderson DJ, Lee SF, Bennett BM. Isoform-specific biotransformation of glyceryl trinitrate by rat aortic glutathione S-transferases. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 279: 1527-34.
77. McGuire JJ, Anderson DJ, Bennett BM. Inhibition of the biotransformation and pharmacological actions of glyceryl trinitrate by the flavoprotein inhibitor, diphenylethylidenehydrazide sulfate. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 271: 708-14.
78. Massey V. The chemical and biological versatility of riboflavin. *Biochem Soc Trans* 2000; 28: 283-96.
79. Allen AD. Hydrolysis and alcoholysis of some organic nitrites. *J Chem Soc* 1952: 1193-206.
80. Baker JW, Easty DM. Hydrolytic decomposition of esters of nitric acid. *J Chem Soc (London)* 1952: 1968-1974.
81. Seth P, Fung HL. Biochemical characterization of a membrane-bound enzyme responsible for generating nitric oxide from nitroglycerin in vascular smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* 1993; 46: 1481-6.
82. Wong S-YP, Fukuto MJ. Reaction of organic nitrate esters and s-nitrosothiols with reduced flavins: a possible mechanism of bioactivation. *Drug Metabol D* 1999; 27: 502-9.
83. Thomson, et al. 1998 (faltan datos de la referencia)
84. Nicoll AE, Mackenzie F, Greer I, Norman JE. Vaginal application of the nitric oxide donor isosorbide mononitrate for prein-



- duction cervical ripening: a randomized controlled trial to determine effects on maternal and fetal hemodynamics. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184: 958-64.
85. Li C, Chan C, Ho P. A comparison of isosorbide mononitrate and misoprostol cervical ripening before suction evacuation. *Obstet Gynecol* 2003; 102: 583-8.
86. Li C, Chan C, Ho P. A study of the efficacy of cervical ripening with nitric oxide donor versus placebo for cervical priming before second-trimester termination of pregnancy. *Contraception* 2003; 68: 269-72.
87. Eppel W, Facchinetti F, Schleussner E, Piccinini F, Pizzi C, Gruber DM, et al. Second trimester abortion using isosorbide mononitrate in addition to gemeprost compared with gemeprost alone: a double-blind randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192: 856-61.
88. Facchinetti F, Piccinini F, Volpe A. Chemical ripening of the cervix with intracervical application of sodium nitroprusside: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2000; 15: 2224-7.
89. Chan CC, Tang OS, Ng EH, Li CF, Ho PC. Intracervical sodium nitroprusside versus vaginal misoprostol in first trimester surgical termination of pregnancy: a randomized double-blinded controlled trial. *Hum Reprod* 2005; 20: 829-33.
90. Chanrachakul B, Herabutya Y, Punyavachira P. Randomized comparison of glyceryl trinitrate and prostaglandin E2 for cervical ripening at term. *Obstet Gynecol* 2000; 96: 549-53.
91. Sharma Y, Kumar S, Mittal S, Misra R, Dadhwal V. Evaluation of glyceryl trinitrate, misoprostol, and prostaglandin E gel for preinduction cervical ripening in term pregnancy. *J Obstet Gynaecol Res* 2005; 31: 210-5.
92. Cacciatore B, Halmesmäki E, Kaaja R, Teramo K, Ylikorkala O. Effects of transdermal nitroglycerin on impedance to flow in the uterine, umbilical, and fetal middle cerebral arteries in pregnancies complicated by preeclampsia and intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179: 140-5.
93. Bates CD, Nicoll AE, Mullen AB, Mackenzie F, Thomson AJ, Norman JE. Serum profile of isosorbide mononitrate after vaginal administration in the third trimester. *BJOG* 2003; 110: 64-7.
94. Ekerhövd E, Bullarbo M, Andersch B, Norström A. Vaginal administration of the nitric oxide donor isosorbide mononitrate for cervical ripening at term: a randomized controlled study. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189: 1692-7.
95. Kahler C, Schleussner E, Moller A, Seewald HJ. Nitric oxide donors: effects on fetoplacental blood flow. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 115: 10-4.
96. De Pace V, Chiossi G, Facchinetti F. Clinical use of oxide donors and L-arginine in obstetrics. *J Maternal-Fetal Neonatal Med* 2007; 20: 569-79.