



Universidad
de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

“Participación de los endocannabinoides, la Ciclooxygenasa-1 (COX-1), la Ciclooxygenasa-2 (COX-2) y la Óxido Nítrico Sintasa (NOS) en la preñez y en el desencadenamiento del parto normal y pretérmino en ratón”

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Maximiliano Cella

Directora de tesis: Dra. Ana María Franchi
Consejera de estudios: Dra. Cristina Maggese



Laboratorio de Fisiopatología de la Preñez y el Parto.
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO).
CONICET-UBA

Buenos Aires, 2007.

“Participación de los endocannabinoides, la Ciclooxygenasa-1 (COX-1), la Ciclooxygenasa-2 (COX-2) y la Óxido Nítrico Sintasa (NOS) en la preñez y en el desencadenamiento del parto normal y pretérmino en ratón”

En este trabajo se investigó en el útero de ratonas preñadas la participación de los sistemas óxido nítrico-NOS, PGs-COX y endocannabinoides-receptores CB en el inicio del parto prematuro (PP) y el parto a término (PaT), así como las interacciones entre ellos.

En primer lugar se estableció un modelo de parto prematuro (PP) inducido por lipopolisacáridos bacterianos, usado como herramienta en los estudios posteriores. Seguidamente se estudiaron las prostaglandinas y las enzimas encargadas de su síntesis, las ciclooxygenasas (COX-1 y COX-2). Se encontró que tanto en los momentos previos al PaT como al PP aumenta la producción de PGE₂ y PGF_{2α}. Este aumento parece deberse a una inducción de la COX-2, ya que el meloxicam, un inhibidor selectivo de esta isoforma, fue capaz de revertir el aumento de las prostaglandinas y de prevenir el PP y retrasar el PaT.

En cuanto al NO, se encontró que su síntesis se ve incrementada en el PP, mientras que disminuye en el PaT. Cuando se estudiaron las isoenzimas encargadas de su síntesis, se encontró que la iNOS varió siguiendo el mismo patrón, mientras que la eNOS y la nNOS permanecieron sin cambios. La administración del inhibidor selectivo de la iNOS aminoguanidina resultó capaz de demorar el PP.

Se estudió también la síntesis de anandamida (AEA), el principal endocanabinoide, hallándose que aumenta en el PaT pero permanece sin cambios en el PP. La actividad de la FAAH, encargada de la degradación de la AEA no mostró cambios en ninguno de los dos casos y los niveles de los receptores de cannabinoides, CB1 y CB2, no variaron en el final de la gestación. Sin embargo el aumento de la AEA al final de la gestación no resultó preponderante para el inicio del parto.

Los estudios de interacciones demostraron que la AEA posee la capacidad de inducir la síntesis de PGs e inhibir la actividad de NOS, y que ambos efectos son

ejercidos vía el receptor CB1. A su vez, la síntesis de AEA no parece ser afectada por las prostaglandinas, mientras que sería inhibida por altos niveles de NO e inducida por bajos niveles de NO.

Finalmente, se encontró que las PGs solo actúan sobre la síntesis de NO, inhibiéndola, cuando esta se encuentra exacerbada. Nuevamente el NO presentó un efecto dual al estudiar como regulaba la producción de PGs, ya que cuando se sintetiza en altas cantidades estimula la producción de PGs, pero la inhibe cuando es producido en bajos niveles.

Palabras claves:

parto, parto prematuro, útero, prostaglandinas, ciclooxigenasa, óxido nítrico, LPS, anandamida

“Participation of the endocannabinoids, the Cyclooxygenase-1 (COX-1), the Cyclooxygenase-2 (COX-2) and the Nitric Oxide Synthase (NOS) in pregnancy and in the onset of normal and preterm labor in mouse”

In this work, the participation of the nitric oxide-NOS, prostaglandins-cyclooxygenases and endocannabinoids-CB receptors systems in the onset of preterm labor (PTL) and term labor (TL) were investigated, as well as the interactions among them.

In first place, we established a model of PTL induced by bacterial lipopolysaccharides.

Next the prostaglandins and their synthesizing enzymes, cyclooxygenases (COX1 and COX2) were studied. An increase in PGE₂ and PGF_{2α} production was observed previous to the TL and the PTL. This increase seems to be due to an induction of the COX-2, since meloxicam, a selective inhibitor of this isoform, abrogated the increase of the prostaglandins and was able to prevent the PTL and to delay the TL.

About NO, his synthesis was found to be increased in the PTL whereas it diminishes in the TL. When the enzymes in charge of NO synthesis were studied we found that iNOS varied following the same pattern than his synthesis, while eNOS and nNOS remained without changes. The administration of the iNOS selective inhibitor aminoguanidine delayed the PTL.

We also investigated the synthesis of the main endocannabinoid, anandamide (AEA), and we observed that it increases in TL but remains without changes in the PTL. FAAH, the enzyme that degrades AEA, did not show changes neither in PTL nor in TL. The protein levels of cannabinoids receptors CB1 and CB2 did not vary in the end of the gestation. Nevertheless the increase of the AEA at the end of the gestation was not preponderant for the onset of labor.

The studies of interactions demonstrated that the AEA has the capacity to induce the synthesis of PGs and to inhibit NOS activity. Both effects are exerted via CB1 receptor. As well, AEA synthesis does not seem to be affected by the

prostaglandins, whereas it would be inhibited by high levels of NO and induced by low levels of NO.

Finally, we established that PGs only acts on NOS activity, inhibiting it, when this is exacerbated. Again, NO display a dual effect when we studied its effect over PGs production, since it stimulates the production of PGs when is synthesized in high amounts, but it down regulates it when is produced in low levels.

Key words:

labor, preterm labor, uterus, prostaglandin, ciclooxigenase, nitric oxide, endocannabinoid, anandamide.

Agradecimientos

A Ana, por todo. Por la ayuda, por las enseñanzas, por la paciencia eterna, por ser un ejemplo diario como persona e investigadora. Por ser una de las personas más consecuente con sus palabras que conocí.

A Mariana y Lauchi. Porque más que compañeras de labo son amigas de laboratorio. Sin ellas esta tesis no existiría, les debo un monumento.

A Silvia, por todas las “sintetas”, por su sencillez, calidez y practicidad.

A Rami, por la compañía. Por todas las cosas que hace en el labo que no están en los resultados pero ayudan...¡y como!

A Juli y Clau, por la energía que aportan, y por los ratones (aunque suene feo).

A Mica, Marquinhos y Legui los “benjamines”, por las ganas y el humor con que se sumaron al grupo.

A Silvina y María Gracia, por el alojamiento y los ricos mates durante la escritura de esta tesis.

A los Rettori, por la compañía en las tardecitas, y a la “madre” de ellos, Valeria, una persona increíblemente generosa (Fuerza Vale!).

A la gente de administración, Ani, Patricia, Noemí, Isabel, Ale y Cristina. Por la ayuda y predisposición para resolver cualquier problema.

A la gente del bioterio, especialmente a Daniel, por la dedicación y atención que da al cuidado de “nuestros animalitos”.

A la gente del lavadero, porque nos alivian la vida.

A toda la gente del CEFyBO. Por todos estos años y las palabras de aliento.

Al Dr. Jota, que nos ahorra todos esos trámites que tanto odiamos.

A toda la gente de los laboratorios de Ruth y Claudia, por como me trataron y ayudaron siempre que necesite algo.

A Carlos, porque arregla todo lo que nos encargamos de romper. Y por las tortas fritas.

A Javi, por mantenerme al tanto de todos los trámites que me olvidaba de hacer.

A la UBA y el CONICET, por darme la oportunidad de formarme en las ciencias y en la vida.

A toda la gente de los desayunoS. Por hacer que no cueste tanto levantarse temprano.

A mis padres, Lilian y Alberto, porque nos apoyaron y ayudaron siempre. Por todos los sacrificios que hicieron y hacen por nosotros. Porque los quiero.

A mis hermanos, Nico, Matías y Joel, los quiero. A sus respectivas. Porque los hacen felices.

A mis sobrinos, Lucas, Hanna, Chiara y Cheque, porque llenan de alegría mi vida con su cariño y sus vocecitas.

A la familia de Romi, porque desde el primer momento me hicieron ser uno más de ellos. Por la ayuda desinteresada. Por el cariño que siempre me dan.

A todos los Chinga, mis amigos, a los que se quedan por seguir cerquita mío, y los que se van porque aunque se me sigan yendo lejos los quiero igual.

A mi Tía Noe, mi segunda mamá.

A mi tía Silvia y mis Abuelos. Por el amor que siempre nos dieron.

A Echi y Lauchi, por su amistad, uno de los regalos más grandes que recibí.

A Magarula, sin quien hoy no estaría orgulloso de ser un Chinga.

A Romi, porque la amo, porque es la mujer con la me imagino sonriendo cuando seamos dos viejitos gruñones y arrugados rodeados de nietos.

A mi amor, Romina

A mis padres y hermanos

Abreviaturas utilizadas

2-AG: 2-araquidonilglicerol
AA: ácido araquidónico
aa: aminoácidos
AEA: anandamida, N-araquidoniletanolamina
AG: aminoguanidina
AMPc: adenosinmonofosfato cíclico
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
ATP: adenosíntrifosfato
CB1: receptor de cannabinoides tipo 1
CB2: receptor de cannabinoides tipo 2
CL: cuerpo lúteo
CL: cuerpo lúteo
cm.: centímetro
col.: colaboradores
COX: ciclooxigenasa
CRH: hormona liberadora de corticotropina
d: día
FAAH: amidohidrolasa de ácidos grasos
FSH: hormona folículoestimulante
GC: guanilato ciclasa
GMPc: guanosínmonofosfato cíclico
gr: gramo/s
h.: hora/s
i.p.: intra-peritoneal
IL: interleuquina
kDa: kilo Daltons
LH: hormona luteinizante
L-NAME: NG-nitro-L-arginina-metil-éster
LPS: lipopolisacáridos

M: molar
NAPE: N-arquidonil-fosfatidil etanolamina
NAPE: N-arquidonil-fosfatidil etanolamina
NF- κ B: factor nuclear κ B
NO: óxido nítrico
NOS: sintasa de óxido nítrico
PaT: parto a término.
PG/PGs: prostaglandina/prostaglandinas
PGE₂: prostaglandina E₂
PGF_{2 α} : prostaglandina F_{2 α}
PLA₂: fosfolipasa A₂
PLD: fosfolipasa D
PP: parto prematuro.
RIA: radioinmunoensayo
s: segundos
SNAP: S-nitroso N-acetil penicilamina
TNF: factor de necrosis tumoral
WB: western blot
 Δ^9 -THC: Δ^9 -tetrahidrocannabinol
 μ g: microgramos

Índice

INTRODUCCIÓN	1
<hr/>	
1.- IMPORTANCIA DEL TEMA DE ESTUDIO	1
2.- CARACTERÍSTICAS DE LOS ANIMALES Y EL TEJIDO DE ESTUDIO	3
2.1.- Animales	3
2.1.1.- Características generales	3
2.1.2.- Características reproductivas de las hembras	3
2.1.3.- La cópula	4
2.1.4- La gestación	5
2.2.- Características generales del tejido utilizado	5
2.2.1.- Fisiología del útero	5
3.- EL PARTO	10
3.1.- Breve historia del parto	10
3.2.-Teorías del parto	11
3.3.- Parto prematuro	15
3.3.1.- Causas del inicio del parto prematuro	16
3.3.2.- Mediadores de inflamación y prematuridad	17
4.- LOS ENDOCANNABINOIDES.	19
4.1.- Historia de los cannabinoides	19
4.2.- Endocannabinoides	20
4.3.- Metabolismo de la anandamida	21
4.4.- Mecanismos de acción	25
4.5.- Participación de la anandamida en eventos reproductivos	27
5.- LAS PROSTAGLANDINAS	29
5.1.- Un poco de historia	29
5.2.- Metabolismo de las prostaglandinas	30
5.3.- Inhibidores de las COX	37
5.4.- Prostaglandinas y parto	38

6.- EL ÓXIDO NÍTRICO	42
6.1.-Biosíntesis	42
6.2.- Mecanismo de acción	46
6.3.- Regulación del sistema COX-prostaglandinas	47
6.4.- Regulación de la síntesis de NO	48
6.4.1.- Modulación del NO por prostaglandinas.	48
6.4.2.- NO y hormonas sexuales	49
6.4.3.- Inhibidores de la síntesis de NO	50
6.5.- Función del NO en la fisiología uterina	51
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	52
<hr/>	
MATERIALES Y MÉTODOS	53
<hr/>	
1.- Medios y drogas	53
1.1- Drogas	53
1.2- Medios	54
2.- Animales utilizados	55
3.- Tratamientos aplicados a los animales	55
3.1.- Determinación de la dosis de LPS inductora de parto prematuro	55
3.2.- Tratamientos con otras drogas	56
3.3.- Estudios durante la preñez	57
4.- Ensayos <i>in vitro</i>	58
5.- Medición de la actividad de la sintasa de óxido nítrico	58
6.- Técnica de radioinmunoensayo	60
6.1.- Procesamiento de las muestras	60

6.2.- Determinación de prostaglandinas	60
7.- Western Blot	61
7.1.- Procesamiento de la muestra	61
7.2.- Separación electroforética de las proteínas	61
7.3.- Electrotransferencia de las proteínas	62
7.4.- Detección inmunológica	62
7.5.- Identificación de las bandas proteicas	63
8.- Determinación de la actividad de síntesis anandamida	64
9.- Cuantificación de la actividad de la FAAH	65
10.- Análisis estadísticos	65
RESULTADOS	66
<hr/>	
1.- Establecimiento del modelo de parto prematuro inducido por LPS	66
Participación de las vías de las prostaglandinas, el óxido nítrico y los endocannabinoides en el parto	70
2.- Participación del sistema ciclooxigenasas-prostaglandinas en el parto	70
2.1.- Participación de las prostaglandinas en el parto a término	70
2.2.- Participación de las prostaglandinas en el parto prematuro	75
2.2.1.- Efecto del meloxicam sobre la síntesis uterina de prostaglandinas en el parto prematuro	75
2.2.2.- Efecto del meloxicam sobre los niveles proteicos de las ciclooxigenasas uterinas en el parto prematuro.	76
2.2.3.- Efecto del meloxicam sobre el inicio del parto prematuro	79
3. Participación del sistema óxido nítrico sintasa-óxido nítrico en el parto	80
3.1.- Participación del óxido nítrico en el parto a término	80

3.2.- Participación del óxido nítrico en el parto prematuro	83
3.2.1.- Efecto de la aminoguanidina sobre el inicio del parto prematuro	84
4.- Participación del sistema de endocannabinoides en el parto	86
4.1.- Participación de la anandamida en el parto a término	86
4.2.- Participación de la anandamida en el parto prematuro	89
Interacciones entre las vías de las prostaglandinas, el óxido nítrico y la anandamida en el parto	90
5.- Interacción entre los sistemas de la anandamida y las prostaglandinas	90
6.- Interacción entre los sistemas de la anandamida y el óxido nítrico	93
7.- Interacciones entre las vías del óxido nítrico y las prostaglandinas	98
DISCUSIÓN	103
<hr/>	
CONCLUSIONES	121
<hr/>	
REFERENCIAS	122
<hr/>	

Introducción

1.- IMPORTANCIA DEL TEMA DE ESTUDIO.

Los factores y mecanismos por los cuales se desencadena el parto no han sido completamente aclarados. Durante los últimos años se han realizado enormes progresos en el entendimiento de los mecanismos moleculares involucrados en el parto, pero la respuesta a cómo se inicia permanece sin resolver.

Uno de los problemas más importantes y acuciantes en la perinatología actual es la patología inherente a la prematuridad. En términos cuantitativos la prematuridad está presente en el 5-9% de todos los embarazos. En nuestro país la incidencia es del 6 al 7,5% de la población estudiada, si bien en centros asistenciales terciarios es superior según el nivel de riesgo de las pacientes asistidas, y en los Estados Unidos afecta del 8 al 12% de todos los nacimientos. La importancia clínica del problema está dada por el hecho que es la causa más importante de la morbi-mortalidad perinatal, condicionando más del 70% de la mortalidad fetal, neonatal o infantil total. De hecho, el recién nacido prematuro tiene 180 veces más probabilidades de morir que el nacido a término. También es, después de las malformaciones, la segunda causa de morbilidad. Además, aumenta la frecuencia de lesiones residuales a corto y largo plazo (parálisis cerebral, retinopatía, displasia bronco-pulmonar, etc.).

El costo económico del tratamiento de la prematuridad es muy elevado, siendo en promedio diez veces mayor en los prematuros que en los niños de peso normal nacidos a término. El gasto en los nacidos prematuros constituye el 35% de todo lo invertido en salud neonatal, y el 10% de lo invertido en todo el período infantil (Roura, 2004).

De acuerdo a la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos, en ese país el gasto en tecnología de cuidado neonatal, que incluye necesidades médicas, educacionales y de recuperación especial, supera los 5.000.000.000 de dólares por año, aunque esto no garantiza la supervivencia de los bebés.

La incidencia del parto prematuro, algunas complicaciones del embarazo y la cantidad de bebés de bajo peso no han variado mucho en los últimos 40 años. El nacimiento antes de término sigue siendo la principal causa de muerte de los neonatos, y la disminución de la

cantidad de niños que mueren se debe fundamentalmente a los avances en el cuidado neonatal y no al tratamiento del parto prematuro.

Al no conocerse los mecanismos precisos de regulación del inicio del parto, las terapéuticas aplicadas no son lo suficientemente eficaces. Un conocimiento más profundo del perfil de morbi-mortalidad materno-fetal contribuirá a la prevención y terapéutica de las enfermedades del embarazo y los trastornos relacionados con el embarazo y el parto en la madre y el infante.

2.- CARACTERÍSTICAS DE LOS ANIMALES Y EL TEJIDO DE ESTUDIO.

2.1.- Animales.

2.1.1.- Características generales.

Los ratones fueron los animales elegidos para este trabajo experimental puesto que presentan numerosas ventajas, entre las que se pueden destacar su facilidad de mantenimiento, la capacidad de reproducirse todo el año con un corto período de gestación, un número relativamente grande de crías y una mayor tolerancia a la endogamia que otras especies de mamíferos.

También cabe destacar que frecuentemente presentan síndromes similares a los humanos a causa de sus similitudes metabólicas y de anatomía interna y que los genes de los genomas humanos y murinos se encuentran conservados en un 99%.

Para nuestros estudios fue utilizada la cepa albina BALB/c, perteneciente al género *Mus*. Los adultos de esta cepa poseen una longitud de 9 a 12 cm, pudiendo pesar entre 20 y 30 gr. las hembras y entre 25 y 35 gr. los machos. Tienen una longevidad de menos de 24 meses. Los ratones deben ser mantenidos, según la cepa, en ciclos de luz : oscuridad de 12:12 o 14:10 h.

2.1.2.-Características reproductivas de las hembras.

Las hembras son ovuladoras espontáneas poliéstricas. Tienen un ciclo estral que dura 4-5 días dividido en proestro, estro, metaestro y diestro. El **proestro** es el período durante el cual ocurre el desarrollo del folículo ovárico. El **estro** es el período en el cual la hembra está receptiva a los machos, usualmente ocurre entre 3 y 5 h. después del comienzo del ciclo de oscuridad (la ovulación se da poco tiempo después) y dura aproximadamente 12 h. Durante el **metaestro** los óvulos formados y madurados por el cuerpo lúteo se mueven hacia el útero por el oviducto. Finalmente, en el **diestro**, los folículos sufren un rápido desarrollo

preparándose para la subsiguiente ovulación. Cada fase del ciclo estral puede ser identificada por el aspecto del epitelio vaginal y la vulva.

Los factores ambientales pueden producir variaciones en el desarrollo normal de los ciclos ya que el tiempo de exposición a la luz, la temperatura y la humedad ambiental producen variaciones en las concentraciones de estradiol circulante.

El primer estro ocurre a los 25-28 días de vida, pero recién se consideran sexualmente maduras, y por lo tanto aptas para la reproducción, a los 50-60 días. El cruce temprano o muy tardío produce partos más espaciados, así como neonatos de menor peso y tamaño. La edad de mayor fertilidad es de los 100 a los 300 días y el último celo ocurre entre los 10 y 16 meses.

2.1.3.- La cópula.

La cópula se produce durante el estro y está influida por feromonas (aumentan la secreción de FSH y LH). Los estrógenos circulantes provocan cambios en el útero y se induce la receptividad al apareamiento. El estro se caracteriza por claros cambios conductuales en el animal: se puede observar que la hembra corre más que de costumbre, sacude las orejas y en presencia de otro ratón presenta lordosis. El macho generalmente copula con hembras en estro alrededor de la mitad del período de oscuridad. El ratón eyacula una sustancia viscosa que se solidifica rápidamente y dura alrededor de 12 h. Este tapón vaginal actúa como barrera para evitar que otros machos se apareen con la hembra y ayuda a su espermia a lograr la fecundación. La observación del tapón provee una forma simple para determinar en el bioterio cuándo ha ocurrido un apareo.



Sin tapón



Con tapón

2.1.4.- La gestación.

Durante la gestación, el endometrio sufre cambios importantes en la composición celular, que se reflejan en cambios pronunciados en la síntesis y secreción de proteínas.

Dependiendo de la cepa utilizada, el período gestacional del ratón dura entre 19 y 21 días a partir de la cópula (19 días en la cepa elegida, BALB/c) y la camada es de entre 6 y 14 crías.

Los ovarios son indispensables para mantener la gestación. Si se procede a una ovariectomía en cualquier etapa de la gestación indefectiblemente se producirá un aborto. Si disminuye la secreción ovárica de progesterona los fetos se reabsorberán, ya que la placenta no produce suficiente progesterona para mantener la gestación.

El crecimiento de los cuernos uterinos se hace visible a los 9-10 días de gestación y los embriones se disponen de manera uniforme en ambos cuernos uterinos.

La cantidad de crías, la edad de la madre y sus condiciones físicas determinan la duración del parto, pudiendo presentarse distocia (dificultad en la expulsión de las crías) en hembras con bajos niveles séricos de vitamina A, que también está relacionado con el número de crías que nacerán.

Una vez que las crías han nacido, la hembra devora de inmediato la placenta, ayudando a la salida de la cría de la bolsa. De esta forma, estimulan a las crías eliminando el contenido líquido de las vías respiratorias.

2.2.-Características generales del tejido utilizado.

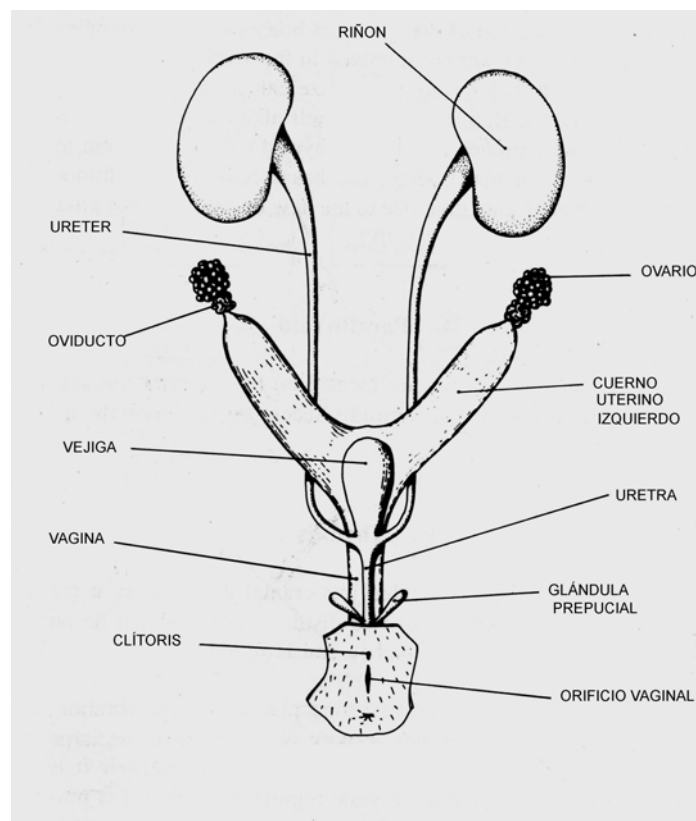
2.2.1.- Fisiología del útero.

En la mujer no embarazada, el útero es una estructura casi sólida, que pesa alrededor de 70 gr, con una capacidad de 10 ml o menos. Durante el embarazo, el útero se transforma en un órgano muscular con una pared relativamente delgada y una capacidad suficiente para acomodar el feto, la placenta y el líquido

amniótico. El volumen total de líquido contenido a término promedia los 5 litros, pero puede ser de 20 litros o más, por lo que al final de la gestación el útero alcanzará una capacidad entre 500 y 1000 veces mayor que la que tenía cuando no había embarazo. Además, se produce un incremento proporcional del peso uterino ya que, a término, el órgano pesa alrededor de 1100 gr.

Durante los primeros meses del embarazo las paredes uterinas se vuelven considerablemente más gruesas, pero a medida que la gestación avanza, éstas se adelgazan en forma gradual, alcanzando a término un espesor de sólo 1,5 cm.

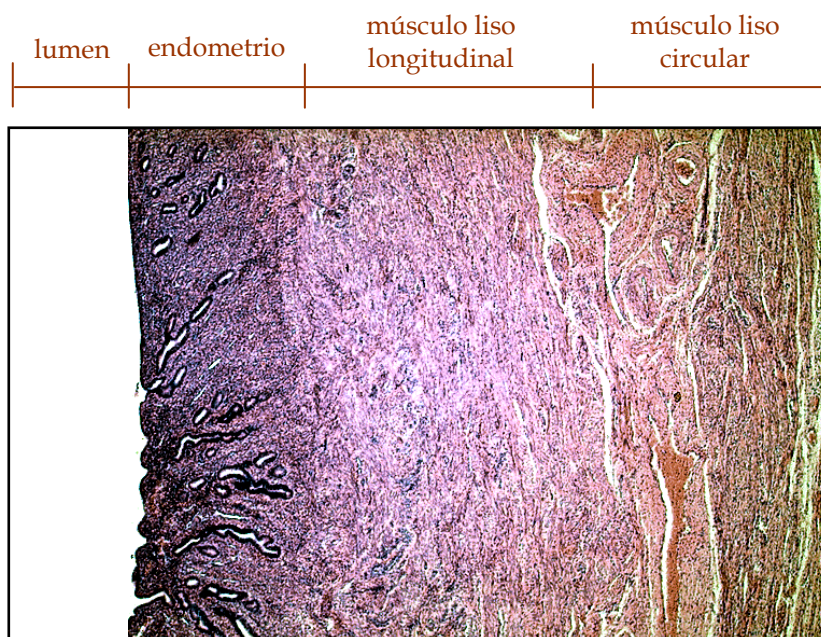
El útero del ratón consiste de dos largos cuernos que se unen en un solo cuerpo, conectado a la vagina por el cérvix. Si bien los cuernos uterinos parecen estar unidos, se mantienen separados por un septo medio y cada uno de ellos desemboca por su respectivo conducto cervical en el extremo superior de la vagina. Los cuernos uterinos se sitúan en la cavidad abdominal dorsal, empezando en los oviductos, y el cuerpo y la vagina están ubicados centralmente respecto al recto y dorsalmente respecto a la vejiga urinaria.



Sistema urogenital del ratón

Las paredes del útero están compuestas por tres capas de tejido diferentes:

- **La mucosa o endometrio:** la más interna, formada por un epitelio simple columnar que extiende glándulas tubulares endometriales hacia el estroma endometrial (lámina propia) y cuyos conductos se abren a la luz del útero.
- **La media muscular o miometrio:** compuesta por una capa interna circular y una externa longitudinal de músculo liso (miometrio), cuyas células se denominan fibras. Estas se disponen en paquetes rodeadas por fibras de colágeno. Entre ambas capas hay una capa de tejido conectivo bien definido, formada por colágeno y fibroblastos.
- **La externa o serosa:** es la cubierta peritoneal del útero. Está constituida por células mesoteliales sostenidas por tejido conectivo que se continúa en el peritoneo (Krinke, 2004).



Corte transversal del útero.

Morfológicamente, el endometrio puede dividirse en una capa funcional y una capa basal. La primera es la que sufre las transformaciones necesarias para la implantación del blastocisto y en ella sucede la proliferación, secreción y degeneración del tejido. La capa basal es el sustrato para que el endometrio pueda regenerarse.

El endometrio y el miometrio funcionan en conjunto para recibir al embrión, sostener su crecimiento y expulsar al feto en el momento del parto. La preparación de un ambiente receptivo es programada por las hormonas esteroideas ováricas, que actúan en forma directa sobre el endometrio y el miometrio, y en forma indirecta a través de diferentes factores de crecimiento y citoquinas (Yen, 2001).

El útero se halla inervado por terminaciones de tipo colinérgicas (sistema nervioso parasimpático) y adrenérgicas (sistema nervioso simpático) que se ubican alrededor de los vasos sanguíneos y del miometrio.

El miometrio es un tejido de tipo unitario, es decir que posee actividad espontánea que se inicia en una zona específica del tejido llamada "marcapasos". Las contracciones del miometrio, aunque no necesariamente sean iniciadas por el impulso nervioso, son coordinadas y reguladas por mediación nerviosa (Burnstock y Prosser, 1960). Además responden al estiramiento desarrollando una tensión activa. El marcapasos uterino se distribuye en todo el tejido. Todas las células del útero pueden ser marcapasos, pero sólo las que poseen excitabilidad elevada pueden generar potenciales de acción.

Existen evidencias para suponer que la transmisión de los potenciales de acción entre las células es eléctrica, probablemente a través de vías de baja resistencia presentes entre células adyacentes (Sladek y col., 1999).

El miometrio (y cualquier otro músculo liso) posee características singulares en comparación con los músculos esqueléticos. Huszar y Walsh (1989) señalaron que estas diferencias representan una ventaja para el miometrio en lo que respecta a la eficiencia de las contracciones uterinas y la expulsión fetal.

Las contracciones miométriales propias del trabajo de parto se diferencian de otras contracciones musculares fisiológicas por el hecho de ser dolorosas. La causa del dolor no se conoce con certeza, pero se han sugerido varias etiologías posibles como la hipoxia del endometrio contraído, la compresión de ganglios nerviosos del cuello uterino y la parte inferior del útero, el estiramiento del cuello uterino

durante la dilatación y el estiramiento del peritoneo que recubre el fondo del útero.

Las contracciones uterinas son involuntarias y, en general, independientes del control extrauterino. El bloqueo nervioso asociado con la anestesia epidural no reduce la frecuencia ni la intensidad de las contracciones uterinas.

El intervalo entre contracciones disminuye progresivamente de 10 minutos al comienzo del primer estadio del trabajo de parto a tan solo 1 minuto o menos. Sin embargo, los periodos de relajación entre contracciones uterinas son esenciales para el bienestar fetal, ya que comprometen el flujo sanguíneo útero-placentario, y en última instancia el flujo feto-placentario, en grado suficiente para provocar hipoxemia fetal.

3.- EL PARTO.

3.1.- Breve historia del parto.

Desde el inicio de la humanidad y hasta mediados del siglo XX (de 1930 a 1950), la mujer paría en el lugar donde le llegaba la hora, y la mayoría de las veces esto sucedía en su domicilio.

La atención de los trabajos de parto la efectuaban las parteras o comadronas, quienes tenían conocimientos prácticos y empíricos de la situación en base a su experiencia, pero no estaban capacitadas para resolver las complicaciones que se presentaban con frecuencia. Las medidas de higiene eran casi nulas, la mujer se encontraba consciente y sin ningún tipo de anestesia eficaz. A causa de estas carencias cualquier trabajo de parto prolongado causaba problemas de morbilidad tanto en el bebé como en la madre; por ejemplo, lesiones cerebrales en el niño por disminución de concentración de oxígeno en su sistema nervioso central, y en la madre lo más frecuente era la fiebre puerperal que llegaba a provocar esterilidad secundaria y hasta la muerte. Al mismo tiempo, se practicaba la dilatación cervical manualmente, en el período de expulsión, lo cual hacía que se perdiera el tono muscular provocando prolapsos de la vejiga, recto y hasta de la matriz o útero a través de la entrada de la vagina.

Desde aproximadamente 1930 empieza la atención obstétrica en algunos hospitales, con lo cual bajó el índice de infección y complicación en el parto, por contar con mejores condiciones de limpieza y con un instrumental adecuado.

Alrededor del año 1940 se empieza a usar la sulfa y posteriormente la penicilina con lo cual se lograron avances importantes en el tratamiento de complicaciones infecciosas. Al mismo tiempo aparecieron sustancias anestésicas volátiles (éter, cloroformo, trilene) que al respirarse disminuían el dolor en la madre, pero sin embargo provocaban alteración en las funciones cardio-respiratorias tanto en ella como en su hijo.

En el año de 1950 gracias a las investigaciones médicas, se inicia el uso de combinaciones de diversas sustancias para "parir sin dolor" con menores riesgos que las anteriores. A esta combinación se la llamó "cóctel obstétrico", y se componía de una sustancia para el dolor, otra amnésica y una llamada "gangliopléjico" que reforzaba y aumentaba el efecto de las anteriores.

Desde 1960, el parto es considerado como un acto quirúrgico y se realiza mayormente en clínicas y hospitales. Al mismo tiempo la asepsia y la antisepsia, así como los medicamentos usados durante y después del parto, disminuyen las complicaciones en forma importantísima, tanto para la madre como para el bebé, sin afectar las funciones cardio-respiratorias de ninguno de los dos. En casos en que el mantenimiento del embarazo represente un riesgo para la madre o el feto se puede inducir el parto farmacológicamente. Para ello generalmente se usa la oxitocina, que es una sustancia producida naturalmente por la hipófisis y que regula y refuerza las contracciones en el trabajo de parto, haciéndolo más breve. También puede usarse la que es actualmente la única prostaglandina permitida para la inducción del parto en casos de embarazos viables, la PGE₂, o el misoprostol, un análogo de la PGE₁ (Mackenzie, 2006).

3.2.- Teorías del parto.

Los procesos fisiológicos que ponen en marcha el parto y el trabajo de parto no se conocen fehacientemente. Originalmente se aceptaba que el éxito del embarazo en todas las especies de mamíferos dependía de la acción de la progesterona, hormona responsable de mantener el útero en reposo hasta cerca del término del embarazo. Esta presunción estaba sustentada por el hecho de que en la mayoría de los mamíferos el parto es precedido por una caída, a veces brusca, en los niveles plasmáticos maternos de progesterona. En la rata, esto suele ocurrir después de pasado aproximadamente el 95% del embarazo (Farina y col., 2004). Además, la administración de progesterona a ratas albinas en una fase tardía del embarazo retardó el inicio del parto (Fomichev, 1977), en tanto el bloqueo del receptor de

progesterona por el antagonista mifepristone (RU486) indujo el parto prematuro en ratones (Dudley y col., 1996).

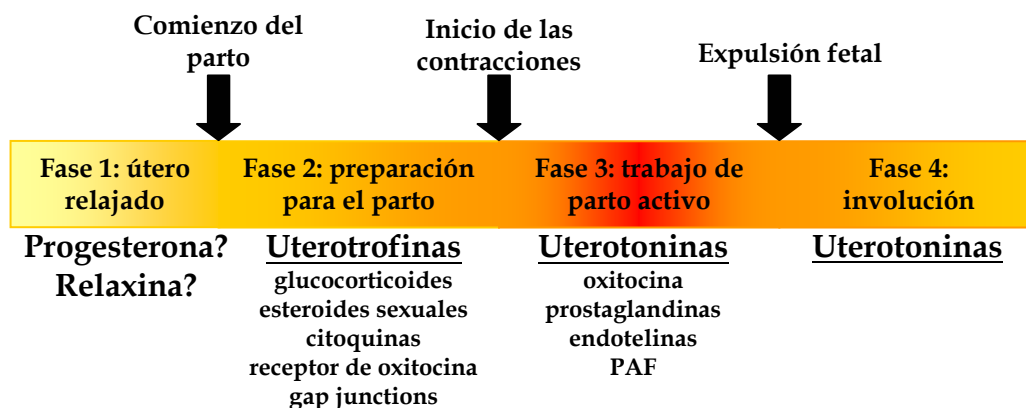
Sin embargo, en el caso de los primates (incluido el ser humano), la iniciación del parto no está precedida por una disminución del nivel de progesterona. En las mujeres embarazadas, el nivel plasmático de progesterona aumenta durante el embarazo y sólo disminuye después de la expulsión de la placenta, que es el tejido responsable de la síntesis de progesterona durante la preñez en la mujer.

En la actualidad prevalecen dos conceptos generales. Desde una perspectiva superficial, estas teorías consisten en:

- la hipótesis de la abolición del mantenimiento del embarazo.
- la teoría de la inducción del parto por una uterotonina.

Los conceptos postulados por la mayoría de los investigadores combinan algunos aspectos de ambas teorías. Algunos científicos también piensan que, mediante algún mecanismo aún indeterminado, el feto humano maduro enviaría la señal inicial que pone en marcha el proceso del parto.

En realidad, la mayoría de las teorías que intentan explicar el proceso del parto implican una o más uterotoninas, ya sea como un fenómeno primario o como un mecanismo secundario, en los procesos del embarazo que conducen al nacimiento. El parto en los mamíferos puede interpretarse como la maduración de una serie de intercomunicaciones entre los sistemas endocrinos materno y fetal. Durante la preñez, la función uterina se puede representar en cuatro fases de acuerdo a su actividad contráctil:



La fase 1 es el período de la gestación en el que el útero se encuentra relajado. En la mayoría de los mamíferos es la fase que ocupa el mayor tiempo de preñez. Durante la fase 2 el útero comienza a prepararse para el trabajo de parto. Las últimas horas del embarazo humano se caracterizan por contracciones del útero que determinan la dilatación y borrado del cuello uterino y provocan el descenso del feto por el canal de parto. Este proceso requiere un importante gasto de energía, de ahí la expresión “trabajo de parto”. Luego del comienzo del trabajo de parto, el útero presenta contracciones vigorosas y constantes que conducen a la expulsión fetal (fase 3). En la fase 3 continúa el borrado del cérvix, que además se dilata para permitir el pasaje del feto por el canal de parto. Finalmente, luego de la expulsión fetal, el útero involuciona hasta volver a tener las dimensiones y las propiedades del no preñado (fase 4).

La transición de la fase 1 a la fase 2 es considerada el comienzo del parto. Durante este período de transición, el útero está bajo la influencia de las uterotrofinas que lo preparan para el trabajo de parto propiamente dicho. El comienzo del trabajo de parto está regulado por las uterotoninas que modulan directamente la fuerza y la periodicidad de las contracciones uterinas.

Es importante comprender estos mecanismos así como los factores involucrados, no sólo para la prevención del desencadenamiento del parto pre-término, sino también para poder ofrecer una alternativa segura a la inducción del trabajo de parto cuando se presentan complicaciones maternas o fetales.

La iniciación del trabajo de parto está regida por cambios en los niveles de hormonas claves, especialmente estrógeno y progesterona. Durante la mayor parte de la preñez, una abundancia de progesterona, que es secretada por la placenta, relaja el músculo liso que recubre el útero y mantiene el cérvix cerrado mediante fuertes fibras de colágeno.

Los factores que desencadenan el parto en la especie humana son desconocidos y muy difíciles de investigar, dado lo inaccesibles que resultan el feto y los tejidos intrauterinos antes o durante el parto (López Bernal, 2003). Conforme el útero se prepara para el parto, niveles crecientes de estrógeno, que se opone a los efectos

de la progesterona, excitan al músculo uterino. También inducen a las membranas fetales superpuestas al cérvix a producir prostaglandinas, las que ablandan el cérvix estimulando la producción de enzimas que digieren sus fibras de colágeno. Durante el parto, el útero genera poderosas contracciones que eventualmente expulsan el feto a través del cérvix abierto (Wickelgren, 2004).

A mediados de los 90, el grupo de Smith reveló un “reloj placentario” que parece sincronizar el cambio de hormonas. Ellos demostraron que los niveles de una proteína placentaria llamada hormona liberadora de corticotrofina (CRH), que promueve la producción de estrógeno, aumenta exponencialmente a lo largo de la preñez (Smith y col., 2002). Distintos grupos han sugerido que el parto prematuro podría estar asociado a un aumento demasiado temprano de CRH, causado por factores genéticos o a situaciones de estrés, como por ejemplo una dieta de bajas calorías o desnutrición (Kumarasamy y col., 2005).

Sin embargo en muchos casos puede no ser posible prevenir la iniciación temprana del trabajo de parto, que puede empezar súbitamente, por ejemplo ante una infección. Por ello varios grupos de trabajo investigan los eventos moleculares que tiene lugar una vez que el trabajo de parto comienza, en un esfuerzo por identificar formas seguras de detenerlo.

Muchas de las nuevas moléculas implicadas participan de vías inflamatorias. Un evento clave en esta respuesta inflamatoria sería, según el grupo de Philip Bennet, la activación del factor de transcripción nuclear NF- κ B, que dispara la transcripción de genes inflamatorios y cuya actividad se encuentra aumentada durante el parto normal y, a niveles aún mayores, en el parto pretérmino (Lindstrom y Bennett, 2005).

La activación de NF- κ B eleva la producción de la citoquina inflamatoria interleuquina-8 (IL-8) y de la enzima productora de prostaglandinas ciclooxigenasa 2 (COX-2). Tanto la IL-8 como las prostaglandinas contribuyen a la maduración del cérvix, evento conocido como borramiento del cuello, y preparan al útero para el parto. Este aumento de NF- κ B durante el parto podría estar causado por las toxinas bacterianas liberadas por una infección (Lindstrom y

Bennett, 2005) o por estiramiento físico del útero (Challis y col., 2005). También los alérgenos podrían inducir al parto por vías inflamatorias (Bytautiene y col., 2004). El feto en maduración también inicia el parto a término mediante una proteína del pulmón que activa vías inflamatorias, la proteína surfactante llamada SP-A (Condon y col., 2004).

Además de la inflamación, una disminución en la capacidad de respuesta a progesterona parece ser clave para el inicio del parto. Se piensa que la progesterona, durante la preñez, bloquea disparadores genéticos del parto y mantiene la quiescencia uterina ejerciendo sus efectos por medio del receptor de progesterona B (Pieber y col., 2001; Thijssen, 2005). Por ejemplo, en especies que van de las ratas al humano, el bloqueo del receptor de progesterona B con una droga como el RU486 induce el parto (Dudley y col., 1996; Fang y col., 2002). Como ya se ha mencionado, en el ser humano no se observa la abrupta disminución de los niveles sanguíneos de progesterona que precede al parto observada en los no primates, por ello muchos investigadores hipotetizan que una disminución “funcional” de la progesterona -esto es, una mengua de la receptividad a esta hormona- iniciaría el parto. En este mecanismo podría estar involucrado un segundo receptor de progesterona, llamado receptor A, que inhibiría al receptor B (Smith y col., 2002). Las prostaglandinas podrían participar en este mecanismo, ya que aumentan la proporción de receptor A respecto al B en células musculares uterinas humanas (Madsen y col., 2004).

3.3.-Parto prematuro.

En el año 1972 la Organización Mundial de la Salud (OMS), definió como parto prematuro aquel que acontece antes de la 37^{ma} semana de gestación en el ser humano, lo que en ratones de la cepa BALB/c equivaldría a los nacimientos ocurridos antes del comienzo del 17^{mo} día de gestación.

Los partos prematuros pueden clasificarse como espontáneos o iatrogénicos (con indicación médica). Los espontáneos son precedidos de un trabajo de parto

pretérmino (43%) o de una ruptura prematura de membranas (32%), o ambos. El resto es debido a indicaciones médicas (25%).

En el caso de complicaciones del embarazo como la preeclampsia, el retardo de crecimiento intrauterino grave y las hemorragias preparto, el obstetra decide terminar el embarazo mediante inducción o cesárea porque cree que esta es la mejor solución para prevenir el deterioro de la salud materna o el bienestar fetal. En cambio en otras ocasiones el parto se dispara por causas relacionadas con la distensión uterina (embarazos múltiples, polihidramnios), infección, trauma o hemorragia subplacentaria. Finalmente hay partos pretérmino de causa desconocida, sin que haya ninguna complicación fisiopatológica o histológica aparente.

3.3.1.- Causas del inicio del parto prematuro.

A pesar de los avances en la fisiopatología de la reproducción, por décadas los investigadores han tenido pocas explicaciones para el parto prematuro. Infecciones uterinas asintomáticas, detectadas por la presencia de microorganismos en el fluido amniótico, son responsables de un tercio a la mitad de los partos prematuros, para el resto no se ha determinado su origen. Sin embargo se ha avanzado en el conocimiento de los eventos moleculares que ocurren en los instantes previos y durante el parto normal. Actualmente, se postula que la inflamación sería central para el proceso del parto, ya sea a término o pretérmino. Nuevas investigaciones muestran que infecciones bacterianas, reacciones alérgicas, el estiramiento del músculo uterino o la producción de hormonas por células del pulmón fetal pueden producir el parto a través de vías inflamatorias. Otros datos revelan mecanismos subyacentes a la receptividad del cuerpo a la progesterona.

- Causas iatrogénicas: Las más frecuentes son la preeclampsia grave, la placenta previa y retraso de crecimiento fetal intrauterino.

- Parto pretérmino de repetición: el hecho de haber dado a luz antes de la 37^{ma} semana es un factor de riesgo muy importante en la siguiente gestación.
- Alteraciones congénitas del feto o de la madre: por ejemplo en el caso de madres con cavidad uterina demasiado pequeña o situaciones de doble útero.
- Factores demográficos-sociales: Hay una serie de factores sociales asociados a una mayor incidencia de parto pretérmino, como por ejemplo el fumar, el uso de heroína y cocaína, la malnutrición, la violencia de género, etc. (López Bernal, 2004)
- Factores endocrinos: Al final del embarazo se produciría un incremento del receptor de progesterona A en el miometrio que antagonizaría el receptor B. Esto estaría acompañado por un incremento en el número total de los receptores de estradiol del miometrio, lo que potenciaría el efecto de los estrógenos. Como ya se mencionó, se ha propuesto que estos cambios endocrinos a nivel tisular estarían bajo el control de CRH de origen placentario o de origen hipotalámico en situaciones de estrés materno (Nicholson y col., 2004).
- Patología de la placenta: Entre las patologías más claramente asociadas están las inflamatorias: corioamnionitis, villitis, funisitis, generalmente de origen infeccioso. Los tejidos placentarios con infiltración inflamatoria producen muchas más prostaglandinas que los tejidos normales (López Bernal y col., 1989).
- Rotura prematura de las membranas: Hay una fuerte asociación con el parto pretérmino (10-35%), pero su etiología es desconocida.

3.3.2.- Mediadores de inflamación y prematuridad.

La matriz extracelular del cérvix uterino está compuesta en un 75-80% de agua y colágeno, este último constituye cerca de un 50% del peso seco, lo que le da fuerza al tejido.

La maduración cervical, que ocurre hacia el final del embarazo y parece estar modulada por la progesterona y/o el estradiol, se caracteriza por cambios que afectan la síntesis de colágeno, formándose fibras de menor fuerza.

Se ha postulado que la dilatación cervical es similar a un proceso inflamatorio, involucrando una amplia variedad de mediadores de inflamación (Stjernholm-

Vladic y col., 2004). Los neutrófilos y los macrófagos parecen desempeñar un papel vital en este contexto, debido a que secretan enzimas que degradan colágeno.

Otras moléculas que participan de la patología del parto prematuro son las citoquinas. Durante el trabajo de parto a término se encontró un aumento significativo del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), IL-1 β , IL-6 e IL-8 en el sector uterino inferior y en el cérvix. En casos de parto pretérmino las concentraciones de IL-1 β , IL-6 e IL-8 aumentan significativamente con la dilatación cervical, pero no se observa variación en la concentración de TNF- α (Winkler y Rath, 1999; Kemp y col., 2002).

Las moléculas de adhesión (como ICAM-1), colagenasas y metaloproteinasas (MMP-8 y MMP-9) también podrían intervenir en este proceso.

Una hipótesis plantea que al término de la preñez, la disminución en la actividad de la progesterona en el segmento uterino inferior puede ocasionar un aumento en la producción de IL-8 por, entre otros, fibroblastos cervicales. La IL-8 actúa como quimioattractante y desencadena la degranulación de los leucocitos.

Por otro lado, la síntesis aumentada de IL-6 estimula la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos, dilatando entonces los vasos cervicales y promoviendo la extravasación leucocitaria. Finalmente, la degranulación de los neutrófilos libera proteasas que llevan a la degradación de la matriz extracelular cervical.

4.- LOS ENDOCANNABINOIDES.

Los endocannabinoides, derivados del metabolismo no oxidativo del ácido araquidónico, son ácidos grasos insaturados que actúan como ligandos endógenos para receptores de cannabinoides. Son considerados nuevos miembros de la gran familia de compuestos conocidos como eicosanoides.

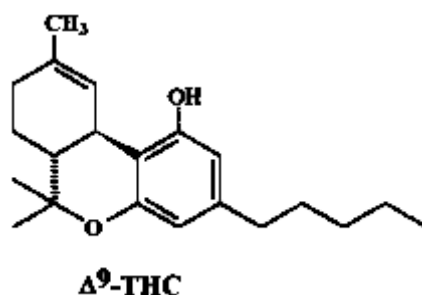
4.1.- Historia de los cannabinoides.

Los cannabinoides constituyen un conjunto de compuestos que suelen tener una estructura de 21 carbonos generalmente formando tres anillos. Están presentes en preparados obtenidos a partir de la planta *Cannabis sativa*, como el hachís y la marihuana, que se encuentran entre las drogas ilegales más consumidas en el mundo.

Estudios arqueológicos indican que se cultivaba marihuana hace miles de años, en tanto que las primeras referencias escritas del uso medicinal del cannabis aparecen alrededor del año 3000 a.C. en la obra de Shen-Nung, padre de la medicina china.

La investigación moderna sobre *Cannabis sativa* comenzó en el año 1841, cuando el doctor escocés W.B. O'Shaughnessy, tras trabajar en India, lleva el cannabis a la medicina occidental. En los siguientes 50 años fueron escritos cientos de artículos y trabajos médicos sobre los beneficios del cannabis.

En 1964, el grupo del doctor Mechoulam logró aislar por primera vez en forma pura e identificar al Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) como el principal componente activo de la marihuana (Gaoni y Mechoulam, 1964).

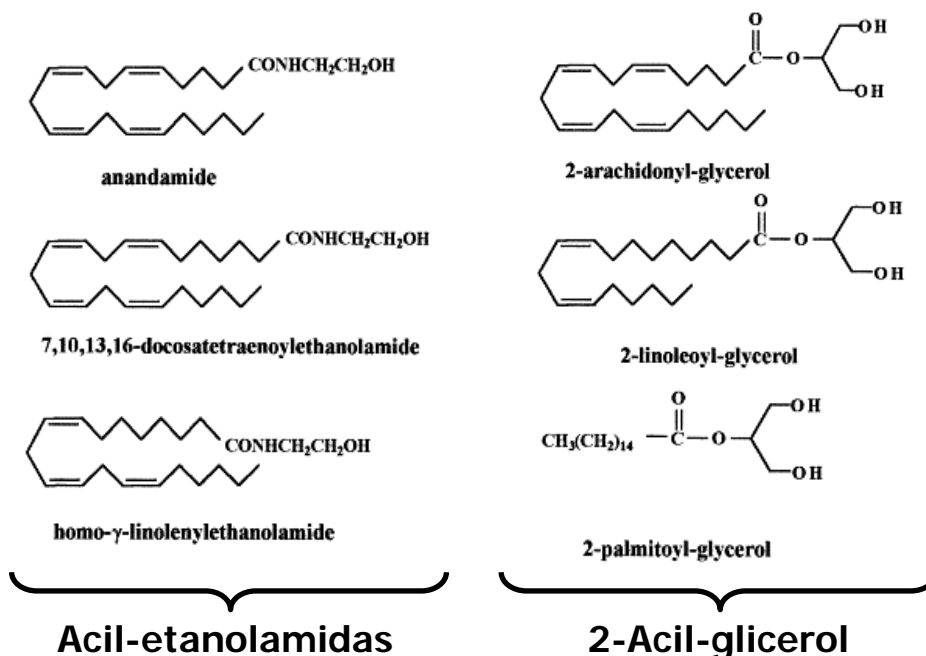


Rápidamente fueron aislados muchos de los cannabinoides naturales presentes en esta planta, que suman alrededor de 60, entre ellos el cannabinoil y el cannabidiol. Dada la elevada lipofiliidad de los cannabinoides, durante mucho tiempo se pensó que ejercían sus efectos mediante interacciones inespecíficas con lípidos de membrana. Sin embargo estudios detallados de la relación estructura-actividad hacían evidente una especificidad de respuesta que solo podía corresponderse con la existencia de receptores específicos. De hecho, la mayor parte de los efectos de los cannabinoides, y los más importantes, son ejercidos vía receptores específicos. Esta línea de investigación resultó en el descubrimiento en el cerebro de sitios de unión de cannabinoides específicos y de alta afinidad (Devane y col., 1988; Herkenham y col., 1990). Poco tiempo después Matsuda y col. (1990) y Gerard y col. (1991) clonaron el receptor de cannabinoides CB1, en tanto que un segundo receptor, CB2, fue clonado en bazo (Munro y col., 1993).

4.2.- Endocannabinoides.

La identificación, caracterización farmacológica y localización de receptores específicos de membrana que mediaban los efectos centrales y periféricos de los cannabinoides llevó a los investigadores a emprender la búsqueda de ligandos endógenos que activaran estos receptores. De esta manera, el grupo del Dr. Mechoulam logró aislar a partir de un extracto lipídico obtenido de cerebro de cerdo una molécula que se acoplaba al CB1, la N-araquidoniletanolamida (Devane y col., 1992). La misma fue llamada anandamida, derivado de la palabra *ananda* que en sánscrito significa “el que trae bendición y tranquilidad interna” o “felicidad”. Posteriormente, a partir de cerebro de perro y cerebro de rata, se aisló otro ligando endógeno, el 2-araquidonil glicerol (2-AG) (Mechoulam y col., 1995; Sugiura y col., 1995). La búsqueda de ligandos endógenos para los receptores de cannabinoides llevó a la identificación de varios derivados de ácidos grasos. En analogía con las endorfinas se llamó a los integrantes de este grupo endocannabinoides. Los principales endocannabinoides estudiados hasta el momento pueden ser separados en dos grupos, las acil-etanolamidas y los 2-acil-

glicerol ésteres. También existen otros endocannabinoides cuyas funciones fisiológicas aún no se conocen como por ejemplo O-araquidoniletanolamina (virodamina), N-araquidonildopamina (NADA) y docosatetraeniletanolamida (DEA).



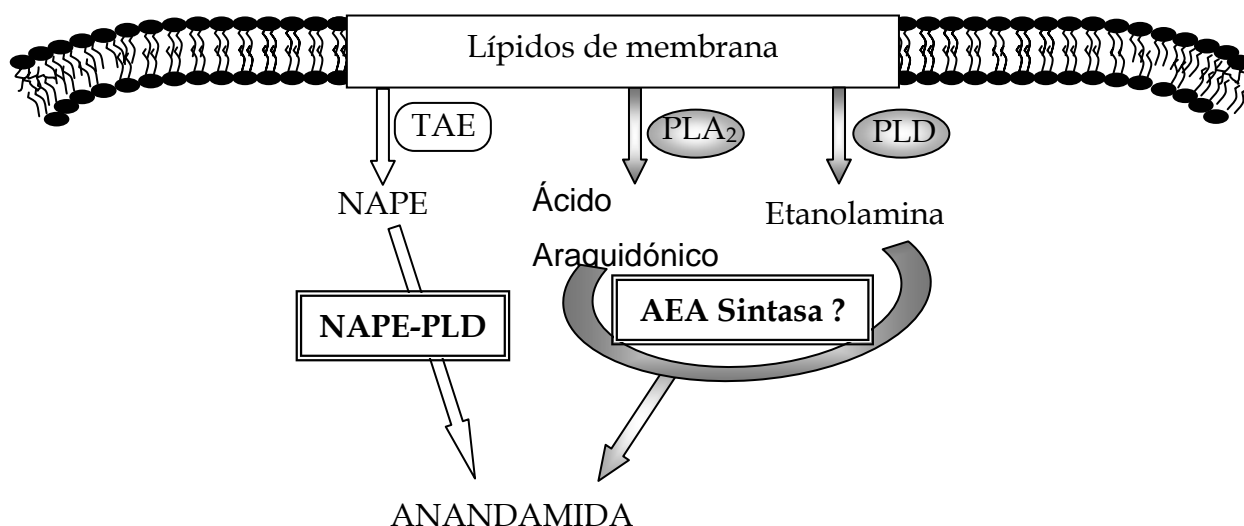
Estructura de los principales endocannabinoides.

4.3.- Metabolismo de la anandamida.

La anandamida (AEA) (Di Marzo y col., 1994) no se encuentra almacenada como tal en la célula, sino que es sintetizada y liberada en respuesta a un determinado estímulo, como la despolarización neuronal o el desafío con lipopolisacáridos bacterianos, posiblemente dependiendo de la remodelación dependiente de Ca^{2+} de precursores fosfolipídicos ubicados en la membrana plasmática (Di Marzo y col., 1998).

Han sido propuestos dos mecanismos diferentes para la síntesis de anandamida. Uno sería la síntesis mediada por transacilasa y fosfodiesterasa a partir de un precursor lipídico de la membrana celular, la N-araquidonil-fosfatidil etanolamina (NAPE), comúnmente conocida como vía del NAPE o vía de Schmid (Schmid y

col., 1990) y el segundo sería la síntesis *de novo* de AEA por condensación a partir de ácido araquidónico libre (AA) y etanolamina a través de una anandamida sintasa, proceso independiente de ATP y Coenzima A (Deutsch y Chin, 1993; Devane y Axelrod, 1994; Kruszka y Gross, 1994).



Vías de síntesis de la anandamida.

Dicha actividad de "anandamida sintasa", no obstante, muestra baja afinidad por los sustratos, por lo que se requieren altos niveles de AA y, especialmente, etanolamina para formar AEA por esta vía (Sugiura y col., 1996; Devane y Axelrod, 1994), y parecería ser en realidad una amidohidrolasa de AEA trabajando en forma inversa, probablemente la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH).

Sin embargo, hay tejidos en los cuales esta vía podría explicar los altos niveles de anandamida en relación a otras aciletanolamidas detectados bajo ciertas condiciones fisiológicas, como aquellas típicas del útero durante la preñez y la pseudopreñez (Schmid y col., 1997). Existe además la posibilidad que una significativa cantidad de anandamida pueda ser formada por este camino si altas concentraciones de AA y etanolamina se encuentran co-localizadas en algún sitio dentro de la célula (Sugiura y col., 2002).

Estudios en ratones NAPE-PLD (-/-) han revelado que estos animales poseen concentraciones de anandamida similares a las que presentan los ratones *wild type*, sugiriendo la existencia de rutas enzimáticas adicionales para la producción de la AEA *in vivo*. Recientemente Simon y Cravatt (2006) han propuesto una nueva vía de biosíntesis de N-aciletanolaminas (NAEs) que ocurre mediante la doble deacilación del NAPE catalizada por una serin-hidrolasa, que genera un glicerofosfo-NAE, seguida por el clivaje mediado por fosfodiesterasa de este intermediario para liberar NAE.

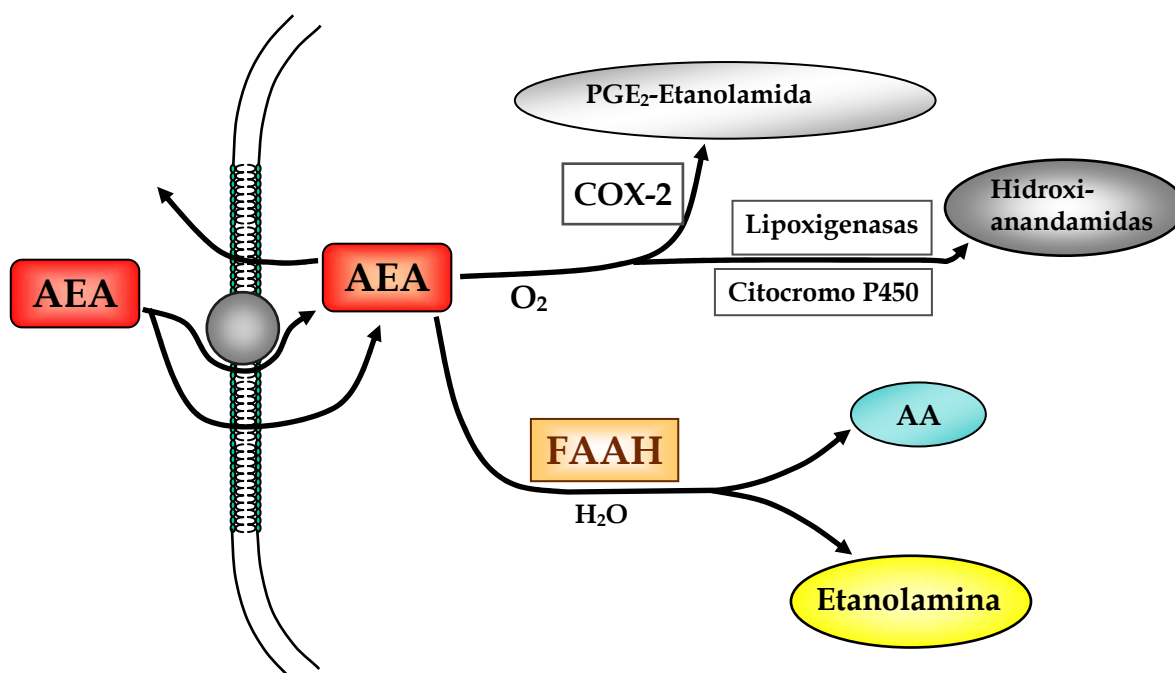
Luego de sintetizada, la AEA es liberada al espacio extracelular, por un mecanismo aún no dilucidado totalmente, en donde puede actuar en forma autócrina o parácrina. Desde allí actúan con distinta selectividad sobre los receptores de cannabinoides, posiblemente incluyendo otros subtipos además de CB1 y CB2, y activan segundos mensajeros que median sus efectos.

La finalización de la acción de la AEA ocurre mediante su recaptación por las células, proceso sobre el que existe una gran controversia, puesto que se ha postulado que podría ocurrir por difusión pasiva a través de la membrana celular (Patricelli y Cravatt, 2001; Glaser y col., 2003), por difusión facilitada mediada por un transportador selectivo putativo (Di Marzo y col., 1994; Beltramo y col., 1997) o por endocitosis (McFarland y col., 2004; Bari y col., 2005). Una vez internalizada, la AEA es degradada a ácido araquidónico y etanolamina por la acción de la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH). Degradando la AEA, la FAAH mantiene un gradiente que dirige la entrada de AEA a la célula.

La FAAH, originalmente conocida como “anandamida hidrolasa” esta codificada por un único gen localizado en el brazo corto del cromosoma uno humano (Wan y col., 1998). Tiene una longitud de 579 amino ácidos y una masa molecular de 63 kDa (Giang y col., 1997). El pH óptimo para su actividad es de 8,5.

La FAAH es más abundante en tejidos de hígado y cerebro y se encuentra presente, en menores niveles, en bazo, riñón, testículo y pulmón (Di Marzo, 1998; Wan y col., 1998).

Otra vía metabólica para la AEA es la oxigenación enzimática a través de la citocromo P450 (Bornheim y col., 1995) y lipoxigenasas, produciendo derivados hidroperóxidos e hidroxilados de la anandamida (Ueda y col., 1995; Edgemon y col., 1998). También ha sido informado que la anandamida puede ser sustrato de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), dando como resultado final prostaglandina E₂-etanolamida y otras prostamidas (Yu y col., 1997).



Vías de degradación de la anandamida.

En resumen, más allá de los avances logrados en el entendimiento de los mecanismos moleculares del sistema de endocannabinoides, la identificación total de las enzimas responsables de la biosíntesis de anandamida y de las moléculas involucradas en su metabolismo son un campo de exhaustiva investigación.

En cerebro porcino, bovino y de rata, la anandamida fue encontrada en concentraciones en un rango que va de “no detectable” a 29 pmol/g tejido. (Felder y col., 1996; Schmid y col., 1995), mientras que niveles más altos fueron observados en el cerebro humano (hasta 148 pmol/g tejido, Felder y col., 1996). La anandamida también ha sido detectada en rata fuera del sistema nervioso central, en riñón (Deutsch y col., 1997), testículos (Sugiura y col., 1996), piel y bazo (Felder y col., 1996) y plasma sanguíneo (Giuffrida y Pomelli, 1998), así como en bazo y corazón humanos (Felder y col., 1996).

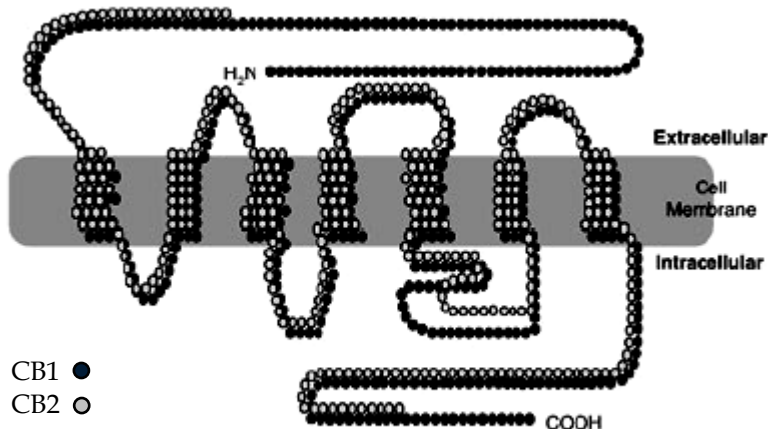
El útero de ratón es el tejido donde se han observado los niveles más altos de anandamida, alcanzando valores de hasta 20 nmol/g tejido. Más aún, el útero de ratón es el único tejido identificado hasta el momento en el cual la anandamida es el principal componente de las N-aciletanolaminas (75-95% de estas) (Schmid y col., 1997).

4.4.- Mecanismos de acción.

La anandamida actúa como agonista de los receptores de cannabinoides, que se denotan por la abreviación CB, sigla que proviene del inglés (por cannabinoid y brain). Hasta el día de hoy han sido encontrados dos tipos de receptores. El primero, CB1, fue descrito y caracterizado por primera vez en el cerebro de rata (Devane y col., 1988), mientras que el segundo subtipo de receptor fue caracterizado por primera vez en macrófagos de la zona marginal del bazo (Munro y col., 1993). El receptor CB1 se considera característico del sistema nervioso central, mientras que CB2 se haya ampliamente distribuido en células del sistema inmune de tejidos periféricos, aunque también se ha encontrado en cerebro.

Ambos receptores pertenecen a la superfamilia de los receptores acoplados a proteína G de 7 dominios transmembrana, y sus respuestas funcionales son mediadas por proteínas que unen GTP sensitivas a toxina de pertussis ($G_{i/o}$).

La AEA también puede actuar sobre receptores vaniloides (Zygmunt y col., 1999). Se sabe que la anandamida es capaz de inducir la liberación de NO en lecho mesentérico de rata aislado. Este efecto puede ser disminuido por un antagonista del receptor de vaniloides de tipo 1 (TRPV1) (Poblete y col., 2005).



Homología en la secuencia de aminoácidos entre los receptores CB1 y CB2.

Los receptores cannabinoides son receptores transmembrana de siete segmentos acoplados a proteína G.

Son reconocidas tres categorías de mecanismos de acción de los endocannabinoides.

La primera consta de los dos efectos de la estimulación de los CB. Primeramente la inhibición de adenilato ciclasa que lleva a niveles disminuidos de AMP cíclico (Howlett, 1985; Howlett y col., 1986; Howlett, 1995) y, en segundo lugar, la inhibición de canales de calcio tipo N y tipo P/Q que conduce a una disminución a la entrada de iones calcio a la célula (Howlett y col. 1986; Caulfield y Brown, 1992; Mackie y Hille, 1992).

La anandamida también ejerce ciertos efectos que no están mediadas por ninguno de los dos receptores CB, pero si lo están por interacciones con proteínas G, entre los cuales se pueden nombrar la activación de la liberación de ácido araquidónico y la inhibición de la señalización de Ca^{2+} mediada por uniones gap en astrocitos (Habayeb y col., 2002)

Finalmente, la tercera categoría involucra mecanismos de acción no mediados por receptores de cannabinoides, como por ejemplo la inhibición de canales de Ca^{2+} de

tipo L, la modulación de la señalización transmembrana de 5HT o NMDA, que no pueden ser bloqueados por antagonistas de los receptores de cannabinoides ni por toxina de pertussis (Mechoulam y col., 1998).

4.5.- Participación de la anandamida en eventos reproductivos.

Los estudios más tempranos se focalizaron en el impacto del uso recreacional del cannabis durante la preñez. Más recientemente los endocannabinoides, sus receptores y sus enzimas metabolizantes han sido implicados en la fisiología y fisiopatología de la preñez.

El uso de marihuana ha sido asociado con numerosas patologías reproductivas, la mayoría de las cuales serían causadas por el THC, por ejemplo niveles disminuidos de testosterona en plasma (Kolodny y col., 1974) y conteos reducidos en esperma e impotencia en hombres (Issidorides, 1978; Whan y col., 2006). En mujeres, el uso crónico de marihuana usualmente está asociado con anormalidades fetales y terminación temprana del embarazo (Qazi y col., 1985; Sherwood y col., 1999; Fried y col., 1984; Day y col., 1991).

Los exocannabinoides tienen varios efectos adversos sobre el eje hipotálamo-pituitaria-ovario en animales y humanos, que son bastante similares a los que producen los endocannabinoides. La anandamida causa la disminución de los niveles séricos de prolactina y hormona luteinizante (LH), aunque no afecta los niveles de hormona folículo-estimulante sérica (FSH) (Wenger y col., 1999), por lo que podría afectar el proceso de ovulación y la regulación del ciclo menstrual.

Según lo informado por Wenger y col. (1997) la anandamida, inyectada diariamente en ratas durante la tercera semana de preñez, produce una prolongación de la misma y aumenta la frecuencia de crías nacidas muertas. En las hembras tratadas con anandamida se observó una disminución en los niveles séricos de progesterona. También se encontraron disminuidos los niveles séricos de las prostaglandinas $F_{1\alpha}$ y $F_{2\alpha}$, lo que podría explicar parcialmente la prolongación de la preñez. La prolongación en la duración de la preñez es

diferente al efecto de los cannabinoides exógenos que, como se ha mencionado, está asociado con el parto pretérmino.

Los endocannabinoides tienen una importante participación en la implantación. El desarrollo del embrión pre-implantatorio hasta el estado de blastocisto, y la diferenciación del útero al estado receptivo son requerimientos básicos para el inicio de la implantación en todas las especies (Dey y col., 2004; Wang y Dey, 2006). La anandamida podría estar involucrada en la regulación de la “ventana” de implantación. Los endocannabinoides han sido señalados en los últimos años como una importante señal del diálogo útero-embrión.

La implantación en el ratón ocurre en el día 4 post-apareo y existen muy pocos datos sobre los niveles de anandamida y las actividades enzimáticas más allá del día 7 de la preñez del ratón.

Cabe destacar que los efectos de la anandamida parecen estar regulados principalmente por su degradación por la FAAH. Un estudio de los niveles y la actividad de la FAAH en los linfocitos maternos sugiere que la FAAH linfocitaria podría utilizarse como marcador de aborto espontáneo (Maccarrone y col., 2000).

La anandamida también podría actuar como reservorio de ácido araquidónico para la generación de prostaglandinas (Schmid y col., 1997).

5.- LAS PROSTAGLANDINAS.

Las prostaglandinas (PGs), al igual que los tromboxanos, los leucotrienos y los recientemente identificados endocannabinoides, son denominados genéricamente eicosanoides, palabra derivada del griego “eico” (veinte), en referencia a las cadenas de 20 carbonos que estos compuestos contienen (Gimeno y col., 1985).

5.1.- Un poco de historia.

Los primeros datos sobre la existencia de las prostaglandinas fueron aportados por Kurzrok y Lieb en 1930, quienes encontraron que el fluido seminal humano fresco producía contracciones cuando se aplicaba al miometrio humano.

Al cabo de unos años, Goldblatt (1933) en Inglaterra y Von Euler (1934) en Suecia, descubrieron de manera independiente que extractos de vesícula seminal de carnero poseían actividad vasopresora y estimulante del músculo liso. En 1935, Von Euler, encontró que esta actividad se asociaba con una sustancia liposoluble que poseía propiedades ácidas, a la que denominó prostaglandina, porque supuso que provenía de la próstata.

La elucidación de la estructura química de estos compuestos recién llegó a fines de la década del 50. Bergström y Sjovall (1957) aislaron, a partir de la vesícula seminal de oveja, dos de estas sustancias que denominaron PGE y PGF, porque fueron separadas por técnicas de partición en éter dietílico y buffer fosfato respectivamente.

Durante las décadas siguientes, fue descubierta una gran diversidad en las actividades biológicas de las PGs, y se elucidaron también las estructuras químicas de cada uno de los miembros de esta familia.

En diciembre de 1982, en Estocolmo (Suecia), los científicos Sune Bergström, Bengt Samuelsson y John Vane, recibieron el premio Nóbel en Medicina por sus descubrimientos concernientes a las prostaglandinas y otros compuestos relacionados biológicamente activos.

5.2- Metabolismo de las prostaglandinas.

Los eicosanoides son sintetizados por las células animales a partir de ácidos grasos poliinsaturados (AGEPI) de la familia del ácido linoleico, del ácido α -linolénico o del ácido araquidónico.

En el hombre con dieta occidental, el ácido araquidónico (AA) es el precursor lipídico más abundante. El AA proviene del ácido linoleico de la dieta o se incorpora preformado al organismo cuando se consumen carnes rojas, grasas animales o aceites no marinos.

El AA se absorbe en el intestino y pasa a la circulación sanguínea, en donde se combina con la albúmina. De allí, puede ingresar en los tejidos y llegar a formar parte de los lípidos de depósitos celulares.

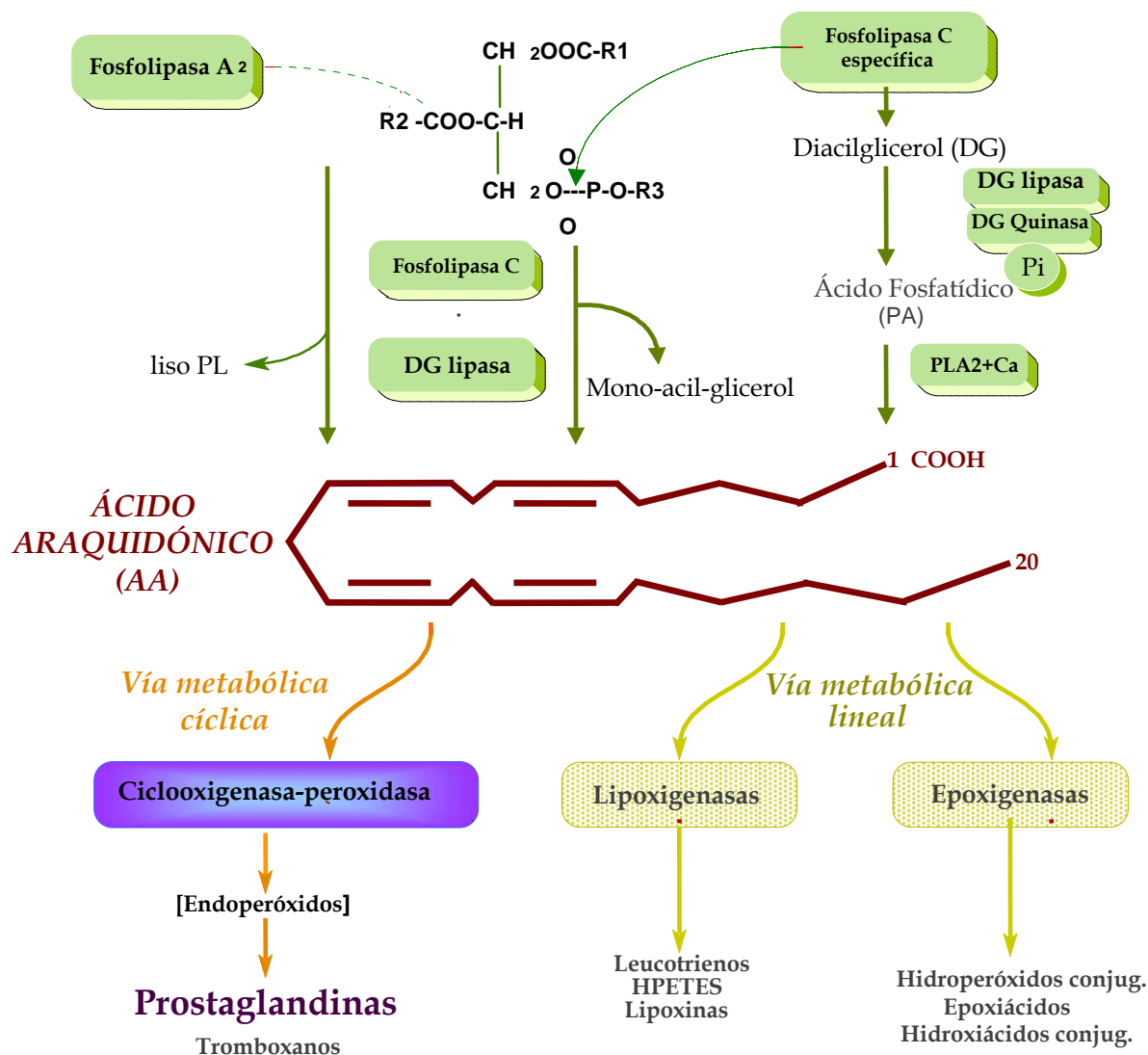
El AA forma parte de los depósitos tisulares acilado a fosfolípidos, triglicéridos y ésteres de colesterol. La mayor parte del AA se encuentra esterificando la posición sn-2 de fosfolípidos celulares. Esto significa que no se encuentra libre, sino que ocupa sitios específicos, desde los cuales debe ser previamente liberado por fosfolipasas movilizadoras que lo hacen accesible a las enzimas metabolizantes. Este fenómeno ocurre en una reacción de deacilación, en la mayoría de los casos dependiente de Ca^{2+} , en la que participan fosfolipasas activadas por estímulos mecánicos, químicos, antigénicos y hormonales.

Parte del AA liberado de los depósitos hísticos queda libre en el citoplasma para ser sustrato de las enzimas metabolizantes presentes en las fracciones solubles o particuladas del citoplasma. Otra parte se recicla para retornar a la membrana plasmática en una reacción de reacilación que requiere ATP y acetil-coenzima A.

Una vez liberado, el AA puede sufrir distintos procesos, pero principalmente es transformado mediante una oxidación enzimática que puede ocurrir por dos vías distintas:

- la **vía metabólica cíclica**: correspondiente a la etapa de formación de eicosanoides por ciclación, mediada por *ciclooxigenasas*, que da lugar a las prostaglandinas y los tromboxanos.

- la **vía metabólica lineal**: incluye los procesos de metabolismo oxidativo a cargo de:
 - *lipoxigenasas*, que dan origen a los leucotrienos, las lipoxinas y los hidroxiácidos (HETEs) e hidroxiperoxiácidos (HPETEs).
 - *epoxigenasas*, que dan origen a epoxiácidos, hidroperóxidos conjugados e hidroxiácidos conjugados



Liberación y metabolización del ácido araquidónico de membrana.

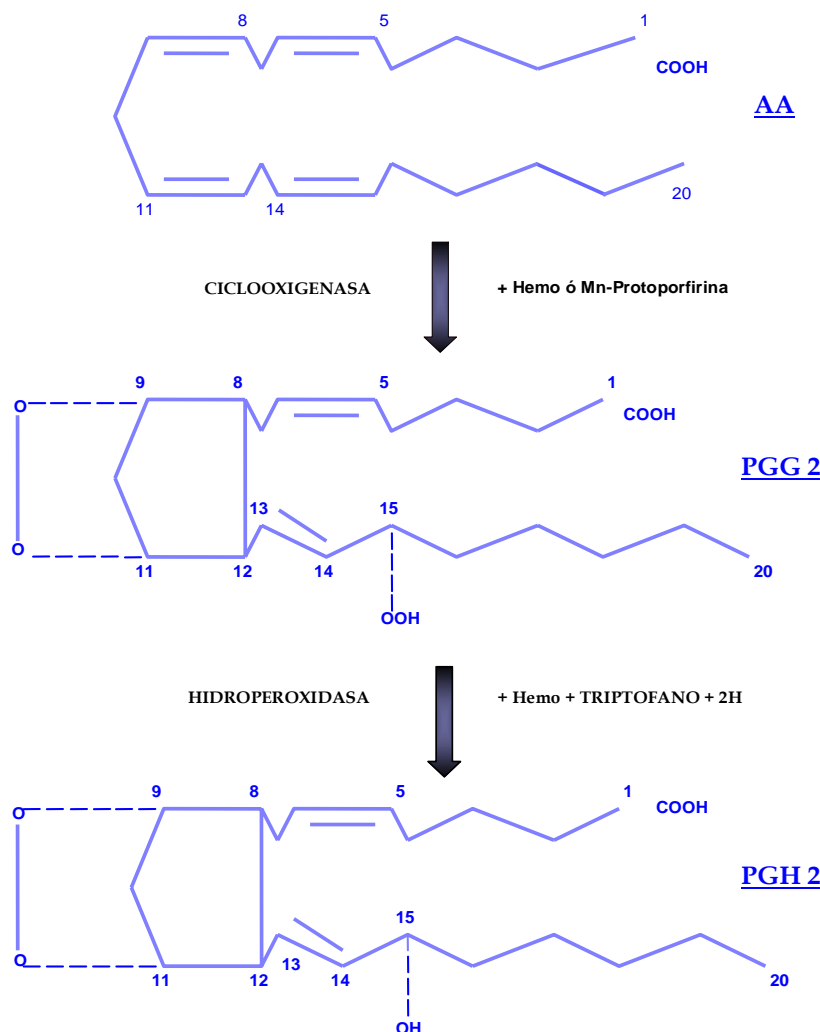
La síntesis de las PGs está limitada por la disponibilidad de precursores y por la activación de las fosfolipasas, requeridas para que el precursor se torne accesible a las enzimas metabolizantes.

Como ya hemos mencionado, una de las vías metabolizantes del AA libre es la cíclica, que está a cargo de un complejo enzimático llamado **sintasa de prostaglandina H (PGH)** o **ciclooxigenasa (COX)**.

La COX es una glicoproteína bifuncional, que existe como homodímero y cada unidad tiene un peso molecular de aproximadamente 70 kDa (Wu, 1995a). Esta enzima está ampliamente distribuida en células y tejidos de mamíferos con excepción de los glóbulos rojos. Su mayor actividad se detecta en el lado citoplasmático de las membranas de las vesículas de la fracción microsomal.

La COX posee dos actividades enzimáticas y ambas requieren la presencia del grupo hemo (Smith y Marnett, 1991).

- **ciclooxigenasa** con la que adiciona dos moléculas de oxígeno al AA para formar el intermediario endoperóxido **PGG₂**.
- **peroxidasa** con la cual reduce el PGG₂ a **PGH₂**.



Transformación del ácido araquidónico en el intermediario inestable PGH₂.

Los endoperóxidos lábiles, como el PGH_2 , son transformados rápidamente en prostanoïdes con actividad biológica por acción de enzimas citoplásmicas específicas, o bien, en forma no enzimática.

Aunque la distribución de la COX es muy amplia, la transformación enzimática de los endoperóxidos en prostanoïdes varía considerablemente en diferentes tejidos y tipos celulares

Hasta el momento se han identificado dos isoformas de la COX: COX-1 y COX-2. Ambas catalizan la conversión del AA en PGH_2 y son similares en su estructura aminoacídica. Sin embargo, cada una es codificada por un gen distinto (Lin y col., 1989; Tsai y col., 1991) y los tamaños de sus respectivos ARNm difieren significativamente (Wen y col. 1993, Xie y col. 1991).

La COX-1 fue la primera isoforma identificada y clonada de vesícula seminal ovina (Merlie y col., 1988). Si bien la COX-1 se expresa constitutivamente en la mayoría de las células de mamíferos, los niveles de COX-1 pueden incrementarse por inducción, indicando que ambas isoformas de COX serían inducibles, pero los mecanismos por los cuales se inducen serían distintos.

La COX-2, por su parte, está selectivamente distribuida y se expresa en células endoteliales y macrófagos luego de la estimulación con LPS (Lee y col., 1992).

Las principales diferencias entre las dos isoformas de COX se presentan en la Tabla 1.

La COX atraviesa por una auto-inactivación irreversible, la cual es intrínseca a la reacción catalítica para la generación de la PGG_2 (Smith y col. 1991). Esta inactivación resulta de la generación de un radical libre tirosilo por la actividad peroxidasa de la enzima, el cual interacciona con el hemo, oxigenándolo y bloqueando la actividad ciclooxigenasa. Esto no altera la estructura peptídica o el peso molecular de la enzima (Smith y col. 1992), por lo que tanto la forma activa como la inactiva corren hasta la misma posición en un gel desnaturizante de poliacrilamida. Tampoco se ve afectada la inmunoreactividad, por lo que pueden ser detectadas usando anticuerpos. Esto es cierto hasta el momento en que la enzima inactiva es degradada por proteasas a fragmentos proteicos de menor peso molecular.

	COX-1	COX-2
Expresión (Dong y Yallampalli, 1996)	Constitutiva, regulada (Wu K, 1995b)	Inducible por citoquinas, factores de crecimiento, hormonas y oncogenes (Salvemini y col., 1993)
Localización tisular (Dong y Yallampalli, 1996)	Generalizada	Macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, células de músculo liso.
Acción fisiológica	Protección de las mucosas, mantenimiento de las funciones y homeostasis normales (Whittle y col., 1980; Wu, 1995b)	Ovulación, parto, situaciones patológicas (particularmente inflamación). (Xie y col., 1991)
Glucocorticoides (O'Banion y col., 1992)	No tienen efecto	Inhiben el proceso transcripcional y post-transcripcional
NSAIDS clásicos: - aspirina, indometacina, ibuprofeno, piroxicam (Reece y col. 1996; Wu, 1995b)	Gran inhibición	Inhibición
NS-398 30 ng/ml (Futaki y col., 1994)	No tiene efecto	Inhibición selectiva
Meloxicam 10 ⁻⁷ a 10 ⁻⁹ M (Engelhardt y col., 1996)	No tiene efecto	Inhibición selectiva

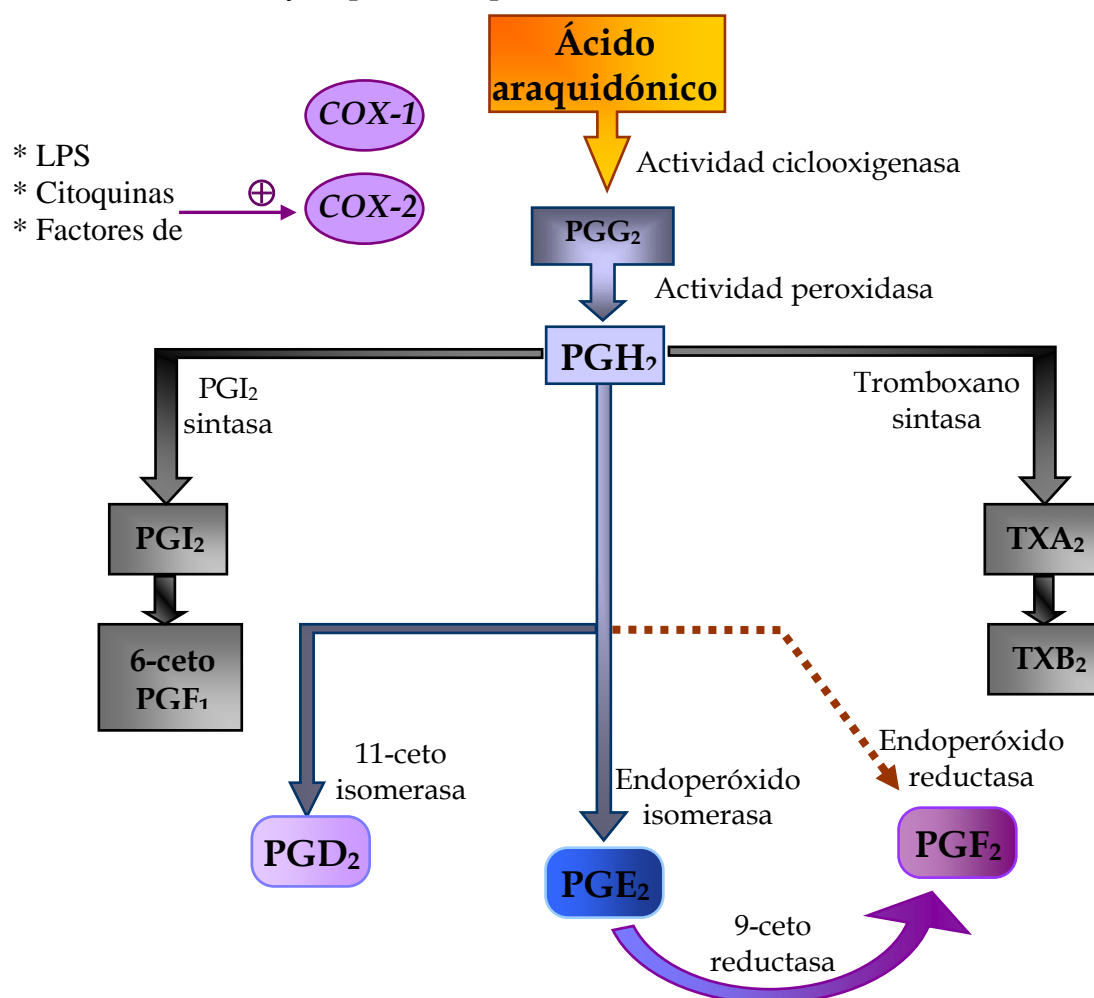
Tabla 1. Características de la COX-1 y la COX-2.

El PGH_2 , por acción de enzimas citoplasmáticas específicas o por un mecanismo no enzimático, es rápidamente transformado en prostanoïdes como:

- Prostaciclina (PGI_2), tromboxano (TXA_2) y PGD_2
- PGE_2 : se forma por la acción de la prostaglandina E sintasa, una enzima unida a membrana, en dos pasos: isomerización del endoperóxido y reducción.
- $\text{PGF}_{2\alpha}$: se sintetiza por reducción de PGH_2 por vías enzimáticas y no enzimáticas y además, en ciertos tejidos, la PGE_2 puede ser convertida en $\text{PGF}_{2\alpha}$ por acción de la 9-ceto-reductasa, en una reacción reversible.

Ambas PGs ejercen efectos estimuladores potentes sobre el músculo liso. Son producidas por casi todos los tejidos pero se observan cantidades sustanciales de ellas en folículo, útero y encéfalo.

La síntesis de PGE_2 en la médula renal se encuentra aumentada durante el embarazo avanzado y se presume que tiene un efecto natriurético.



Transformación del ácido araquidónico en sus metabolitos activos.

Las PGs poseen las siguientes características:

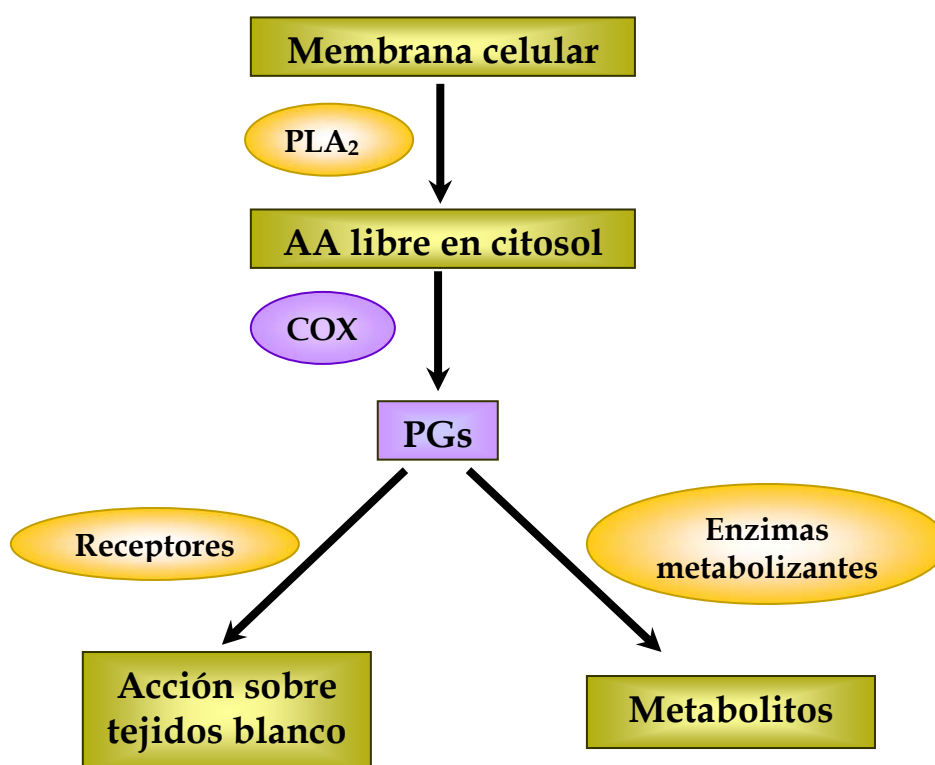
- tienen acción evanescente ya que son rápidamente catabolizadas. La concentración que alcanzan las PGs en los tejidos y demás fluidos resulta de un balance entre los procesos de síntesis y degradación, ambos de corta duración. El proceso de catabolismo, rápido y eficiente, ocurre principalmente en el pulmón. El pulmón recibe sangre venosa cargada de PGs y otras sustancias y entrega sangre arterial depurada de PGs. Este es un rasgo característico y muy importante de las PGs.
- no se encuentran almacenadas ni preformadas como lo están sus precursores: se sintetizan solamente cuando el AA es liberado desde su depósito en respuesta a diversos estímulos específicos como hormonas, antígenos, hipoxia y otros.
- son autacoides, ejerciendo su efecto localmente o en la vecindad de los tejidos que las producen.
- amplifican o deprimen otras respuestas funcionando como verdaderas hormonas.
- pueden actuar como mediadores fisiológicos o producir respuestas farmacológicas con implicancia en una variedad de procesos como: función renal, inflamatoria, inmune, reproductora, contracción o relajación del músculo liso intestinal, uterino, bronquial y cardíaco, regulación del flujo sanguíneo, liberación de hormonas y estimulación de las funciones plaquetarias.
- actúan generalmente de a pares, con acción opuesta.

Las PGs producen su acción luego de la unión a receptores celulares específicos, independientemente que éstos sean de membrana o intracelulares. Como resultado de esta unión ocurre una estimulación de la enzima adenilato ciclasa, que cataliza la conversión de adenosintrifosfato (ATP) en adenosinmonofosfato cíclico (AMPc). El AMPc actúa entonces como segundo mensajero, desplazando la subunidad reguladora de una proteína quinasa inactiva dejándola con la subunidad catalítica activa. La subunidad activa es seguidamente fosforilada en

presencia de ATP. La proteína fosforilada puede a su turno activar o inhibir otras proteínas, expresándose finalmente un efecto biológico global.

Los efectos contráctiles de los prostanoideos sobre el músculo liso pueden estar mediados por la liberación de calcio, mientras que los efectos de relajación estarían mediados por AMPc y GMPc (Yallampalli y col., 1994).

Como resumen general podemos decir:



Síntesis y degradación de las PGs a partir del AA.

5.3.-Inhibidores de las COX.

Dada la importancia clínica y farmacológica de las PGs, se ha trabajado mucho en el hallazgo de inhibidores de su síntesis.

Los AINES (drogas antiinflamatorias no esteroideas), como aspirina, **indometacina** e ibuprofeno actúan reduciendo la conversión de AA en PGs, lo que puede ocasionar lesiones gástricas luego de su administración. Estas sustancias son generalmente uno o dos órdenes de magnitud más potentes en la inhibición de

COX-1 que en la inhibición de COX-2, aunque varios compuestos han sido recientemente desarrollados en busca de la inhibición selectiva de la COX-2.

El inhibidor selectivo de la COX-2 **meloxicam** [4-hidroxi-2metil-N-(5-metil-2-tiazolil)-2H-1,2-benzotiazina-3-carboxamida-1,1-dióxido] ha demostrado poseer potentes propiedades antiinflamatorias y analgésicas con poca producción de lesiones gastrointestinales en ratas (Ogino y col., 2002). Por otra parte el meloxicam presenta un perfil farmacocinético en ratones similar al que presenta en humanos. El tiempo medio de eliminación ($t_{1/2}$) en ratones hembras es 4,8 y 6,4 h cuando es administrado oral e intravenoso respectivamente (Busch y col., 1998).

Otro inhibidor específico de la COX-2 es el NS-398 [N-(2-ciclohexiloxi-4-nitrofenil) metanosulfonamida].

Los glucocorticoides son potentes agentes antiinflamatorios y, aunque originalmente se creía que su acción se ejercía solo a nivel de la PLA₂, con la consiguiente disminución de los niveles de AA disponibles, en la actualidad se sabe que los glucocorticoides bloquean la inducción que ejercen las citoquinas sobre la COX-2, y de esta forma disminuirían la síntesis de prostanoïdes (Mitchell y col., 1993).

5.4.-Prostaglandinas y parto.

El descubrimiento de las PGs en el plasma seminal permitió dilucidar el efecto que éstas poseen sobre las contracciones uterinas. Posteriormente se determinó que facilitan la implantación del blastocisto y el transporte del huevo (Evans, 1988).

En el útero, las PGs generan contracción de la musculatura lisa ya que promueven la liberación de Ca²⁺ y el aumento de receptores a oxitocina. Durante el embarazo la producción de PGs estaría limitada por inhibidores endógenos, lo que permite mantener la quiescencia uterina (Mitchell y col., 1993; Brennecke y col., 1982). A término, y posiblemente en respuesta a la caída de los inhibidores endógenos, se produce un aumento en la concentración de las PGs en los tejidos intrauterinos y

esto está correlacionado con el comienzo y el mantenimiento del trabajo de parto (Thornburn y col., 1988). Consistentemente con este modelo, Gu y col., (1990) encontraron que el nivel de producción de PGs al día 15 de preñez en el miometrio de rata es significativamente menor que al día 22 (día de parto).

El incremento en la producción de PGs dentro del útero cumple un rol fundamental en la iniciación del parto en la mujer (Hisrt y col., 1995a). Los tejidos intrauterinos (Challis y Olson, 1988) y las membranas fetales (Edwin y col., 1996) son la principal fuente de PGs involucradas en la regulación parácrina del parto. Estudios *in vitro* han demostrado que la producción de PGs aumenta con el comienzo del trabajo de parto. Existe evidencia también que la concentración de PGs en fluido amniótico se incrementa en asociación con el trabajo de parto y este aumento es probablemente un paso crítico en el proceso de iniciación del parto (Salmon y Amy, 1973). La síntesis de PGs también aumenta en la decidua con el comienzo del trabajo de parto. De hecho la decidua es blanco de factores uterinos que estimulan la síntesis de PGs (Mac Donald y col., 1991).

Durante los dos últimos trimestres de embarazo la administración de PGE₂ y de PGF_{2α} provoca contracciones uterinas y descamación cervical induciendo el trabajo de parto (O'Brien y col., 1986; Hulka y Chepko, 1987; Williams y col., 1985). La sensibilidad del útero a las PGs aumenta a medida que la gestación progresa. Durante el parto, los niveles de PGE₂ y PGF_{2α} se encuentran aumentados en el fluido amniótico y en el plasma materno (Romero y col., 1989, 1992). Sumado a esto, se sabe también que durante el trabajo de parto el amnios produce PGE₂ exclusivamente, mientras que la decidua sintetiza PGE₂, PGF_{2α} y PGI₂ (Romero y col., 1990).

La descamación del cérvix es uno de los sucesos que se observan antes de comenzar el trabajo de parto. La aplicación local de PGs a concentraciones que no producen contracción uterina puede inducir la descamación cervical.

En el amnios humano la actividad de la COX se incrementa con el comienzo del parto (Teixiera y col. 1993, 1994). Esto sugiere que se debe alcanzar un nivel crítico de COX necesario para desencadenar el parto. Rice y col. (1988) han demostrado en oveja, que un drástico incremento de la actividad de la enzima precede al

trabajo de parto. Por otro lado Hirst y col. (1995b) encontraron en amnios humano niveles incrementados del ARNm de COX-2 previos al parto, y determinaron que este aumento estaba correlacionado con la actividad enzimática. Los trabajos de Rice y de Hirst avalan la premisa de que las PGs son producidas antes del trabajo de parto siendo causa de y no consecuencia del mismo.

Las PGs también son capaces de inducir abortos. Varios estudios demostraron que la administración intravenosa de PGE₂ o PGF_{2α} produce aborto en el 80% de los casos. Las PGs E₂ y F_{2α} pueden ser abortivas en las primeras semanas de embarazo dada su acción oxitócica, pero ésta acción suele ser inconstante y puede acompañarse de importantes efectos adversos como vómitos, diarrea e hipertermia (Katzung, 1992).

Las PGs provocan la regresión del cuerpo lúteo. Se ha determinado que la PGF_{2α}, de origen uterino en los roedores y de origen ovárico en los primates, causa luteólisis y disminución de la producción de progesterona por el ovario. Por esto la administración de PGF_{2α} interrumpe la preñez temprana en la rata y el conejo, especies en las que la preñez depende de la progesterona ovárica y no de la placentaria, como es el caso de los humanos (Soloff, 1989).

En los roedores el cuerpo lúteo (CL) involucrena hacia el final de la preñez, y en este proceso tiene una activa participación el útero. La secreción de PGF_{2α} por parte del útero hacia la vena uterina está asociada temporalmente con la regresión lútea espontánea e inducida hormonalmente en varias especies, entre las que se encuentra la rata (Castracane y Shaikh, 1976). Si bien el CL tiene la capacidad de producir PGF_{2α}, no sería ésta la responsable del inicio de la luteólisis. En la rata se postula que la PGF_{2α} ovárica solamente reforzaría mediante un mecanismo de retroalimentación positivo sobre el útero, el efecto luteolítico desencadenado por la PGF_{2α} uterina. Se ha demostrado *in vivo* que las infusiones de PGF_{2α} directamente en el CL provocan la regresión luteal (Auletta y col., 1973, 1984; Wilks, 1980). En la rata preñada la luteólisis debe ser evitada ya que la progesterona de origen lúteo es esencial para el mantenimiento de la gestación

temprana, media y tardía. Hacia el final de la preñez el aumento en la expresión de la COX-1 sería el responsable de aumentar la producción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ uterina. Gross y col. (1998) informaron que en ratones deficientes en COX-1 la producción uterina de $\text{PGF}_{2\alpha}$ fue significativamente menor hacia el final de la preñez, prolongando el inicio del trabajo de parto. La administración de este prostanoides restauró el inicio del parto como ocurría en los animales sin deficiencia de COX-1. Es por esto, que se postula que la COX-1 tendría un papel fundamental en la inducción de la luteólisis necesaria para el inicio del parto, mientras que el posterior incremento en la expresión de COX-2 contribuiría al aumento en la síntesis de las PGs responsables de estimular la contractilidad miometrial (Tsuboi y col., 2003).

Es importante mencionar que en los primates la regulación de la luteólisis no sería estrictamente dependiente de PGs uterinas, ya que la histerectomía no prolonga la vida media del CL (Beling y col., 1970; Castracane y col., 1979). Además, el CL es la principal fuente de esteroides necesarios para el mantenimiento del embarazo sólo durante los tres primeros meses. Luego, la placenta sustituye al CL como órgano productor de esteroides.

6.- EL ÓXIDO NÍTRICO.

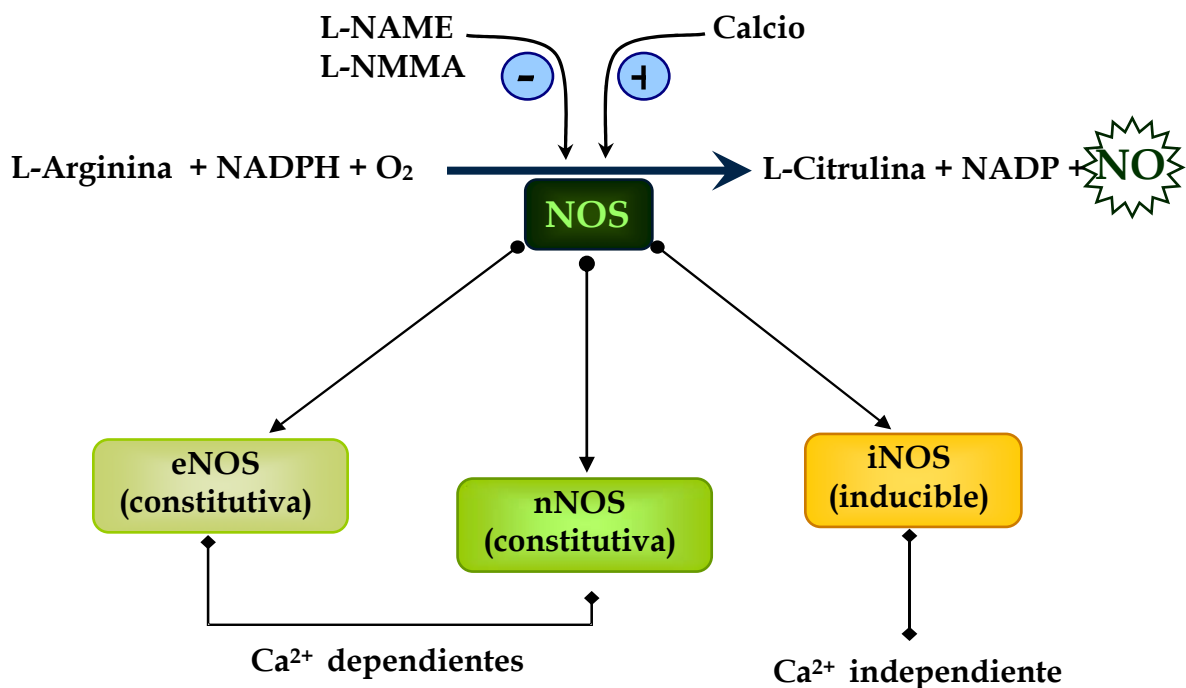
6.2.- Biosíntesis.

El óxido nítrico (NO, del inglés nitric oxide) es una molécula gaseosa, inestable y multifuncional que se produce en varios tipos celulares (músculo liso, células mesangiales, neuronas, plaquetas, macrófagos, fibroblastos, células epiteliales) y media diversos procesos fisiológicos, incluyendo vasodilatación, crecimiento celular, apoptosis, neurotransmisión, antiagregación plaquetaria y citotoxicidad. Presenta una vida media corta (menor a los 30 seg.) y llega a sus sitios de acción principalmente por difusión a través de las membranas celulares.

La síntesis del NO se produce a través de una familia de enzimas, genéricamente denominadas NOS, que se encuentran ampliamente distribuidas en los tejidos. Hasta el momento, se han sido informadas y exhaustivamente estudiadas tres isoformas de la enzima NOS que presentan diferente nomenclatura según se haga alusión al orden en el que fue descubierta o al tejido en el que fue detectada por primera vez. También existiría una cuarta isoforma, llamada NOS mitocondrial, aunque los conocimientos sobre ella son mucho menores. Todas las isoformas comparten las siguientes características:

- Se presentan en forma de dímero (compuesto formado por 2 moléculas idénticas más simples);
- En su sitio activo poseen flavina y hemo;
- Presentan un sitio de unión para el complejo calcio-calmodulina.

La reacción catalizada por la NOS es la siguiente:



En esta reacción se utilizan como sustratos el aminoácido L-arginina, el oxígeno molecular y el NADPH. En presencia de NADPH y otros cofactores, la NOS convierte L-arginina en citrulina y NO en cantidades equimolares.

Históricamente las tres isoformas de la NOS, codificadas por genes distintos, han sido divididas en constitutivas (eNOS y nNOS) e inducible (iNOS). Sin embargo, descubrimientos recientes sugieren que la expresión de eNOS y nNOS también puede ser inducida y que en algunos tejidos la iNOS parece estar presente en todo momento.

Actualmente la clasificación de las isoenzimas de la NOS se basa más en la dependencia de su actividad de los niveles intracelulares de calcio. Tanto la eNOS como la nNOS son fuertemente reguladas por calcio y calmodulina, mientras que la iNOS se une fuertemente a calmodulina, y por lo tanto es relativamente independiente de calcio.

- **nNOS o bNOS (NOS I).**

Fue la primera isoforma detectada y purificada en cerebro, de allí la nomenclatura "b" (del inglés "brain") o "n" (neuronal) (Schmidt y col., 1991). Aunque estudios

posteriores indican que está asociada predominantemente a la membrana del retículo endoplasmático y membranas sinápticas en neuronas y asociada al sarcolema de células musculares (Kobzik y col., 1994), esta isoforma se encuentra descrita en varios tejidos incluyendo tejidos reproductivos femeninos (Alí y col., 1997). Es un homodímero y cada subunidad tiene una masa molecular de 150-160 kDa.

- **eNOS (NOS III).**

Fue la última en ser descubierta, y se identificó originalmente en endotelio de vasos sanguíneos (Pollock y col., 1991), y luego en pulmón e hígado (Springall y col., 1992). Es una proteína asociada generalmente a la membrana de células endoteliales y su masa molecular es de 135-140 kDa.

Como ya se ha mencionado, ambas isoformas se expresan en forma constitutiva y su actividad catalítica depende de calcio/calmodulina (Förstermann y col., 1991). Las células que presentan las enzimas constitutivas, como las neuronas (nNOS) y las células endoteliales (eNOS) responden a agonistas que elevan el Ca^{2+} intracelular. El Ca^{2+} aumenta la unión de la calmodulina con la NOS, lo que produce una activación transitoria de la enzima llevando a la síntesis de NO (Carrera y col., 1999).

Las enzimas constitutivas son sensibles a los quelantes de Ca^{2+} y a los inhibidores de la calmodulina y son sintetizadas en forma continua y regulada.

El NO generado por estas isoformas es responsable de una variedad de acciones biológicas como relajación endotelio dependiente, inhibición y agregación plaquetaria y comunicación célula-célula en sistema nervioso central. La reducción de la síntesis de NO podría ser responsable de hipertensión y desórdenes vasculares (Rees y col., 1989; Panza y col., 1990), estenosis pilórica (Huang y col., 1993) y función neuronal defectiva.

- **iNOS (NOS II).**

Se la descubrió en macrófagos y posee un peso molecular de 125-130kDa. En su forma nativa es citosólica (Nathan, 1992), aunque dependiendo de la especie y del tipo celular puede ser particulada (Vodovotz y col., 1995).

A diferencia de las anteriores, esta isoforma es calcio-independiente y, una vez activada, genera NO por largos períodos. Su expresión puede ser estimulada por lipopolisacáridos de *E. coli*, factores de crecimiento o citoquinas.

El NO producido por esta isoforma juega un rol importante en las respuestas del sistema inmune, en la patogénesis de shock por endotoxinas y en la destrucción tisular autoinmune (Franchi y col., 1994).

- **NOS mitocondrial.**

Bates y col. (1995), Ghafourifar y Richter (1997) y Giulivi y col. (1998) identificaron una NOS mitocondrial (mtNOS). Esta enzima, asociada a la membrana interna de la mitocondria, es activa constitutivamente, dependiente de calcio y ejerce un control importante sobre la respiración mitocondrial y el metabolismo celular del oxígeno (Boveris y col., 1999).

Tipo de NOS	Tamaño	Distribución	Características
NOS I (nNOS)	1429 aminoácidos 160 kDa constitutiva	sistema nervioso central, nervios periféricos músculo	Puede generar tanto NO como O ₂ según la ausencia o no de L-arginina. Se activa por el influjo celular de Ca ²⁺ inducido por glutamato.
NOS II (iNOS)	1153 aminoácidos 130 kDa Inducible	Diversos tipos de células, principalmente leucocitos	Se activa por citoquinas: TNF-alfa, IL-6, INF-gama, LPS, NF-kB, IL-1 Acción bactericida
NOS III (eNOS)	140 kDa constitutiva	Endotelio vascular	Depende de la concentración de Ca ²⁺ y tetrahidrobiopterina
NOS mitocondrial	1203 aminoácidos 135 kDa constitutiva	Membrana interna	Modula la respiración mitocondrial

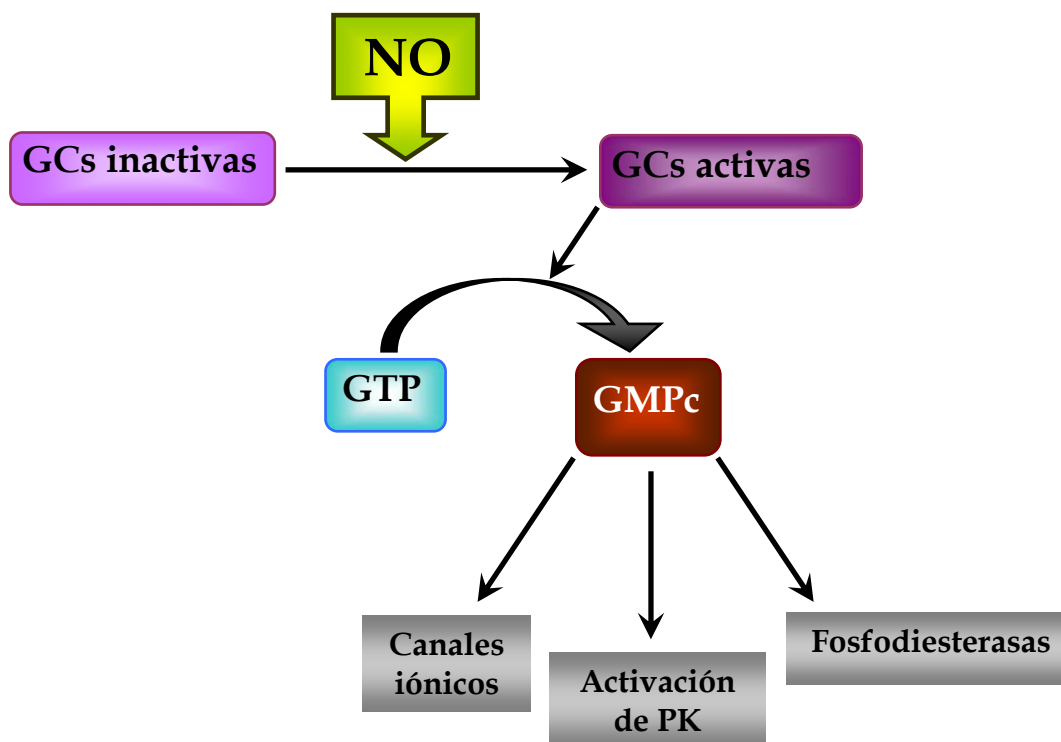
Tabla 2. Características generales de las isoformas de la NOS.

Los dos tipos (constitutivas e inducible) de NOS pueden coexistir en la misma célula. Las células endoteliales, por ejemplo, liberan NO por un tiempo prolongado en respuesta al factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa) y lo hacen solo brevemente cuando son estimuladas con un agonista de Ca^{2+} como la bradiquinina (Busconi y Michel, 1993).

6.2.- Mecanismo de acción.

El principal mecanismo de acción del NO, en la mayoría de los tejidos, es la activación de una guanilato ciclasa soluble (GCs) con la subsecuente formación del segundo mensajero guanosín monofosfato cíclico (GMPc). Si bien hay una creciente familia de guanilato ciclasas (GC), sólo las formas solubles que contienen hemo son activadas por NO. El complejo de hierro reducido (Fe^{2+}) que forma el hemo tiene una alta afinidad de unión y reactividad con NO, y la unión del NO al hemo altera la conformación de éste y modifica la actividad de la enzima (Ignarro, 1991). Así, el NO activa la enzima GCs para la producción de GMPc a partir de guanosina trifosfato (GTP). La actividad de GMPc termina por su rápida conversión a GMP, que es catalizada por varias fosfodiesterasas.

Continuando la cadena de estímulos que lleva a la vasodilatación, el GMPc activa proteínas quinasas dependientes de GMPc (PKG), enzimas que fosforilan diferentes proteínas de membrana en el retículo sarcoplasmático, entre ellas los canales de potasio, un sistema proteico llamado IP3-IRAG y un polipéptido del retículo sarcoplasmático llamado fosfolambam. La activación de estas tres vías lleva a una disminución de la concentración intracelular de Ca^{2+} que resulta en una inhibición de la vasoconstricción (Gewaltig y Kojda, 2002).



La generación del GMPc media la relajación muscular, inhibe el crecimiento de células del músculo liso y previene la agregación plaquetaria y la adherencia de los neutrófilos a las células endoteliales (Murad, 1994).

Distintos estudios sugieren que el NO también puede producir efectos biológicos activando vías que no dependen de GC.

El NO puede actuar como secuestrador de radicales libres e inactivar al superóxido, previniendo la citotoxicidad celular (Cooke y Tsao, 1993). Sin embargo, bajo otras condiciones, el NO puede reaccionar con el superóxido y generar peroxinitritos (ONOO⁻), compuestos que tienen un alto poder oxidante (Beckman y Crow, 1993), es decir que ejerce un efecto dual dependiendo de las condiciones.

Este gas también es capaz de formar complejos de alta afinidad con una variedad de grupos metálicos (Corbett y col., 1992).

6.3.- Regulación del sistema COX-prostaglandinas.

Otro mecanismo de acción importante del NO es la modulación de la síntesis y liberación de PGs. Tanto las COX como las lipoxigenasas son enzimas que

contienen hierro en el sitio activo de la molécula. Por interacción del NO con el hierro de cualquiera de éstas pueden modificarse sus actividades.

Aparentemente, cuando la motilidad uterina es baja la inducción de la síntesis de prostaglandinas por el NO, que activa a la COX, causa una rápida estimulación de las contracciones miométriales, mientras que cuando está declinando la motilidad, el NO actúa primariamente vía una GC que libera GMPc y la acción de los prostanoïdes liberados es de alguna forma bloqueada (Maier y col., 1990). Nuevamente el NO demuestra ejercer un efecto dual.

Adicionalmente, se ha demostrado en una línea celular de macrófagos de ratón que el NO activa COX-1 y COX-2 por un mecanismo GMPc independiente (Ialenti y col., 1992).

Sautebin y col. demostraron que tanto el NO endógeno como el exógeno incrementan la biosíntesis de prostaglandinas en la rata (1995).

En condiciones fisiológicas la actividad de la COX puede ser permanentemente estimulada por NO endógeno. La interacción entre el camino del NO y de la COX podría ser relevante en procesos de inflamación crónica y aguda, los cuales parecen ser modulados por NO, ya que en ambos tipos de proceso el grado de lesión fue reducido por inhibidores de la NOS y exacerbado por L-arginina (Futaki y col., 1994). Sin embargo, en algunos tejidos el NO es capaz de inhibir la síntesis de prostaglandinas (Pérez Martínez y col., 2000; Stadler y col., 1993; Minghetti y col., 1996).

6.4.- Regulación de la síntesis de NO.

6.4.1.- Modulación del NO por prostaglandinas.

La información referente a la acción de las prostaglandinas sobre el NO es controversial. Diversos investigadores han informado que las prostaglandinas pueden actuar sobre el sistema NO en algunos casos inhibiendo y en otros estimulando su síntesis. En macrófagos peritoneales murinos, la adición de PGE₂ (conjuntamente con LPS) durante el proceso de activación provoca una

disminución en la producción de NO, mientras que la indometacina (inhibidor no selectivo de las COX) provoca un incremento en la síntesis de NO. Estos resultados sugieren una acción inhibitoria de las PGs sobre la inducción de la iNOS en estas células (Raddassi y col., 1993). Por otro lado, Gaillard y colaboradores (1992) determinaron un rol estimulador de las PGs sobre la síntesis de NO en células de Kupffer.

Los mecanismos de acción de las PGs sobre la síntesis de NO pueden ser atribuidos en la mayoría de los casos a la acción de un segundo mensajero como el AMP cíclico (AMPC). Los mecanismos moleculares por los cuales el AMPC regula la NOS se han relacionado con un incremento en la estabilidad del mensajero o una variación en la actividad transcripcional (Koide y col., 1993).

6.4.2. NO y hormonas sexuales.

La regulación de la síntesis de NO es muy importante dado que los niveles de NO determinan sus mecanismos de acción. Las NOS pueden ser reguladas a diferentes niveles por calcio, calmodulina, fosforilaciones, citoquinas y hormonas, entre otros.

Numerosos investigadores han informado que las NOS son reguladas por esteroides sexuales. Weiner y col. (1994) sugieren que el tratamiento con estrógenos, así como el estado de preñez, aumenta la actividad de la isoforma dependiente de calcio (iNOS) y que este aumento estaría mediado por la activación de los propios receptores de estrógenos.

Por otro lado, algunos investigadores postulan que un enlace entre las hormonas sexuales y el sistema NO-GMPc existe en varios tejidos.

Yallampalli y col. (1994b) sugieren que el sistema NO-progesterona sería uno de los responsables del mantenimiento de la preñez, dado que un inhibidor de la NOS (L-NAME) potencia significativamente los efectos de un antagonista de progesterona y desencadena el parto en ratas, sugiriendo que estos dos sistemas podrían interactuar en el mantenimiento de la preñez.

Durante la gestación, la quiescencia miometrial en la rata coincide con elevadas concentraciones de los niveles de progesterona. El mantenimiento artificial de los niveles progesterona altos, previenen la disminución de la producción uterina de NO observada hacia el final de la preñez. Por otro lado, la disminución de la progesterona previa al parto a término induce un incremento en los niveles de NO del cérvix (Buhimschi y col., 1996).

Buhimschi y colaboradores (2000) también demostraron que las hormonas esteroideas regulan diferencialmente la producción de NO y GMPc en útero, dependiendo de la dosis y del estado reproductivo del animal.

Por su parte, la progesterona puede controlar la adaptación vascular al NO. El tratamiento con progesterona revierte parcialmente la hipertensión sanguínea inducida por L-NAME y la reducción del peso fetal en ratas preñadas (Chwalisz, 1993). Este sistema podría estar estimulando al sistema efector de cGMP en el tejido vascular como ocurre en el útero.

6.4.3.- Inhibidores de la síntesis de NO.

Los inhibidores se dividen en cuatro clases:

- 1) Análogos competitivos de la L-arginina, que tienen la capacidad de inhibir competitivamente la actividad de la NOS cuando se adicionan conjuntamente con el sustrato L-arginina. Los más utilizados en investigación son L-NMMA (NG-monometil-L-arginina) y L-NAME (NG-nitro-L-arginina-metil-éster). Estos compuestos inhiben a todas las isoformas (Palmer y col., 1988). Otros compuestos, como la **aminoguanidina (AG)**, son inhibidores selectivos de la isoforma iNOS (Misko y col., 1993).
- 2) Compuestos con afinidad al grupo hemo de la NOS. El propio NO liberado en altas concentraciones o el monóxido de carbono pueden inhibir a la enzima (Rengasamy y Johns, 1994; Dulak y Jozkowicz, 2003).
- 3) Compuestos que compiten con los cofactores de la NOS (Bredt y Snyder, 1992, 1994; Dawson y col., 1993).
- 4) Sustancias que modifican algún cofactor de la enzima (Dawson y col., 1993).

6.5.- Función del NO en la fisiología uterina.

El NO tiene un papel importante en los procesos reproductivos.

En el útero, la NOS ha sido localizada en diferentes tipos celulares como vasculatura, epitelio glandular y células del estroma endometrial y miometrial (Telfer y col., 1995).

Franchi y col. (1994) demostraron que el NO regula la contractilidad de la musculatura lisa uterina y las contracciones espontáneas. Por otro lado, Yallampalli y col. (1993) observaron que el NO provoca distensión uterina durante la preñez, pero no en momentos previos al parto, favoreciendo la quiescencia uterina durante la gestación.

Años más tarde, Ali y col. (1997) encontraron que los cambios hormonales que ocurren durante la preñez y el parto son responsables de regular las variaciones que se observan en la actividad de la NOS en el útero y en el cervix durante la gestación. Sladek y Roberts (1996) demostraron que el NO también contribuye con la vasodilatación sistémica materna y regula el flujo sanguíneo fetoplacentario y uterino.

Como se ve en estos trabajos, el NO ha sido involucrado en numerosos procesos reproductivos. Sin embargo, hasta el momento, no hay estudios que permitan concluir cómo se controla la síntesis y la acción del NO en el útero.

Los antecedentes más destacados como punto de partida para elaborar la hipótesis de trabajo se pueden resumir en:

- * El sistema endocannabinoide/receptores CB está presente en el útero.
- * Las mujeres que consumen marihuana sufren alteraciones en sus embarazos.
- * La administración de THC o anandamida a animales preñados retrasa el parto.
- * Las prostaglandinas, que pueden generar contracción miometrial, ven aumentada su concentración en los tejidos intrauterinos antes del parto.
- * El óxido nítrico regula la contractilidad de la musculatura lisa uterina, manteniendo la quiescencia del útero uterina durante la preñez.
- * El óxido nítrico y las prostaglandinas pueden modularse mutuamente en diversos sistemas experimentales.
- * Existen algunos estudios que prueban la existencia de interacciones entre los endocannabinoides y las prostaglandinas/NO.

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

Hipótesis general

Las prostaglandinas, el óxido nítrico y los endocannabinoides participan en los mecanismos involucrados en el inicio del parto, tanto a término como pretérmino.

Objetivos:

- 1) Establecer un modelo murino de parto prematuro.
- 2) Estudiar la participación y las interacciones entre las vías de las prostaglandinas, el óxido nítrico y los endocannabinoides en el inicio del parto a término.
- 3) Estudiar la participación y las interacciones entre las vías de las prostaglandinas, el óxido nítrico y los endocannabinoides en el inicio del parto prematuro.
- 4) Estudiar si estas interacciones están implicadas en el desencadenamiento del parto a término y del parto pretérmino.

1.- Medios y drogas.

1.1.- Drogas.

De Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA) fueron obtenidos:

- Lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* 055:B5. (L4005)
- Rojo punzó S
- Ditiotreitól (DTT)
- Anticuerpos secundarios conjugados a fosfatasa alcalina.
- S-nitroso N-acetil penicilamina (SNAP).
- Antisueros de PGE₂ y PGF_{2α}
- Aminogaunidina

Las membranas de nitrocelulosa (Trans-Blot, 0,45μm) fueron adquiridas de laboratorios Bio-Rad (CA, EE.UU.)

El material radioactivo utilizado para los ensayos de radioinmunoensayo (RIA) y síntesis de anandamida fue obtenido de Amersham Corporation (Arlington Heights, IL, USA) y Perkin Elmer:

- [5,6,8,9,11,12,14,15(n)-³H]-prostaglandina F_{2α} (160 Ci/mmol, 200μCi/ml)
- [5,6,8,9,11,12,14,15(n)-³H]-prostaglandina E₂ (130 Ci/mmol, 100μCi/ml)
- [1-¹⁴C]-ácido araquidónico (51 mCi/mmol, 100μCi/ml)
- [5,6,8,9,11,12,14,15-³H]-anandamida (172,4 Ci/mmol, 100μCi/ml)
- L-[U-¹⁴C]-arginina (360 mCi/mmol, 50μCi/ml)

Los reactivos para western blot (WB) fueron suministrados por Sigma y Bio-Rad.

Los anticuerpos utilizados para la detección de COX-1, COX-2, CB1 y CB2 fueron suministrados por Cayman. Los anticuerpos contra iNOS, eNOS, y nNOS fueron provistos por Santa Cruz Biotechnology.

El meloxicam se adquirió de laboratorios Boehringer y la indometacina de laboratorios Montpellier.

Los antagonistas de los receptores de cannabinoides AM251 y AM630 se adquirieron en Cayman.

Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

1.2.- Medios.

- **Líquido de centelleo para muestras acuosas.**

Optiphase HiSafe 3 de PerkinElmer.

- **Líquido de centelleo para muestras sólidas.**

Optiphase HiSafe 2 de PerkinElmer.

- **Buffer fosfato (PBS)**

NaCl 136,9 mM + KCl 2,68 mM + KH₂PO₄ 1,47 mM + Na₂HPO₄•7H₂O 8 mM.

- **Krebs - Ringer - Bicarbonato (KRB).**

NaCl 118mM + KCl 4,7 mM + KH₂PO₄ 1,18 mM + MgSO₄•7H₂O 1,22mM + 25.3 NaHCO₃ 25 mM + glucosa 11,1mM.

- **Buffer de inhibidores para muestras de Western Blot.**

PBS + EDTA 1mM + aprotinina 2 µg/ml + leupeptina 20 µM + DTT 5mM + STY 2 mM+ ácido caproico 1 mM + benzamidina 2 mM.

- **Buffer muestra de WB.**

Azul de bromofenol 0.3 % (p/v) + Buffer Tris 0.5 M (pH=6.8) + SDS 1% (p/v) + β-mercaptoetanol 5% (v/v) + glicerol 10 % (v/v).

- **Buffer de corrida de WB.**

Tris base 123,8 mM (pH=8.3) + glicina 0,96 M + SDS 17,3 mM.

- **Buffer de transferencia de WB.**

Tris 25 mM (pH=8.1-8.4) + glicina 192 mM + metanol 20% (v/v).

- **Rojo Punzo S.**

Rojo Punzo S (ácido 3-hidroxi-4-[2-sulfo-4-(4-sulfofenilazo) fenilazo]-2,7-naftalenodisulfónico) 0.5 % (p/v) + ácido acético 1 % (v/v)

- **TBS.**

Tris/HCl 50 mM (pH=7.5) + NaCl 500 mM.

- **TTBS.**

Tris/HCl 50 mM (pH=7.5) + NaCl 500 mM + Tween 20 (0.1 %).

- **Buffer RIA PGs.**

K₂HPO₄•3H₂O 7.3 mM + KH₂PO₄ 2.7 mM + ClNa 154 mM + albúmina bovina 7.1 mM + azida sódica 15.4 mM. pH=7.4

2.- Animales utilizados.

Se utilizaron ratones hembra de la cepa BALB/c, de peso homogéneo (20-25 gr), mantenidas bajo ciclos de luz-oscuridad (14 h-10 h) y temperatura (23°C-25°C) constantes.

Se colocaron en apareo hembras de entre 2 y 8 meses de edad con machos de la misma cepa (entre 2 y 12 meses de edad) y la ocurrencia de apareo fue constatada por medio de la observación de la presencia o ausencia de tapón mucoso vaginal.

Se separaron aquellas ratonas que presentaron tapón vaginal y se mantuvieron con agua y alimento *ad libitum* hasta el día de preñez indicado.

La preñez en la cepa BALB/c bajo las condiciones de nuestro bioterio tiene una duración de 19 días, definiéndose el día 0 como aquel en el que se observa presencia del tapón vaginal.

3.- Tratamientos aplicados a los animales.

3.1.- Determinación de la dosis de LPS inductora de parto prematuro.

Con el objetivo de determinar la dosis inductora de parto prematuro (PP) para ser utilizada como modelo de estudio, se ensayaron distintos protocolos de administración basados en trabajos con otras cepas existentes en bibliografía.

- 1) Hembras tratadas con una única dosis de LPS:** se administró a hembras preñadas, por vía intra-peritoneal (i.p.), una dosis simple de LPS entre las 9 y 10 h. del día 15 de preñez. Las dosis ensayadas fueron de 40, 50, 60 y 80 µg/ratón. Se registró la hora y el día del parto de la primera cría.
- 2) Hembras tratadas con dos dosis de LPS:** se administraron dos dosis i.p. de LPS separadas 3 h. entre si (a las 9 y 12 h. o a las 10 y 13 h) a hembras en el día 15 de preñez. Las dosis ensayadas fueron 40/40, 30/30, 20/20, 10/20 y 10/10 µg/ratón.

3) Hembras sham: hembras en el día 15 de preñez recibieron i.p. el mismo volumen de vehículo utilizado para disolver el LPS (1 ó 2 dosis de 100 µl de solución fisiológica, 0.9% NaCl).

4) Hembras controles no tratadas: hembras preñadas que no recibieron ningún tratamiento.

El efecto de la inyección *per se* se verificó comparando el momento de disparo del parto en las hembras control con respecto al momento de disparo del parto en las hembras *sham*.

Una vez establecida la dosis efectiva de LPS, tanto las hembras control, como las *sham* y las tratadas se sacrificaron por dislocación cervical. Mediante una incisión longitudinal medio-ventral se extrajeron los tejidos de interés, se limpiaron de grasa y se congelaron a -70°C hasta su posterior utilización.

3.2.- Tratamientos con otras drogas

-Meloxicam: En base a los antecedentes de bibliografía se ensayaron distintos protocolos de administración.

En el **parto prematuro** se probaron:

1. Una dosis única de meloxicam (40 µg i.p., en 100µl de solución fisiológica), 2 h. antes de la primera inyección de LPS.
2. Cuatro dosis de meloxicam de 40 µg cada una, aplicándose una en simultáneo con cada inyección de LPS y las otras dos 3 y 6 h. luego de la segunda inyección de LPS.

Para el **parto a término (PaT)** se administraron 5 dosis de meloxicam de 40 µg (i.p., en 100µl de solución fisiológica) a las 0, 8, 16 y 24 h. del día 18 y a las 8 h. del 19 de preñez.

-Indometacina: Para el PaT, se inyectaron 4 dosis de indometacina de 50 ug (i.p, en 100 µl de solución fisiológica) a las 20 h. del día 17, a las 8 y 20 h. del día 18 y a las 8 h. del 19 de preñez.

- **S-nitroso N-acetil penicilamina (SNAP):** Para el PaT, fue disuelto en solución fisiológica y administrado (60 µg/ratón, i.p.) a las 0 y 6 h. del d19 de preñez.

- **Aminoguanidina:** Para el PP, se administraron tres dosis de aminoguanidina de 6 mg/ratón cada una en el día 15 de preñez. La primera se inyectó 3 h. antes de la administración de LPS, la segunda junto a la segunda inyección de LPS y la tercera 6 h. después.

- **AM251:** Para el PaT. Fue disuelto en aceite vegetal. Para ello se vortexeó 15 seg. y se sonicó durante 5 seg. Se inyectaron 5 dosis de 100 µg (s.c.) a las 20 h. del día 17, a las 8, 16 y 24 h. del día 18 y a las 8 h. del 19 de preñez

En todos los tratamientos, para los estudios sobre la duración de la preñez se dejaron parir los animales y se registró la hora y el día de inicio del parto.

Para los estudios de síntesis de prostaglandinas, actividad NOS, actividad de síntesis de AEA, actividad de la FAAH y western blot los ratones tratados se sacrificaron a las 22 h. del día 15 de preñez en el PP y a las 9 h. del d19 en el PT. Mediante una incisión longitudinal medio-ventral se extrajeron los cuernos uterinos, limpiándolos de grasa, placenta y fetos y se congelaron a -70°C hasta su posterior utilización.

3.3.- Estudios durante la preñez.

Hembras preñadas se sacrificaron por dislocación cervical en los días 13, 15, 16, 18 y 19 de preñez, se extrajo el útero limpiándolo de grasa, placenta y fetos. El tejido se congeló a -70°C hasta su procesamiento.

4.- Ensayos *in vitro*.

- **Efecto de la anandamida sobre la síntesis de PGs:** La anandamida se disolvió en medio KRB para lograr la concentración deseada a partir de una solución stock 10^{-2} M (en DMSO). Los fragmentos uterinos se incubaron en 1 ml de la solución correspondiente durante 1 h. a 37°C y se continuó normalmente con la técnica de RIA.

Para el estudio de los receptores involucrados los tejidos se pre-incubaron durante 15 con los antagonistas (AM251 ó AM630) disueltos en medio KRB y luego se co-incubaron con el antagonista y la anandamida durante 1h a 37°C .

- **Efecto de la anandamida sobre la actividad NOS:** Los fragmentos uterinos se preincubaron durante 1 h. a 37°C con carbógeno en presencia o ausencia de la anandamida, disuelta en medio KRB. Se llegó a la concentración deseada a partir de una solución stock 10^{-2} M (en DMSO). Luego se pasaron a HEPES completo y se continuó normalmente con la técnica de medición de la NOS.

Para el estudio de los receptores involucrados los tejidos se pre-incubaron durante 15 con los antagonistas (AM251 ó AM630) disueltos en medio KRB y luego se co-incubaron con el antagonista y la anandamida durante 1h a 37°C .

- **Efecto del SNAP sobre la síntesis uterina de prostaglandinas:** El SNAP se disolvió en medio KRB para lograr la concentración deseada y se puso a liberar durante 1 h. a 37°C . Pasada esa hora se agregaron los fragmentos uterinos a los tubos y se incubó durante 1h. a 37°C . Luego se continuó normalmente con la técnica de RIA.

5.- Medición de la actividad de la sintasa de óxido nítrico.

Fue utilizada la técnica de Bretz & Snyder (1989) modificada, que se basa en la conversión de $[^{14}\text{C}]\text{-L-arginina}$ y O_2 a $[^{14}\text{C}]\text{-L-citrulina}$ y NO. Puesto que estos son producidos en cantidades equimolares, se puede utilizar la medición de citrulina,

que permanece en la muestra, como medida de la cantidad de NO (el cual es rápidamente destruido) producida.

Los cuernos uterinos provenientes de los animales de los distintos tratamientos fueron cortados en fragmentos pequeños (70-120 mg), pesados y homogeneizados en 500ul de buffer HEPES completo (HEPES 20,14 mM, pH=7,4, conteniendo Cl_2Ca 0.45mM, DTT 2.5mM, NADPH 0.5mM y valina 25mM (inhibidor de las arginasas)).

Posteriormente, los tejidos fueron incubados con [^{14}C]-L-arginina 10uM (0.3uCi), durante 15 min., en baño Dubnoff a 37°C con agitación constante y atmósfera de carbógeno.

Finalizada la incubación, cada muestra fue centrifugada a 7800 g por 10 min.

El sobrenadante del centrifugado se sometió a cromatografía de intercambio iónico, para separar la citrulina formada, utilizando columnas DOWEX AG50W-X8 (forma aniónica Na^+) que retienen la arginina y dejan pasar la citrulina. Se colectó el eluido de cada columna, luego se realizaron tres lavados con agua destilada para terminar de despegar la citrulina de la columna, colectándose estos eluido en los mismos tubos que los anteriores, a los que se agregó el líquido de centelleo Optiphase HiSafe 3 (PerkinElmer)

La radioactividad de los eluidos ([^{14}C]-L-citrulina) se cuantificó en un contador de centelleo beta (Beckman).

En cada ensayo se adicionó un tubo conteniendo solamente 500ul de buffer HEPES completo y [^{14}C]-L-arginina. La radioactividad medida en estos tubos luego del pasaje por la columna fue considerada inespecífica y ese valor fue restado a las muestras a determinar.

La actividad de la enzima se expresó como fentomoles de citrulina radioactiva producidos por mg de peso húmedo de tejido en 15 minutos (fmol [^{14}C]-citrulina/mg p.h. x 15 min.).

6.- Técnica de radioinmunoensayo.

Mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA, Jaffe y Behrman, 1974), usando los correspondientes anticuerpos específicos, se determinó el nivel de PGE₂ y PGF_{2α} liberado por el útero.

6.1.- Procesamiento de las muestras.

Los fragmentos uterinos provenientes de los distintos tratamientos se colocaron en viales conteniendo 1 ml de medio KRB y se incubaron durante 1 h. a 37°C en atmósfera de carbógeno. Luego se acidificó (pH=3) con HCl 1N y se adicionaron 2 ml de acetato de etilo. Se colectó la fase orgánica en un vial. La extracción se repitió dos veces más. La fase orgánica recolectada se secó en estufa de vacío y las muestras se guardaron a 4°C hasta su utilización.

6.2.- Determinación de prostaglandinas.

Las muestras y todos los reactivos fueron reconstituidos en buffer RIA de prostaglandinas. A partir de una solución madre de la prostaglandina correspondiente se realizaron diluciones hasta obtener una concentración final de 0.08 µg/ml (80000 pg), a partir de la cual se construyó la curva de calibración haciendo diluciones seriadas al medio (75-40000 pg).

A continuación se detallan los volúmenes empleados:

	buffer	muestra	antisuero	radioactivo	carbón
estándar	400	-	-	100	-
inespecífico	200	-	-	100	200
tubo O	100	-	100	100	200
curva	-	100	100	100	200
muestra	-	100	100	100	200

Los volúmenes están expresados en µl.

Luego de la adición del antisuero se incubó 30 min. a 4°C. Posteriormente se adicionó la PG marcada y se incubó durante 1 h. a 4°C. Las formas libres y unidas se separaron por el agregado de una suspensión de carbón activado (1%)-dextrán (0.1%) seguido de una centrifugación a 2000 x g durante 15 min. a 4°C (Sorvall RC-5B). El sobrenadante se volcó en viales que contenían 1 ml de líquido de centelleo para muestras acuosas. La radioactividad se cuantificó en un contador de centelleo beta (Beckman).

Para obtener una distribución normal de los datos se aplicó una transformación logarítmica. Los datos se expresaron como pg prostaglandina producida por mg de peso húmedo de tejido (pg PG / mg p.h.).

El método posee una reactividad cruzada menor al 0.1% para las prostaglandinas analizadas. La sensibilidad es de 5 pg/tubo y la constante de afinidad es $K_a = 1.5 \cdot 10^{10}$ L/mol.

7.- Western Blot.

7.1.- Procesamiento de la muestra.

Los tejidos a -70°C se descongelaron y se homogenizaron en buffer de inhibidores. Los homogenatos se sonicaron (Ultrasonic Cell Disrupter, Microson, Heat System Inc.) durante 30 segundos y se centrifugaron a 1500 g por 5 min. para remover los restos tisulares. Se conservaron los sobrenadantes a -20°C.

Se cuantificó el contenido de proteínas de cada muestra por el método de Bradford (1976).

7.2- Separación electroforética de las proteínas.

Los sobrenadantes de cada homogenato se hirvieron durante 5 min. en buffer muestra. Cada muestra estaba formada por tejido proveniente de 4 animales distintos. Se sembraron 80-100 µg de proteína total en cada calle.

Las proteínas se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

según la técnica descrita por Laemmli (1970).

Las muestras se corrieron primero en un gel concentrador 4% 0.125 M Tris pH=6.8. El porcentaje del gel separador varió de acuerdo a la proteína que se quiso detectar. Para las enzimas COX, la FAAH y los receptores CB1 y CB2 se utilizó uno al 10%, para las NOS el gel se preparó al 7,5%. Las muestras se separaron a 0.03 Amperes constantes hasta que el frente de corrida llegó al final del gel. Los marcadores de peso molecular (BioRad, rainbow) se corrieron bajo las mismas condiciones.

7.3.- Electrotransferencia de las proteínas.

Una vez que finalizó la corrida, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, 0.45 μ m) utilizando un aparato de transblot (BioRad). La transferencia se llevó a cabo a 4°C durante 18 h. a voltaje constante (40 V).

La membrana transferida se tiñó con Rojo Punzó S. Esta tinción se realizó con el objetivo de comprobar que las muestras sembradas en cada calle presentaban la misma cantidad de proteínas totales y que el proceso de transferencia se había realizado correctamente.

Posteriormente, las membranas se lavaron exhaustivamente con TTBS y se bloquearon durante 60 min. a temperatura ambiente en TBS conteniendo 5% de leche descremada.

7.4.- Detección inmunológica.

Luego del bloqueo las membranas se incubaron con el primer anticuerpo por 18 h. a 4°C. A continuación se detallan las condiciones en que fueron empleados los anticuerpos:

Anticuerpo	Dilución empleada
CB1	1:1000
CB2	1:500
COX-1	1:250
COX-2	1:250
iNOS	1:500
eNOS	1:300

nNOS	1:1000
Actina	1:4000

Los primeros anticuerpos son policlonales desarrollados en conejo y las diluciones de los mismos se realizaron en TBS.

Las membranas se lavaron tres veces por 10 min. en TTBS y posteriormente se incubaron durante 1 h. a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo diluido en TBS. Luego, las membranas se lavaron como se mencionó para el primer anticuerpo.

En todos los casos, como control negativo se sembró una calle que no fue incubada con el anticuerpo primario específico. En aquellos casos en que se contaba con un control positivo este fue sembrado en una de las calles y revelado igual que el resto.

Los segundos anticuerpos utilizados están acoplados a fosfatasa alcalina. El revelado de la membrana se realizó con la sal de 5-bromo-4-cloro-3-indolil toluidina fosfato (β CIP) y azul de p-nitrotetrazolio (N β T) (Sigma).

7.5.- Identificación de las bandas proteicas.

Las bandas proteicas se identificaron mediante el uso de los marcadores de peso molecular. La ubicación de cada banda se calculó usando una regresión logarítmica a partir de las posiciones de los marcadores de peso molecular. La posición de cada banda se tomó como la distancia desde el origen de la corrida hasta el centro de cada una.

$$Rf = \frac{\text{distancia recorrida (mm) por la proteína a determinar}}{\text{distancia recorrida (mm) por la proteína patrón}}$$

Las membranas se digitalizaron mediante un scanner UMAX Astra 1220S y la intensidad de las bandas se cuantificó utilizando el programa Image J (NIH). Las bandas correspondientes a cada proteína fueron normalizadas contra la banda correspondiente a la actina (43 kDa), como una medida de control de siembra

constante en cada calle. Los resultados se expresaron como la densidad óptica (d.o.) relativa a la actina.

8.- Determinación de la actividad de síntesis anandamida.

La síntesis de anandamida fue medida, con modificaciones menores, según la técnica descrita previamente por distintos grupos (Paria y col., 1996; Fernández Solari y col., 2004). El tejido uterino fue homogeneizado en buffer Tris/HCl 20 mM (pH=7,6) conteniendo EDTA 1 mM. Tras determinar la concentración de proteínas de cada muestra por el método de Bradford (1976), se incubaron 150 µg de proteína por 5 min. a 37°C en buffer 50 µM Tris/HCl (pH=9) conteniendo etanolamina 20mM y [¹⁴C]-ácido araquidónico 40µM (0,1µCi, actividad específica 51 mCi/mmol). Se detuvo la reacción y se hizo una primera extracción mediante la adición de una mezcla cloroformo : metanol (1:1 v/v). La fase acuosa se extrajo dos veces más con cloroformo.

Las muestras se sembraron en placas de cromatografía de placa delgada (TLC) Silica Gel 60 de aluminio con zona concentradora. Las placas se corrieron en la fase orgánica de un sistema de solventes compuesto por acetato de etilo : hexano : ácido acético : agua destilada (100:50:20:100 v/v). Los lípidos fueron visulizados por tinción con yodo, identificados por co-migración con standards de AA y AEA y raspados de la placa y cuantificados por conteo de centelleo líquido. Los R_f de AEA y AA fueron 0,33 y 0,78 respectivamente. La actividad del pico radioactivo correspondiente a la AEA fue contada y expresada como un porcentaje de la radioactividad total de cada calle.

La actividad enzimática se expresó como nmol AEA/ hora por mg proteína. Previamente se habían determinado las condiciones óptimas de reacción (tiempo de incubación, concentración de proteínas, etc.).

9.- Cuantificación de la actividad de la FAAH.

La actividad de la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH) fue medida según lo descrito por Paria y col. (1996) con modificaciones menores.

Brevemente, los tejidos fueron homogeneizados en buffer Tris/HCl 20 mM (pH=7,6) conteniendo EDTA 1 mM. y se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford.

Se incubaron 100 µg de proteínas durante 30 minutos a 37°C en 200 µl de buffer Tris/HCl 50 mM (pH=8,5) que contenía [³H]-anandamida 100 µM (0,05 µCi) y 20 nmoles de anandamida fría. La reacción se detuvo mediante la adición de una mezcla cloroformo : metanol (1:1 v/v). La fase acuosa se extrajo dos veces más con cloroformo.

Las muestras se sembraron en placas de cromatografía de placa delgada (TLC) Silica Gel 60 de aluminio con zona concentradora. Las placas se corrieron en la fase orgánica de un sistema de solventes compuesto por acetato de etilo : hexano : ácido acético : agua destilada (100:50:20:100 v/v). Los lípidos fueron visulizados por tinción con yodo, identificados por co-migración con standards de AA y etanolamida y raspados de la placa y cuantificados por conteo de centelleo líquido. La actividad del pico radioactivo correspondiente al AA fue contada y expresada como un porcentaje de la radioactividad total de cada calle.

La actividad enzimática se expresó como nmol AA/h. x mg proteína.

10.- Análisis estadísticos.

La evaluación estadística se realizó aplicando la prueba de ANOVA (uno o dos factores) seguido de una Comparación Múltiple de Tukey's. Para el caso de dos tratamientos, la prueba estadística empleada fue el "t" de Student.

Los datos fueron expresados como los valores medios ± SEM (error estándar de la media). Cuando P<0.05 se consideraron significativas las diferencias entre las medias.

1.- Establecimiento del modelo de parto prematuro inducido por LPS.

Nuestro primer objetivo fue desarrollar un modelo de parto prematuro (PP) en ratonas de la cepa BALB/c. Para ello, y en base a antecedentes existentes en la literatura, se ensayaron distintos protocolos de administración consistentes en una o dos dosis de LPS, inyectado por vía intra-peritoneal (i.p.) en la mañana del día 15 de preñez. Las dosis probadas y los resultados obtenidos pueden verse en la Tabla 1.

El efecto de la inyección *per se* se verificó comparando el momento de inicio del parto en las hembras control y en las tratadas con solución salina (*sham*). En las hembras *sham* el parto comenzó el día 19 de gestación a las 9 h. (± 2 h.), lo que no difirió de lo observado en las hembras control (Figura 1). Por lo tanto, las inyecciones no afectaron *per se* el inicio del parto.

En primer lugar analizamos el efecto de administrar a las hembras preñadas dosis únicas del LPS en el día 15 de gestación (40, 50, 60 y 80 $\mu\text{g}/\text{ratón}$) (Tabla 1A). Se observó que la mayor dosis ensayada (80 $\mu\text{g}/\text{ratón}$) indujo la muerte de la mayoría de las hembras (75%), y la que sobrevivió, si bien tuvo parto a término, solo dio a luz una cría, pudiéndose observar en el útero los sitios de implantación del resto de los embriones, sugiriendo que estos fueron expulsados a raíz del tratamiento con LPS.

Resultados similares se observaron para la dosis de 60 $\mu\text{g}/\text{ratón}$, y aunque en este caso una de las hembras tuvo parto prematuro, tan solo 3 crías nacieron saludables, expulsando además 4 fetos necróticos.

La dosis de 50 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ fue la que indujo el inicio prematuro del parto en un mayor porcentaje de animales (70%). Sin embargo, en 5 de los 7 casos se produjo la muerte de la madre durante el parto.

Finalmente se ensayó una dosis de 40 $\mu\text{g}/\text{ratón}$, que no indujo el PP en ninguno de los casos.

En base a trabajos previos se decidió entonces analizar el efecto de la administración de dos dosis de LPS, administradas i.p. con un intervalo de 3 horas en el día 15 de preñez. Como se puede ver en la Tabla 1B, las dosis más elevadas de LPS (2 dosis de 30 ó 40 µg/ratón) resultaron letales, provocando la muerte de todos los animales tratados.

Cuando se administraron 2 dosis de 20 µg/ratón, equivalente en cantidad a la menor dosis única ensayada, se produjo PP en todos los casos, pero en un 33% de los casos la madre murió durante el parto.

Al estudiar el efecto de dosis menores (2 dosis de 10 µg/ratón) se encontró que aunque ningún animal murió, tan solo se indujo el PP en el 25% de los casos. Por ello se probó una dosis intermedia entre estas últimas dos, como se ve destacado en la Tabla 1B. Usando una primera dosis de 10 µg a las 9-10 h. del día 15 de preñez y, tres horas más tarde, una segunda dosis de 20 µg, se indujo el parto prematuro en todos los casos con una mortalidad mínima de las madres. Se decidió entonces utilizar este protocolo de administración, esquematizado en la Figura 1, como modelo de parto prematuro.

En este modelo el parto se produjo alrededor de las 22 h. del día 15 de preñez, o sea transcurrido aproximadamente el 80% del tiempo de gestación, lo que en el hombre equivaldría a un parto pretérmino a las 31 semanas de gestación. Por su parte el número de crías (9 ± 2) no varió con respecto a las hembras *sham* (día 19, nº de crías: 10 ± 3) ni a las hembras control (día 19, nº de crías: 10 ± 3).

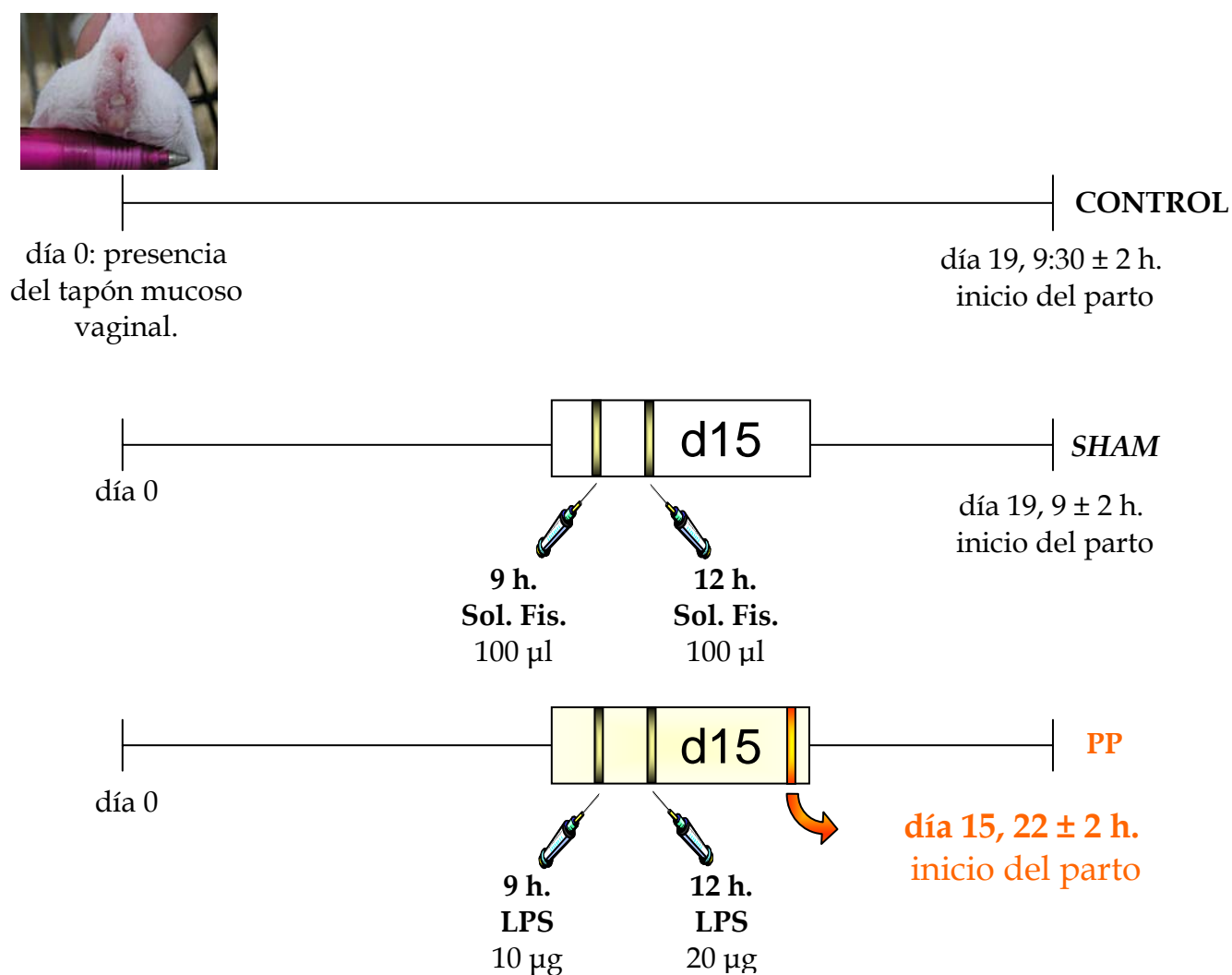
Cabe destacar que si bien el LPS produjo algunos efectos sistémicos en la madre (piloerección y postura agachada), los mismos desaparecían 24 h. después del tratamiento y solo un porcentaje mínimo (5%) de los animales murió por el tratamiento con la endotoxina.

	dosis	n	PP	parto en d19	muertos
A) 1 dosis	80 µg/ ratón	4	-	1 (1 cría)	3
	60 µg/ ratón	4	1 (3 crías)	1 (3 crías)	2
	50 µg/ ratón	10	2	3	5 (en parto)
	40 µg/ ratón	4	-	2	2
	<i>sham</i> (1 dosis)	4	-	4	-
B) 2 dosis	2 x 40 µg	4	-	-	4
	2 x 30 µg	4	-	-	4
	2 x 20 µg	6	4 (66%)	-	2 (en parto)
	1 x 10 µg + 1 x 20µg	20	19 (95%)	-	1 (en parto)
	2 x 10 µg	4	1	3	-
	<i>sham</i> (2 dosis)	4	-	4	-

Tabla 1.

Efecto de la administración de LPS sobre el inicio del parto.

Hembras en el día 15 de preñez recibieron i.p. distintas dosis de LPS. Las hembras *sham* se trataron con vehículo (solución fisiológica). Se registró el momento del parto y el número de crías.



	Control	Sham	PP
Momento del parto	Mañana del d19	Mañana del d19	Noche del d15 *
Número de crías	10 ± 3	10 ± 3	9 ± 2

* 10 ± 2 h post LPS

Figura 1.

Esquemas de inyección en los modelos estudiados.

Hembras en el día 15 de preñez no recibieron ningún tratamiento (**control**) o se les administró vehículo (solución fisiológica, i.p.) (**sham**) o LPS (**PP**). Se las observó hasta el momento del parto, registrándose la hora de inicio del mismo y el número de crías. $n \geq 4$ para cada tratamiento estudiado.

Participación de las vías de las prostaglandinas, el óxido nítrico y los endocannabinoides en el parto.

2.- Participación del sistema ciclooxygenasas-prostaglandinas en el parto.

Varios autores han informado que las prostaglandinas son las responsables de desencadenar las contracciones uterinas necesarias para la expulsión fetal (Romero y col., 1994; Bukowski y col., 2001). En particular, la PGE₂ y la PGF_{2α} son potentes estimuladores de la contractilidad miometrial y son producidas por el útero durante el parto (Gu, 1990). Ambas prostaglandinas poseen actividad uterotónica (Vane y Williams, 1973). Por ello se decidió estudiar su rol en el parto a término y en el parto pretérmino inducido por LPS.

2.1.- Participación de la prostaglandinas en el parto a término.

Para corroborar la participación del sistema prostaglandinas-ciclooxygenasas (PGs-COX) en el parto normal, se colectaron los úteros de hembras sacrificadas en los días 13, 15, 16, 18 y 19 de preñez, y se utilizaron para cuantificar, por radioinmunoensayo, la producción de prostaglandinas. Se observó que la producción de PGE₂ y de PGF_{2α} aumentan hacia el final de la preñez, alcanzando los máximos niveles en los momentos previos al parto (Figura 2A).

La ciclooxygenasa es la enzima que cataliza el paso clave en la conversión de AA a prostanoides bioactivos. Como se mencionó anteriormente existen dos isoformas de esta enzima, COX-1 y COX-2.

Distintos trabajos muestran que cantidades crecientes de prostaglandinas (especialmente PGE₂ y PGF_{2α}) son detectadas en el tejido uterino durante el parto a término y que existiría una inducción de la COX-2 al final de la preñez (Gu, 1990; Vane y Williams, 1973). Por otro lado, Gross y col. (1998) informaron que en ratones deficientes en COX-1 la producción de PGF_{2α} es menor al final de la preñez.

Considerando los datos previos de la literatura y el aumento en la síntesis de prostaglandinas encontrado hacia el final de la gestación, se decidió determinar si existía una variación en el nivel proteico de las COX.

La Figura 2B muestra que ambas ciclooxigenasas, COX-1 y COX-2, se encuentran presentes en el útero de ratonas preñadas, ya que los anticuerpos utilizados reaccionaron específicamente con bandas de 72 kDa para COX-1 y de 70 kDa para COX-2, lo que concuerda con los pesos informados para estas proteínas. Coincidiendo con lo informado por otros autores se observó un aumento significativo en los niveles proteicos de la COX-2 uterina hacia el final de la gestación, que se correlacionó con el aumento en la síntesis de prostaglandinas, mientras que la banda correspondiente a la COX-1 permaneció sin cambios a lo largo del tercio final de la preñez (Figura 2B).

Las bandas correspondientes a cada isoforma fueron normalizadas contra la banda correspondiente a la proteína actina (43 kDa), como una medida de control de siembra constante en cada calle.

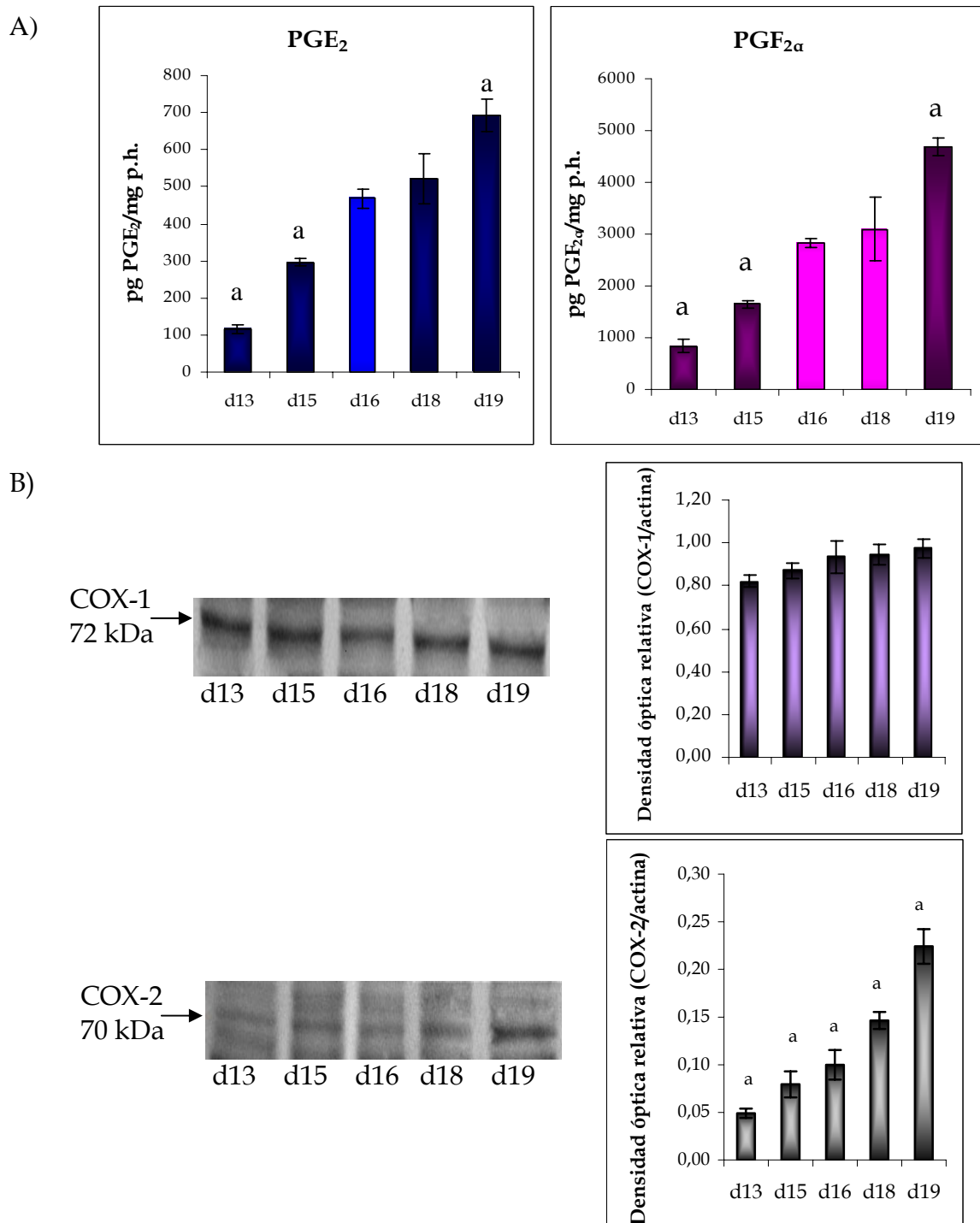


Figura 2.

Participación del sistema COX-prostaglandinas en el parto a término.

A) Producción de PGE₂ y PGF_{2α} por fragmentos uterinos de ratonas preñadas en diferentes días de gestación. Los resultados representan la media ± SEM de 3 experimentos independientes. En todos los casos n≥4.

B) WB representativo y análisis densitométrico de las bandas de COX-1 y COX-2. Las bandas correspondientes a las COX fueron normalizadas contra actina (43 kDa), a=P<0,01 vs. el resto.

Teniendo en cuenta el aumento en la producción de prostaglandinas uterinas observado en momentos previos al parto, un grupo de ratonas preñadas (n=4) fue tratado con indometacina (dosis de 40 µg/ratón, i.p.), un inhibidor no selectivo de las ciclooxigenasas, para analizar la importancia de las prostaglandinas en el inicio del parto.

Este tratamiento produjo un retraso en el inicio del parto de aproximadamente 8 h. y, causó una disminución en el nivel proteico de la COX-2 (Figura 3B).

Estos resultados evidencian que las prostaglandinas producidas por el útero al término de la gestación son esenciales para el desencadenamiento del parto a término.

Debido a la correlación encontrada entre el aumento de la producción de prostaglandinas y el aumento en la expresión proteica de COX-2, se decidió estudiar si la inhibición selectiva de la misma era suficiente para causar un retraso del parto.

Para ello se trataron ratonas preñadas con meloxicam, un inhibidor selectivo de la COX-2, a partir del día 18 de preñez (momento en que se registra el mayor aumento en la producción de PGs y en los niveles proteicos de COX-2). El tratamiento (descrito en materiales y métodos), resultó en un retraso en el inicio del parto de aproximadamente 24 h., dado que todas las hembras parieron entre las 8 y las 12 h. del día 20 de preñez (n=6).

Cuando se analizó la producción uterina de PGE₂ y PGF_{2α}, ésta se encontró disminuida en las hembras tratadas con meloxicam (Figura 3A), efecto que parece ser ejercido, al menos en parte, mediante una disminución en el nivel proteico de la COX-2, mientras que no se vio afectado el nivel proteico de la COX-1 (Figura 3B).

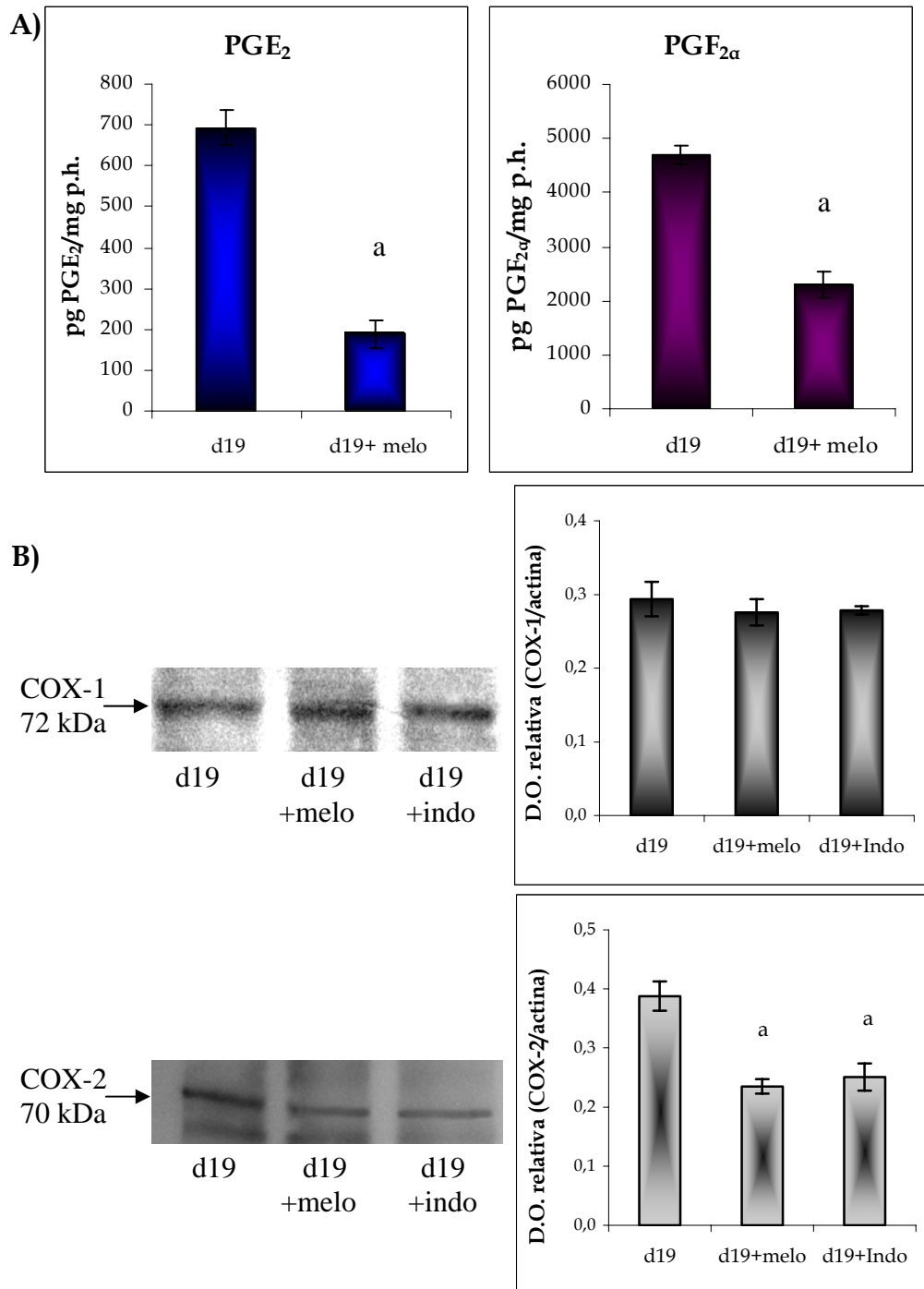


Figura 3.

Efecto de inhibidores de las COXs sobre el sistema COX-PGs en el parto a término.

A) Producción de PGE₂ y PGF_{2α} por fragmentos uterinos de ratonas en el día 19 de preñez. Los resultados representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. En todos los casos $n \geq 4$. $a = P < 0,001$ vs. d19

B) WB representativo y análisis densitométrico de las bandas de COX-1 y COX-2. Las bandas correspondientes a las COX fueron normalizadas contra actina (43 kDa).

2.2.- Participación de las prostaglandinas en el parto prematuro.

Considerando el papel preponderante del sistema COX/PGs observado en el parto a término, el siguiente objetivo fue estudiar si la síntesis de PGE₂ y PGF_{2α}, así como los niveles proteicos de las COXs, se encontraban incrementados en úteros de ratonas con parto prematuro inducido por LPS.

Se encontró que la administración i.p. de dos dosis consecutivas de LPS (10 y 20 µg) en la mañana del día 15 de gestación ocasionó un incremento en la síntesis uterina de PGF_{2α} en el d15 de más de un 250%, alcanzando niveles similares a los observados en el d19. También la síntesis de PGE₂ se vio incrementada por el tratamiento con LPS, aunque en este caso el aumento fue de menor magnitud (aprox. 50%) (Figura 4).

A la vista de estos resultados, se decidió analizar si esta endotoxina tenía además un efecto sobre el nivel proteico de las ciclooxigenasas.

Como se observa en la figura 5A, una banda de 72 kDa fue reconocida por el anticuerpo dirigido contra COX-1 (Figura 5A). El análisis densitométrico de esta banda reveló que no existían diferencias en los niveles proteicos de COX-1 durante el parto prematuro (d15+LPS).

Por su parte, la administración i.p de LPS en el día 15 de gestación provocó un aumento significativo en el nivel proteico de la COX-2 uterina (Figura 5B).

2.2.1.- Efecto del meloxicam sobre la síntesis uterina de prostaglandinas en el parto prematuro.

Los resultados presentados hasta aquí demuestran que en el parto prematuro inducido por LPS existe un incremento de la producción uterina de prostaglandinas y de la expresión proteica de la COX-2, por ello se estudió si el meloxicam, inhibidor selectivo de la COX-2, podía regular la producción de PGE₂ y PGF_{2α} en el parto prematuro.

Como se observa en la Figura 4, el aumento de la síntesis de ambas prostaglandinas causado por el tratamiento con LPS fue revertido por la acción

del meloxicam, que provocó una disminución significativa en la síntesis de PGE₂ y PGF_{2α}, llevándolas a niveles similares a los obtenidos para ratonas de d15 (Figura 4).

Cabe destacar que cuando se administró solo meloxicam (d15+melo), se observó una disminución en la producción de ambas prostaglandinas con respecto a las hembras control (d15), lo que sugiere que la COX-2 participa en la producción basal de prostaglandinas uterinas durante la gestación.

2.2.2- Efecto del meloxicam sobre los niveles proteicos de las ciclooxygenasas uterinas en el parto prematuro.

Dado que la síntesis de prostaglandinas se vio aumentada por la administración i.p. de LPS en el día 15 de gestación, y que este efecto fue revertido por meloxicam, se evaluó si estos tratamientos tenían además un efecto sobre el nivel proteico de las isoformas de la COX.

En la Figura 5 se observa el nivel proteico de la COX-1 y la COX-2 uterinas bajo las diferentes condiciones experimentales.

El análisis densitométrico de las bandas reveló que ni el tratamiento con LPS ni la administración de meloxicam producen una variación en los niveles proteicos de COX-1 (Figura 5A).

En la Figura 5B se observa que la administración de meloxicam en el día 15 de preñez no modifica la expresión proteica de COX-2. Por otro lado, cuando este inhibidor es administrado en animales tratados con LPS, la expresión de esta isoforma disminuye aproximadamente un 15%.

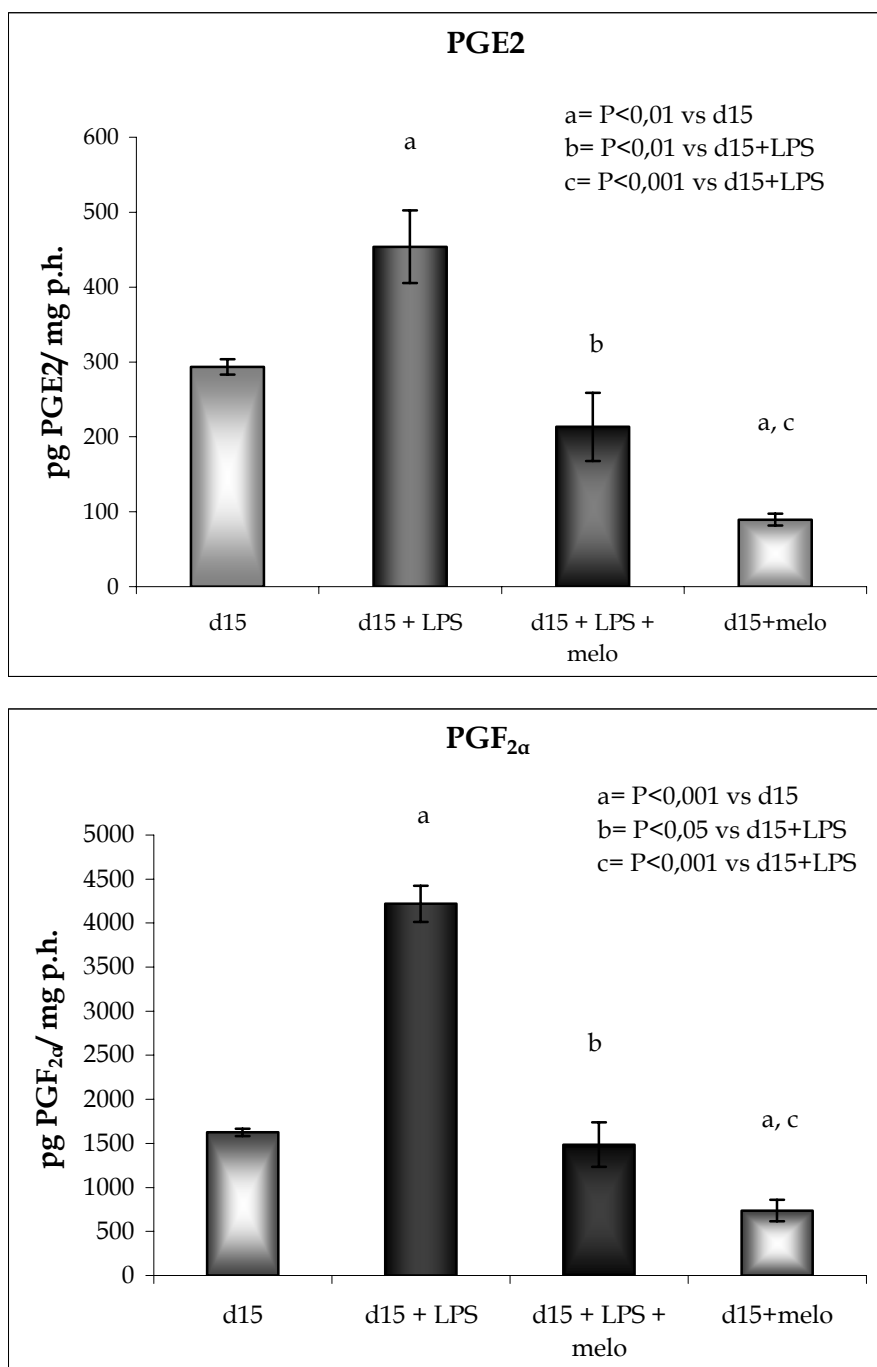


Figura 4.

Efecto de la administración LPS y meloxicam sobre la síntesis uterina de prostaglandinas.

Se administró LPS (i.p.) a dos grupos de ratonas en día 15 de preñez. Uno de estos grupos recibió además cuatro dosis de meloxicam, una con cada dosis de LPS y otras dos 3 y 6 hs después (i.p., 40µg).

Los resultados representan la media±SEM. En todos los casos n≥4.

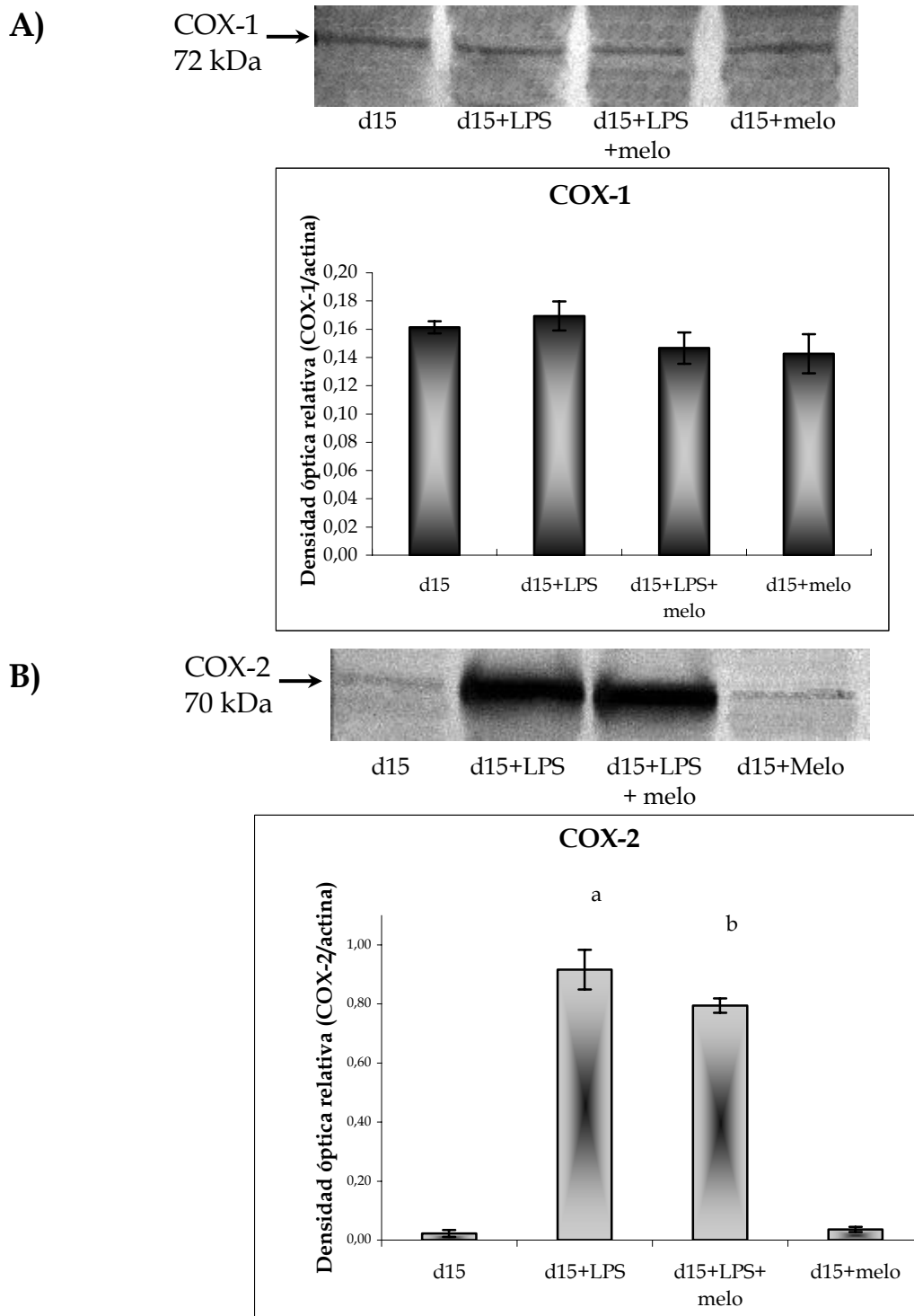


Figura 5.

Regulación del nivel proteico de las isoformas de la COX en el útero.

A) WB representativo y análisis densitométrico de las bandas de COX-1

B) WB representativo y análisis densitométrico de las bandas de COX-2.

a= $p < 0.001$ vs d15, b= $p < 0.05$ vs d15+LPS.

Los resultados representan la media \pm SEM de 3 experimentos, cada uno realizado con n=4 fragmentos uterinos.

2.2.3.- Efecto del meloxicam sobre el inicio del parto prematuro.

Los resultados obtenidos hasta el momento indicaban que el meloxicam era capaz de anular el incremento en la síntesis de PGs provocado por el LPS, así como también atenuar el aumento en la expresión proteica de COX-2 generado por esta endotoxina. Por lo tanto se resolvió estudiar si este inhibidor también podía prevenir el parto prematuro inducido por LPS.

Como puede verse en la Tabla 2, la administración de meloxicam en el día 15 de preñez (4 dosis, 40 µg, i.p.) previno el inicio prematuro del parto inducido por LPS, permitiendo que las hembras preñadas lleguen a término en un 90% de los casos. Cabe destacar que la administración de meloxicam a ratonas en el día 15 de preñez no modificó el inicio del parto, que se produjo el d19.

	LPS (n=20)			LPS + meloxicam (n=10)			meloxicam (n=4)		
	PP	P d19	muertos	PP	P d19	muertos	PP	P d19	muertos
n	19	-	1	1	9	-	-	4	-

Tabla 2.

Efecto del meloxicam sobre el parto prematuro inducido por LPS.

En resumen, estos resultados demuestran que el incremento en la producción de prostaglandinas que se observa en el parto prematuro está mediado principalmente por la COX-2. Por ello, el tratamiento con un inhibidor selectivo de esta isoforma previno el parto prematuro y prolongó la preñez hasta el día 19 de gestación, indicando que los altos niveles de prostaglandinas producidos por la COX-2 en respuesta a la administración de LPS son cruciales para el desencadenamiento prematuro del parto.

3. Participación del sistema óxido nítrico sintasa-óxido nítrico en el parto.

Varios estudios postulan la participación del NO en el mantenimiento de la preñez (López Bernal y col., 1993) y se ha observado que parches de gliceril trinitrato, un dador de NO (Lees y col., 1994; Smith y col., 2007), o la administración de arginina (Facchinetti y col. 1996), sustrato de la NO sintasa, son capaces de prolongar embarazos de riesgo.

Sin embargo Jaekle y col. (1994) encontraron que metabolitos del NO están aumentados en pacientes con parto prematuro y ruptura prematura de membranas.

Así, puesto que los datos de la bibliografía no demuestran claramente cual sería el rol del NO durante el parto normal, y no surge de ellos una utilidad terapéutica concreta del NO durante la amenaza de parto prematuro, se decidió estudiar la participación del NO en el parto a término, así como en el modelo de parto prematuro inducido por LPS.

3.1.- Participación del óxido nítrico en el parto a término.

En primer lugar se midió la actividad uterina de la sintasa de óxido nítrico (NOS) en el tercio final de la gestación (d13 a d19). Fue utilizada la técnica de Bredt & Snyder (1989) modificada, que se basa en la conversión de [¹⁴C]-L-arginina y O₂ a [¹⁴C]-L-citrulina (que permanece en la muestra) y NO (el cual es rápidamente destruido), que son producidos en cantidades equimolares.

Como se ve en la Figura 6A, la actividad la NOS permanece constante entre los días 13 y 16 de preñez, y disminuye significativamente hacia el final de la gestación (d18 y d19). Estos resultados son coincidentes con el rol que ha sido asignado al NO en el mantenimiento de la quiescencia uterina durante la gestación (Yallampalli y col., 1993) y con su capacidad de regular la contractilidad de la musculatura lisa uterina (Franchi y col., 1994).

En base a este resultado se resolvió estudiar si un aumento del nivel de óxido nítrico al final de la preñez podía retrasar el momento del parto. Para ello se

utilizó el S-nitroso N-acetil penicilamina (SNAP), un dador lento de óxido nítrico ($t_{1/2}$ de liberación=6 h. a 37°C), y se ensayaron distintos protocolos de administración. Cuando el SNAP fue administrado (60 µg/ratón, i.p.) a las 0 y 6 h. del d19 produjo un retraso del parto de 7 ± 1 h., indicando que la caída de los niveles uterinos de NO juega un rol importante en el inicio del parto a término.

Dado que es conocido que las 3 isoformas de la NOS se expresan en el útero de ratonas preñadas (Purcell y col., 1999), el siguiente objetivo fue determinar si estas se encontraban moduladas durante la gestación. Con esta finalidad se estudió la expresión de iNOS, eNOS y nNOS por la técnica de western blot, revelándose con anticuerpos dirigidos contra cada una de las isoformas.

Los datos obtenidos demuestran que las tres isoformas, se encuentran presentes en el útero de ratonas preñadas durante el final de la gestación (Figura 6).

El anticuerpo dirigido contra la iNOS reveló una banda correspondiente a un peso molecular de 130 kDa que disminuye gradualmente conforme se acerca el momento del parto, en semejanza con lo mostrado por la actividad de la NOS (Figura 6B).

Por otra parte, si bien las isoformas dependientes de Ca^{2+} , eNOS (140kDa) y nNOS (155kDa) fueron detectadas, no presentaron variaciones en los días estudiados (Figura 6B).

Así, la disminución en la actividad de NOS observada en fragmentos uterinos a término podría estar relacionada, al menos en parte, a una disminución en los niveles proteicos de la iNOS.

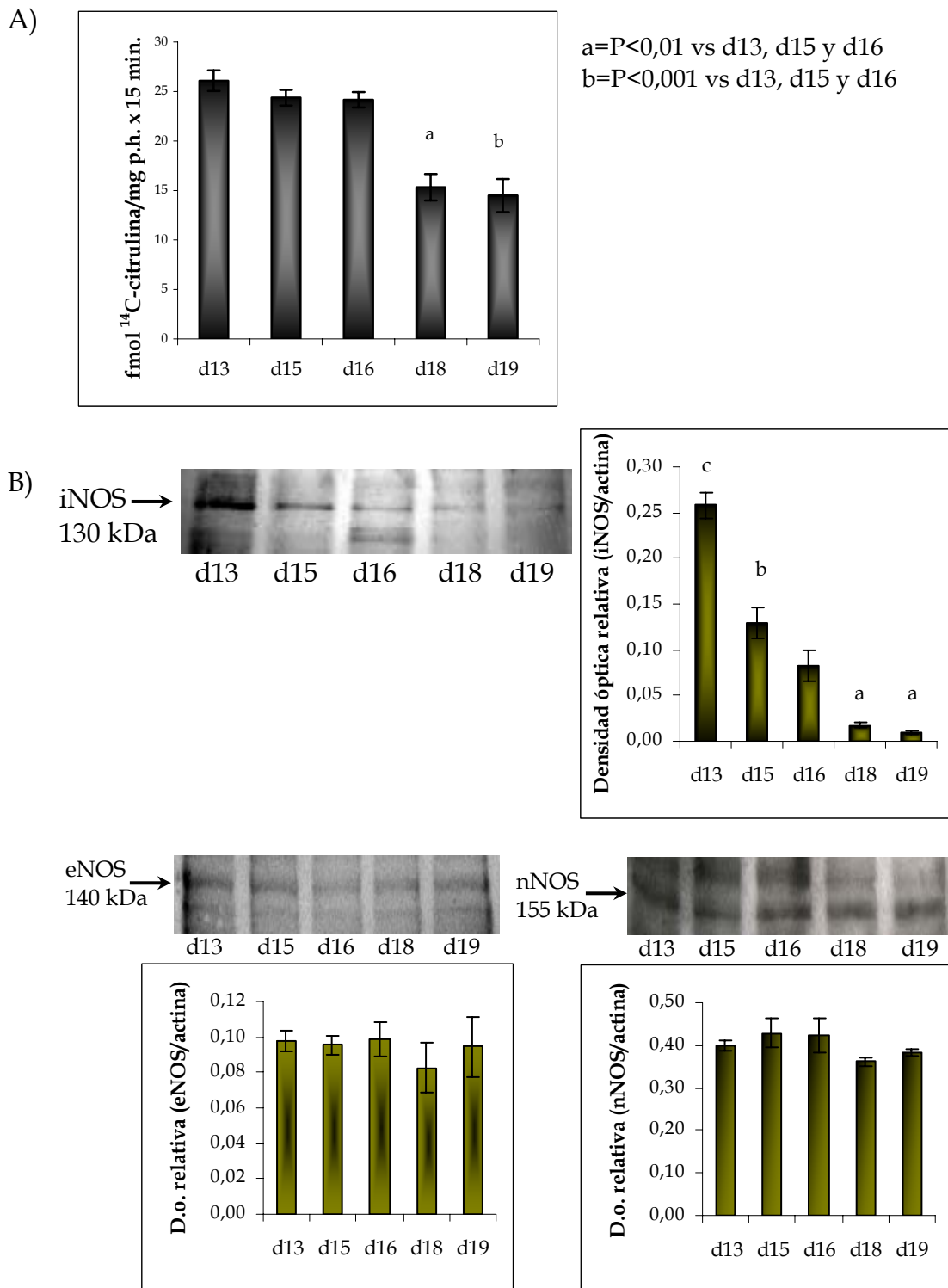


Figura 6.

Participación del sistema NOS-NO en el parto a término.

A) Actividad de la sintasa de óxido nítrico (NOS) en el útero de ratonas preñadas. Los resultados representan la media ± SEM de 3 experimentos independientes. En todos los casos n≥4.

B) WB representativo y análisis densitométrico de las bandas correspondientes a iNOS, eNOS y nNOS. Las bandas fueron relativizadas a actina.

a=P<0,001 vs. d13, d15 y d16; b=P<0,01 vs. d16; c=P<0,01 vs. d15 y d16.

3.2.- Participación del óxido nítrico en el parto prematuro.

Los datos de la literatura y nuestros resultados en el parto a término, donde una disminución de la síntesis de NO y de la expresión de la iNOS precedían al inicio del parto, sugerían que este mediador tenía un papel protector de la preñez. Sin embargo, es conocido que el LPS induce el sistema NOS-NO en numerosos sistemas, y esta endotoxina provocaba parto prematuro en nuestro modelo. Por ello, se decidió investigar el perfil de síntesis de NO y los niveles proteicos uterinos de las distintas isoformas de la NOS en el modelo de parto prematuro inducido por LPS.

A diferencia de lo observado en el parto a término, donde la síntesis de NO decrecía al final de la preñez, cuando se midió la actividad de la NOS en útero de ratones tratados con LPS, esta aumentó significativamente previo al parto (Figura 7A).

Adicionalmente, cuando se estudió el nivel proteico de las distintas isoformas de la NOS, se registró un aumento de la iNOS en fragmentos uterinos de ratonas tratadas con LPS (Figura 7B). Por otro lado, los niveles de eNOS y nNOS no fueron alterados por el tratamiento con la endotoxina. Estos resultados sugieren que durante el parto prematuro inducido por LPS los niveles de NO estarían elevados no solo por un incremento en la actividad sino por un aumento de la expresión proteica de la iNOS.

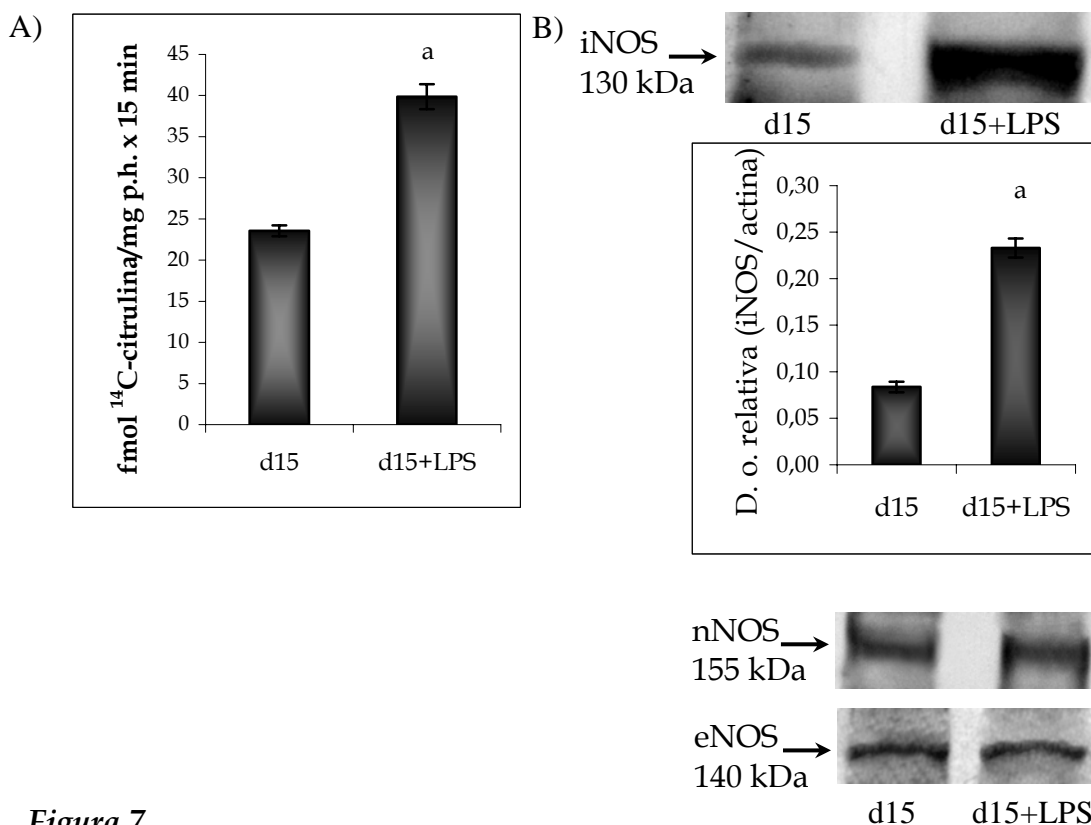


Figura 7.

Participación del óxido nítrico en el parto prematuro.

A) Actividad de la sintasa de óxido nítrico uterina (NOS) en el parto prematuro. Los resultados representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. En todos los casos $n \geq 4$. $a = P < 0,001$ vs d15.

B) WB representativo y análisis densitométrico de las bandas correspondientes a iNOS, nNOS y eNOS. Las bandas fueron relativizadas a la banda de actina (43 kDa) como una medida de control de siembra constante en cada carril. $a = P < 0,001$ vs d15.

3.2.1.- Efecto de la aminoguanidina sobre el inicio del parto prematuro.

Con la finalidad de corroborar el rol que desempeña el NO en el desencadenamiento del parto prematuro, se decidió estudiar si un inhibidor selectivo de la iNOS podía prevenir el PP, ya que la iNOS fue la isoforma inducida en nuestro modelo y es además la principal responsable de la síntesis de NO en caso de infecciones.

Para ello se ensayaron diferentes protocolos de administración de aminoguanidina (AG), un inhibidor selectivo de esta isoforma, encontrándose que cuando se administraron tres dosis de 6 mg/ratón (i.p.), según se describe en materiales y métodos, la aminoguanidina provocó un retraso del parto prematuro en el 100% de los casos (Figura 8). El 55% de los animales tratados con AG llegaron a término (d19 de preñez), mientras que el 45% restante solo tuvo un retraso del inicio del parto de aproximadamente 20 horas (Figura 8B).

Estos resultados indican que el NO, producido en grandes cantidades por la iNOS en animales tratados con LPS, tiene un papel relevante en la inducción prematura del parto.

A)

	LPS (n=20)			LPS + aminoguanidina (n=13)			aminoguanidina (n=4)		
	PP	P d19	muertos	PP	P d19	muertos	PP	P d19	muertos
n	19	-	1	5	6	2	-	4	-

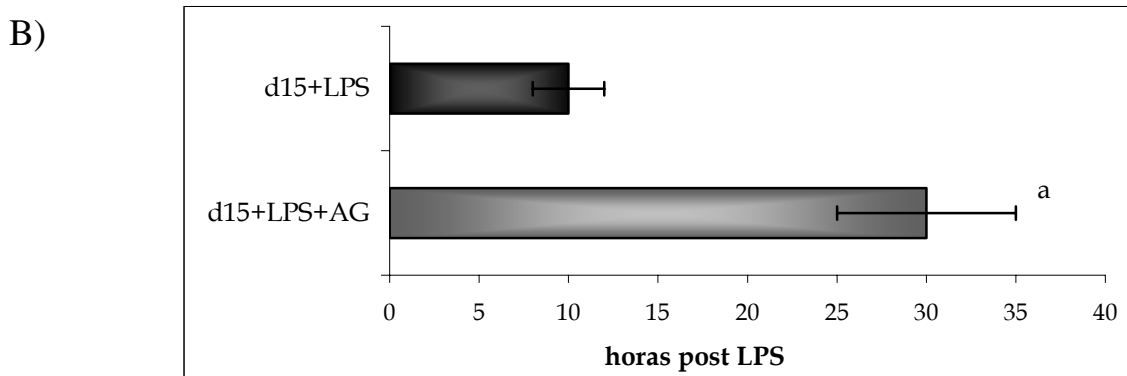


Figura 8.

Efecto de la aminoguanidina (AG) sobre el parto prematuro inducido por LPS.

A) Número de ratones que tuvo parto pretérmino (PP), parto a término (P d19) o en el que la hembra tratada murió (muertos).

B) Horas post-LPS a las que se produjo el parto prematuro. a= $p < 0,01$ vs d15+LPS+AG
d15+LPS: hembras tratadas solo con LPS.

d15+LPS+AG: hembras tratadas con LPS y aminoguanidina

4.- Participación del sistema de endocannabinoides en el parto.

Ha sido descrito un perfil de síntesis uterina de anandamida (AEA) en los primeros días de preñez en el ratón, sugiriéndose una participación de estos lípidos en la implantación-preñez temprana (Paria y col., 1995, 2001; Liu y col., 2002). Sin embargo no existen estudios de la síntesis de anandamida durante el parto normal o patológico.

Por esto se decidió estudiar tanto en el modelo de parto prematuro como en el parto a término el perfil de síntesis de AEA y el nivel de expresión de los receptores de endocannabinoides (CB1 y CB2). También se estudió si en el momento del parto se modificaba la actividad de la enzima responsable de la degradación de la anandamida, la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH).

4.1.- Participación de la anandamida en el parto a término.

Utilizando la técnica ya descrita en materiales y métodos, que mide la formación de [¹⁴C]-anandamida a partir de [¹⁴C]-ácido araquidónico y etanolamina, se estudió la actividad de síntesis de AEA en el útero de ratonas en los días 13, 15, 16, 18 y 19 de preñez.

Como puede observarse en la Figura 9A, la actividad de síntesis de AEA aumenta progresivamente hacia el final de la preñez. De esta forma, la síntesis de anandamida aumenta el día 18 ($P \leq 0.01$ vs. d15) llegando a valores máximos el día 19, es decir en los momentos previos al inicio del parto ($P < 0.001$ vs. d15).

Por su parte, la actividad de la FAAH no se modificó, sugiriendo que los niveles de AEA uterina estarían aumentados en el momento previo al inicio del parto (Figura 9B).

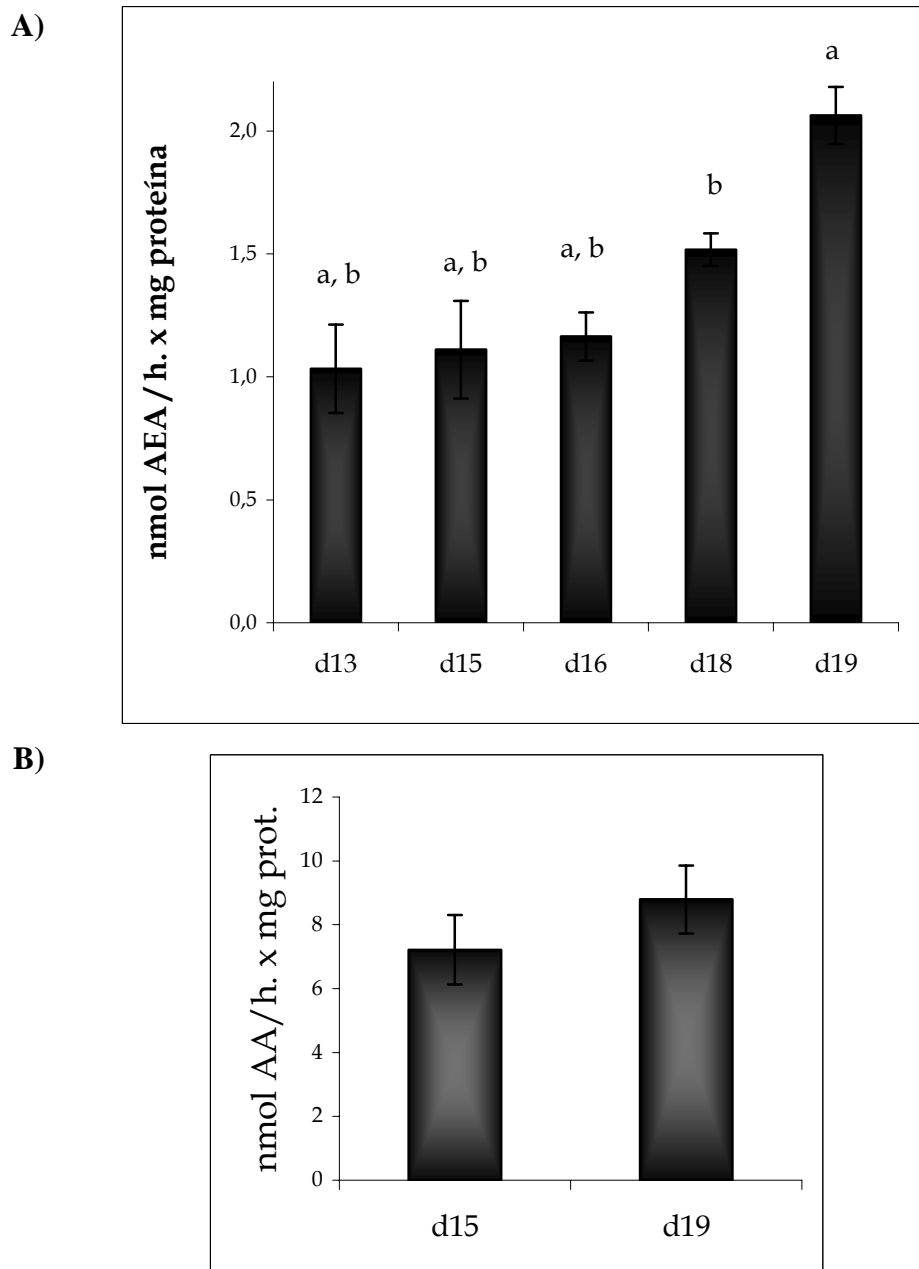


Figura 9.

Participación de la anandamida en el parto a término.

A) Actividad de síntesis uterina de anandamida en el tercio final de la preñez.

a= $P < 0.01$ vs. d18, b= $P < 0.001$ vs. d19.

B) Actividad de la FAAH uterina en el parto a término.

Los endocannabinoides actúan a través de sus receptores CB1 y CB2, por lo tanto la posible participación de la anandamida en la preñez y el parto podría estar regulada por variaciones en los niveles proteicos de dichos receptores.

Si bien existen trabajos en los que estudian la expresión de los ARNm correspondientes en el útero de distintos animales, así como un trabajo de Denedy y col. (2004) en el que presentan la expresión de los ARNm y de las proteínas en el miometrio humano, nunca había sido demostrada la expresión proteica de los receptores CB1 y CB2 en el tejido uterino de ratón. Por ello se decidió estudiar la presencia y la modulación de ambos receptores en el útero de ratonas preñadas hacia el final de la gestación.

Se encontró que una fracción proteica de aproximadamente 63 kDa, correspondiente a la forma glicosilada de CB1, fue reconocida por el anticuerpo dirigido contra CB1 (Figura 10A). Se detectó también el receptor de cannabinoides de tipo 2 (CB2) en el útero de ratonas preñadas, ya que el anticuerpo contra CB2 reaccionó específicamente con una banda de 38,2 kDa (Figura 10B). El análisis densitométrico de las bandas marcadas permitió ver que tanto los niveles proteicos de CB1 como de CB2 permanecen sin cambios en el último tercio de la preñez.

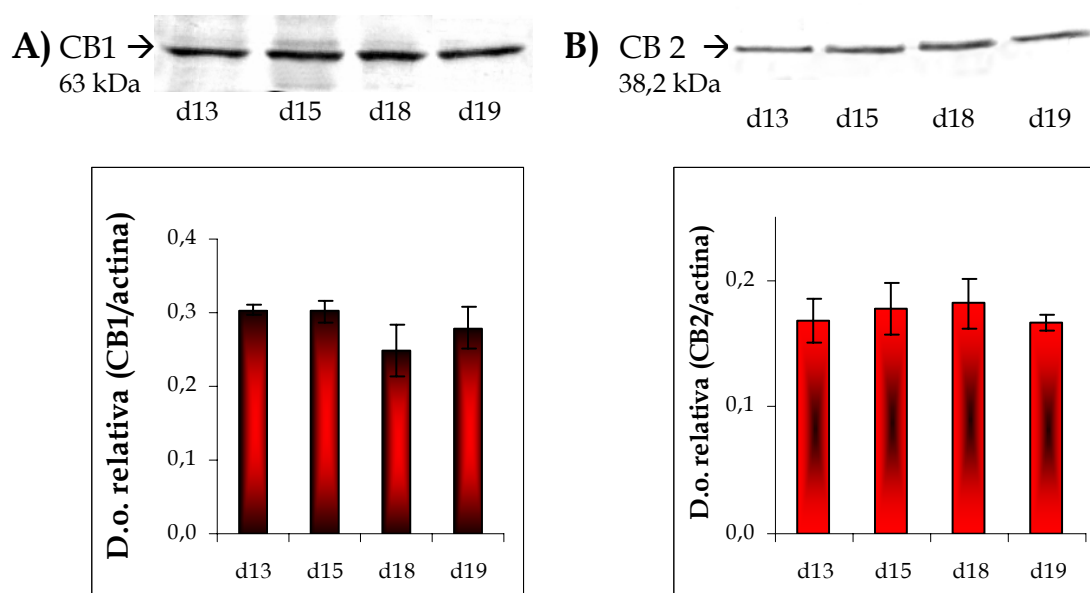


Figura 10.

Nivel proteico de los receptores de cannabinoides uterinos en la preñez.

A) WB representativo y análisis densitométrico de las bandas de CB1.

B) WB representativo y análisis densitométrico de las bandas de CB2.

Los resultados representan la media \pm SEM de 3 experimentos.

4.2.- Participación de la anandamida en el parto prematuro.

Habiendo observado que la síntesis de anandamida aumentaba hacia el final de la gestación, se estudió si esta también se veía incrementada en el modelo de parto prematuro. A diferencia de lo descrito en el parto a término, en los animales tratados con LPS no se observó un incremento de la actividad de síntesis de anandamida en momentos previos al parto (Figura 11A). Además, en el útero de los animales tratados con LPS tampoco se vio modificada la actividad de la FAAH, enzima metabolizante de la AEA. (Figura 11B).

Estos resultados sugieren que si bien la síntesis de anandamida aumenta antes del parto a término, la inducción prematura del parto con LPS no está asociada a un incremento en la síntesis de este endocannabinoide.

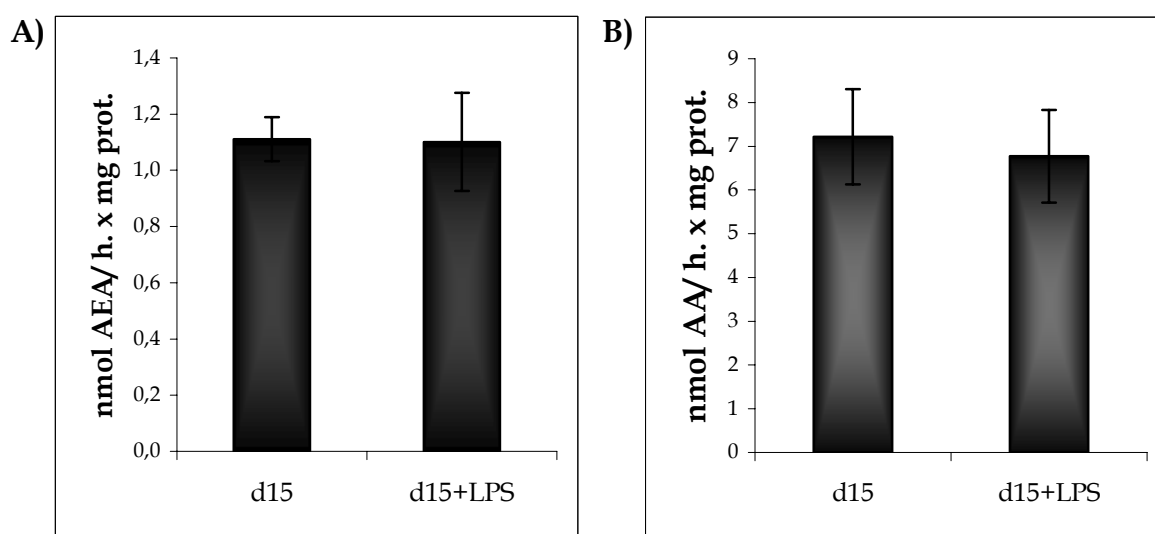


Figura 11.

Participación de la anandamida en el parto prematuro.

A) Actividad de la anandamida sintasa uterina en el parto prematuro.

B) Actividad de la FAAH uterina en el parto prematuro.

Interacciones entre las vías de las prostaglandinas, el óxido nítrico y la anandamida en el parto

5.- Interacción entre los sistemas de la anandamida y las prostaglandinas.

El ácido araquidónico es sustrato tanto en la síntesis de AEA como en la síntesis de prostaglandinas. Se han encontrado datos en la literatura que indican una interacción entre ambos sistemas. Por ejemplo ha sido informado que la anandamida es capaz de inducir la síntesis de PGE₂ y la expresión de COX-2 por células endoteliales microvasculares del cerebro (Chen y col., 2005) y que la R (+)-metanandamida, un análogo estable de la AEA no metabolizable por la FAAH, causa la inducción de COX-2 en células de cáncer de pulmón y en macrófagos (Gardner y col., 2003; Vannacci y col., 2004). Por otro lado se ha visto, en útero de ratón, que los bajos niveles de anandamida presentes en los sitios de implantación correlacionan con altos niveles de COX-2, sugiriendo que las prostaglandinas producidas por esta enzima podrían controlar los niveles de AEA (Park y col., 2004).

En base a estos datos se decidió investigar la posible interacción entre estos sistemas en el desencadenamiento del parto.

En primer lugar se estudió el efecto de la anandamida sobre la síntesis uterina de prostaglandinas. Para ello se cuantificó por RIA la producción uterina de PGE₂ y PGF_{2α} de animales en el día 15 de gestación incubados durante 1 h. con medio KRB como control (d15), o con distintas concentraciones de anandamida (10⁻⁹M, 10⁻⁷M ó 10⁻⁶M).

En concordancia con lo observado por Chen y col. (2005), la incubación con anandamida indujo la síntesis de PGE₂, efecto que fue independiente de la concentración de AEA ensayada (Figura 12A).

El mismo efecto pudo observarse cuando se midió la síntesis de PGF_{2α}, ya que ésta fue inducida por la incubación con anandamida en todas las concentraciones probadas (Figura 12A). Dado que los niveles fisiológicos de este endocannabinoide en el útero de ratón son de orden nanomolar, se decidió

utilizar la concentración 10^{-9} M de AEA para evaluar la participación de CB1 y CB2 en la respuesta observada.

Como se observa en la Figura 12 B, esta inducción es ejercida por la acción de la AEA sobre el receptor de cannabinoides CB1, ya que fue completamente inhibida por la co-incubación con AM251, un antagonista de CB1, mientras que la co-incubación con AM630, antagonista de CB2, no produjo ningún efecto (Figura 12B).

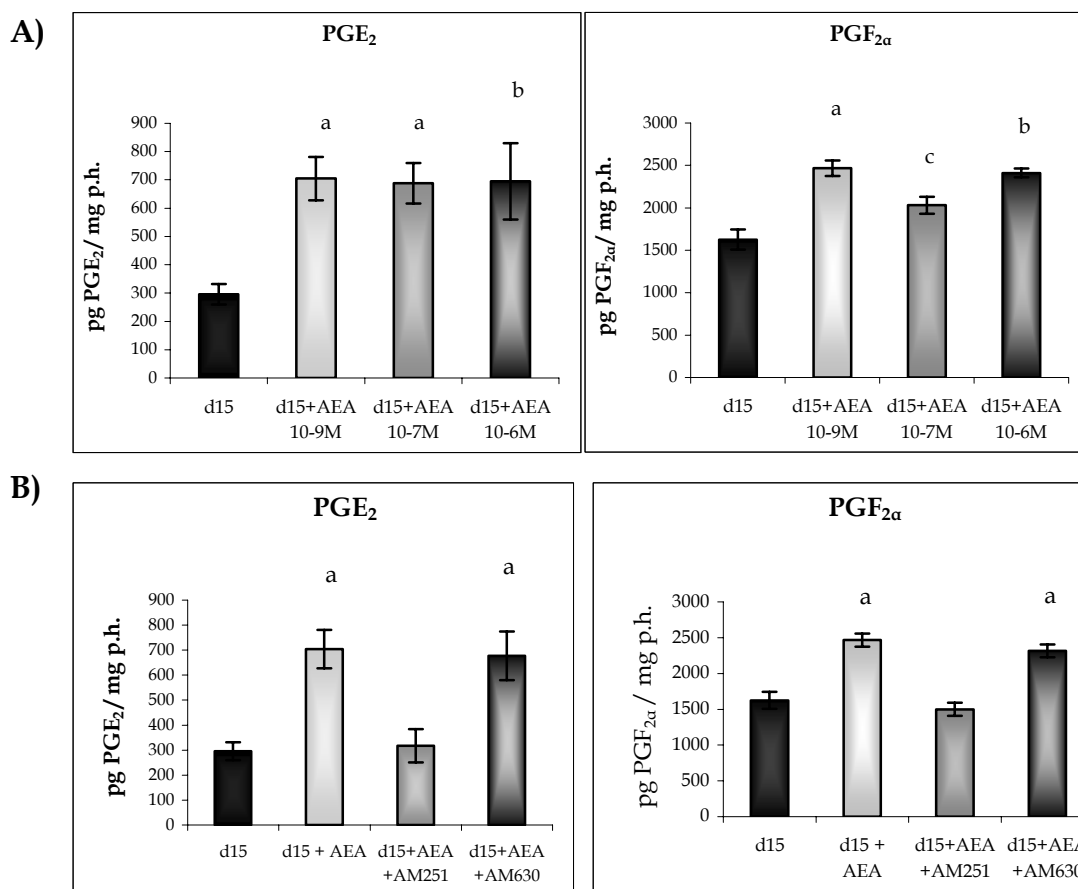


Figura 12.

Efecto de la anandamida sobre la síntesis uterina de prostaglandinas.

A) Se incubaron úteros de d15 con anandamida 10^{-9} M, 10^{-7} M ó 10^{-6} M durante 1 h. y se midió la producción de PGE₂ y PGF_{2α}.

B) Se incubaron úteros de d15 con anandamida 10^{-9} M en presencia o ausencia de antagonista de CB1 (AM251, 10^{-5} M) o CB2 (AM630, 10^{-5} M) durante 1h y se midió la producción de PGE₂ y PGF_{2α}. Los resultados representan la media \pm SEM de 2 experimentos. En todos los casos $n \geq 4$.

a= $P < 0,001$ vs d15, b= $P < 0,01$ vs d15, c= $P < 0,05$ vs d15.

Habiendo encontrado que la AEA *in vitro* era capaz de aumentar la síntesis de PGs, se estudió el efecto del inhibidor selectivo de la COX-2, meloxicam, sobre la actividad de síntesis de anandamida *in vivo*.

Para ello se midió la actividad de síntesis de anandamida en úteros de animales de d15 (d15) y de animales de d15 inyectados con meloxicam (d15+melo), con LPS (d15+LPS) o con LPS y meloxicam (d15+LPS+melo).

Como se puede ver en la Figura 13A, la inhibición de la síntesis de prostaglandinas en el día 15 de preñez no produjo ningún cambio en la síntesis de anandamida, ni en los ratones control de d15 ni en los sometidos al modelo de parto pretérmino. El meloxicam tampoco produjo variaciones en la actividad de síntesis de anandamida en animales en el día 19 de preñez, donde si había causado un retraso del parto a término (Figura 13B). Estos resultados sugieren que las prostaglandinas no serían un factor regulador de la actividad de síntesis de anandamida.

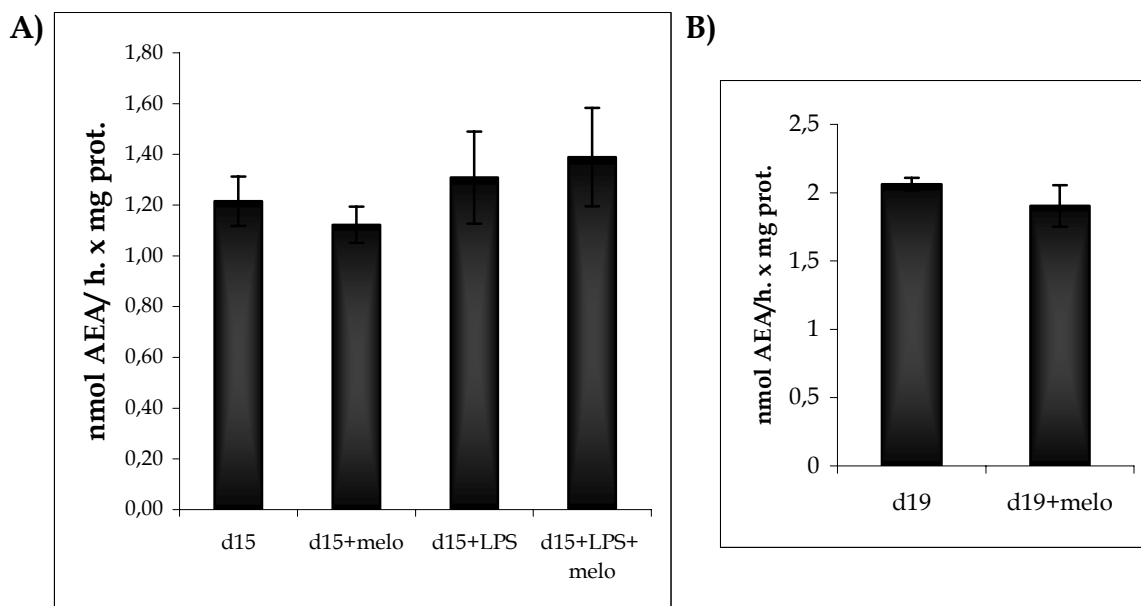


Figura 13.

Efecto de meloxicam sobre la actividad de síntesis uterina de anandamida.

A) Se trataron animales de d15 con LPS (d15+LPS), con meloxicam (d15+melo) o con LPS y meloxicam (d15+LPS+melo) y se midió la actividad de síntesis de AEA.

B) Se trataron animales de d19 con meloxicam y se midió la actividad de síntesis de AEA.

Los resultados representan la media \pm SEM de 2 experimentos. En todos los casos $n \geq 4$.

6.- Interacción entre los sistemas de la anandamida y el óxido nítrico.

Existen antecedentes que relacionan estos dos sistemas. Por ejemplo Chang y col. (2001) observaron que la anandamida inhibía la producción de NO inducida por LPS en macrófagos J774. También ha sido propuesta una posible interacción entre el NO y la señalización por endocannabinoides en las repuestas de relajación física (Stefano y col., 2003).

En base a esto se estudió en primer lugar el efecto de la anandamida sobre la actividad de la sintasa de óxido nítrico.

Cuando los úteros de d15 se incubaron *in vitro* con distintas concentraciones de AEA, sólo la concentración de AEA 10^{-9} M (concentración fisiológica) fue capaz de inhibir la actividad de las NOS uterinas, en tanto que la incubación con concentraciones mayores de AEA (10^{-7} M y 10^{-6} M) no produjo ningún efecto (Figura 14A). Se pudo comprobar que esta inhibición estaba mediada por la acción de la AEA sobre el receptor de cannabinoides CB1, ya que fue abrogada por la co-incubación con el antagonista de CB1 (AM251), y no por la co-incubación con el antagonista de CB2 (AM630) (Figura 14B).

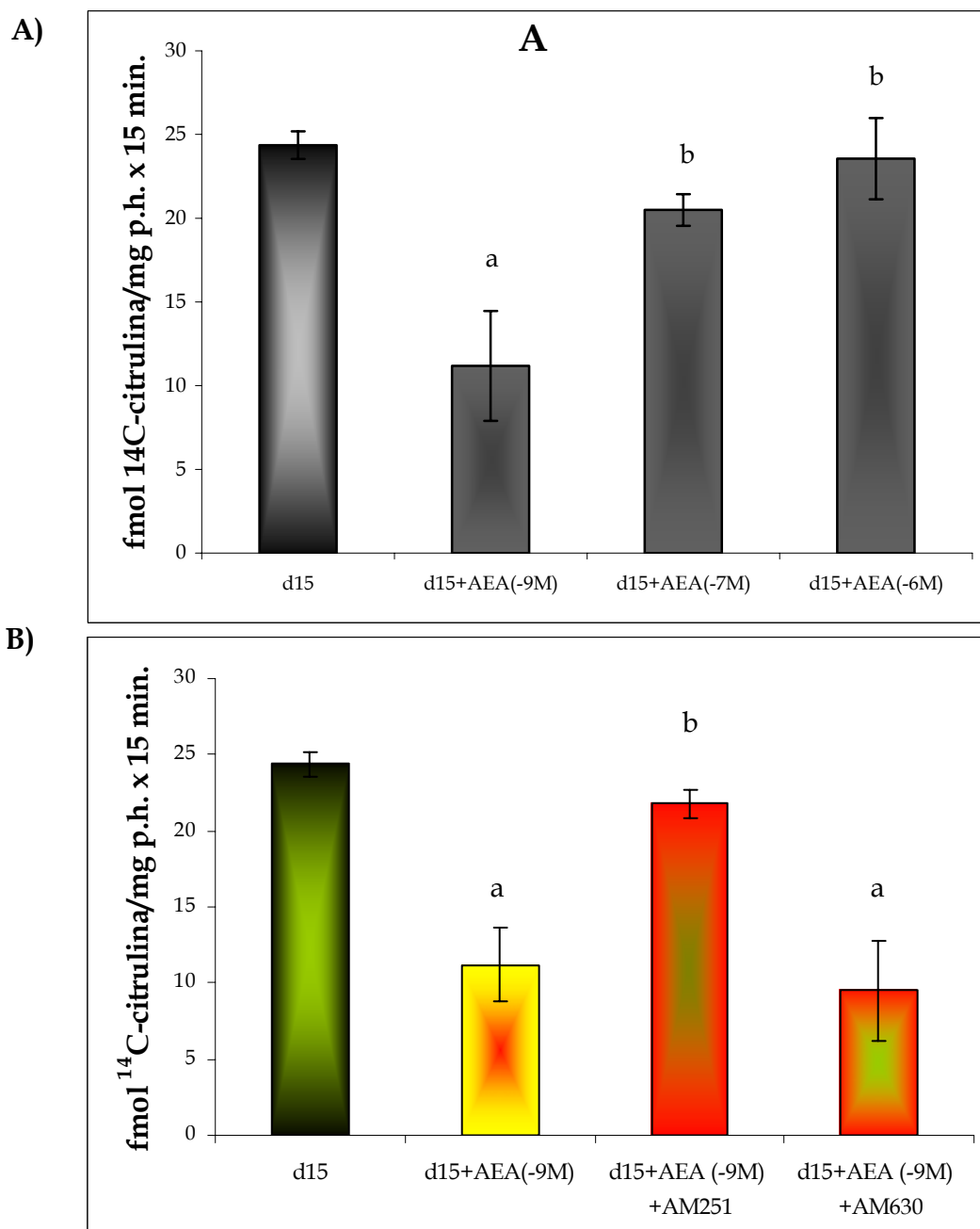


Figura 14.

Efecto de la anandamida sobre la actividad uterina de NOS.

A) Se incubaron úteros de d15 con anandamida 10^{-9} M, 10^{-7} M ó 10^{-6} M durante 1 h y se midió la actividad de NOS.

a= $P < 0,001$ vs. d15; b= $P < 0,01$ vs d15+AEA (-9).

B) Se incubaron úteros de d15 con anandamida 10^{-9} M en presencia o ausencia de antagonista de CB1 (AM251, 10^{-5} M) o CB2 (AM630, 10^{-5} M) durante 1h y se midió la actividad de NOS.

a= $P < 0,001$ vs. d15; b= $P < 0,01$ vs. d15+AEA (-9).

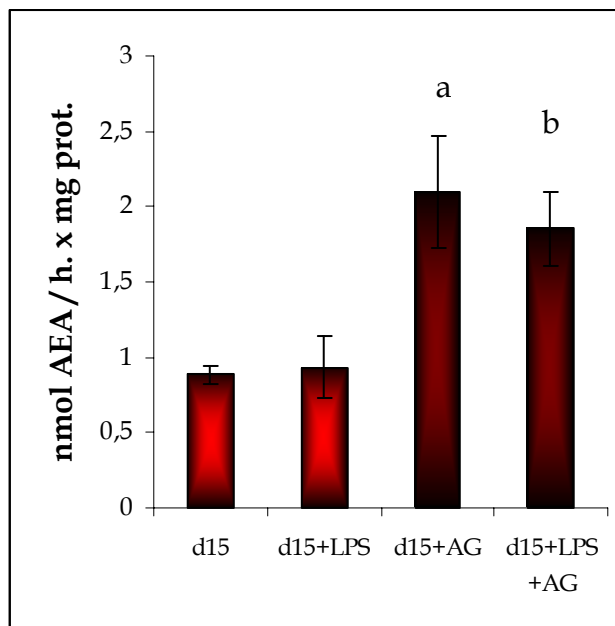
Los resultados representan la media \pm SEM. En todos los casos $n \geq 4$.

En segundo lugar, para investigar si el NO es capaz de modular los niveles uterinos de AEA, se estudió el efecto un inhibidor selectivo de la iNOS (aminoguanidina, AG) sobre la actividad de síntesis de anandamida. Para ello se administró, según lo descrito en materiales y métodos, AG a ratonas en d15 de preñez tratadas o no con LPS. Esto resultó en un incremento significativo de la actividad de síntesis de anandamida, tanto en los animales control como en los sometidos al tratamiento con LPS (Figura 15A), lo que indica que altos niveles de óxido nítrico podrían inhibir la síntesis de anandamida.

Adicionalmente, se investigó si el tratamiento con SNAP (un dador de NO) producía cambios en la actividad de síntesis de anandamida. Como se ve en la Figura 15B, la administración de una dosis baja de SNAP a ratonas en d19 de gestación resultó en un significativo aumento de la síntesis de anandamida.

Así, se prueba que los sistemas de NO y anandamida tienen la capacidad de regularse mutuamente.

A)



B)

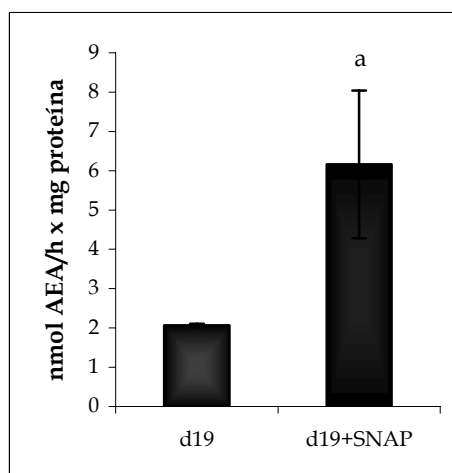


Figura 15.

Efecto del óxido nítrico sobre la síntesis uterina de anandamida.

A) Efecto de la aminoguanidina sobre la síntesis uterina de anandamida.

Se administró aminoguanidina (AG) a ratonas en el d15 de preñez (d15+AG) o en el d15 tratadas con LPS (d15+LPS+AG) y se midió la síntesis uterina de anandamida.

a=P<0,05 vs. d15; b=P<0,05 vs. d15+LPS. Los resultados representan la media \pm SEM de 2 experimentos. En todos los casos n \geq 4.

A) Efecto del SNAP sobre la síntesis uterina de anandamida en el PaT.

Se administraron 2 dosis de SNAP a ratonas en el d19 de preñez (d19+SNAP) y se midió la síntesis uterina de anandamida.

a=P<0,001 vs. d19. En todos los casos n \geq 4.

Puesto que se había observado un aumento en la síntesis de anandamida en los momentos previos al parto a término, y considerando que este endocannabinoide tiene la capacidad de regular la síntesis de prostaglandinas y óxido nítrico vía el receptor CB1, se resolvió analizar si la anandamida ejerce un rol preponderante en el desencadenamiento del parto a término. Para ello se administraron distintas dosis de AM251 (antagonista de CB1) según el protocolo descrito en materiales y métodos, encontrándose que en ninguna de las dosis ensayadas este antagonista produjo una prolongación de la preñez. Esto indica que si bien la producción uterina de anandamida está incrementada en el parto a término, esta no sería fundamental para el inicio del mismo.

7.- Interacciones entre las vías del óxido nítrico y las prostaglandinas.

Nuestro grupo ha demostrado que los caminos de la COX-2 y la iNOS interactúan en distintos eventos infecciosos e inflamatorios y en respuesta a distintos agentes como el LPS y las interleuquinas (Franchi y col., 1998; Farina y col., 2000; Ribeiro y col., 2003).

En el presente trabajo se encontró que tanto en el parto a término como en el parto pretérmino existen variaciones en la actividad de la NOS y en los niveles proteicos de la iNOS, así como en la producción de prostaglandinas y los niveles proteicos de la COX-2.

Por ello, y considerando que la administración de meloxicam fue capaz de prolongar la duración de la gestación normal y de prevenir la inducción del parto prematuro por LPS se decidió estudiar si las prostaglandinas regulaban de algún modo la vía del óxido nítrico.

En primer lugar se encontró en los animales tratados con LPS y meloxicam, que presentaban niveles bajos de PGs, un aumento significativo de la actividad de la NOS (Figura 16A), aunque no se observó un incremento concomitante de la expresión de la iNOS (Figura 16C).

Sin embargo, el meloxicam no produjo variaciones en la actividad uterina de la NOS cuando se administró a ratones en el d15 o en el día 19 de gestación.

Estos resultados sugieren que los altos niveles de PGs estarían inhibiendo la síntesis de NO producido en condiciones inflamatorias, cuando la expresión de la isoforma inducible se encuentra exacerbada; mientras que, en condiciones basales, no modificarían la síntesis de NO.

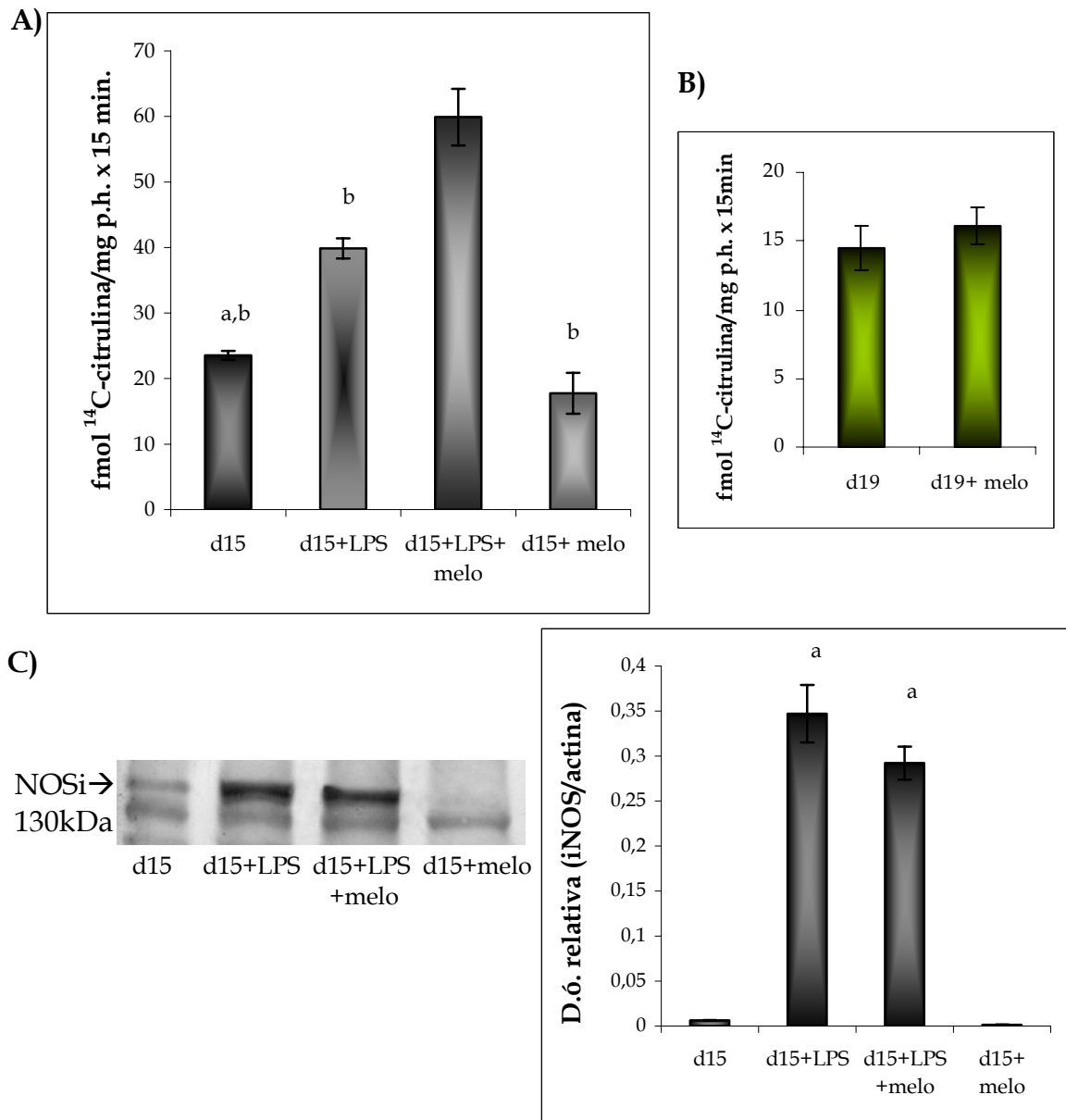


Figura 16.

Efecto del meloxicam sobre la vía del NO.

A) Efecto sobre la NOS en el parto prematuro.

a= $P < 0.01$ vs. d15+LPS, b= $P < 0.001$ vs. d15+LPS+melo.

B) Efecto sobre la NOS en el parto a término

Los resultados representan la media \pm SEM de 3 experimentos. En todos los casos $n \geq 4$.

C) Efecto sobre los niveles proteicos de la iNOS. WB representativo y análisis densitométrico de las bandas de iNOS.

a= $P < 0.001$ vs. d15.

Existen datos en bibliografía que indican que los altos niveles de NO resultantes de la activación de la iNOS podrían ser los responsables de inducir la activación de la COX-2 en procesos inflamatorios (Mollace y col., 2005). Adicionalmente, nuestros resultados demostraban que en el PP se producía un aumento en los niveles proteicos de la iNOS y una inducción concomitante de la síntesis de óxido nítrico y el sistema COX-PGs.

Por lo tanto, se analizó si la inhibición de la iNOS podía afectar la síntesis de prostaglandinas. Se utilizó para ello la aminoguanidina (AG), administrada en las mismas dosis que resultaron en la prevención del parto prematuro.

Como se ve en la Figura 17, la AG fue capaz de revertir completamente el aumento en la producción de PGE₂ causado por el LPS, y parcialmente el aumento de PGF_{2α}, mientras que no afectó la síntesis de prostaglandinas en condiciones basales. Estos resultados apoyan la idea que una producción elevada de óxido nítrico, como la obtenida cuando se induce el parto prematuro con LPS, estaría induciendo la producción uterina de prostaglandinas.

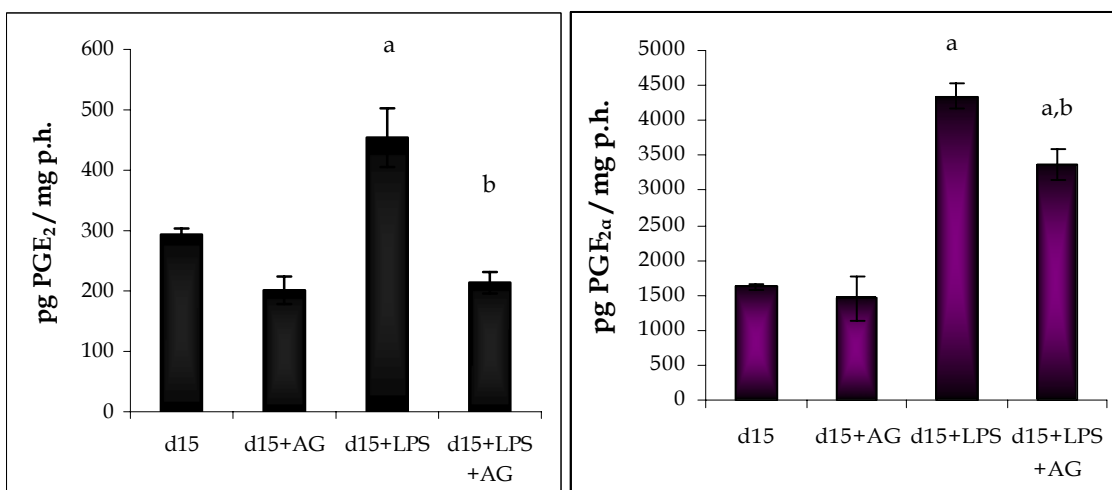


Figura 17.

Efecto de la aminoguanidina sobre la producción de prostaglandinas en el parto prematuro.

Se administró AG a ratonas en d15 de preñez controles y tratadas con LPS y se midió la producción de PGs por fragmentos uterinos de dichos animales.

a=P<0,05 vs. d19, b=P<0,01 vs. d19.

Los resultados representan la media ± SEM de 3 experimentos. En todos los casos n≥4.

Los resultados obtenidos hasta aquí sugerían que el óxido nítrico tendría un efecto estimulador sobre la síntesis uterina de PGs en el modelo de parto prematuro. Sin embargo, durante el parto a término se había observado que una caída en la actividad uterina de la NOS era acompañada por un aumento de la síntesis de prostaglandinas. Consecuentemente, los resultados sugieren que el NO estaría ejerciendo un efecto dual sobre la síntesis de PGs.

Adicionalmente, trabajos previos publicados por Liew y colaboradores demostraron que el óxido nítrico, dependiendo de su concentración, ejerce efectos duales sobre la proliferación de células T (Liew, 1995).

Se decidió entonces estudiar el rol del NO sobre la modulación de la síntesis uterina de prostaglandinas, utilizando para ello SNAP, un dador lento de NO.

En primer lugar se administró SNAP a hembras preñadas de 19 días de gestación de acuerdo al protocolo descrito en materiales y métodos, y se cuantificó la producción uterina de prostaglandinas. Como se puede ver en la Figura 18A, el tratamiento de los animales con dosis bajas de NO al final de la gestación produjo una disminución en la producción de PGE₂ y PGF_{2α} (ensayos *in vivo*).

Posteriormente, se incubaron fragmentos uterinos de ratonas en d19 de preñez con una concentración baja (100 μM) o una concentración alta de SNAP (1mM) durante 1 h. a 37°C (ensayos *in vitro*) y luego se cuantificó la síntesis de prostaglandinas.

La incubación de los fragmentos uterinos con SNAP 100 μM resultó en una disminución en la producción de ambas prostaglandinas, mientras que cuando fueron incubados con dosis elevadas del dador de NO (1mM) se produjo un aumento de la síntesis de PGE₂ y PGF_{2α} (Figura 18B).

Estos resultados indican que el NO estaría ejerciendo un efecto dual sobre la síntesis de prostaglandinas en el útero de ratona preñada. En concentraciones bajas como las observadas en la preñez normal tiene un efecto inhibitorio sobre

la síntesis de estos autacoides. Por otro lado, en condiciones de sepsis, cuando la síntesis de NO está exacerbada por el efecto de la endotoxina, contribuye al aumento de la síntesis de prostaglandinas.

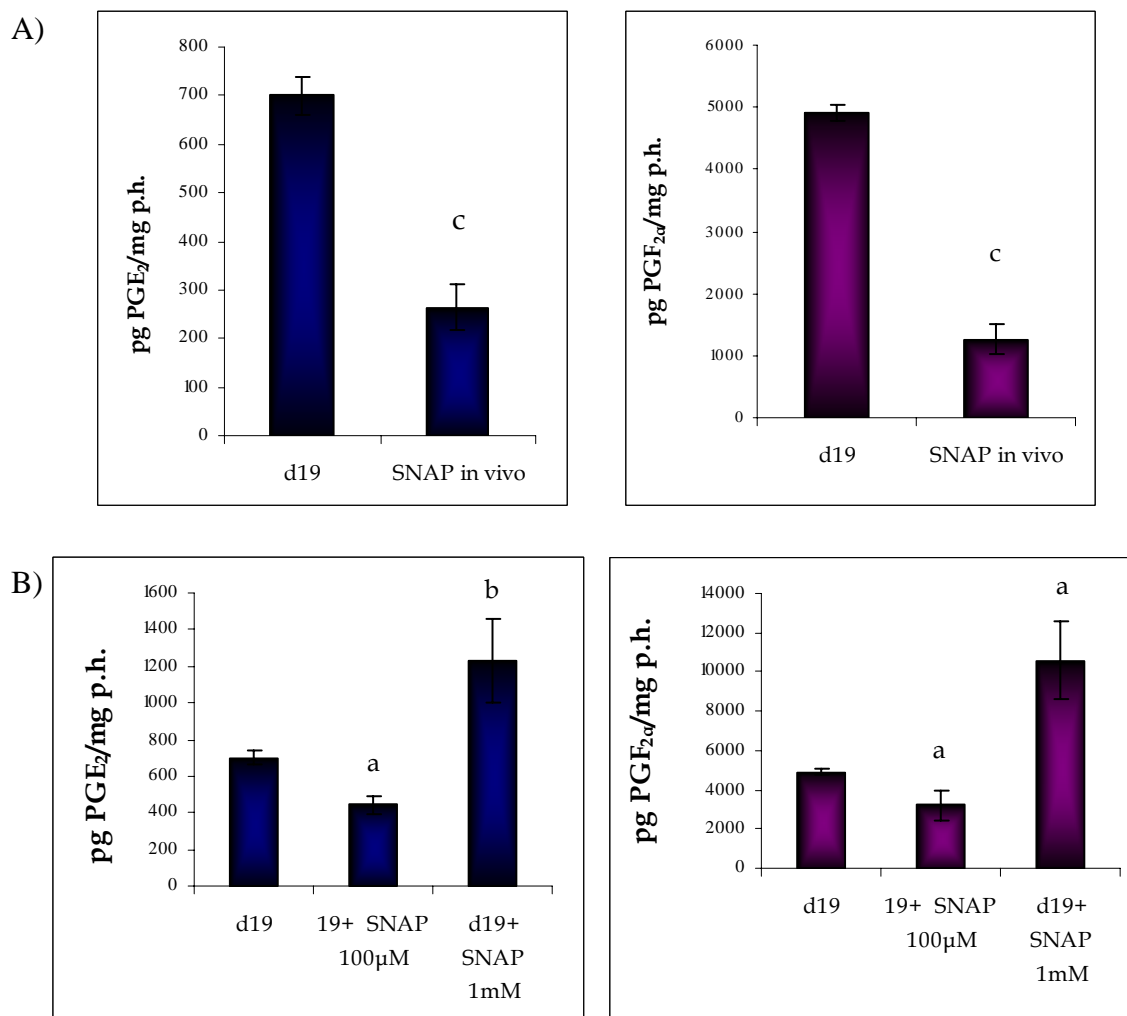


Figura 18.

Efecto del SNAP sobre la producción de prostaglandinas en el parto a término.

A) **Ensayos *in vivo*.** Se administró SNAP a ratonas en d19 de preñez y se midió la producción de PGs por fragmentos uterinos de dichos animales.

B) **Ensayos *in vitro*.** Se sacrificaron ratonas en d19 de preñez, se colectaron fragmentos uterinos, se incubaron con SNAP 100µM o 1mM y se midió la producción de PGs.

a=P<0,05 vs. d19, b=P<0,01 vs. d19, c=P<0,001 vs. d19

El embarazo, tiene un gran impacto en la salud de la población. Por lo tanto, el mejoramiento de la calidad de vida de las madres y los recién nacidos debe ser uno de los objetivos a cumplir en la agenda de salud pública.

La prematuridad es uno de los problemas más importantes y acuciantes en la perinatología actual. Si bien la neonatología ha alcanzado grandes logros en el tratamiento y cuidado de los nacidos prematuramente, lo que ha permitido un aumento de su tasa de supervivencia, los bebés prematuros aún presentan una gran tasa de morbi-mortalidad. Esto se debe en gran medida al desconocimiento de los mecanismos íntimos del inicio del trabajo de parto a término y pretérmino. Por ello, la dilucidación de los procesos involucrados es un tema de gran interés, con múltiples incógnitas a ser esclarecidas, y en el que un progreso en el conocimiento podría ayudar a mejorar la salud de millones de personas.

En nuestro laboratorio investigamos algunos de los mecanismos fisiopatológicos que se desarrollan durante la preñez.

Específicamente, en este trabajo estudiamos la participación de las vías de los endocannabinoides, las prostaglandinas y el óxido nítrico en útero de ratón hacia el final de la preñez y en el desencadenamiento del parto a término (PaT) y del parto pretérmino (PP) inducido por LPS.

Si bien en la literatura existen estudios sobre el papel del sistema de endocannabinoides en la gestación, estos están dirigidos a la preñez temprana y, especialmente, a la implantación. Por este motivo decidimos estudiar el rol de los endocannabinoides en la preñez tardía, el parto normal y el parto pretérmino en ratón.

Por otra parte, a pesar de los avances realizados en el estudio de la participación de las ciclooxigenasas y el óxido nítrico en los mecanismos involucrados en el inicio del parto, aún no se conocen como ambos caminos metabólicos interaccionan durante la preñez y el parto.

Por ello, estudiamos la interacción de estos sistemas en el parto a término y pretérmino y, adicionalmente, su posible regulación por y sobre el sistema de endocannabinoides.

Nuestro primer objetivo fue el establecimiento de un modelo de parto prematuro, con el fin de disponer de una herramienta que nos permitiera estudiar los mecanismos involucrados en el inicio prematuro del parto. Si bien la etiología del parto prematuro es multifactorial, numerosas evidencias implican a factores infecciosos como causa posible del 40% de los casos de prematuridad (Lettieri y col., 1993). Por ello, y basándonos en distintos modelos de parto pretérmino publicados anteriormente (Kaga y col., 1996; Gross y col., 2000), ensayamos la capacidad de los lipopolisacáridos bacterianos (LPS) para de inducir el parto prematuro. Los lipopolisacáridos bacterianos (LPS) son componentes de la membrana externa de las bacterias gram negativas que constituyen poderosos estímulos para las células del sistema inmune y están asociados, frecuentemente, al desencadenamiento del síndrome séptico o al shock séptico.

El objetivo fue conseguir un modelo de parto prematuro inducido por LPS en el cual la dosis utilizada no causara mortalidad materna, ya que en la mayor parte de los partos debidos a infecciones no existe peligro para la vida de la madre; de hecho muchos de ellos están asociados a infecciones subclínicas.

Esto nos permitió establecer un modelo para el estudio del PP. El mismo consiste en administrar a hembras BALB/c en el día 15 de preñez una dosis de LPS de 10 µg a las 9 h. y una de 20 µg a las 12 h. por vía intra-peritoneal (i.p.). Este esquema de administración resultó en un excelente modelo de estudio, ya que indujo el PP en el 100% de los casos con mínima mortalidad materna (5%).

Dosis mayores, si bien indujeron el PP, causaron una alta tasa de mortalidad de las madres, mientras que dosis mas bajas indujeron el PP solo en un 25% de los casos. Cabe destacar que dosis 10 veces más elevadas son necesarias para producir shock séptico en ratas y ratones adultos (Karima y col., 1999).

El parto se produjo 10 ± 2 horas después de la segunda inyección de LPS, alrededor de las 22 h. del día 15 de preñez, o sea transcurrido aproximadamente

el 80% del tiempo de gestación, puesto que el parto a término de esta cepa ocurre aproximadamente a las 9:30 h. del día 19. En el ser humano esto equivaldría a un PP a las 31 semanas de embarazo.

El número de crías (9 ± 2) no varió con respecto a las hembras *sham* (10 ± 3) ni a las hembras control (10 ± 3).

Las diferencias con los modelos previamente publicados están en las dosis y en las cepas de ratón utilizadas. El uso de la cepa BALB/c fue considerado por su sensibilidad al LPS. Puesto que es una cepa establecida hace un tiempo relativamente largo, está bien caracterizada. Además, al ser una cepa endocriada posee uniformidad genética y fenotípica, lo que reduce el número de animales necesarios para los experimentos, ya que disminuye la variabilidad (Davisson y Linder, 2004).

Una vez establecido el modelo de PP, seguimos dos estrategias principales: en primer lugar estudiar la participación de los tres sistemas (NO, PGs y endocannabinoides) en el parto a término y pretérmino, y luego, analizar las posibles regulaciones entre ellos.

Las prostaglandinas tienen la capacidad de promover las contracciones uterinas y ocupan un rol central entre aquellas moléculas implicadas en el desencadenamiento del parto (Challis y Lye, 1994). Se sabe que son producidas por tejidos maternos y fetales durante la preñez, y su concentración en líquido amniótico aumenta durante el parto (Cox y col., 1993; Hillier y col., 1974). De hecho las prostaglandinas, especialmente PGE₂ y PGF_{2 α} , son sintetizadas y liberadas en grandes cantidades en el tejido uterino durante el parto en la rata (Gu y col., 1990). Estudios realizados en humanos demuestran un incremento en la producción intrauterina de prostaglandinas previo al trabajo de parto (Skinner y Challis, 1985), así como un aumento de la actividad y expresión proteica de las enzimas claves en su biosíntesis (Hirst y col. 1995b; Mijovic y col. 1998). Los estudios realizados por Rees y colaboradores (1984) revelan que en el útero, tanto el miometrio como el endometrio están involucrados en la

producción de prostaglandinas. Se sabe además que las prostaglandinas poseen una potente actividad uterotónica (Vane y Williams 1973) y se ha informado que el miometrio se contrae en respuesta a prostaglandinas exógenas, *in vivo* e *in vitro* (Senior y col., 1993). Dada esta importante acción uterotónica, la regulación de su síntesis y metabolismo es crítica para el control del nivel de prostanoïdes bioactivos que llegan a sus sitios de acción en el miometrio. Decidimos entonces estudiar la síntesis uterina de prostaglandinas y los niveles proteicos de las enzimas responsables de su síntesis, ciclooxigenasa-1 (COX-1) y ciclooxigenasa-2 (COX-2) en el PaT y en nuestro modelo de PP.

En el presente estudio, observamos que tanto la producción uterina de PGE₂ como de PGF_{2α} aumentan en el final de la preñez (d19>d15) en hembras con parto a término. Coincidentemente, la liberación de estas prostaglandinas también se vio aumentada en los momentos previos al parto cuando este se indujo prematuramente por el tratamiento con LPS (d15+LPS). Además, los valores alcanzados por ambas prostaglandinas tras la administración de la endotoxina resultaron similares a los observados en el día 19 en la preñez normal, antes del parto a término.

Distintos grupos demostraron que tanto la COX-1 como la COX-2 se encuentran reguladas durante la preñez en ratas y que los niveles de ambas isoformas aumentan hacia el final de la gestación (Farina y col., 2004; Dong y col., 1996). En ratones, Tsuboi y col. (2000) informaron que la expresión del ARNm de la COX-2 aumenta abruptamente en el momento del parto, mientras que la inducción del ARNm de la COX-1 es más temprana (d15) y permanece elevada hasta el final de la preñez. Sin embargo, otros grupos encontraron un aumento gradual en el nivel proteico de la COX-1, mientras que el nivel proteico de la COX-2 permanecía constante hacia el final de la gestación (Winchester y col., 2002).

Por esto, el siguiente paso fue estudiar los niveles proteicos de las ciclooxigenasas uterinas en nuestro sistema. Los análisis de western blot revelaron que los niveles proteicos de la COX-2 uterina se incrementan

gradualmente hacia el final de la preñez, alcanzando el máximo el d19. También pudo observarse un aumento en los niveles de COX-2 en los momentos previos al parto cuando este fue inducido por LPS, aunque en este caso el aumento registrado fue de mayor magnitud que en el parto normal.

A diferencia de lo observado para la COX-2, cuando se estudió la expresión de la COX-1 no se evidenció variación en los niveles proteicos, ni en el parto a término ni en el parto pretérmino.

Esto coincide con antecedentes según los cuales, si bien ambas isoformas de la COX comparten estructuras similares, difieren marcadamente en sus patrones de regulación y funciones fisiológicas (Smith y col., 1996). Mientras que la COX-1 es fácilmente detectable en muchos tejidos y es considerada la responsable de funciones fisiológicas de "mantenimiento", la COX-2 es considerada la isoforma inducible, que generalmente no es detectada en la mayoría de los tejidos pero puede ser encontrada en grandes cantidades en macrófagos y otras células inflamatorias luego de la exposición a citoquinas, factores de crecimiento y mitógenos. También se sabe que la actividad del promotor de COX-2 aumenta en el trofoblasto humano luego de la exposición a LPS (Anteby y col., 1998).

Con el fin de corroborar la importancia de las prostaglandinas en el desencadenamiento del parto decidimos estudiar el efecto de un inhibidor selectivo de las COXs en el inicio del parto a término. Encontramos que la administración de indometacina en el final de la preñez produjo un retraso en el inicio del parto de aproximadamente 8 h.

Sin embargo, aunque los anti-inflamatorios no esteroideos (AINES), como la indometacina, han demostrado su efectividad en demorar la progresión del PaT y el PP en modelos animales (Fidel y col., 1994) y en estudios en humanos (Besinger y col., 1991), inhiben tanto la COX-1 como la COX-2. Debido a esto provocan efectos secundarios adversos sobre el feto (como cierre prematuro del ductus arterioso, disfunciones renales, hipertensión pulmonar, enterocolitis necrotizante y hemorragia intracraneal del recién nacido) y la madre (edema pulmonar, gastritis) (Norton y col., 1993; Major y col; 1994; Higby y col., 1993;

Besinger y col., 1991). Por ello la inhibición selectiva de COX-1 o COX-2 podrían permitir terapias efectivas, disminuyendo la morbilidad fetal y materna.

Debido a esto, y teniendo en cuenta el aumento de los niveles proteicos de la COX-2 en el parto, decidimos ensayar la capacidad del meloxicam, un inhibidor selectivo de COX-2, de retrasar el PaT y prevenir el PP. La administración del meloxicam (i.p) fue capaz de retrasar en aproximadamente 24 h. el inicio del parto a término. Cuando este inhibidor fue administrado en animales tratados con LPS logró prevenir el parto pretérmino en un 90% de los casos (n=10). Esto coincide con lo observado por otros autores utilizando distintos inhibidores selectivos de la COX-2 y otras cepas de ratón (Hirsch y Wang, 2005).

En ambos casos el meloxicam revirtió el aumento de la producción de PGE₂ y PGF_{2α}. Adicionalmente, provocó una disminución del nivel proteico de COX-2 en el PaT y en el PP, efecto que también fue observado tras la administración de indometacina. Estos hallazgos sugieren que el aumento en la síntesis de prostaglandinas es un requisito para el inicio del parto en condiciones normales y de sepsis.

Los resultados hasta aquí presentados demuestran que si bien ambas ciclooxigenasas se expresan en el útero de ratón durante la preñez, en momentos previos al parto solo se encuentra aumentada la COX-2, y que altos niveles de prostaglandinas, principalmente debidos a la acción de la COX-2, son de fundamental importancia para el inicio del parto a término así como para la inducción prematura del parto por LPS.

Una vez caracterizado el sistema COX-prostaglandinas en el parto normal y pretérmino, estudiamos el sistema nitrérgico (NOS-NO) en útero de ratón durante el parto a término y el parto pretérmino.

La mayor parte de los antecedentes postulan que el NO es importante en el mantenimiento de la preñez (López Bernal y col., 1993). Adicionalmente, ha sido informado que durante la gestación existe una inducción de la producción de NO por el miometrio, que contribuye al mantenimiento de la quiescencia

uterina, en tanto disminuye hacia el final de la preñez, favoreciendo así a las contracciones que resultan en el parto (Maul y col., 2003). Si bien dadores de NO han sido ensayados en la prevención del parto prematuro (Lees y col., 1994), aún no existen evidencias concluyentes que permitan apoyar el uso de los mismos en la prevención del PP ya que, por ejemplo, se ha visto que niveles mayores de NO son producidos durante ciertas condiciones patológicas del embarazo como preeclampsia (Hudicek-Martincic y col., 2004).

Cuando medimos la actividad de la NOS en el tercio final de la preñez, encontramos una marcada disminución de la misma en los días 18 y 19 de gestación, lo que coincide con los antecedentes mencionados. Además encontramos que esta caída desempeña un rol importante en el inicio del parto a término, puesto que al administrar un dador de óxido nítrico (SNAP) a las ratonas en d19 de preñez logramos retrasar el inicio del parto en aproximadamente 7 h.

La presencia de iNOS, eNOS y nNOS ya ha sido informada en el útero de ratones preñados (Purcell y col., 1999). Al estudiar los niveles proteicos de las distintas isoformas de la NOS en el parto a término, encontramos que la eNOS y la nNOS se expresan en el útero de ratonas preñadas, aunque no presentan variaciones en el tercio final de la gestación. Sin embargo, el análisis densitométrico de la iNOS reveló que el nivel proteico disminuye gradualmente conforme se acerca el momento del parto, en concordancia con lo mostrado por la actividad de la NOS.

Eso resulta de gran importancia puesto que la iNOS tiene la capacidad de producir niveles de NO mil veces mayores que los producidos por las isoformas calcio dependientes (eNOS y nNOS). Esto sugiere que la disminución en la actividad de NOS observada en el parto a término podría estar relacionada, al menos en parte, a una disminución en los niveles proteicos de la iNOS uterina.

Existen numerosos antecedentes que demuestran un aumento en la concentración de NO por la expresión exacerbada de la iNOS en procesos de sepsis y distintos procesos inflamatorios (Mollace y col., 2005). Nuestro grupo ha demostrado además que el LPS induce la producción de NO mediante el incremento del nivel proteico de la iNOS en decidua y útero de ratones preñados en el día 7 de gestación, y que esto provoca la reabsorción y expulsión de los embriones (Ogando y col., 2003).

En consecuencia, se investigó el perfil de síntesis de NO y los niveles proteicos uterinos de las distintas isoformas de la NOS en el modelo de parto prematuro inducido por LPS.

Encontramos que cuando se induce el PP con LPS se produce un importante aumento de la actividad de la NOS uterina, a diferencia de lo observado en el parto a término.

Al igual que en el parto a término, en el PP hallamos que las isoformas dependientes de Ca^{2+} (eNOS y nNOS), no sufrían variaciones. En este modelo, la administración de LPS resultó en un incremento del nivel proteico de la iNOS, en coincidencia con los resultados obtenidos para la actividad de NOS uterina.

Estos resultados concuerdan con las observaciones de Jaekle y col. (1994), quienes encontraron que los metabolitos del NO están aumentados en pacientes con parto prematuro y ruptura prematura de membranas.

Si el aumento de la iNOS tuviera un rol preponderante en la inducción del PP por LPS, un inhibidor selectivo de dicha isoforma debería tener la capacidad de inhibir, al menos en parte, el inicio del PP. Por ello utilizamos aminoguanidina (AG), el inhibidor selectivo de la iNOS, encontrando que esta retrasó el inicio del parto prematuro en el 100% de los casos. El 55% de los animales tratados con AG llegó a término (parto en el día 19 de preñez), mientras que el 45% restante solo tuvo un retraso del inicio del parto de aproximadamente 20 horas.

Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren una vez más que la isoforma iNOS sería la principal responsable de las variaciones en la

producción de NO observadas tanto en el parto a término como en el parto prematuro. Pero mientras que en el parto a término la caída concomitante de la producción de NO y el nivel proteico de la iNOS favorece las contracciones uterinas, en el modelo de parto prematuro se observa un fuerte incremento de ambos parámetros.

En tercer lugar caracterizamos el sistema de endocannabinoides en el tercio final de la gestación, el parto a término y el parto pretérmino.

En los últimos años se ha dado un explosivo incremento en las investigaciones concernientes a los cannabinoides y endocannabinoides, habiéndose demostrado que los endocannabinoides participan en numerosos procesos fisiológicos y patológicos.

Hasta el presente han sido identificados y clonados dos receptores de cannabinoides, CB1 y CB2 (Park y col., 2004) y nuevas vías de síntesis de anandamida, uno de los principales endocannabinoides, siguen siendo propuestas. A pesar de las numerosas investigaciones realizadas sobre el papel de los endocannabinoides en procesos reproductivos, la mayoría de ellas se orientan hacia el estudio de la preñez temprana, donde ya ha sido probado que tienen gran importancia en la regulación de los procesos implantatorios (Paria y col., 2001; Liu y col., 2002). Sin embargo, existen pocos estudios sobre la acción y el efecto de los endocannabinoides en el final de la preñez y el parto. En modelos animales la exposición del útero al tetrahidrocannabinol (THC), principal componente psicoactivo de la marihuana, produjo embriotoxicidad, toxicidad fetal y malformaciones teratogénicas específicas (Geber y Schramm, 1969; Phillips y col., 1971). Solo existe un trabajo de Wenger y col. (1997) en el que la administración diaria de anandamida o THC durante la tercera semana de preñez en la rata resultó en una prolongación de la preñez, que podría ser explicada por la disminución observada en los niveles de PGF_1 y $\text{PGF}_{2\alpha}$ séricas. Sin embargo un trabajo anterior asociaba el consumo de marihuana a un mayor riesgo de parto prematuro (Gibson y col., 1983) y en una investigación reciente

de Habayeb y colaboradores (2004) se encontró un importante aumento en los niveles plasmáticos de AEA en mujeres a término en trabajo de parto con respecto a mujeres a término sin trabajo de parto. Mientras que Schmid y colaboradores (1997) han observado que el útero de ratón es el tejido de mamífero donde se detectan los niveles más altos de anandamida, alcanzando valores de hasta 20 nmol/g tejido.

Dados estos antecedentes decidimos estudiar el perfil de la actividad de síntesis de anandamida, la actividad de la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH, enzima encargada de la degradación de la AEA) y el nivel de expresión de los receptores a endocannabinoides (CB1 y CB2), tanto en los animales controles como en los sometidos al modelo de PP.

En primer lugar observamos que el útero de ratonas preñadas es capaz de sintetizar anandamida en todos los días estudiados. Cuando analizamos la actividad de síntesis de anandamida en el último tercio de la preñez pudimos observar que aumenta hacia el final de la gestación, alcanzando los máximos valores momentos previos al parto (d19). Sin embargo cuando el parto fue inducido prematuramente por LPS, este aumento no fue observado.

Por su parte, la actividad de la FAAH no se modificó ni en el parto a término ni en el PP, sugiriendo que los niveles de AEA uterina estarían aumentados en el parto a término pero no en el pretérmino. Estos resultados indican que la regulación de los niveles de anandamida en el parto a término es distinta de la que se produce en el parto prematuro asociado a infecciones.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis son los primeros en demostrar la expresión proteica de CB1 y CB2 en el útero de ratón durante la preñez. Adicionalmente existen trabajos en animales y en el miometrio humano que informan la expresión de los ARNm de ambos receptores (Dennedy y col., 2004).

Mediante el uso de anticuerpos específicos encontramos que los dos tipos de receptores son expresados en el útero de ratonas preñadas. Una fracción

proteica de aproximadamente 63 kDa, correspondiente a la forma glicosilada de CB1 (Porcella y col., 2000), fue reconocida por el anticuerpo dirigido contra esta isoforma. Se comprobó que esta banda correspondía al CB1 mediante la preincubación del anticuerpo con un péptido bloqueante específico, que provocó la desaparición de la banda correspondiente.

El anticuerpo contra CB2 reaccionó específicamente con una banda de 38,2 kDa, lo que coincide con lo observado en eosinófilos humanos y mastocitos y con la masa molecular que predice su secuencia aminoacídica (Oka y col., 2004; Samson y col., 2003).

El análisis densitométrico de las bandas obtenidas permitió observar que ninguno de los dos receptores de cannabinoides varía sus niveles proteicos a lo largo de la preñez.

De esta forma, en el presente trabajo de tesis se demuestra por primera vez que los receptores de cannabinoides CB1 y CB2 se expresan en el útero de ratón durante la preñez, y que sus niveles proteicos no varían en el tercio final de la gestación.

Una vez caracterizados los tres sistemas en estudio en el parto prematuro y el parto a término, pasamos a investigar las interacciones entre ellos.

En primer lugar, estudiamos la interacción entre los sistemas de la anandamida y las prostaglandinas, ya que el ácido araquidónico es el sustrato tanto para la síntesis de AEA como para la síntesis de prostaglandinas.

Existe una creciente cantidad de trabajos referidos a la interacción entre los sistemas de endocannabinoides y prostaglandinas. Por ejemplo, ha sido informado que la anandamida es capaz de inducir la síntesis de PGE₂ y la expresión de COX-2 por células endoteliales microvasculares del cerebro (Chen y col., 2005) y que la R (+)-metanandamida, un análogo estable de la AEA no metabolizable por la FAAH, causa la inducción de COX-2 en células de cáncer de pulmón y en macrófagos (Gardner y col., 2003; Vannacci y col., 2004). Por

otro lado se ha visto, en útero de ratón, que los bajos niveles de anandamida presentes en los sitios de implantación correlacionan con altos niveles de COX-2, sugiriendo que las prostaglandinas producidas por esta enzima podrían controlar los niveles de AEA (Park y col., 2004), aunque no existen pruebas directas.

Analizamos entonces si la anandamida tenía la capacidad de regular la producción de prostaglandinas uterinas en los modelos estudiados. Al incubar fragmentos uterinos de ratonas en d15 de preñez con anandamida, momento en el cual sus niveles son bajos, se obtuvo un incremento significativo en la producción de PGE₂ y PGF_{2α}, lo que coincidió con los antecedentes disponibles en la literatura. Dicho aumento resultó independiente de la concentración de AEA ensayada (10⁻⁹M, 10⁻⁷M o 10⁻⁶M) y está mediado por el receptor de cannabinoides CB1, ya que fue completamente inhibido por la co-incubación con AM251 (antagonista de CB1) pero no por la co-incubación con AM630 (antagonista de CB2).

Los resultados de la síntesis de anandamida y la actividad de la FAAH, mostraron que existe un incremento previo al parto a término de los niveles uterinos de anandamida. Además, trabajos recientes demuestran que, vía el receptor CB1, este endocannabinoide puede afectar la contractilidad miometrial (Dennedy y col., 2004).

Ante estas evidencias, y habiendo demostrado en esta tesis que la anandamida tiene la capacidad de regular la síntesis de prostaglandinas vía el receptor CB1, nos propusimos investigar si la anandamida desempeñaba un rol preponderante en el desencadenamiento del parto a término. Con este objetivo se administraron distintas dosis de AM251 según el protocolo descrito en materiales y métodos, encontrándose que en ninguno de los casos este antagonista produjo una alteración en la duración de la preñez. Esto indica que si bien la producción uterina de anandamida está incrementada en el parto a término, dicho aumento no sería fundamental para el inicio del mismo.

Luego buscamos establecer si las prostaglandinas endógenas ejercen algún tipo de efecto sobre el sistema de endocannabinoides. La administración de meloxicam, un inhibidor selectivo de la COX-2, no afectó la síntesis de AEA en los ratones en d15 controles ni en los animales sometidos al modelo de parto prematuro, cuando la síntesis de prostaglandinas se encontraba estimulada. La actividad de síntesis de anandamida tampoco se vio afectada al tratar con meloxicam a ratonas preñadas en el día 19. Estos resultados indican que las prostaglandinas no ejercerían un efecto directo sobre la actividad de síntesis de anandamida. Por lo tanto, el incremento en la síntesis de este endocanabinoide encontrado al término de la gestación no estaría regulado por las prostaglandinas.

Nos propusimos entonces analizar si el NO podía ser una de las moléculas moduladoras del sistema de endocannabinoides al término de la gestación.

Para investigar si el NO es capaz de modular los niveles uterinos de AEA, se estudió el efecto un inhibidor selectivo de la iNOS (aminoguanidina, AG) sobre la actividad de síntesis de anandamida. La administración de AG a ratonas en el d15 de preñez, así como también a las hembras sometidas al modelo de PP, resultó en un incremento significativo de la actividad de síntesis de anandamida en ambos grupos, lo que indicaría un efecto inhibidor del NO sobre la síntesis de anandamida.

Para analizar el efecto de este mediador gaseoso al término de la gestación se investigó el efecto del SNAP administrado a ratonas preñadas de 19 días, momento en el cual los niveles de NO son mínimos. El dador de NO, administrado en la misma dosis que causó un retraso del parto a término, provocó un aumento en la actividad de síntesis de AEA.

Estos resultados sugieren que el óxido nítrico tendría un efecto dual sobre la síntesis de anandamida. Cuando el nivel de NO es bajo (PaT) induciría la actividad de síntesis de anandamida, mientras que en altos niveles (PP) pasaría a ejercer una inhibición de la misma. Esto podría relacionarse con lo informado

por Maccarrone y col. (2000), quienes encontraron que dadores de NO inducen la captación, y por lo tanto la degradación, de anandamida por células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC).

Numerosos trabajos postulan que la anandamida tendría un efecto inhibitorio del sistema NOS-NO. Chang y col. (2001) observaron que la AEA era capaz de disminuir la producción de NO inducida por LPS en macrófagos J774. El mismo efecto fue encontrado en cultivos de astrocitos de ratón por Molina-Holgado y col., (2002), quienes además demostraron que este efecto era ejercido vía el receptor CB1. Asimismo, Fimiani y col., (2000) indicaron que la preincubación con anandamida podía inhibir la expresión de iNOS inducida por la exposición a LPS e IFN- γ en cultivo de fragmentos atriales humanos. Sin embargo, otros autores postulan un efecto inductor de la AEA sobre el sistema del NO. En este sentido, Stefano y col. (1996) comunicaron que la AEA puede inducir la liberación de NO en monocitos humanos, el mismo efecto que produce en lecho mesentérico de rata, aunque en este caso actuaría vía el receptor vanilloide de tipo 1 (TRPV1) (Poblete y col. 2005).

Nuestros resultados demuestran que, en el útero de ratonas en d15 de preñez, la incubación de los fragmentos uterinos con una dosis fisiológica de AEA (10^{-9} M) causa una inhibición de la actividad de NOS. Por su parte, concentraciones mayores de AEA (10^{-7} y 10^{-6} M) no produjeron ningún efecto. Además pudimos comprobar que esta inhibición está mediada por la acción de la AEA sobre el receptor de cannabinoides CB1, ya que fue abrogada por la co-incubación con AM251, un antagonista de CB1, y no por AM630, antagonista de CB2.

Estos resultados sugieren que el incremento en la actividad de síntesis de AEA observado en el día 19 podría estar mediando, al menos en parte, la disminución en la producción de NO al final de la gestación.

Finalmente, estudiamos la interacción entre los sistemas de NOS-NO y COX-PGs en el desencadenamiento del parto a término y pretérmino.

El óxido nítrico y las prostaglandinas comparten varias similitudes:

- Ambos tienen una biosíntesis constitutiva vía complejos bioenzimáticos bien identificados (COX para las PGs y NOS para el NO).
- Su liberación basal ha demostrado ejercer un rol protector en muchas funciones fisiopatológicas.
- Bajo estados inflamatorios, o en etapas tempranas de muchas enfermedades caracterizadas por la ocurrencia de procesos inflamatorios, ambos son liberados simultáneamente en grandes cantidades. Esta liberación es debida principalmente a la activación de enzimas inducibles, la COX-2 y la iNOS.

La primera conexión entre estas vías fue hecha en 1993, cuando se demostró que el incremento en la liberación de PG durante procesos inflamatorios es principalmente dirigido por el NO (Salvemini y col., 1993). Trabajos recientes ponen en evidencia un diálogo constante entre ambos sistemas, pero priorizando la modulación de los mecanismos moleculares que regulan la vía de generación de las PGs. El efecto final de esta actividad regulatoria no es unívoco, ya que se ha demostrado que tanto el NO endógeno así como los dadores de NO pueden activar o inhibir la vía de las COX dependiendo de los niveles de NO liberados (Mollace y col., 2005).

En nuestro laboratorio se ha demostrado, que los caminos de la COX-2 y la iNOS interactúan en distintos eventos infecciosos e inflamatorios y en respuesta a distintos agentes como LPS y las citoquinas (Franchi y col., 1998; Farina y col., 2000; Ribeiro y col., 2003). Además ha sido informado que la administración de PGF_{2α} podía inducir el PP en ratas, inhibiendo la expresión de la iNOS y disminuyendo la producción de NO (Dong y col., 1997)

En el presente trabajo demostramos que tanto en el parto a término como en el parto pretérmino existen variaciones en la actividad de la NOS y en los niveles proteicos de la iNOS, así como en la producción de prostaglandinas y los niveles proteicos de la COX-2.

Considerando que la administración de meloxicam fue capaz de prolongar la duración de la gestación normal y de prevenir la inducción del parto prematuro por LPS investigamos si las prostaglandinas endógenas regulaban de algún

modo la vía del óxido nítrico. Durante el PP, el tratamiento con meloxicam indujo la actividad de la NOS, aún por encima de los valores obtenidos con LPS. Sin embargo no causó una variación en la actividad uterina de la NOS cuando se administró a ratones control en el d15 o en el día 19 de gestación, en condiciones fisiológicas.

Estos resultados sugieren que los altos niveles de PGs producidos en respuesta al LPS estarían inhibiendo la síntesis de NO producido en condiciones inflamatorias, tal vez actuando como mecanismo protector para evitar que el NO alcance niveles que puedan resultar dañinos para el tejido y el feto. Algo similar fue observado en células de la microglía, donde la PGE₂ inhibió la producción de nitritos y la expresión de iNOS inducidas por LPS (Minghetti y col., 1997). Previamente, el mismo efecto inductor del meloxicam sobre la actividad de NOS había sido observado por nuestro grupo en el útero de ratas estrogenizadas (Ribeiro y col., 2004), donde demostramos que las PGs inhibían la síntesis de NO.

Se sabe que en procesos inflamatorios las variaciones en la producción de prostaglandinas están dirigidas por el NO.

Como ya se ha mencionado, en el PP habíamos observado un aumento de la actividad NOS asociado a un aumento en el nivel proteico de la iNOS. Por ello utilizamos un inhibidor selectivo de la iNOS, la AG, para estudiar si una disminución en la síntesis de NO afectaba la síntesis de PGs. Encontramos que al inhibir la actividad de la iNOS se revirtió completamente el aumento en la producción de PGE₂ causado por el LPS, y parcialmente el aumento de PGF_{2 α} , mientras que no afectó la síntesis de prostaglandinas en condiciones basales. Estos resultados apoyan la idea que una producción elevada de óxido nítrico, como la producida por el tratamiento con LPS, estaría induciendo la producción uterina de prostaglandinas.

Posteriormente analizamos el rol del NO sobre la modulación de la síntesis uterina de prostaglandinas en el parto a término, utilizando para ello SNAP, un dador lento de NO. Encontramos que el tratamiento de los animales con dosis

bajas de SNAP al final de la gestación produjo una disminución en la producción de PGE₂ y PGF_{2α}, mostrando que en este caso el NO estaría inhibiendo la síntesis de prostaglandinas.

Para analizar si esta aparente contradicción en el efecto del NO sobre la síntesis de PGs se debía a un efecto dual del mismo, incubamos fragmentos uterinos de ratonas en d19 de preñez con una concentración baja (100 μM) o una concentración alta de SNAP (1mM).

Los experimentos *in vitro* demostraron que el NO tendría un efecto dual sobre la síntesis de prostaglandinas. El tratamiento con SNAP provocó una disminución en la producción de ambas prostaglandinas cuando fragmentos uterinos de d19 de preñez fueron incubados con bajas dosis (100 μM), mientras que con dosis elevadas del dador de NO (1mM) se produjo un aumento de la síntesis de PGE₂ y PGF_{2α}.

Estos resultados sugieren que bajas concentraciones de NO como las observadas en la preñez normal tiene un efecto inhibitorio sobre la síntesis de estos autacoides. Por otro lado, en condiciones de sepsis, cuando la síntesis de NO se encuentra exacerbada por el efecto de la endotoxina, este mediador podría contribuir al aumento de la síntesis de prostaglandinas.

En resumen, en este trabajo encontramos que los procesos que llevan al desencadenamiento del parto a término o en forma prematura implican variaciones en los sistemas NOS-NO y COX-PGs.

De acuerdo a los resultados obtenidos, pensamos que el parto a término podría ser la consecuencia de una atenuación de las vías que favorecen la quiescencia uterina (como el NO), lo que resultaría en una relativa dominancia de las vías estimuladoras de la contractilidad miométrial como las prostaglandinas.

En contraste con el efecto protector de la preñez del NO observado en el parto a término, cuando se induce el parto por LPS, el NO producido por la estimulación de la iNOS contribuye al desencadenamiento del mismo. La producción exacerbada de este mediador induce las vías estimuladoras de las prostaglandinas, que lleva al inicio prematuro del parto.

En este trabajo mostramos la presencia del sistema endocannabinoides-receptores CB uterino durante el final de la preñez, tanto en condiciones normales como en la inducción del parto por LPS. Si bien la síntesis de AEA está regulada durante la preñez e interactúa con los otros sistemas estudiados (PGS-COX y NO-NOS), con la metodología empleada no se puso en evidencia un rol preponderante de la AEA en el inicio del parto.

Creemos que los resultados presentados ponen de manifiesto la existencia de fuertes mecanismos regulatorios y de interacción entre los tres sistemas estudiados, aportando una base para que investigaciones posteriores permitan continuar desentrañando la amplia gama de componentes que se encuentran involucrados en la regulación de la quiescencia uterina durante la preñez y la contractilidad miometrial en el momento del parto.

Los resultados presentados sugieren que tanto la preñez como el inicio del parto son procesos finamente regulados y que los sistemas involucrados en los mismos tienen acciones diversas en situaciones normales o patológicas.

Profundizar nuestros conocimientos sobre los mecanismos de los procesos patológicos que llevan al parto prematuro permitirá intervenciones específicas y adecuadas para su prevención.

- ✖ Se demuestra por primera vez la expresión de los receptores de cannabinoides, CB1 y CB2 en el útero.
- ✖ El aumento observado en los niveles uterinos de anandamida al final de la gestación, no se produce en el parto prematuro ni es decisivo para el disparo del parto a término.
- ✖ El incremento de la producción uterina de prostaglandinas en el momento del parto, tanto a término como prematuro, es fundamental para el inicio del parto, y se relaciona principalmente con un aumento en la expresión proteica de la COX-2.
- ✖ Tanto la disminución de la actividad de la NOS encontrada en el parto a término como el aumento en el parto prematuro son primordiales para el inicio de estos.
- ✖ Las variaciones en los niveles de NO coinciden con los cambios en el nivel proteico de la iNOS.
- ✖ Los tres sistemas estudiados tienen la capacidad de regularse mutuamente.
- ✖ El NO ejerce efectos duales sobre la anandamida y las prostaglandinas, en altos niveles induce a las prostaglandinas e inhibe a la anandamida, mientras que en bajos niveles induce a la anandamida e inhibe a las prostaglandinas.
- ✖ Existen importantes diferencias entre los mecanismos de disparo del parto a término y el parto prematuro inducido por LPS.

- **Ali M, Buhimschi I, Chwalisz K, Garfield RE.** 1997. Changes in expression of the nitric oxide synthase isoforms in rat uterus and cervix during pregnancy and parturition. *Mol. Hum. Reprod.* 3(11): 995-1003.
- **Anteby EY, Johnson RD, Huang X, Dryden DK, Nelson DM, Sadovsky Y.** 1998. Lipopolysaccharide enhances the transcription of prostaglandin H synthase-2 gene in primary human trophoblasts. *Am J Obstet Gynecol.* 178(3): 469-473.
- **Auletta FJ, Kamps DL, Pories S, Bisset J, Gibson M.** 1984. An intra-corporis luteum site for the luteolytic action of prostaglandin F2 alpha in the rhesus monkey. *Prostaglandins.* 27(2):285-298.
- **Auletta FJ, Speroff L, Caldwell BV.** 1973. Prostaglandin F2a-induced steroidogenesis and luteolysis in the primate corpus luteum. *J Clin Endocrinol Metab.* 36: 405-407.
- **Bari M, Battista N, Fezza F, Finazzi-Agro A, Maccarrone M.** 2005. Lipid rafts control signaling of type-1 cannabinoid receptors in neuronal cells. Implications for anandamide-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 280(13):12212-12220.
- **Bates TE, Loesch A, Burnstock G, Clark JB.** 1995. Immunocytochemical evidence for a mitochondrially located nitric oxide synthase in brain and liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 213(3):896-900.
- **Beckman JS, Crow JP.** 1993. Pathological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite formation. *Biochem Soc Trans.* 21(2):330-334.
- **Beling GC, Marcus SL, Markam SM.** 1970. Functional activity of the corpus luteum following hysterectomy. *J Clin Endocrinol Metab.* 30: 30-39.
- **Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D.** 1997. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* 277(5329):1094-1097.
- **Bergtröm S y Sjövall J.** 1957. The isolation of prostaglandins. *Acta Chem. Scand.* 11: 1086.
- **Besinger RE, Niebyl JR, Keyes WG, Johnson TR.** 1991. Randomized comparative trial of indomethacin and ritodrine for the long-term treatment of preterm labor. *Am J Obstet Gynecol.* 164(4): 981-986.
- **Bornheim LM, Kim KY, Chen B, Correia MA.** 1995. Microsomal cytochrome P450-mediated liver and brain anandamide metabolism. *Biochem Pharmacol.* 50(5):677-686.
- **Boveris A, Costa LE, Cadenas E, Poderoso JJ.** 1999. Regulation of mitochondrial respiration by adenosine diphosphate, oxygen, and nitric oxide. *Methods Enzymol.* 301: 188-198.
- **Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
- **Bredt DS, Snyder SH.** 1989. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86(22): 9030-9033.
- **Bredt y Snyder.** 1992. Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulina proyein kinase, identification of flavin and calmodulina binding sites. *J. Biol. Chem.* 267: 10976-10981.
- **Bredt y Snyder.** 1994. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Ann. Rev. Biochem.* 61: 175-195.
- **Brennecke S, Bryce R, Turnbull A, Mitchell M.** 1982. Inhibition of prostaglandin synthase by maternal plasma factor(s) in early human pregnancy. *Br J Obs Gyn and Reprod Biol.* 89:612-616.
- **Buhimschi I, Ali M, Jain V, Chwalisz K, Garfield RE.** 1996. Differential regulation of nitric oxide in the rat uterus and cervix during pregnancy and labor. *Hum. Reprod.* 11: 1755-1766.

- **Buhimschi IA, Yallampalli C, Buhimschi CS, Saade GR, Garfield RE.** 2000. Distinct regulation of nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate production by steroid hormones in the rat uterus. *Mol. Hum. Reprod.* 6(5):404-414.
- **Bukowski R, Mc Kay L, Shi S, Saad GR, Garfield RE.** 2001. The effects of cervical application of inhibitors of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 on delivery in rats. *Am J Obstet Gynecol.* 185: 959-965.
- **Burnstock G y Prosser CL.** 1960. Responses of smooth muscles to quick stretching: relation of stretch to conduction. *Am J Physiol.* 198: 921-925.
- **Busch U, Schmid J, Heinzl G, Schmaus H, Baierl J, Huber C, Roth W.** 1998. Pharmacokinetics of meloxicam in animals and the relevance to humans. *Drug Metab Dispos.* 26(6):576-584.
- **Busconi L, Michel T.** 1993. Endothelial nitric oxide synthase. N-terminal myristoylation determines subcellular localization. *J Biol Chem.* 268(12):8410-8413.
- **Bytautiene E, Romero R, Vedernikov YP, El-Zeky F, Saade GR, Garfield RE.** 2004. Induction of premature labor and delivery by allergic reaction and prevention by histamine H1 receptor antagonist. *Am J Obstet Gynecol.* 191(4):1356-1361.
- **Carrera MC, Riobo N, Lisdero C, Poderoso JJ.** 1999. El óxido nítrico y las óxido nítrico sintasas. *Antioxidantes y Calidad de Vida* 6: 5.
- **Castracane VD y Shaikh AA.** 1976. Effect of decidual tissue on the uterine production of prostaglandins in pseudopregnant rats. *J Reprod Fertil.* 46: 101-104.
- **Castracane VD, Moore GT, Shaikh AA.** 1979. Ovarian function of hysterectomized *Macaca fascicularis*. *Biol Reprod.* 20: 462-472.
- **Caulfield MP, Brown DA.** 1992. Cannabinoid receptor agonists inhibit Ca current in NG108-15 neuroblastoma cells via a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Br J Pharmacol.* 106(2): 231-232.
- **Challis J y Lye SJ.** 1994. Parturition. En "The Physiology of Reproduction" ed 2. Eds. Knobil E, Neill J. Raven Press, New York. vol 2: 985-1031.
- **Challis J y Olson D.** 1988. Parturition En "The Physiology of Reproduction" Eds. Knobil E, Neill J. Pp. 1271 Raven Press, New York.
- **Challis JR, Bloomfield FH, Bocking AD, Casciani V, Chisaka H, Connor K, Dong X, Gluckman P, Harding JE, Johnstone J, Li W, Lye S, Okamura K, Premyslova M.** 2005. Fetal signals and parturition. *J Obstet Gynaecol Res.* 31(6):492-499.
- **Chang YH, Lee ST, Lin WW.** 2001. Effects of cannabinoids on LPS-stimulated inflammatory mediator release from macrophages: involvement of eicosanoids. *J Cell Biochem.* 81(4): 715-723.
- **Chen P, Hu S, Yao J, Moore SA, Spector AA, Fang X.** 2005. Induction of cyclooxygenase-2 by anandamide in cerebral microvascular endothelium. *Microvasc Res.* 69(1-2):28-35.
- **Chwalisz K.** 1993. Role of progesterone in the control of labor. In *Basic Mechanisms of Term and Preterm Labor*. Schering Foundation Workshop 5. Chwalisz K, Garfield R (eds.). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg New York. pp 97-163.
- **Condon JC, Jeyasuria P, Faust JM, Mendelson CR.** 2004. Surfactant protein secreted by the maturing mouse fetal lung acts as a hormone that signals the initiation of parturition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(14):4978-4983.
- **Cooke JP, Tsao PS.** 1993. Cytoprotective effects of nitric oxide. *Circulation* 88:2451-2454.
- **Corbett JA, Wang JL, Hughes JH, Wolf BA, Sweetland MA, Lancaster JR Jr, McDaniel ML.** 1992. Nitric oxide and cyclic GMP formation induced by interleukin 1 beta in islets of Langerhans. Evidence for an effector role of nitric oxide in islet dysfunction. *Biochem. J.* 287 (Pt.1):229-235.

- **Cox SM, King MR, Casey ML, MacDonald PC.** 1993. Interleukin-1 beta, -1 alpha, and -6 and prostaglandins in vaginal/cervical fluids of pregnant women before and during labor. *J Clin Endocrinol Metab.* 77(3): 805-815.
- **Davisson MT y Linder C.** 2004. Strains, stocks and mutant mice. En "The laboratory mouse". Eds. Hedrich H, Bullock G. Elsevier Academic Press. London. Pag: 25-46.
- **Dawson TM, Steiner SP, Dawson VL, and Snyder SH.** 1993. Immunosupressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects glutamate neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 9808-9012.
- **Day N, Sambamoorthi U, Taylor P, Richardson G, Robles N, Jhon Y, Scher M, Stoffer D, Cornelius M, Jasperse D.** 1991. Prenatal marijuana use and neonatal outcome. *Neurotoxicol Teratol.* 13: 329-334.
- **Dennedy MC, Friel AM, Houlihan DD, Broderick VM, Smith T, Morrison JJ.** 2004. Cannabinoids and the human uterus during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 190(1): 2-9
- **Deutsch DG, Chin SA.** 1993. Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochem Pharmacol.* 46(5):791-796.
- **Deutsch DG, Goligorsky MS, Schmid PC, Krebsbach RJ, Schmid HH, Das SK, Dey SK, Arreaza G, Thorup C, Stefano G, Moore LC.** 1997. Production and physiological actions of anandamide in the vasculature of the rat kidney. *J Clin Invest.* 100(6):1538-1546.
- **Devane WA, Axelrod J.** 1994. Enzymatic synthesis of anandamide, an endogenous ligand for the cannabinoid receptor, by brain membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(14):6698-6701.
- **Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC.** 1988. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 34(5):605-613.
- **Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R.** 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258(5090):1946-1949.
- **Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H.** 2004. Molecular cues to implantation. *Endocr Rev.* 25: 341-373.
- **Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D.** 1994. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 372(6507):686-691.
- **Di Marzo.** 1998. 'Endocannabinoids' and other fatty acid derivatives with cannabimimetic properties: biochemistry and possible physiopathological relevance. *Biochim Biophys Acta.* 1392(2-3):153-175.
- **Dong YL, Dai BS, Singh P, Yallampalli C.** 1997. Involvement of nitric oxide pathway in prostaglandin F2 alpha-induced preterm labor in rats. *Am J Obstet Gynecol.* 177(4): 907-917.
- **Dong YL, Yallampalli C.** 1996. Interaction between nitric oxide and prostaglandin E₂ pathways in pregnant rat uteri. *Am. J. Physiol.* 270 (3 Pt 1): E471-E476.
- **Dudley DJ, Branch DW, Edwin SS, Mitchell MD.** 1996. Induction of preterm birth in mice by RU486. *Biol Reprod.* 55(5): 992-995.
- **Dulak J, Jozkowicz A.** 2003. Carbon monoxide: a "new" gaseous modulator of gene expression. *Acta Biochim. Pol.* 50(1):31-47.
- **Edgemond WS, Hillard CJ, Falck JR, Kearns CS, Campbell WB.** 1998. Human platelets and polymorphonuclear leukocytes synthesize oxygenated derivatives of arachidonylethanolamide (anandamide): their affinities for cannabinoid receptors and pathways of inactivation. *Mol Pharmacol.* 54(1):180-188.

- **Edwin S, Romero R, Munoz H, Branch D, Mitchell M.** 1996. 5-Hydroxyeicosatetraenoic acid and human parturition Prostaglandins 51: 403-412.
- **Engelhardt G, Böegel R, Schnitzer Ch, Utzmann R.** 1996. Meloxicam: influence on arachidonic acid metabolism. Biochem Pharmacol. 51: 21-38.
- **Evans RM.** 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Science. 240: 889-895.
- **Facchinetti F, Neri I, Genazzani AR.** 1996. L-arginine infusion reduces preterm uterine contractions. J Perinat Med. 24(3): 283-285.
- **Fang X, Wong S, Mitchell BF.** 2002. Messenger RNA for progesterone receptor isoforms in the late-gestation rat uterus. Am J Physiol Endocrinol Metab. 283(6):E1167-E1172.
- **Farina M, Ribeiro ML, Ogando D, Gimeno M, Franchi AM.** 2000. IL1 alpha augments prostaglandin synthesis in pregnant rat uteri by a nitric oxide mediated mechanism. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 62(4): 243-247.
- **Farina M, Ribeiro ML, Weissmann C, Estevez A, Billi S, Vercelli C, Franchi A.** 2004. Biosynthesis and catabolism of prostaglandin F2alpha (PGF2alpha) are controlled by progesterone in the rat uterus during pregnancy. J Steroid Biochem Mol Biol. 91(4-5): 211-218.
- **Felder CC, Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Priller J, Axelrod J, Nguyen DN, Richardson JM, Riggin RM, Koppel GA, Paul SM, Becker GW.** 1996. Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. FEBS Lett. 393(2-3):231-235.
- **Fernandez-Solari J, Scorticati C, Mohn C, De Laurentiis A, Billi S, Franchi A, McCann SM, Rettori V.** 2004. Alcohol inhibits luteinizing hormone-releasing hormone release by activating the endocannabinoid system. Proc Natl Acad Sci U S A. 101(9):3264-3268.
- **Fidel PL Jr, Romero R, Wolf N, Cutright J, Ramirez M, Araneda H, Cotton DB.** 1994. Systemic and local cytokine profiles in endotoxin-induced preterm parturition in mice. Am J Obstet Gynecol. 170(5 Pt 1): 1467-1475.
- **Fimiani C, Magazine H, Welters ID, Bilfinger TV, Salsano F, Tonnesen E, Stefano GB.** 2000. Antagonism of LPS and IFN-gamma induced iNOS expression in human atrial endothelia by morphine, anandamide, and estrogen. Acta Pharmacol Sin. 21(5): 405-409.
- **Fomichev NI.** 1977. Effect of large doses of progesterone on pregnancy, lactation and morphology of the corpora lutea. Probl Endokrinol (Mosk). 23(1): 70-74.
- **Förstermann U, Schmidt SHH, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Nakame M.** 1991. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification of different cell types. Biochem. Pharmacol. 42: 1849-1857.
- **Franchi A, Motta A, Farina M, Ribeiro ML, Ogando D, Gimeno M.** 1998. Effect of IL-1alpha on prostaglandin synthesis of oestrogenized rat uterus is mediated by nitric oxide. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 58(6): 413-416.
- **Franchi AM, Chaud M, Rettori V, Suburo A, Mc Cann SM, Gimeno, M.** 1994. Role of nitric oxide in eicosanoid synthesis and uterine motility in estrogen-treated rat uteri. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 539- 543.
- **Fried PA, Watkinson B, Willan A.** 1984. Marijuana use during pregnancy and decreased length of gestation. Am J Obstet Gynecol. 150: 23-27.
- **Futaki N, Takahash S, Yokoyama M, Arai I, Higuchi S, Otomo S.** 1994. NS-398, a new anti-inflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase (COX-2) activity in vitro. Prostaglandins 47(1): 55-59.

- **Gaillard T, Mulsch A, Klein H, Decker K.** 1992. Regulation by prostaglandins E2 of cytokine-elicited nitric oxide synthesis in rat liver macrophages. *Biol. Chem.* 373: 897-902.
- **Gaoni Y, Mechoulam R.** 1964. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc.*, 86:1646.
- **Gardner B, Zhu LX, Sharma S, Tashkin DP, Dubinett SM.** 2003. Methanandamide increases COX-2 expression and tumor growth in murine lung cancer. *FASEB J.* 17(14):2157-2159.
- **Geber WF, Schramm LC.** 1969. Teratogenicity of marihuana extract as influenced by plant origin and seasonal variation. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 177(1): 224-230.
- **Gerard CM, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M.** 1991. Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J.* 279 (Pt 1):129-134.
- **Gewaltig MT, Kojda G.** 2002. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc Res.* 55(2):250-260.
- **Ghafourifar P, Richter C.** 1997. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett.* 418(3):291-296.
- **Giang DK, Cravatt BF.** 1997. Molecular characterization of human and mouse fatty acid amide hydrolases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(6):2238-2242.
- **Gibson GT, Baghurst PA, Colley DP.** 1983. Maternal alcohol, tobacco and cannabis consumption and the outcome of pregnancy. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 23(1): 15-19.
- **Gimeno A, Gimeno M, Lazzari M, Terraño A.** 1985. Prostaglandinas y Compuestos relacionados. Editorial El Ateneo, Argentina.
- **Giuffrida A, Piomelli D.** 1998. Isotope dilution GC/MS determination of anandamide and other fatty acylethanolamides in rat blood plasma. *FEBS Lett.* 422(3):373-376.
- **Giulivi C, Poderoso JJ, Boveris A.** 1998. Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem.* 273(18):11038-11043.
- **Glaser ST, Abumrad NA, Fatade F, Kaczocha M, Studholme KM, Deutsch DG.** 2003. Evidence against the presence of an anandamide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(7):4269-4274.
- **Goldblatt MW.** 1933. A depressor substance in seminal fluid. *J. Soc. Chem. Ind. (London)* 52: 1056-1057.
- **Gross G, Imamura T, Vogt SK, Wozniak DF, Nelson DM, Sadovsky Y, Muglia LJ.** 2000. Inhibition of cyclooxygenase-2 prevents inflammation-mediated preterm labor in the mouse. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 278(6): R1415-1423.
- **Gross GA, Imamura T, Luedke C, Vogt SK, Olson LM, Nelson MD, Sadosky Y, Muglia LJ.** 1998. Opposing actions of prostaglandins and oxytocin determine the onset of murine labor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 11875-11879.
- **Gu W, Rice E, Thornburn D.** 1990. Prostaglandins E2 and F2 alpha in mid - pregnant rat uterus and at parturition. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essent Fatty Acids.* 40: 27-30 (1990).
- **Habayeb OM, Bell SC, Konje JC.** 2002. Endogenous cannabinoids: metabolism and their role in reproduction. *Life Sci.* 70(17):1963-77.
- **Habayeb OM, Taylor AH, Evans MD, Cooke MS, Taylor DJ, Bell SC, Konje JC.** Plasma levels of the endocannabinoid anandamide in women--a potential role in pregnancy maintenance and labor? *J Clin Endocrinol Metab.* 89(11): 5482-5487.
- **Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC.** 1990. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(5):1932-1936.

- **Higby K, Xenakis EM, Pauerstein CJ.** 1993. Do tocolytic agents stop preterm labor? A critical and comprehensive review of efficacy and safety. *Am J Obstet Gynecol.* 168(4): 1247-1456.
- **Hillier K, Calder AA, Embrey MP.** 1974. Concentrations of prostaglandin F2alpha in amniotic fluid and plasma in spontaneous and induced labours. *J Obstet Gynaecol Br Commonw.* 81(4):257-263.
- **Hirsch E, Goldstein M, Filipovich Y, Wang H.** 2005. Placental expression of enzymes regulating prostaglandin synthesis and degradation. *Am J Obstet Gynecol.* 192(6): 1836-1842.
- **Hirst J, Teixeira F, Zakar T, Olson D.** 1995a. Prostaglandin H synthase-2 expression increases in human gestational tissues with spontaneous labour onset. *Reprod Fertil Dev.* 7: 633-637.
- **Hirst J, Teixeira F, Zakar T, Olson D.** 1995b. Prostaglandin endoperoxide-H synthase-1 and -2 messenger ribonucleic acid levels in human amnion with spontaneous labor onset. *J Clin Endocrinol Metab.* 80: 517-523.
- **Howlett AC, Qualy JM, Khachatrian LL.** 1986. Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol Pharmacol.* 29(3):307-313.
- **Howlett AC.** 1985. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Biochemistry of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol.* 27(4): 429-436.
- **Howlett AC.** 1995. Pharmacology of cannabinoid receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 35:607-634.
- **Huang PL, Dawson TM, Brecht DS, Snyder SH, Fishman MC.** 1993. Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell* 75 (7): 1273-1286.
- **Hudicek-Martincic G, Kusan-Jukic M, Salihagic-Kadic A.** 2004. Nitric oxide--an important signalling molecule in normal and pathological pregnancy. *Lijec Vjesn.* 126(3-4): 80-85.
- **Hulka J y Chepko M.** 1987. Vaginal prostaglandin E1 analogue (ONO-802) to soften the cervix in first trimester abortion. *Obstet Gynecol* 69: 57-60.
- **Huszar G y Walsh MP.** Biochemistry of the myometrium and cervix. 1989. En "Biology of the uterus" Eds. Wynn RM y Jollie WP. Pp. 355. Plenum, New York.
- **Ialenti A, Ianaro A, Moncada S, Di Rosa M.** 1992. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. *Eur J Pharmacol.* 211(2): 177-182.
- **Ignarro LJ.** 1991. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. *Biochem. Pharmacol.* 41 (4): 485-490.
- **Issidorides MR.** 1978. Observations in chronic hashish users: nuclear aberrations in blood and sperm and abnormal acrosomes in spermatozoa. *Adv Biosci.* 22-23: 377-388.
- **Jaekle RK, Lutz PD, Rosenn B, Siddiqi TA, Myatt L.** 1994. Nitric oxide metabolites and preterm pregnancy complications. *Am J Obstet Gynecol.* 171(4):1115-1119.
- **Jaffe BM y Behrman HR.** 1974. Methods of Hormone Radioimmunoassay. Eds. Jaffe y Behrman. Pp. 19. Academic Press., N.Y.
- **Kaga N, Katsuki Y, Obata M, Shibutani Y.** 1996. Repeated administration of low-dose lipopolysaccharide induces preterm delivery in mice: a model for human preterm parturition and for assessment of the therapeutic ability of drugs against preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 174(2): 754-759.
- **Karima R, Matsumoto S, Higashi H, Matsushima K.** 1999. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Mol Med Today.* 15(3): 123-132.

- **Katzung BG.** 1992. The Eicosanoids: Prostaglandins, Thromboxanes, Leukotrienes and Related Compounds. En "Basic and clinical Pharmacology". Eds. Appleton & Lange. Pp. 264. Norwalk, Connecticut.
- **Kemp B, Menon R, Fortunato SJ, Winkler M, Maul H, Rath W.** 2002. Quantitation and localization of inflammatory cytokines interleukin-6 and interleukin-8 in the lower uterine segment during cervical dilatation. *J Ass Reprod Genet.* 19:215-219.
- **Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, Stamler JS.** 1994. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* 372 (6506): 546-548.
- **Koide M, Kawahara Y, Nakayama I, Tsuda T, Yocoyama M.** 1993. Cyclic AMP-elevating agents induced an inducible type of nitric oxide synthase in cultured vascular smooth muscle cell. *J. Biol. Chem.* 268: 24959-24966.
- **Kolodny RC, Masters WH, Kolodner RM, Toro G.** 1974. Depression of plasma testosterone levels after chronic intensive marihuana use. *N Engl J Med.* 290: 872-874.
- **Krinke GJ.** 2004. Normative histology of organs. En *The laboratory mouse.* (ed. Hans Hedrich H y Bullock G.). Elsevier Academic Press. San Diego, California. 133-166.
- **Kruszka KK, Gross RW.** 1994. The ATP- and CoA-independent synthesis of arachidonylethanolamide. A novel mechanism underlying the synthesis of the endogenous ligand of the cannabinoid receptor. *J Biol Chem.* 269(20):14345-14348.
- **Kumarasamy V, Mitchell MD, Bloomfield FH, Oliver MH, Campbell ME, Challis JR, Harding JE.** 2005. Effects of periconceptual undernutrition on the initiation of parturition in sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 288(1):R67-72.
- **Kurzrok R, and Lieb CC.** 1930. Biochemical studies of human semen. II. The action of semen on the human uterus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 28: 268-272.
- **Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* 227: 680-685.
- **Lee SH, Soyoola E, Chanmugam P, Hart S, Sun W, Zhong H, Liou S, Simmons D, Hwang D.** 1992. Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 267 (36): 25934-25938.
- **Lees C, Campbell S, Jauniaux E, Brown R, Ramsay B, Gibb D, Moncada S, Martin JF.** 1994. Arrest of preterm labour and prolongation of gestation with glyceryl trinitrate, a nitric oxide donor. *Lancet.* 343(8909):1325-1326.
- **Lettieri L, Vintzileos AM, Rodis JF, Albin SM, Salafia CM.** 1993. Does "idiopathic" preterm labor resulting in preterm birth exist? *Am J Obstet Gynecol.* 168(5):1480-1485.
- **Liew FY.** 1995. Regulation of lymphocyte functions by nitric oxide. *Curr Opin Immunol.* 7(3): 396-399.
- **Lin AH, Bienkowski MJ, Gorman RR.** 1989. Regulation of prostaglandin H synthase mRNA levels and prostaglandin biosynthesis by platelet-derived growth factor. *J. Biol. Chem.* 264: 17379-17383.
- **Lindstrom TM, Bennett PR.** 2005. The role of nuclear factor kappa B in human labour. *Reproduction.* 130(5):569-581.
- **Liu WM, Duan EK, Cao YJ.** 2002. Effects of anandamide on embryo implantation in the mouse. *Life Sci.* 71(14):1623-1632.
- **Lopez Bernal A, Hansell DJ, Khong TY, Keeling JW, Turnbull AC.** 1989. Prostaglandin E production by the fetal membranes in unexplained preterm labour and preterm labour associated with chorioamnionitis. *Br J Obstet Gynaecol.* 96(10):1133-1139.

- **López Bernal A, Watson SP, Phaneuf S, Europe-Finner GN.** 1993. Biochemistry and physiology of preterm labour and delivery. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* 7(3): 523-552.
- **López Bernal A.** 2004. Causas del inicio del parto prematuro. En "Parto Prematuro". Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires; Madrid. Pag. 33-47.
- **Lopez Bernal, A.** 2003. Mechanisms of labour-Biochemical aspects. *Br J Obstet Gynecol.* 110 Suppl. 20: 39-45.
- **Maccarrone M, Bari M, Lorenzon T, Bisogno T, Di Marzo V, Finazzi-Agro A.** 2000. Anandamide uptake by human endothelial cells and its regulation by nitric oxide. *J Biol Chem.* 275(18): 13484-13492.
- **Maccarrone M, Valensise H, Bari M, Lazzarin N, Romanini C, Finazzi-Agro A.** 2000. Relation between decreased anandamide hydrolase concentrations in human lymphocytes and miscarriage. *Lancet.* 355(9212): 1326-1329.
- **MacDonald P, Koga S, Casey M.** 1991. Decidual activation in parturition: examination of amniotic fluid for mediators of the inflammatory response. *Ann NY Acad Sci.* 622: 315-330.
- **Mackenzie IZ.** 2006. Induction of labour at the start of the new millennium. *Reproduction.* 131(6):989-998.
- **Mackie K, Hille B.** 1992. Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(9): 3825-3829.
- **Madsen G, Zakar T, Ku CY, Sanborn BM, Smith R, Mesiano S.** 2004. Prostaglandins differentially modulate progesterone receptor-A and -B expression in human myometrial cells: evidence for prostaglandin-induced functional progesterone withdrawal. *J Clin Endocrinol Metab.* 89(2): 1010-1013.
- **Maier JA, Hla T, Maciag T.** 1990. Cyclooxygenase is an immediate-early gene induced by interleukin-1 in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 265(19): 10805-10808.
- **Major CA, Lewis DF, Harding JA, Porto MA, Garite TJ.** 1994. Tocolysis with indomethacin increases the incidence of necrotizing enterocolitis in the low-birth-weight neonate. *Am J Obstet Gynecol.* 170: 102-106.
- **Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI.** 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature.* 346(6284): 561-564.
- **Maul H, Longo M, Saade GR, Garfield RE.** 2003. Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery. *Curr Pharm Des.* 9(5): 359-380.
- **McFarland MJ, Porter AC, Rakhshan FR, Rawat DS, Gibbs RA, Barker EL.** 2004. A role for caveolae/lipid rafts in the uptake and recycling of the endogenous cannabinoid anandamide. *J Biol Chem.* 279(40):41991-41997.
- **Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al.** 1995. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* 50(1):83-90.
- **Mechoulam R, Fride E, Di Marzo V.** 1998. Endocannabinoids. *Eur J Pharmacol.* 359(1):1-18.
- **Merlie JP, Fagan D, Mudd J, Needleman P.** 1988. Isolation and characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase). *J. Biol. Chem.* 263 (8): 3550-3553.
- **Mijovic JE, Zakar T, Nairn TK, Olson DM.** 1998. Prostaglandin endoperoxide H synthase (PGHS) activity and PGHS-1 and -2 messenger ribonucleic acid abundance in human chorion throughout gestation and with preterm labor. *J Clin Endocrinol Metab.* 83(4): 1358-1367.

- **Minghetti L, Nicolini A, Polazzi E, Creminon C, Maclouf J, Levi G.** 1997. Inducible nitric oxide synthase expression in activated rat microglial cultures is downregulated by exogenous prostaglandin E2 and by cyclooxygenase inhibitors. *Glia*. 19(2): 152-160.
- **Minghetti L, Polazzi E, Nicolini A, Creminon C, Levi G.** 1996. Interferon- α and nitric oxide down-regulate lipopolysaccharide-induced prostanoid production in cultured rat microglial cells by inhibiting cyclooxygenase-2 expression. *J. Neurochem.* 66: 1963-1970.
- **Misko TP, Moore WM, Kasten TP, Nickols GA, Corbett JA, Tilton RG, McDaniel ML, Wolliamson JR, Currie MG.** 1993. Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Eur. J. Pharmacol.* 233: 119-125.
- **Mitchell JA, Akarasereenont P, Flower RJ, Vane JR.** 1993. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11693- 11697.
- **Molina-Holgado F, Molina-Holgado E, Guaza C, Rothwell NJ.** 2002. Role of CB1 and CB2 receptors in the inhibitory effects of cannabinoids on lipopolysaccharide-induced nitric oxide release in astrocyte cultures. *J Neurosci Res.* 67(6): 829-836.
- **Mollace V, Muscoli C, Masini E, Cuzzocrea S, Salvemini D.** 2005. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacol Rev.* 57(2): 217-252.
- **Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M.** 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* 365(6441):61-65.
- **Murad F.** 1994. Regulation of cytosolic Guanylyl Cyclase by nitric oxide: the NO-cyclic GMP signal transduction system. *Adv. Pharmacol.* 26: 19-33.
- **Nathan C.** 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cell. *FASEB J.* 6: 3051-3064.
- **Nicholson RC, King BR, Smith R.** 2004. Complex regulatory interactions control CRH gene expression. *Front Biosci.* 9:32-39.
- **Norton ME, Merrill J, Cooper BA, Kuller JA, Clyman RI.** 1993. Neonatal complications after the administration of indomethacin for preterm labor. *N Engl J Med.* 329(22): 1602-1607.
- **O'Banion MK, Winn V, Young DA.** 1992. cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4888-4892.
- **O'Brien W, Knuppel R, Cohen G.** 1986. Plasma prostaglandin metabolite levels after use of prostaglandin E2 gel for cervical ripening. *Am J Obstet Gynecol.* 155: 1037-1040.
- **Ogando DG, Paz D, Cella M, Franchi AM.** 2003. The fundamental role of increased production of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced embryonic resorption in mice. *Reproduction.* 125(1): 95-110.
- **Ogino K, Saito K, Osugi T, Satoh H.** 2002. Meloxicam (Mobic): a review of its pharmacological and clinical profile. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 120 (6): 391-397.
- **Oka S, Ikeda S, Kishimoto S, Gokoh M, Yanagimoto S, Waku K, Sugiura T.** 2004. 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, induces the migration of EoL-1 human eosinophilic leukemia cells and human peripheral blood eosinophils. *Leukoc Biol.* 76(5): 1002-1009.
- **Palmer RM, Ashton DS, Moncada S.** 1988. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333 (6174): 664-666.
- **Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, Epstein SE.** 1990. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *New Engl. J. Med.* 323 (1): 22-29.
- **Paria BC, Das SK, Dey SK.** 1995. The preimplantation mouse embryo is a target for cannabinoid ligand-receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(21):9460-9464.

- **Paria BC, Deutsch DD, Dey SK.** 1996. The uterus is a potential site for anandamide synthesis and hydrolysis: differential profiles of anandamide synthase and hydrolase activities in the mouse uterus during the periimplantation period. *Mol Reprod Dev.* 45(2): 183-192.
- **Paria BC, Song H, Wang X, Schmid PC, Krebsbach RJ, Schmid HH, Bonner TI, Zimmer A, Dey SK.** 2001. Dysregulated cannabinoid signaling disrupts uterine receptivity for embryo implantation. *J Biol Chem.* 276(23):20523-20528.
- **Park B, McPartland JM, Glass M.** 2004. Cannabis, cannabinoids and reproduction. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 70(2):189-197.
- **Patricelli MP, Cravatt BF.** 2001. Proteins regulating the biosynthesis and inactivation of neuromodulatory fatty acid amides. *Vitam Horm.* 62: 95-131.
- **Perez Martinez S, Farina M, Ogando D, Ribeiro ML, Gimeno M, Franchi AM.** 2000. Nitric oxide inhibits prostanoid synthesis in the rat oviduct. *Pgs. Leuk. & Ess. Fatty Acids.* 62 (4): 239-242.
- **Phillips RN, Turk RF, Forney RB.** 1971. Acute toxicity of delta-9-tetrahydrocannabinol in rats and mice. *Proc Soc Exp Biol Med.* 136(1): 260-263.
- **Pieber D, Allport VC, Hills F, Johnson M, Bennett PR.** 2001. Interactions between progesterone receptor isoforms in myometrial cells in human labour. *Mol Hum Reprod.* 7(9): 875-879.
- **Poblete IM, Orliac ML, Briones R, Adler-Graschinsky E, Huidobro-Toro JP.** 2005. Anandamide elicits an acute release of nitric oxide through endothelial TRPV1 receptor activation in the rat arterial mesenteric bed. *J Physiol.* 568(Pt 2):539-551.
- **Pollock JS, Forstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M, 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 U S A.* 88(23): 10480-10484.
- **Purcell TL, Given R, Chwalisz K, Garfield RE.** 1999. Nitric oxide synthase distribution during implantation in the mouse. *Mol Hum Reprod.* 5(5): 467-475.
- **Qazi QH, Mariano E, Milman DH, Beller E, Crombleholme W.** 1985. Abnormalities in offspring associated with prenatal marijuana exposure. *Dev Pharmacol Ther.* 8: 141-148.
- **Raddassi K, Petit J, Lemaire G.** 1993. LPS-induced activation of primed murine peritoneal macrophages is modulated by prostaglandins and cyclid nucleotides. *Cell Immunol.* 149: 50-64.
- **Reece MS, Mc Gregor JA, Allen KG, Mathias M, Harris M.** 1996. Prostaglandins in selected reproductive tissues in preterm and full term gestations. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essent Fatty Acids.* 55: 303-307.
- **Rees DD, Palmer RM, Moncada S.** 1989. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (9): 3375-3378.
- **Rees MC, Anderson AB, Demers LM, Turnbull AC.** 1984. Endometrial and myometrial prostaglandin release during the menstrual cycle in relation to menstrual blood loss. *J Clin Endocrinol Metab.* 58(5): 813-818.
- **Rengasamy A, Johns A.** 1994. Regulation of nitric oxide synthase by nitric oxide. *Mol. Pharmacol.* 44: 124-128.
- **Ribeiro M, Cella M, Farina M, Franchi A.** 2004. Effects of aminoguanidine and cyclooxygenase inhibitors on nitric oxide and prostaglandin production, and nitric oxide synthase and cyclooxygenase expression induced by lipopolysaccharide in the estrogenized rat uterus. *Neuroimmunomodulation.* 11(3):191-198.
- **Ribeiro ML, Cella M, Farina M, Franchi A.** 2003. Crosstalk between nitric oxide synthase and cyclooxygenase metabolites in the estrogenized rat uterus. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 68(4): 285-290.

- **Rice G, Wong M, Thorburn G.** 1988. Gestational changes in prostaglandin synthase activity of ovine cotyledonary microsomes. *J Endocrinol.* 118: 265-270.
- **Romero R, Avila C, Santhanam U, Sehgal P.** 1990. Amniotic fluid interleukin 6 in preterm labor. Association with infection. *J Clin Inv.* 85: 1392-1400.
- **Romero R, Baumann P, Gonzalez R, Gomez R, Rittenhouse L, Behnke E and Mitchell MD.** 1994. Amniotic fluid prostanoid concentrations increase early during the course of spontaneous labor at term. *Am J Obstet Gynecol* 171: 1613-1620.
- **Roura, LC.** 2004. Introducción. En "Parto Prematuro". Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires; Madrid. Pag. IX-X.
- **Salmon J y Amy J.** *Prostaglandins* 4: 523 (1973).
- **Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currier MG.** 1993. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7240-7244.
- **Samson MT, Small-Howard A, Shimoda LM, Koblan-Huberson M, Stokes AJ, Turner H. J** *Immunol.* 2003 .Differential roles of CB1 and CB2 cannabinoid receptors in mast cells. 170(10): 4953-4962.
- **Sautebin L, Ialenti A, Ianaro A, Di Rosa MD.** 1995. Modulation by nitric oxide of prostaglandin biosynthesis in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 114: 323-328.
- **Schmid HH, Schmid PC, Natarajan V.** 1990. N-acylated glycerophospholipids and their derivatives. *Prog Lipid Res.* 29(1):1-43.
- **Schmid PC, Krebsbach RJ, Perry SR, Dettmer TM, Maasson JL, Schmid HH.** 1995. Occurrence and postmortem generation of anandamide and other long-chain N-acylethanolamines in mammalian brain. *FEBS Lett.* 375(1-2):117-120.
- **Schmid PC, Paria BC, Krebsbach RJ, Schmid HH, Dey SK.** 1997. Changes in anandamide levels in mouse uterus are associated with uterine receptivity for embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(8):4188-4192.
- **Schmidt HH, Pollock JS, Nakane M, Gorsky LD, Forstermann U, Murad F.** 1991. Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(2): 365-369.
- **Senior J, Marshall K, Sangha R, Clayton JK.** 1993. In vitro characterization of prostanoid receptors on human myometrium at term pregnancy. *British Journal of Pharmacology* 108: 501-506.
- **Sherwood RA, Keating J, Kavvadia V, Greenough A, Peters TJ.** 1999. Substance misuse in early pregnancy and relationship to fetal outcome. *Eur J Pediatr* 158:488-492.
- **Simon GM, Cravatt BF.** 2006. Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-N-acyl ethanolamine and a role for alpha/beta-hydrolase 4 in this pathway. *J Biol Chem.* 281(36): 26465-26472.
- **Skinner KA, Challis JR. R.** 1985. Changes in the synthesis and metabolism of prostaglandins by human fetal membranes and decidua at labor. *Am J Obstet Gynecol.* 151(4): 519-523.
- **Sladek M, Westerhausen-Larson A, Roberts J.** 1999. Endogenous nitric oxide suppresses rat myometrial connexin 43 gap junction protein expression during pregnancy. *Biol Reprod.* 61: 8-13.
- **Sladek SM, Roberts JM.** 1996. Nitric oxide synthase activity in the gravid rat uterus decreased a day before the onset of parturition. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 175: 1661-1667.
- **Smith GN, Walker MC, Ohlsson A, O'Brien K, Windrim R.** 2007. Randomized double-blind placebo-controlled trial of transdermal nitroglycerin for preterm labor. *Am J Obstet Gynecol.* 196(1): 37.e1-37.e8.

- **Smith R, Mesiano S, McGrath S.** 2002. Hormone trajectories leading to human birth. *Regul Pept.* 108(2-3):159-164.
- **Smith WL y Marnett LJ.** 1991. Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochem Biophys Acta* 1083: 1-17.
- **Smith WL, Eling TE, Kulmacz RJ, Marnett LJ, Tsai A.** 1992. Tyrosyl radicals and their role in hydroperoxide-dependent activation and inactivation of prostaglandin endoperoxide synthase. *Biochemistry.* 31: 3-7
- **Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL.** 1996. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem.* 271(52): 33157-33160.
- **Soloff MF.** 1989. Endocrine control of parturition. En "Biology of the uterus". Eds. Wynn RM, Jollie WP. Pp 559. Plenum Medical Book Company, New York and London.
- **Springall DR, Riveros-Moreno V, Buttery L, Suburo A, Bishop AE, Merrett M, Moncada S, Polak JM.** 1992. Immunological detection of nitric oxide synthase(s) in human tissues using heterologous antibodies suggesting different isoforms. *Histochemistry.* 98(4): 259-266.
- **Stadler J, Harbrecht BG, de Silvio M, Curran RD, Jordan ML, Simmons RL, Billiar TR.** 1993. Endogenous nitric oxide inhibits the synthesis of cyclooxygenase products and interleukin-6 by rat Kupfer cells. *J. Leukoc. Biol.* 53: 165-172.
- **Stefano GB, Esch T, Cadet P, Zhu W, Mantione K, Benson H.** 2003. Endocannabinoids as autoregulatory signaling molecules: coupling to nitric oxide and a possible association with the relaxation response. *Med Sci Monit.* (4): RA63-75.
- **Stefano GB, Liu Y, Goligorsky MS.** 1996. Cannabinoid receptors are coupled to nitric oxide release in invertebrate immunocytes, microglia, and human monocytes. *J Biol Chem.* 271(32):19238-19242.
- **Stjernholm-Vladic Y, Stygar D, Mansson C, Masironi B, Akerberg S, Wang H, Ekman-Ordeberg G, Sahlin L.** 2004. Factors involved in the inflammatory events of cervical ripening in humans. *Reprod Biol Endocrinol.* 2(1):74.
- **Sugiura T, Kobayashi Y, Oka S, Waku K.** 2002. Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 66(2-3):173-192.
- **Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K.** 1995. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 215(1):89-97.
- **Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Tonegawa T, Nakane S, Yamashita A, Waku K.** 1996. Enzymatic synthesis of anandamide, an endogenous cannabinoid receptor ligand, through N-acylphosphatidylethanolamine pathway in testis: involvement of Ca(2+)-dependent transacylase and phosphodiesterase activities. *Biochem Biophys Res Commun.* 218(1):113-117.
- **Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Tonegawa T, Nakane S, Yamashita A, Ishima Y, Waku K.** 1996. Transacylase-mediated and phosphodiesterase-mediated synthesis of N-arachidonylethanolamine, an endogenous cannabinoid-receptor ligand, in rat brain microsomes. Comparison with synthesis from free arachidonic acid and ethanolamine. *Eur J Biochem.* 240(1):53-62.
- **Teixeira F, Zakar T, Hirst J, Guo F, Machin G, Olson D.** 1993. Prostaglandin endoperoxide H synthase (PGHS) activity increases with gestation and labour in human amnion *J Lipid Mediat* 6: 515-523.
- **Teixeira F, Zakar T, Hirst J, Guo F, Sadowsky D, Machin G, Deminaczuk N, Resch B, Olson D.** 1994. Prostaglandin endoperoxide-H synthase (PGHS) activity and immunoreactive PGHS-1 and

PGHS-2 levels in human amnion throughout gestation, at term, and during labor. *J Clin Endocrinol and Metab.* 79: 1396-1402.

- **Telfer JF, Lyall F, Norman JE, Cameron IT.** 1995. Identification of nitric oxide synthase in human uterus. *Hum. Reprod.* 10(1):19-23.
- **Thijssen JH.** 2005. Progesterone receptors in the human uterus and their possible role in parturition. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 97(5): 397-400.
- **Thornburn G, Parkington H, Rice G, Jenkin G, Sigger J, Shepherd R, Myles K.** 1988. Regulation of electrical activity in the miometrium of pregnant ewe. En "The endocrine control of fetus". Eds. Kunsel W y Jensen A. Pp. 391
- **Tsai AL, Sanduja R, Wu KK.** 1991. Evidence for two pools of prostaglandin H synthase in human endothelial cells. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.* 21A:141-4.
- **Tsuboi K, Iwane A, Nakasawa S, Sugimoto Y, Ichikawa A.** 2003. Role of prostaglandin synthase 2 in murine parturition: study on ovariectomy-induced parturition in prostaglandin F receptor deficient mice. *Biol Reprod.* 69: 195-201.
- **Ueda N, Yamamoto K, Kurahashi Y, Yamamoto S, Ogawa M, Matsuki N, Kudo I, Shinkai H, Shirakawa E, Tokunaga T.** 1995. Oxygenation of arachidonylethanolamide (anandamide) by lipoxygenases. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.* 23:163-165.
- **Vane JR, Williams KI.** 1973. The contribution of prostaglandin production to contractions of the isolated uterus of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 48: 629-639.
- **Vannacci A, Giannini L, Passani MB, Di Felice A, Pierpaoli S, Zagli G, Fantappie O, Mazzanti R, Masini E, Mannaioni PF.** 2004. The endocannabinoid 2-arachidonylglycerol decreases the immunological activation of Guinea pig mast cells: involvement of nitric oxide and eicosanoids. *J Pharmacol Exp Ther.* 311(1):256-264.
- **Vodovotz Y, Russel D, Xie QW, Bogdan C, Nathan CF.** 1995. Vesicle membrane association of nitric oxide synthase in primary mouse macrophages. *J. Immunol.* 154: 2914-2925.
- **Von Euler US.** 1934. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Phatol. Pharmakol. 175: 78.
- **Von Euler US.** 1935. A depressor substance in the vesicular gland. *J. Physiol. (London)* 84: 21P.
- **Wan M, Cravatt BF, Ring HZ, Zhang X, Francke U.** 1998. Conserved chromosomal location and genomic structure of human and mouse fatty-acid amide hydrolase genes and evaluation of clasper as a candidate neurological mutation. *Genomics.* 54(3):408-414.
- **Wang H, Dey SK.** 2006. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet.* 7: 185-199.
- **Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S.** 1994. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(11):5212-5216.
- **Wen PZ, Warden C, Fletcher BS, Kujubu DA, Herschman HR, Lulis AJ.** 1993. Chromosomal organization of the inducible and constitutive prostaglandin synthase/cyclooxygenase genes in mouse. *Genomics* 15: 458-460.
- **Wenger T, Fragkakis G, Giannikou P, Probonas K, Yiennakakis N.** 1997. Effects of anandamide on gestation in pregnant rats. *Life Sci.* 60(26): 2361-2371.
- **Wenger T, Toth BE, Juaneda C, Leonardelli J, Tramu G.** 1999. The effects of cannabinoids on the regulation of reproduction. *Life Sci.* 65(6-7): 695-701.
- **Whan LB, West MC, McClure N, Lewis SE.** 2006. Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol, the primary psychoactive cannabinoid in marijuana, on human sperm function in vitro. *Fertil Steril* 85: 653-660.

- **Whittle B, Higgs GA, Eakins KE, Moncada S, Vane JR.** 1980. Selective inhibition of prostaglandin production in inflammatory exudates and gastric mucosa. *Nature*. 284: 271-273.
- **Wickelgren I.** 2004. Premature labor. Resetting pregnancy's clock. *Science*. 304(5671): 666-668.
- **Wilks JW.** 1980. Effect of (15S)-methyl-prostaglandin F2a methyl ester and estrogens upon the corpus luteum and conceptus of the rhesus monkey. *Prostaglandins*. 20: 807-823.
- **Williams J, Wilkerson W, O'Brien W, Knuppel R.** 1985. Use of prostaglandin E2 topical cervical gel in high-risk patients: a critical analysis. *Obstet Gynecol*. 66: 769-773.
- **Winchester SK, Imamura T, Gross GA, Muglia LM, Vogt SK, Wright J, Watanabe K, Tai HH, Muglia LJ.** 2002. Coordinate regulation of prostaglandin metabolism for induction of parturition in mice. 1: *Endocrinology*. 143(7): 2593-2598.
- **Winkler M, Rath W.** 1999. Changes in the cervical extracellular matrix during pregnancy and parturition. *J Perinat Med*. 27:45-61.
- **Wu KK.** 1995. Inducible Cyclooxygenase and Nitric Oxide Synthase. *Advances in pharmacology* 33: 179-207.
- **Wu KK.** 1995a. Inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase. *Adv Pharmacol*. 33: 179-207.
- **Wu KK.** 1995b. Molecular regulation and augmentation of prostacyclin biosynthesis *Agents Actions Suppl*. 45: 11-17.
- **Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL.** 1991. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88(7): 2692-2696.
- **Yallampalli C, Byam-Smith M, Nelson SO, Garfield RE.** (1994b) Steroid hormones modulate the production of nitric oxide and cGMP in the rat uterus. *Endocrinology* 134(4): 1971-1974.
- **Yallampalli C, Garfield RE, Byam-Smith M.** 1993. Nitric oxide inhibits uterine contractility during pregnancy but not during delivery. *Endocrinology* 133 (4): 1899-1902.
- **Yallampalli C, Izumi H, Byam-Smith M, Garfield RE.** (1994). An L-arginine-nitric oxide-cyclisguanosine monophosphate system exists in the uterus and inhibits contractility during pregnancy. *Ann. J. Obstet. Gynecol*. 170: 175-185.
- **Yen YK.** 2001. The fragility of fertility. *Nat Genet*. 29: 243-244.
- **Yu M, Ives D, Ramesha CS.** 1997. Synthesis of prostaglandin E2 ethanolamide from anandamide by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*. 272(34):21181-21186.
- **Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, Hogestatt ED.** 1999. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*. 400(6743): 452-457.