

Tesis Doctoral

Participación de la anandamida en la reabsorción embrionaria murina inducida por lipopolisacárido

Vercelli, Claudia Alejandra

2010

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

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

Cita tipo APA:

Vercelli, Claudia Alejandra. (2010). Participación de la anandamida en la reabsorción embrionaria murina inducida por lipopolisacárido. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Vercelli, Claudia Alejandra. "Participación de la anandamida en la reabsorción embrionaria murina inducida por lipopolisacárido". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

**“PARTICIPACIÓN DE LA ANANDAMIDA EN LA
REABSORCIÓN EMBRIONARIA MURINA INDUCIDA POR
LIPOPOLISACÁRIDO”.**

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

Claudia Alejandra Vercelli.

Directora de tesis: Dra. Ana María Franchi.

Consejera de estudios: Dra. Paula Vissio.

Laboratorio de Fisiopatología de la Preñez y el Parto.

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO).

CONICET-UBA.

Buenos Aires, 2010.

“Participación de la anandamida en la reabsorción embrionaria murina inducida por lipopolisacárido”.

La anandamida (AEA), el endocannabinoide más abundante en el tracto reproductivo, es un importante mediador de los procesos de implantación y desarrollo embrionario pero niveles elevados de esta molécula en el útero son perjudiciales. A su vez, el óxido nítrico (NO) y las prostaglandinas (PGs) están involucrados en la reabsorción embrionaria (RE) inducida por lipopolisacárido (LPS). En varios trabajos se ha descrito que el LPS modula la producción de AEA y que ésta interacciona con el NO y las PGs. Por ello, estudiamos si este endocannabinoide estaba implicado en la RE inducida por LPS en el útero y la decidua de ratón durante la preñez temprana, evaluando su participación en un modelo *in vitro*.

Observamos que tanto en el útero como en la decidua, el LPS tiene importantes efectos sobre el sistema endocannabinoide (SEC) modulando la síntesis y la degradación de AEA y la expresión de los receptores de estos compuestos (receptores de cannabinoide, CB). Demostramos también que la AEA induce su propio catabolismo en la decidua.

Por otro lado, encontramos que la AEA media el efecto estimulador del LPS sobre la síntesis de NO y la expresión de la NO sintasa inducible (NOSi), a través de sus receptores específicos.

También hallamos que la AEA participa en la modulación que ejerce el LPS sobre el camino biosintético de las PGs, hecho que puede contribuir a la contracción miométrial que favorece la expulsión de los fetos en un proceso de sepsis. Se estudiaron distintas enzimas del camino biosintético y del metabolismo de las PGs, y se observó que la AEA aumenta la expresión de la Ciclooxygenasa-2 (COX-2) mientras que inhibe la de la PGE sintasa microsomal 1 (PGESm-1) e incrementa la síntesis del metabolito de PGE₂ (PGEM).

Por otro lado, el efecto deletéreo de la endotoxina sobre los tejidos estudiados pudo ser bloqueado en parte cuando se co-incuba con antagonistas de los receptores de cannabinoides, sugiriendo que estos compuestos son parte del mecanismo de acción del LPS.

Palabras clave: lipopolisacárido – anandamida - óxido nítrico – prostaglandinas – sistema endocannabinoide - reabsorción embrionaria.

“Participation of anandamide in lipopolysaccharide-induced embryonic resorption in mice”.

Mouse uterus contains the highest levels of anandamida (AEA), one of the major endocannabinoids studied so far, suggesting an important role for this substance in reproduction. AEA levels fluctuate with the state of pregnancy: down-regulation is associated with uterine receptivity, while up-regulation has been shown to impair pregnancy and embryo development in mice. In addition, nitric oxide (NO) and prostaglandins (PGs) are involved in lipopolysaccharide (LPS)-induced embryonic resorption. Numerous studies have examined the relationship between LPS and AEA and the interaction of this endocannabinoid with NO and PGs. In this sense, we studied whether AEA is involved in LPS-induced embryonic resorption in murine uterus and decidua during early pregnancy, evaluating its participation in an *in vitro* model.

We found that LPS had a profound effect on the endocannabinoid system (ECS) modulating AEA synthesis and its degradation, and affected the expression of cannabinoid receptors (CB) both in the uterus and in the decidua. We also observed that AEA induced its own catabolism in the decidua.

On the other hand, AEA mediated LPS-induced NO production and increased the expression of the inducible form of the Nitric Oxide Synthase (iNOS), through cannabinoid receptors (CB).

In addition, AEA mediated LPS-induced PG production and this fact may contribute to myometrial contraction which, in turn, favors the expulsion of the fetus during sepsis. We studied several enzymes that participate in PG synthesis and metabolism and we found that AEA increased Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression, down-regulated microsomal PGE synthase 1 (mPGES-1) levels and augmented PGE₂ metabolite (PGEM) synthesis.

We also showed that LPS induced tissue damage and this effect is abrogated, in part, when tissues are co-incubated with CB antagonists, suggesting that AEA is involved in the deleterious effect of LPS.

Keywords: lipopolysaccharide – anandamide - nitric oxide – prostaglandins – endocannabinoid system – embryonic resorption.

Los resultados presentados en este trabajo de tesis han sido parcialmente publicados en:

Vercelli CA, Aisemberg J, Billi S, Cervini M, Ribeiro ML, Farina M, Franchi AM. *Anandamide regulates lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthesis and tissue damage in the murine uterus*. Reproductive BioMedicine Online. (2009) 18(6): 824-831.

Vercelli CA, Aisemberg J, Billi S, Wolfson ML, Franchi AM. *Endocannabinoid system and nitric oxide are involved in the deleterious effect of lipopolysaccharide on murine decidua*. Placenta. (2009) 30:579-584.

Agradecimientos

A Ana. Porque con ella aprendí a pensar con la cabeza y porque me dejó crecer sin ataduras en un lugar que considero mi segunda casa. Por su visión de la ciencia, el optimismo que le pone a todas las cosas y esa receta de brownies con la que me hago la canchera en las reuniones familiares... Por confiar en mi.

A Silvia. Porque tu dedicación y el hacerme anotar hasta los detalles mas obvios de un protocolo me dieron el coraje para poner a punto hasta la preparación del mate. Porque muchas de las técnicas de esta tesis salieron gracias a lo que hiciste y a las enseñanzas impartidas y por eso siento que seguí estando.

A Rami. Porque sin esos mates espectaculares que preparás me hubiese costado el doble arrancar tan temprano. Por la oreja que me prestaste en los momentos buenos y en los difíciles.

A Mari, Silvina y Lauchi. Porque cada una me mostró una visión distinta de la ciencia y con sus consejos me abrieron la cabeza. Por las múltiples anécdotas personales, mates y choripanes compartidos.

A Maki, porque *“desconozco ampliamente”* otra persona que le ponga tanta buena onda a las cosas. Por los *“temones”* de los viernes ochentosos y los conocimientos brindados acerca de los beneficios del calzado especial para el supinador, los descuentos en el outlet de Montagne y *“cómo sembrar una planta de tomate y no morir en el intento”*.

A la Cuchi, a Clau y a Manu. Por la mesada de todos los días, los congresos, las mateadas, los *“after office”* de los viernes y las innumerables picadas compartidas que contribuyeron a que mi colesterol alcance valores siderales.

A Isa, Ani, Patri Noemí y Ale. Porque con su trabajo y dedicación nos alivian el trabajo a todos. Por el cariño que me dieron desde el primer día.

A Cris, por esos salamines caseros y los mates vespertinos.

A Sara, Pachi y Estela. Porque sin ellas mi trabajo sería más difícil.

A Carlos, por estar siempre al pie del cañón. Por los asados, los mates y las charlas.

A Daniel, Eduardo, Marce y Enzo. Por el cuidado diario de nuestros inocentes ratones.

A Micaela. Por iluminarnos con un idioma nuevo del que pensamos sacar provecho con el "*Sordelli Ilustrado*". Por hacernos reír con esas anécdotas que sólo a vos te pasan.

A los Rettori. Porque aunque nos separe una puerta nos extrañamos. Por el aguante las tardes-noches de cultivo ... y a su jefa, Vale, por el cariño y la confianza que depositaste en mí.

A la gente de los laboratorios de Ruth y Claudia, que siempre me dieron una mano cuando necesité algo.

A mis entrañables amigos Juli, Gabi, Dalia, Tito, Marce, Ana y Laura, con los que compartí interminables debates existenciales sobre temas escatológicos, comilonas, mates y litros de gin & tonic.

A Juli. Porque en ella encontré una persona maravillosa y generosa en la que confío incondicionalmente y que recorrió a mi lado uno de los tramos más importantes de mi vida. Porque rió, lloró, se alegró y sufrió conmigo cada instancia de esta tesis y estuvo, está y estará siempre en mi corazón.

A mis suegros y cuñados. Porque son mi segunda familia y me apoyan y aconsejan desde que formo parte de sus vidas.

A mi Abu, que me mira desde arriba, y a Pedro. Por todo el cariño que me dieron y porque sé que están aunque no están.

A mis viejos, Cristina y César, y a mi hermana Diana. Porque me apoyaron siempre en todas y cada una de las ideas locas que yo llamo “proyectos”. Por creer en mí y demostrármelo constantemente.

A Nico, el hombre que elegí para recorrer y disfrutar este viaje que se llama “vida”. El que me dio fuerzas para levantarme cada vez que me caí, el que me secó las lágrimas cada vez que lloré y me aceptó como soy. Porque lo respeto y admiro como persona y lo amo como hombre.

A todos los que me ayudaron y acompañaron! Gracias!

Al amor de mi vida, Nico.

A mis viejos y a Diana.

Abreviaturas

15-PGDH:	15-hidroxi-prostaglandina dehidrogenasa
2-AG:	2-araquidonil glicerol
5HT:	Serotonina
9-PKR:	9-Prostaglandina E2-ceto-reductasa
AA:	Ácido araquidónico
AEA:	Anandamida
AF:	Ácido fosfatídico
AG:	Aminoguanidina
AGEPI:	Ácidos grasos esenciales poliinsaturados
AINES:	Anti-inflamatorios no esteroides
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
AS:	Anandamida sintasa
ATP:	Adenosín trifosfato
CB1:	Receptor de cannabinoides tipo 1
CB2:	Receptor de cannabinoides tipo 2
CB3:	Receptor de cannabinoides tipo 3
COX-1:	Ciclooxigenasa-1
COX-2:	Ciclooxigenasa-2
DAG:	Diacilglicerol
DG lipasa:	Digliceridolipasa
DGL:	Digliceridolipasas
EDTA:	Ácido etilendiaminotetracético
EGF:	Factor de crecimiento epidermal
FAAH:	Hidrolasa de amidas de ácidos grasos
FSH:	Hormona foliculo estimulante
GC:	Guanilato ciclasa
GCs:	Guanilato ciclasa soluble
GMP:	Guanosín monofosfato
GMPc:	Guanosín monofosfato cíclico
GSH:	Glutación reducido
GTP:	Guanosín trifosfato
h:	hora/s
HDL:	Lipoproteína de alta densidad
HETEs:	Hidroperoxiácidos

HPETEs:	Hidroxi-peroxiácidos
I o INDO:	Indometacina
IGF:	Factor de crecimiento insulínico
IP3:	Inositol trifosfato
ITU:	Infección del tracto uterino
kDa:	kilo Daltons
LBP:	Proteína de unión al LPS
LGL:	Linfocitos grandes granulados
LH:	Hormona luteinizante
Liso PL:	Lisofosfolípido
L-NAME:	L-arginina-metil-éster
L-NMMA:	L-monometil-L-arginina
LPS:	Lipopolisacárido
LTs:	Leucotrienos
MAG:	Monoacilglicerol
mg:	miligramo/s
ML:	Músculo liso
NADP:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
NAPE:	N-araquidonil-fosfatidiletanolamina
NAPE-PLC:	N-acil- fosfatidiletanolamina fosfolipasa C
NAPE-PLD:	N-acil- fosfatidiletanolamina fosfolipasa D
NF-κB:	Factor nuclear κB
NMDA:	N-metil-D-aspartato
NO:	Oxido nítrico
NOS:	Oxido nítrico sintasa
NOSe:	NO sintasa endotelial
NOSi:	NO sintasa inducible
NOSmt:	NO sintasa mitocondrial
NOSn:	NO sintasa neuronal
ONOO:	Peroxinitrito
pAEA:	Fosfo-anandamida
PGE ₂ :	Prostaglandina E ₂
PGEM:	Metabolito de la PGE ₂
PGES:	Prostaglandina E sintasa

PGESc:	Prostaglandina E sintasa citosólica
PGESm-1:	Prostaglandina E sintasa microsomal 1
PGESm-2:	Prostaglandina E sintasa microsomal 2
PGF _{2α} :	Prostaglandina F _{2α}
PGFM:	Metabolito de la PGF _{2α}
PGH ₂ :	Endoperóxido
PGI ₂ :	Prostaciclina
PGs:	Prostaglandinas
Pi:	Fósforo inorgánico
PI-PLC:	Fosfoinositol-fosfolipasa C
PK:	Proteín quinasa
PLA ₂ :	Fosfolipasa A ₂
PLC:	Fosfolipasa C
PLD:	Fosfolipasa D
RE:	Reabsorción embrionaria
RIA:	Radioinmunoensayo
SEC:	Sistema endocannabinoide
SOD:	Superóxido dismutasa
TAC:	Transacilasa
THC:	Tetrahidrocannabinol
TLC:	Cromatografía en capa delgada
TLR:	Receptor de tipo toll
TRPV1:	Receptor de vanilloides tipo 1
TRPV4:	Receptor de vanilloides tipo 4
TXs:	Tromboxanos

Índice

INTRODUCCIÓN	1
<hr/>	
1.- RELEVANCIA DEL TEMA DE ESTUDIO.	1
2.- CARACTERÍSTICAS DE LOS ANIMALES Y EL TEJIDO DE ESTUDIO.	
2.1.- Características generales de los animales.	4
2.1.1.- Características reproductivas.	4
2.2.- Características del tejido.	6
2.2.1.- El útero.	6
2.2.2.- La decidua.	8
3.- LOS ENDOCANNABINOIDES.	
3.1.- Historia de los cannabinoides.	10
3.2.- Endocannabinoides.	11
3.3.- Mecanismos de acción.	12
3.4.- Metabolismo de la AEA.	14
3.5.- Participación de la AEA en eventos reproductivos.	17
3.6.- La AEA y el LPS.	19
4.- EL ÓXIDO NÍTRICO.	
4.1.- Biosíntesis.	20
4.2.- Clasificación y características de las NOS.	22
4.3.- Mecanismo de acción del NO.	24
4.4.- NO y el LPS.	25
4.4.1.- El LPS.	25
4.4.2.- Función del NO en la fisiología/patología uterina.	27
4.5.- Endocannabinoides y NO.	29
5.- LAS PROSTAGLANDINAS.	
5.1.- Estructura.	30
5.2.- Metabolismo de las prostaglandinas.	31
5.2.1.- Biosíntesis.	31
5.2.2.- Inhibidores de las COX.	37
5.2.3.- Catabolismo.	39

5.3.- Prostaglandinas y reproducción.	40
5.4.- Prostaglandinas y endocannabinoides.	41
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	43
<hr/>	
MATERIALES Y MÉTODOS	46
<hr/>	
1.- DROGAS.	46
2.- SOLUCIONES Y MEDIOS.	47
3.- ANIMALES.	48
4.- TÉCNICAS	
4.1.- Cultivo de tejidos.	49
4.2.- Medición de NO ₃ +NO ₂ . Reacción de Griess.	49
4.3.- RT-PCR.	50
4.4.- Western Blot.	51
4.4.1.- Procesamiento de las muestras.	51
4.4.2.- Separación electroforética de las proteínas.	51
4.4.3.- Electrotransferencia de las proteínas.	52
4.4.4.- Detección inmunológica.	52
4.4.5.- Identificación de las bandas proteicas.	53
4.5.- Radioinmunoensayo (RIA).	53
4.6.- Determinación de la actividad la AEA sintasa.	54
4.7.- Determinación de la actividad de la FAAH.	55
4.8.- Cuantificación del metabolito de PGE ₂ .	56
4.9.- Determinación de la actividad de la 9-PKR.	56
4.10.- Determinación de la actividad de la PGES.	57
4.11.- Inmunohistoquímica.	58
5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.	58

1.- El LPS modula la actividad y la expresión de algunos de los componentes del sistema endocannabinoide.	59
1.1.- Establecimiento de las condiciones óptimas del cultivo.	59
1.2.- Niveles del ARNm de CB1 y CB2.	61
1.3.- Actividad de AEA sintasa y niveles proteicos de la NAPE-PLD.	63
1.4.- Actividad de FAAH, niveles de ARNm y proteicos.	67
1.5.- Participación de la AEA en la actividad de la FAAH inducida por LPS.	69
2.- La AEA modula la producción de NO y la expresión de la NOSi.	72
2.1.- Efecto de la AEA en la producción de NO.	72
2.2.- Efecto de la AEA en la expresión de las isoformas de la NOS.	74
3.- La producción de NO inducida por LPS está mediada por la AEA.	78
4.- El LPS produce daño tisular y nitración de proteínas.	82
5.- La AEA modula la producción de PGE ₂ y PGF _{2α} inducida por LPS.	90
6.- La AEA modula la producción de PGE ₂ y PGF _{2α} y los niveles de ARNm y proteicos de la COX-2.	93
7.- La AEA no modifica la actividad de la 9-PKR.	95
8.- La AEA incrementa la producción del metabolito de PGE ₂ pero no modifica los niveles de ARNm ni los niveles proteicos de la 15-PGDH.	96
9.- La AEA modifica la actividad de la PGES y los niveles de ARNm y proteicos de la PGESm-1.	100

DISCUSIÓN 103

CONCLUSIONES 124

REFERENCIAS 125

introducción

1.- IMPORTANCIA DEL TEMA DE ESTUDIO.

El establecimiento y la continuidad del embarazo es una situación mucho menos exitosa de lo que uno podría imaginar, considerando que la tasa de aborto temprano post-implantación es de alrededor del 30% (Clark y Chaouat, 1989). Debido a que existe un importante subregistro, la realidad en cuanto a pérdida de embarazos trasciende lo observado clínicamente ya que muchas mujeres nunca llegan a saber que han tenido un aborto. Estas situaciones ocurren antes o coinciden con el siguiente período menstrual y no representan más que un sangrado anormal o abundante. Esta situación sugiere que la tasa de aborto espontáneo real puede estar acercándose al 40% ó 50% (Wilcox y col., 1988).

El aborto espontáneo es una patología que carece de un tratamiento terapéutico eficaz provocando infelicidad y estrés para gran cantidad de parejas que se ven imposibilitadas de tener un embarazo viable.

La etiología del aborto espontáneo de origen materno es multifactorial. Entre las causas más comunes se encuentran la trisomía de autosomas, la monosomía del cromosoma X y las malformaciones estructurales (Kajii y col., 1980; Simpson, 1980). Las enfermedades auto-inmunes como el síndrome antifosfolípídico o el lupus eritematoso sistémico son también causales de aborto.

En el 50% de los casos la causa es desconocida y han sido estrechamente asociados a desórdenes inmunológicos (Piccinni, 2006). El sistema inmune a nivel local, es decir en la interfase materno-fetal, facilitaría la implantación y el desarrollo placentario, promoviendo la tolerancia fetal. Sin embargo, una eliminación ineficiente de los agentes infecciosos, o una respuesta inmune exacerbada pueden contribuir a desórdenes en la preñez que incluyen la preeclampsia, el parto prematuro y el aborto.

Las infecciones del tracto urinario (ITUs) son un hecho muy común durante el embarazo. En general, se caracterizan por la presencia de una cantidad significativa de bacterias que colonizan parte o la totalidad del tracto urinario. Estas infecciones, sobre todo si cursan en forma asintomática, son uno de los

factores de riesgo más importantes para la salud tanto materna como fetal y están altamente relacionadas con el retraso del crecimiento fetal, el parto prematuro y la mortalidad fetal. Las enterobacterias (pertenecientes al grupo Gram negativo (-), y productoras de lipopolisacárido (LPS)) son responsables de aproximadamente el 90% de las ITUs.

Desde hace muchos años se ha asociado al consumo de marihuana con un aumento de la frecuencia de abortos y una restricción del crecimiento fetal (Das y col., 1995; Pertwee, 1997). Desde el descubrimiento de los endocannabinoides, análogos lipídicos endógenos del compuesto activo de la marihuana (Liu y col., 2002), numerosos estudios han señalado a la anandamida (AEA, principal endocannabinoide), como un componente importante del diálogo materno-fetal. Se ha informado que la presencia de AEA es necesaria para una correcta implantación y un adecuado desarrollo embrionario, pero niveles elevados de este compuesto son contraproducentes para ambos procesos. Este hecho hace que la enzima que degrada la AEA, la hidrolasa de amidas de ácidos grasos (FAAH), tenga una papel crucial en la prevención de fallas en la preñez previniendo la acumulación de altas cantidades de esta molécula en el útero. De hecho, Maccarrone y col. (2000) observaron que linfocitos maternos de mujeres que han sufrido abortos espontáneos presentan niveles y actividad de la FAAH reducidos respecto de las que tienen un embarazo exitoso, sugiriendo que la FAAH linfocitaria podría utilizarse como marcador temprano de aborto espontáneo. Además, Habayeb y col. (2008) han observado que mujeres cuyos embarazos terminaron en un aborto espontáneo presentan niveles elevados de AEA plasmática respecto de aquellas cuyos embarazos llegaron a término.

Investigaciones recientes muestran que el LPS es capaz de inducir la síntesis de AEA en macrófagos murinos (Liu y col., 2003) y en linfocitos humanos (Maccarrone y col., 2001) y además disminuye la expresión y la actividad de la FAAH en este último tipo celular (Maccarrone y col., 2001). Estas evidencias sugieren que el LPS tiene la capacidad de modular el sistema endocannabinoide (SEC).

El estudio de los mecanismos moleculares del SEC y su relación con el efecto deletéreo del LPS sobre la preñez podría contribuir al desarrollo de nuevas

estrategias terapéuticas, o al mejoramiento de las ya existentes, que contribuyan a la prevención del aborto séptico.

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

2.1.- Características generales de los animales de estudio.

Para nuestros estudios fueron utilizados ratones de las cepas albinas BALB/c y CD1, pertenecientes al género *Mus*. Los adultos de estas cepas poseen una longitud de 9 a 12 cm, pudiendo pesar entre 20 y 35 gr. según el sexo. Tienen una longevidad de menos de 24 meses. Los ratones fueron mantenidos en ciclos de luz : oscuridad de 14:10 h. Se reproducen todo el año, los períodos de gestación y destete son breves, y las camadas numerosas. Son mamíferos euterianos como el hombre, con quien conservan el 99 % del genoma.

Para algunos estudios se utilizaron ratones *knock out* para el gen del receptor de cannabinoides tipo 1 (CB1). Los ratones mutantes fueron generados según lo descrito por Ledent y col. (1997).

2.1.1.- Características reproductivas de las hembras.

El ciclo reproductivo del ratón es estral. Las hembras son poliéstricas continuas, es decir, presentan ciclos consecutivos durante todo el año que sólo son interrumpidos por períodos gestacionales. El ciclo estral que dura de 4 a 5 días está dividido en 4 fases: proestro, estro, metaestro y diestro.

El desarrollo del folículo ovárico ocurre durante el período de **proestro**. 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 son transportados por el oviducto hasta el útero y finalmente, en el **diestro**, los folículos sufren un rápido desarrollo preparándose para la siguiente ovulación. Cada fase del ciclo estral puede ser identificada mediante un extendido vaginal por el aspecto del epitelio que se descama.

Tanto las hembras como los machos son sexualmente maduros a los 50-60 días de edad. La cópula se produce durante el estro y está influenciada por

feromonas. El macho generalmente copula con hembras en estro alrededor de la mitad del período de oscuridad. El eyaculado del ratón es una sustancia viscosa que rápidamente se solidifica y perdura alrededor de 12 h. Este tapón vaginal (figura 1) actúa como barrera para evitar que otros machos se apareen con la hembra y ayuda a su espermatozoides 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

Figura 1.- Ausencia / presencia de tapón para determinar el momento del apareo.

El período gestacional del ratón dura entre 19 y 21 días a partir de la cópula (dependiendo de la cepa elegida) y la camada es de entre 6 y 14 crías. Una vez que las crías han nacido, la hembra devora la placenta, ayudando a la salida de la cría y estimulando la eliminación del líquido de las vías respiratorias.

Los ovarios son indispensables para mantener la gestación. Si se realiza una ovariectomía o disminuye la secreción ovárica de progesterona en etapas tempranas de la gestación, indefectiblemente se producirá un aborto y los fetos serán reabsorbidos debido a que la placenta no produce suficiente progesterona para mantener la preñez (Rubinstein y Forbes, 1963).

2.2.- Características generales del tejido utilizado.

2.2.1.- El útero.

Anatómicamente, el útero murino es un órgano bicórneo donde cada uno de los cuernos comienza en el oviducto y recorre la cavidad abdominal dorsal conectándose a la vagina por el cervix (Neal y col., 1943) (figura 2). 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.

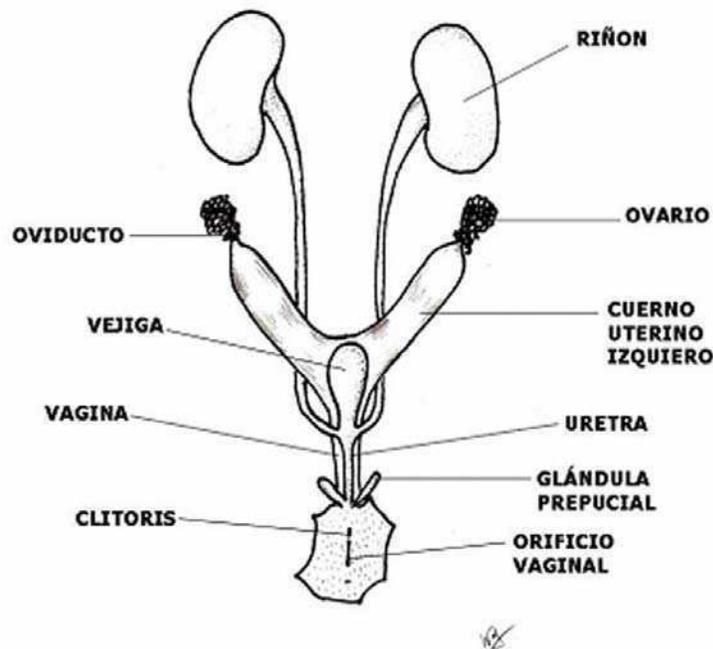


Figura 2.- Sistema urogenital del ratón.

Histológicamente, las paredes del útero están compuestas por tres capas de tejido diferentes (figura 3): la externa o serosa, la media muscular o miometrio y la mucosa interna o endometrio (Ham, 1970).

- La **serosa** es la cubierta peritoneal del útero. Está constituida por una capa epitelial secretora que consiste en una monocapa de epitelio simple avascular, sostenida por tejido conectivo que se continúa con el peritoneo. El tejido conectivo proporciona nutrientes al epitelio a través de vasos sanguíneos, así como inervación. Dentro de la cavidad, la secreción de fluido seroso reduce la

fricción del movimiento muscular. Además, la membrana sirve como capa de anclaje a otros órganos y estructuras corporales (Krinke, 2004).

- El **miometrio** está compuesto por músculo liso dispuesto en una capa interna circular y una externa longitudinal al eje mayor del útero. Entre ambas capas hay tejido conectivo bien definido formado por fibras de colágeno, fibroblastos y células inmunes (Ham, 1970).

El músculo liso (ML), también conocido como visceral o involuntario, se divide en dos grupos dependiendo de sus características electrofisiológicas:

- ML unitario, que posee actividad espontánea;
- ML multiunitario, que se caracteriza por tener fibras organizadas en unidades motoras activables por un nervio motor extrínseco (Eccles y Magladery, 1937).

El miometrio es un tejido de tipo unitario cuya actividad contráctil está coordinada y regulada por mediación nerviosa y por moléculas producidas por el propio miometrio. El órgano se halla inervado por terminaciones de tipo colinérgicas y adrenérgicas del sistema nervioso autónomo.

- La mucosa o **endometrio** es la capa más interna (expuesta a la luz uterina), formada por un epitelio simple columnar que extiende glándulas tubulares endometriales hacia el estroma endometrial. El estroma es una lámina propia de gran espesor y en él se hallan incluidas las glándulas tubulares simples, cuyos conductos, atravesando la superficie epitelial, se abren en la luz del útero y cuyas porciones más profundas casi alcanzan al miometrio. El endometrio se divide en 3 capas histológica y funcionalmente distintas. La más profunda (la adyacente al miometrio) es el estrato basal que alimenta y sustenta. Le sigue una ancha capa de tejido estromal esponjoso adyacente a una capa superficial compacta y delgada. Estas últimas 2 se denominan en conjunto estrato funcional ya que son las que sufren más cambios y las que se descaman periódicamente cuando el ciclo es menstrual.

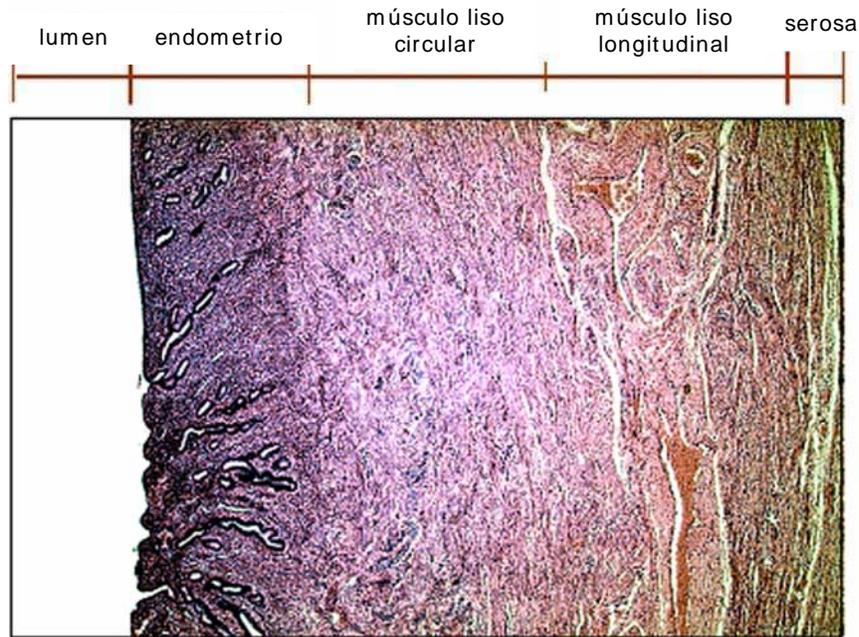


Figura 3.- Corte transversal del útero.

2.2.2.- La decidua.

El útero sufre profundos cambios en respuesta a la implantación del embrión. Es el estroma endometrial el que se modifica radicalmente para formar la decidua en un proceso denominado decidualización. Este proceso comienza en las células estromales lindantes a los blastocistos implantados, y luego se extiende a gran parte del endometrio. Su avance produce un aumento en el tamaño y el peso del útero, no sólo producto de la proliferación, aumento de tamaño y diferenciación de las células del estroma sino también causado por la infiltración leucocitaria, el aumento localizado de la permeabilidad vascular y el desarrollo de edema tisular.

La formación de la decidua hace que los embriones implantados queden incluidos en una masa engrosada de tejido decidual, separados unos de otros por tejido endometrial no transformado. Este tejido tiene diversas funciones biológicas, nutritivas, estructurales e inmunológicas y, aunque no han sido determinadas en su totalidad, se cree que la decidua es un componente crítico de la respuesta materna al embrión. En parte porque controla la naturaleza

invasiva del trofoblasto y porque juega un papel parácrino y autócrino importante, tanto para la madre como para el feto.

La decidualización es un fenómeno endocrino dependiente de progesterona. Bajo su influencia, las células fusiformes del estroma se diferencian en dos tipos: células predeciduales grandes, redondeadas, con núcleo hipocromático y abundante citoplasma, y células más pequeñas con abundante contenido granular en el citosol. Hoy sabemos que la progesterona sola no basta para producir esta reacción. Los factores de crecimiento como el EGF, el IGF-1/2 y proteínas como fibronectina y laminina, también son necesarios.

Aunque el estroma uterino contiene varios tipos celulares que probablemente tienen distintas funciones en la decidualización (Padykula, 1981), la mayoría de los estudios sostienen que los elementos del estroma tipo fibroblastos son los que darán lugar a las células deciduales definitivas (Kleinfeld y col., 1983). Las otras células del estroma son infiltradas: macrófagos y linfocitos grandes granulados (LGL) que tienen su origen en médula ósea y se acumulan en el endometrio, aparentemente en respuesta a hormonas.

3.- LOS ENDOCANNABINOIDES.

3.1.- Historia de los cannabinoides.

“La única característica permanente del estudio del Cannabis es que se pone de moda cada tanto”. Raphael Mechoulam.

Los cannabinoides constituyen un conjunto de compuestos presentes en preparados obtenidos a partir de la planta *Cannabis sativa*.

Durante los primeros 50 años del siglo XIX químicos en distintos países europeos trataron de encontrar los alcaloides que presuntamente estaban presentes en el *Cannabis*. Las investigaciones médicas de esa época mostraban los trabajos de O'Shaughnessy y el uso del *Cannabis* en la India, principalmente en enfermedades neurológicas, así como el trabajo de Moreau en Francia y el uso del *Cannabis* para tratar enfermedades psiquiátricas. En todos los casos se obtenían preparados activos a partir de la planta *Cannabis sativa* pero la irreproducibilidad de los resultados farmacológicos y la imposibilidad de aislar un constituyente activo llevó a que la investigación no avanzara por varias décadas (Mechoulam, 1986).

El primer progreso real se produjo en los años 1940s por Lord Todd en Inglaterra y más tarde por Roger Adams en Estados Unidos. Ambos lograron aislar, independientemente, el cannabinoil (un constituyente psicoactivo muy débil) y el cannabidiol (un constituyente inactivo) pero no pudieron atribuirles la actividad del *Cannabis*. Estudios posteriores llevaron a obtener compuestos con actividad similar al *Cannabis* pero el componente activo principal de la planta todavía no podía identificarse. Nuevamente, la investigación se estancó por un par de décadas (Mechoulam, 1986).

Recién en el año 1964, el grupo del Dr. Mechoulam logró aislar por primera vez en forma pura e identificar al Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC, figura 4) como el principal componente activo de la marihuana (Gaoni y Mechoulam, 1964). Rápidamente fueron identificados muchos de los cannabinoides naturales presentes en esta planta que suman alrededor de 60.

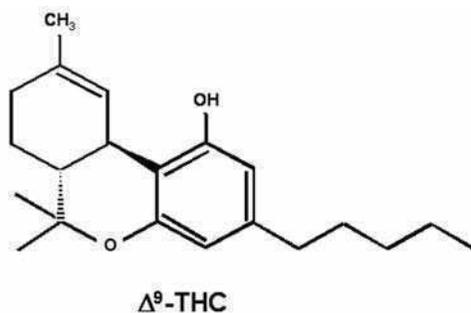


Figura 4.- Estructura del THC.

Durante mucho tiempo se pensó que los cannabinoides ejercían sus efectos mediante interacciones inespecíficas con lípidos de membrana dada su elevada lipofiliidad. 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 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).

3.2.- Endocannabinoides.

La presencia de un receptor específico para cannabinoides llevó a los investigadores a emprender la búsqueda de un ligando endógeno capaz de unirse y activar 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 (AEA), 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*.

3.3.- Mecanismos de acción.

La AEA actúa como un agonista de los dos receptores de cannabinoides encontrados hasta ahora, CB1 y CB2. 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 sensibles a toxina de pertussis ($G_{i/o}$). Presentan un 48% de homología entre ellos y un 68% de homología entre sus regiones transmembrana (figura 5).

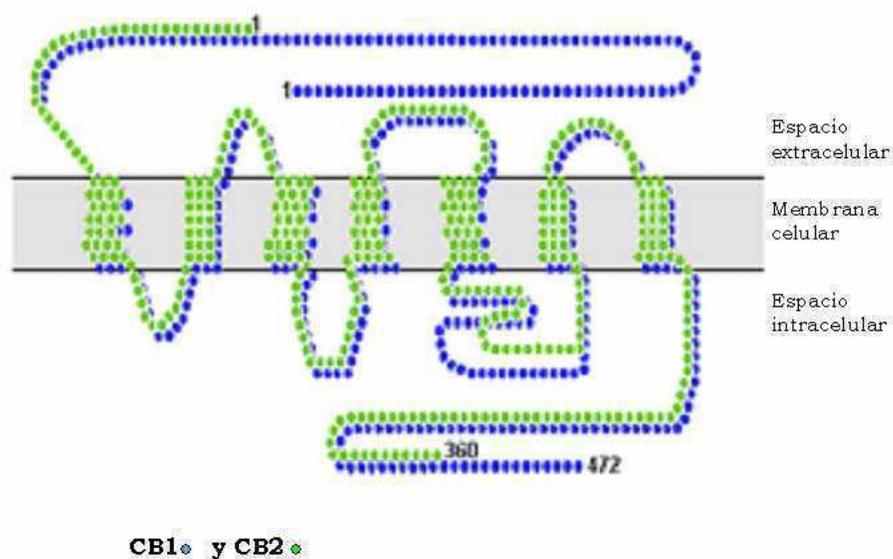


Figura 5.- Estructura de los receptores de cannabinoides CB1 y CB2.

Los endocannabinoides pueden actuar:

I. A través de la estimulación de los receptores CB1 y CB2 produciendo, por un lado, la inhibición de la adenilato ciclasa que lleva a niveles disminuidos de AMP cíclico (Paria y col., 1995; Matsuda y col., 1990), y por otro, la regulación de canales iónicos (como la inhibición de canales de calcio tipo L, N y P/Q y la

activación de canales de K⁺ (Mackie y col., 1992; Mackie y col., 1995; Henry y col., 1995; Gebremedhin y col., 1999).

Investigaciones recientes indican que los endocannabinoides pueden actuar vía otros receptores CB. Un ejemplo de esto es un posible receptor CB3, conocido como GPR55, el cual es un receptor huérfano que aparentemente no se acopla con proteínas G_i o G_s, lo que sugeriría que activa caminos de señalización diferentes a los ejecutados por CB1 y CB2 (Baker y col., 2006; Sawzdargo y col., 1999).

II. Por mecanismos que no están mediados 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 Ca²⁺ mediada por uniones gap en astrocitos (Habayeb y col., 2002).

III. Participando en mecanismos de acción no mediados por receptores de cannabinoides, como por ejemplo la modulación de la señalización transmembrana de 5HT o NMDA, que no pueden ser bloqueados por antagonistas de los receptores de cannabinoides ni por la toxina de pertussis (Mechoulam y col., 1998).

IV. A través de los receptores de vanilloides tipo 1 (TRPV1) o tipo 4 (TRPV4). El más estudiado hasta ahora es el TRPV1 el cual es una proteína de 6 pasos transmembrana y un canal catiónico no selectivo que se activa por moléculas derivadas de plantas, como la capsaicina, y por estímulos como el calor y los protones (Szallasi y col., 1999). La AEA es un agonista de TRPV1 y la interacción con este receptor se produce a nivel citosólico (a diferencia de los receptores CB1 y CB2 cuya unión se produce del lado extracelular) provocando la activación de canales iónicos no selectivos, la activación de protein-quinasas, aumento de la concentración intracelular de Ca²⁺ desacoplamiento mitocondrial y liberación del citocromo C (Maccarrone y col., 2003; Yamaji y col., 2003).

3.4.- Metabolismo de la AEA.

Una característica de la AEA, y del resto de los endocannabinoides, es que no se encuentra almacenada como tal en la célula, sino que es sintetizada a partir de precursores en las membranas celulares en respuesta a un determinado estímulo. Ejemplos de estímulos son la despolarización neuronal o el desafío con lipopolisacáridos bacterianos entre otros (Di Marzo y col., 1998).

Se han propuesto varias vías de síntesis de AEA, siendo dos las principales: la vía del NAPE y la vía de la AEA sintasa.

I. Vía del NAPE o Vía de Schmid: esta vía involucra la activación de una enzima transacilasa dependiente de Ca^{2+} que transforma un precursor fosfolipídico en la membrana celular en un producto denominado N-arquidonil-fosfatidiletanolamina (NAPE). La hidrólisis de NAPE vía una enzima específica denominada N-acil-fosfatidiletanolamina fosfolipasa D (NAPE-PLD) produce la AEA (Habayeb y col., 2002) (figura 6).

II. Vía de la AEA sintasa: por este mecanismo se sintetiza 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). 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 hidrolasa de amidas de AEA trabajando en forma inversa, probablemente la hidrolasa de amidas de ácidos grasos (FAAH).

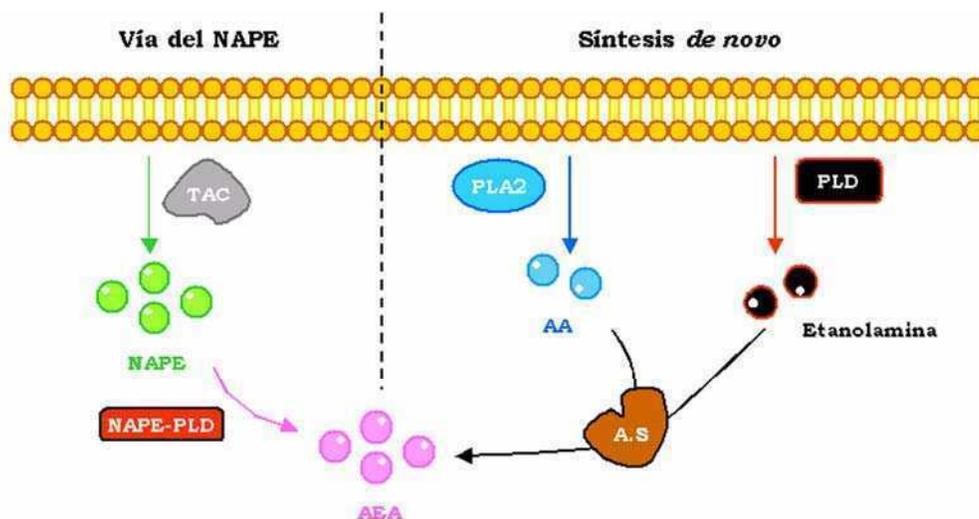


Figura 6.- Vías de síntesis de AEA. TAC, transacilasa; PLA2, fosfolipasa A2; PLD, fosfolipasa D; AA, ácido araquidónico; A.S, anandamida sintasa.

Sin embargo, hay tejidos en los cuales esta vía podría explicar los altos niveles de AEA, 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 AEA 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).

Por otro lado, estudios en ratones *knock out* para la NAPE-PLD han revelado que estos animales poseen concentraciones de AEA similares a las que presentan los ratones *wild type*, sugiriendo la existencia de rutas enzimáticas alternativas para la producción de la AEA *in vivo* (Okamoto y col., 2007). De hecho, el grupo de Liu y col. (2006) proponen un mecanismo de síntesis de AEA en cerebro de ratón que sería independiente de la NAPE-PLD y que involucra una fosfolipasa C (NAPE-PLC) la cual sería responsable de clivar el NAPE para generar un lípido, fosfoanandamida (pAEA), el cual sería luego defosforilado por fosfatasa.

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 (Piomelli y col., 2000). Desde allí actúa con distinta selectividad sobre los receptores de cannabinoides, posiblemente incluyendo otros subtipos además de CB1 y CB2, y activando segundos mensajeros que median sus efectos.

La acción de la AEA finaliza mediante su recaptación por las células, proceso sobre el que existe una gran controversia, puesto que se ha postulado que podría ocurrir:

- a) por **difusión pasiva** a través de la membrana celular (Patricelli y Cravatt, 2001; Glaser y col., 2003);
- b) por **difusión facilitada** mediada por un transportador selectivo putativo (Di Marzo y col., 1994; Beltramo y col., 1997);
- c) 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 hidrolasa de amidas de ácidos grasos (FAAH, figura 7). Degradando la AEA, la actividad de la FAAH mantiene un gradiente que dirige la entrada de AEA a la célula.

La FAAH es más abundante en el hígado y en el cerebro y se encuentra presente, en menores niveles, en el bazo, el riñón, el testículo y el pulmón (Di Marzo, 1998; Wan y col., 1998). Originalmente conocida como “anandamida hidrolasa” esta codificada por un único gen localizado en el brazo corto del cromosoma 1 humano (Wan y col., 1998). Tiene una longitud de 579 amino ácidos y una masa molecular de 63 kDa (Giang y col., 1997).

Además de la FAAH, existen otras dos vías de metabolización de la AEA descritas hasta ahora (figura 7):

- a) **vía de las lipooxigenasas y del citocromo P450**: donde se produce la oxigenación enzimática de la AEA generando derivados hidroperóxidos e hidróxidos de la anandamida (Ueda y col., 1995; Edgmond y col., 1998).

b) vía de la ciclooxigenasa-2 (COX-2): donde la AEA es sustrato de esta enzima dando como resultado final prostaglandina E₂-etanolamida y otras prostamidas (Yu y col., 1997).

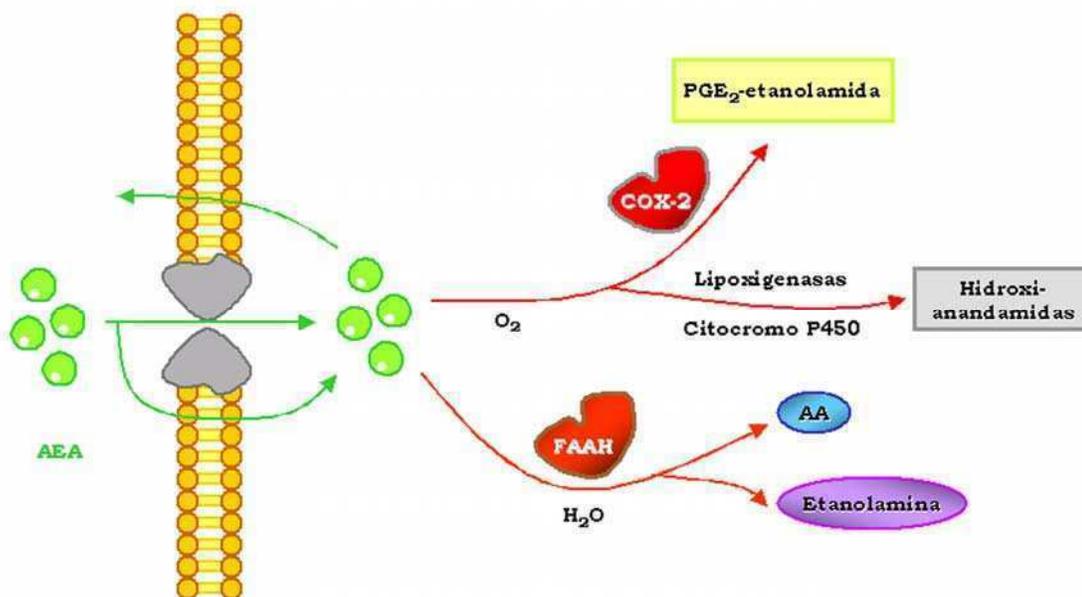


Figura 7.- Vías de degradación de la AEA. AA, ácido araquidónico.

3.5.- Participación de la AEA en eventos reproductivos.

El uso crónico de la marihuana ha sido asociado con numerosas patologías reproductivas, la mayoría de las cuales serían causadas por el THC. Por ejemplo, se observan niveles disminuidos de testosterona en plasma (Kolodny y col., 1974), conteo reducido de espermatozoides en esperma e impotencia en hombres (Issidorides, 1978; Whang y col., 2006); mientras que en mujeres, el uso crónico de marihuana usualmente está asociado con anomalías 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 administración de AEA a ratas ovariectomizadas causa la disminución de los niveles séricos de la prolactina y

de la hormona luteinizante (LH), aunque no afecta los niveles de la hormona folículo-estimulante (FSH) (Wenger y col., 1999), por lo que podría afectar el proceso de ovulación y la regulación del ciclo menstrual.

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

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 de mamíferos (Dey y col., 2004; Wang y Dey, 2006). La AEA parecería tener un papel importante durante la “ventana” de implantación, sincronizando el desarrollo embrionario con la preparación del útero hasta la etapa receptiva (Schmid y col., 1997).

Los endocannabinoides han sido postulados en los últimos años como una importante señal de diálogo en la interfase materno-fetal. Niveles elevados de AEA en los sitios inter-implantatorios se asocian con una inhibición de la proliferación del trofoblasto mientras que niveles bajos de esta molécula en los sitios implantatorios producen el efecto contrario. De esta manera, un efecto dual puede observarse dependiendo de la concentración local de AEA (Paria y col., 2000).

Cabe destacar que los niveles de la AEA parecen estar regulados principalmente por su degradación por la FAAH. Maccarrone y col. (2000) observaron que linfocitos maternos de mujeres que han sufrido abortos espontáneos presentan niveles y actividad reducidos de la FAAH respecto de las que tienen un embarazo exitoso, sugiriendo que la FAAH linfocitaria podría utilizarse como marcador de aborto espontáneo. Además, Habayeb y col. (2008) han observado que mujeres cuyos embarazos terminaron en un aborto espontáneo presentan niveles más elevados de AEA plasmática que aquellas cuyos embarazos llegaron a término.

3.6.- La AEA y el lipopolisacárido (LPS).

En los últimos años se ha demostrado que el LPS modula el sistema endocannabinoide de distintas maneras dependiendo del tipo celular estudiado.

Por un lado, el LPS es capaz de inducir la síntesis de AEA en linfocitos humanos (Maccarrone y col., 2001) y macrófagos murinos y también aumenta la actividad de la NAPE-PLD en este último tipo celular (Liu y col., 2003). Por otro lado, el LPS disminuye la expresión de la FAAH y su actividad en linfocitos humanos (Maccarrone y col., 2001), pero también se ha observado que la endotoxina es capaz de aumentar los niveles de ARNm y la actividad de la FAAH en una línea celular de macrófagos murinos (Liu y col., 2003).

Resultados previos de nuestro laboratorio muestran que el LPS es capaz de producir reabsorción embrionaria en ratón, aumentando la producción de NO tanto en el útero como en la decidua (Ogando y col., 2003). Es interesante destacar que también hemos observado que la anandamida modula la producción de NO en la placenta de la rata (Cella y col., 2008). Estos datos sugieren que la anandamida podría estar participando del efecto deletéreo del LPS sobre el tejido embrionario.

4.- EL ÓXIDO NÍTRICO.

4.1.- Biosíntesis.

El óxido nítrico (NO) es una molécula gaseosa, inestable y multifuncional producida 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.

El NO presenta un efecto dual en muchas situaciones fisiológicas/patológicas. Por ejemplo, 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 anión superóxido y generar peroxinitrito (ONOO⁻), compuesto que tiene un alto poder oxidante (Beckman y Crow, 1993). Ni el anión superóxido ni el NO son particularmente tóxicos *in vivo* dado que existen mecanismos que minimizan su acumulación (Beckman, 1996a y 1996b). El radical superóxido es rápidamente removido por altas concentraciones de la enzima superóxido dismutasa (SOD) mientras que el NO difunde rápidamente a través de las membranas celulares y entra en los glóbulos rojos (Butler y col., 1998) donde es convertido a nitratos por la acción de la oxihemoglobina (Figura 8). Esto limita la vida media del NO a menos de 30 segundos.

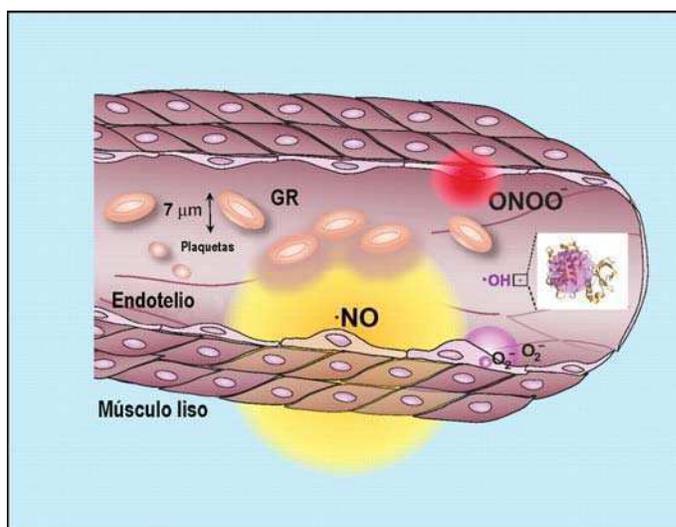


Figura 8.- Difusión celular del NO. Pacher y col. *Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. Physiol Rev.* 2007. 87(1):315-424. GR, glóbulo rojo.

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

La síntesis de esta molécula se produce a través de una familia de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS), que se encuentran ampliamente distribuidas en los tejidos. Hasta el momento, han sido identificadas y exhaustivamente estudiadas tres isoformas de la enzima NOS que presentan diferente nomenclatura según se haga alusión al orden en el que fueron descubiertas o al tejido en el que fueron detectadas por primera vez.

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.

Las NOS 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 (figura 9).

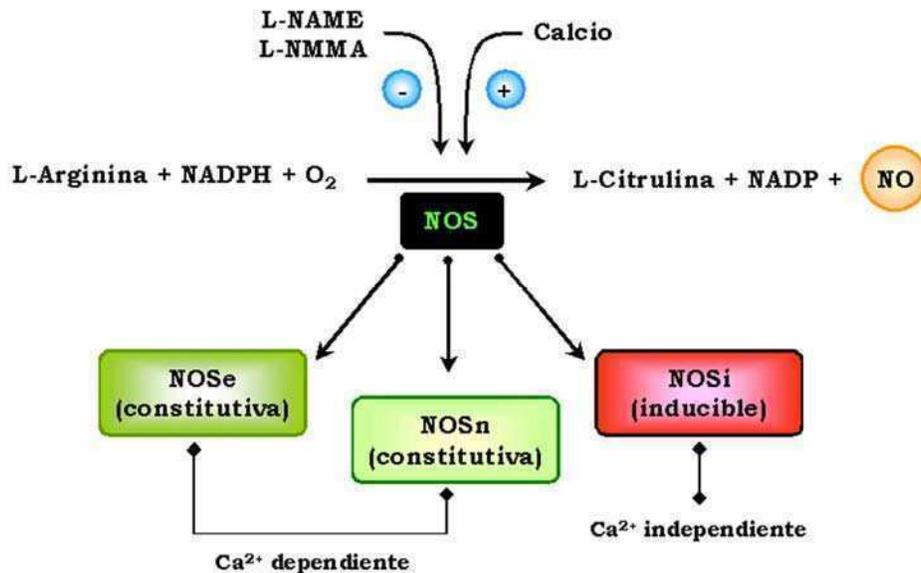


Figura 9.- Biosíntesis de NO e isoformas de la NOS.

4.2.- Clasificación y características de las NOS.

Históricamente las tres isoformas de la NOS, codificadas por genes distintos, han sido divididas en constitutivas (NOS endotelial o NOSe y NOS neuronal o NOSn) e inducible (NOSi) (figura 9). Sin embargo, descubrimientos recientes sugieren que la expresión de NOSe y NOSn también puede ser inducida y que en algunos tejidos la NOSi 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 NOSe como la NOSn son fuertemente reguladas por calcio y calmodulina, mientras que la NOSi se une fuertemente a calmodulina, y por lo tanto es relativamente independiente de calcio.

I. NOSn (NOS I).

Fue la primera isoforma detectada y purificada en cerebro, de allí la nomenclatura “b” (del inglés “brain”) o “n” (neuronal). Esta isoforma está descrita en varios tejidos incluyendo tejidos reproductivos femeninos (Alí y col., 1997) y se asocia predominantemente a la membrana del retículo endoplasmático, a las membranas sinápticas en neuronas y al sarcolema de células musculares (Kobzik y col., 1994). Es un homodimero y cada subunidad tiene una masa molecular de aproximadamente 150-160 kDa.

II. NOSi (NOS II).

Se la descubrió en macrófagos y posee un peso molecular de aproximadamente 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 la NOSn, esta isoforma es calcio-independiente y, una vez activada, genera NO en grandes cantidades y por largos periodos. Su expresión puede ser estimulada por lipopolisacáridos de *E. coli*, factores de crecimiento o citoquinas.

III. NOSe (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 aproximadamente 135-140 kDa. Como ya se ha mencionado, esta isoforma se expresa 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 (NOSn) y las células endoteliales (NOSe) 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. El NO generado por estas isoformas es responsable de una variedad de acciones biológicas como la relajación del endotelio, inhibición y agregación plaquetaria y comunicación célula-célula en el 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 y función neuronal defectiva (Huang y col., 1993).

IV. NOSmt (NOS mitocondrial).

También se ha postulado la existencia de una cuarta isoforma, llamada NOS mitocondrial, aunque aún no ha sido clonada.

Bates y col. (1995), Ghafourifar y Richter (1997) y Giulivi y col. (1998) identificaron una NOS mitocondrial (NOSmt). 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).

4.3.- Mecanismo de acción del NO.

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 (figura 10).

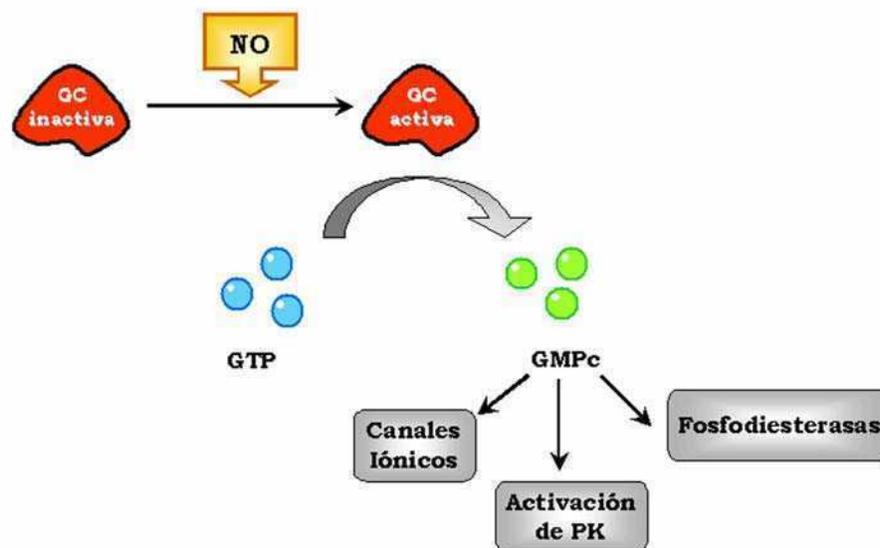


Figura 10.- Mecanismo de acción del NO.

El GMPc también participa de la activación de proteínas quinasas dependientes de GMPc (PKs), enzimas que fosforilan diferentes proteínas de membrana en el retículo sarcoplasmático, entre ellas los canales de potasio, un sistema proteico llamado IP3-IRAG (IP3R-associated cGMP kinase substrate) 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).

El GMPc también 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.

4.4.- NO y el lipopolisacárido.

4.4.1.- El lipopolisacárido.

El lipopolisacárido (LPS) es el principal componente de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Es un importante factor de virulencia y es por ello que su sola presencia justifica que la membrana externa se denomine generalmente capa de lipopolisacáridos o simplemente LPS.

El LPS no solamente forma parte de la estructura externa de estas bacterias sino que además es liberado constantemente al medio que las circunda unido a otras proteínas bacterianas. Una vez en el torrente sanguíneo, se dispone en agregados debido a su naturaleza anfipática y sólo se presenta como monómero gracias a la acción de la proteína plasmática LBP o "**LPS Binding Protein**".

El LBP es una molécula que, transfiere lípidos y cataliza el pasaje del LPS desde los agregados al CD14, soluble o de membrana. También transfiere la endotoxina a fosfolípidos, especialmente el HDL (Vreugdenhil y col., 2003; Wurfel y col., 1994).

El complejo LPS/LBP se une al receptor CD14 en la membrana de células monocíticas o al CD14 soluble presente en sangre y fluidos. Los blancos del complejo CD14 soluble/LPS son células que no poseen el receptor, como las

endoteliales o epiteliales. Este mecanismo permite que células que no expresan CD14 puedan responder a la endotoxina.

Múltiples evidencias sugieren la participación del CD14 en fases tempranas del mecanismo de acción del LPS pero no en la cascada de señalización celular, ya que su dominio glico-fosfatidil-inositol, que lo ancla a la membrana, impide la traducción de señales.

En este sentido, han sido identificadas una serie de proteínas transmembrana pertenecientes a la familia de los receptores de tipo Toll o TLRs como posibles transmisoras de la señal del LPS.

El TLR4 fue identificado como un receptor para el LPS cuando se determinó que los ratones C3H/HeJ, que se sabía que eran resistentes al shock endotóxico, presentaban una mutación en el gen que codifica al TLR4 (Poltorak y col., 1998). Estudios posteriores con ratones *knock out* confirmaron esta resistencia (Takeuchi y col., 1999) y lo involucran directamente con esta vía. En el caso de TLR2, su aporte es aún controversial (Chow y col., 1999).

La señal emitida por el TLR4 provoca el reclutamiento secuencial de MyD88, una molécula adaptadora, y de IRAK o “Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase” (figura 11). Esta última finalmente interacciona con TRAF6 (TNF Receptor-Associated Factor 6) promoviendo la activación celular vía el factor nuclear- κ B (NF- κ B) o *c-Jun* N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAP), ambos involucrados en la activación de numerosos genes pro-inflamatorios (Muzio y col., 1998).

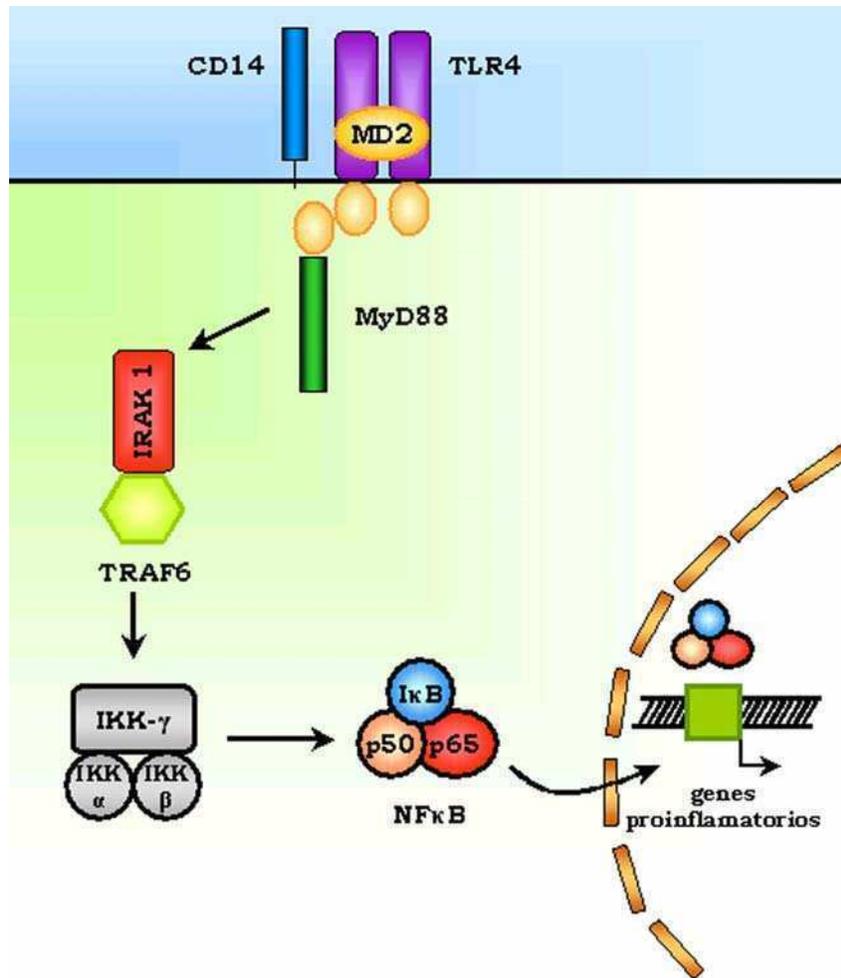


Figura 11.- TLR4. Transducción de señales.

4.4.2.- Función del NO en la fisiología / patología uterina.

El NO cumple importantes funciones durante la preñez y participa en procesos fisiológicos como la implantación, decidualización, vasodilatación y relajación miometrial (Franchi y col., 1994; Yallampalli y col., 1993; Ali y col., 1997; Sladek y Roberts, 1996). Sin embargo, en altas concentraciones como las producidas durante la sepsis, el NO es tóxico dado que genera radicales libres (Grisham y col., 1999).

El LPS es capaz de producir un aumento en la producción de óxido nítrico e infiltración leucocitaria en diversos tejidos (Salter y col., 1991). La mayor parte de ese NO liberado proviene de la actividad de la óxido nítrico sintasa

inducible (NOSi) y a diferencia de lo que ocurre con las otras dos isoformas conocidas, la NOSe y la NOSn, la liberación de NO por la NOSi es de mayor magnitud y más prolongada en el tiempo (Alderton y col., 2001).

Se ha informado que la expresión basal de la NOSi en el útero y la producción de NO se asocia con el mantenimiento de la quiescencia del órgano, necesaria para que la gestación llegue a término (Dong y col., 1996b; Farina y col., 2001; Izumi y col., 1995; Buhimischi y col., 1996).

En nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo murino de reabsorción embrionaria (RE) inducida por LPS (Ogando y col., 2003) que consiste en la administración de una única dosis de LPS (1 ug/g de peso) a hembras BALB/c en el día 7 de gestación. Éste puede ser considerado un modelo de RE temprana ya que apenas unas horas antes de administrar la endotoxina se ha iniciado el proceso de gastrulación del embrión.

La dosis de LPS utilizada produce un 100 % de RE a las 24 h, induciendo necrosis total del embrión y de la mayor parte de la decidua. Los restos son expulsados 48 h después de haberse administrado el LPS y la madre recupera la capacidad gestacional.

La RE inducida por LPS cursa con un incremento significativo en la producción decidual y uterina de NO, el cual alcanza su máximo nivel a las 6 h post-inyección. Este incremento es acompañado por un aumento en la expresión proteica de la NOSi en ambos tejidos (Ogando y col., 2003). Por inmunohistoquímica se observan infiltrados deciduales de macrófagos y granulocitos, NOSi y CD14 positivos que son parte del exudado.

Por otro lado, la administración de aminoguanidina (AG), un inhibidor selectivo de la actividad de la NOSi, revierte completamente la RE inducida por LPS. La inhibición en la síntesis de NO reduce significativamente la fibrinólisis e infiltración del tejido, visualizándose una matriz extracelular mucho menos dañada.

En conjunto, estos datos sugieren que el NO participa en el proceso de reabsorción embrionaria inducido por el LPS.

4.5.- Endocannabinoides y NO.

Se ha informado que la AEA aumenta la síntesis de NO en células endoteliales renales de rata (Deutsch y col., 1997) y en líneas celulares endoteliales humanas (Fimiani y col., 1999).

Carney y col. (2009) demostraron que agonistas de los receptores de cannabinoides inducen la producción de NO por acción de la NOSn en células de la línea celular N18TG2 (neuroblastoma murino).

Como hemos mencionado anteriormente, en nuestro laboratorio hemos observado que la anandamida modula la producción de NO en la placenta de la rata (Cella y col., 2008).

Estos datos sugieren que la anandamida podría estar participando del efecto deletéreo del LPS sobre el tejido embrionario.

5.- LAS PROSTAGLANDINAS.

5.1.- Estructura.

Las prostaglandinas (PGs), como también los tromboxanos (TXs) y los leucotrienos (LTs) se denominan genéricamente eicosanoides, palabra que deriva del griego *eico* que significa 20 (Gimeno y col., 1985). Todos ellos son derivados de ácidos grasos de 20 carbonos sintetizados por las células animales a partir de ácidos grasos esenciales poliinsaturados (AGEPI). Las prostaglandinas fueron aisladas por primera vez de fluido seminal y deben su nombre a la creencia de que formaban parte de las secreciones de la próstata.

Las prostaglandinas poseen el esqueleto básico del ácido prostanoico, molécula hipotética de 20 átomos de carbono formando un anillo ciclopentano con un carboxilo y una cadena lateral alifática. Las distintas sustituciones del ciclopentano permiten que las prostaglandinas se identifiquen con letras del alfabeto: A, B, C, D, E, F, G y H. Las variantes descubiertas se diferencian por pequeños cambios en la metilación u oxidación de sus cadenas carbonadas. Los carbonos se numeran del 1 al 20 comenzando por el grupo carboxilo y terminando por el grupo metilo; por ejemplo, la PGE se diferencia de la PGF únicamente por la presencia de un grupo cetónico en el noveno carbono de la PGE, mientras que en la PGF hay un grupo hidroxilo en la misma posición.

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

Debido a la carencia de técnicas analíticas adecuadas y a los acontecimientos sociales de la época, las respuestas sobre la estructura química de estos compuestos recién llegó a fines de la década del 50 cuando Bergström y Sjövall aislaron, a partir de la vesícula seminal de oveja, dos de estas sustancias que denominaron PGE y PGF, ya que fueron separadas por técnicas de partición en éter dietílico y buffer fosfato respectivamente.

Durante la siguiente década, se descubrió una gran diversidad de actividades biológicas de las PGs, así como también las estructuras químicas de cada uno de los miembros de esta familia.

Hoy en día se sabe que todas las células menos los glóbulos rojos producen PGs, y son consideradas potentes mensajeros lipídicos involucradas tanto en procesos fisiológicos como patológicos. Entre ellos se pueden mencionar: función renal (Smith, 1989; Adam y Wolfram, 1984), inflamatoria e inmune (Kuehl y Egan, 1980), reproductiva, contracción o relajación del músculo liso intestinal, uterino, bronquial y cardíaco, regulación del flujo sanguíneo, liberación de hormonas (Olofsson y Leung, 1994) y estimulación de las funciones plaquetarias (Samuelsson y col., 1975).

5.2.- Metabolismo de las PGs.

5.2.1.- Biosíntesis.

El ácido araquidónico (AA) es uno de los principales AGEPI y proviene del ácido linoleico de la dieta o se incorpora preformado al organismo humano cuando se consumen carnes rojas, grasas animales o aceites no marinos. Se absorbe en el intestino y pasa al plasma sanguíneo, en donde se combina con la albúmina. Así, puede ingresar a los tejidos y llegar a constituir parte de los lípidos de depósitos tisulares acilado a fosfolípidos, triglicéridos y ésteres de colesterol.

La mayor parte del AA se encuentra esterificado en la posición sn-2 de fosfolípidos celulares. Esto significa que no se encuentra libre, sino que ocupa sitios específicos, desde los cuales debe ser 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.

Pueden plantearse tres mecanismos principales que intervienen en la liberación de AA (figura 12):

- I. asociado con PLA₂ (fosfolipasa A₂), que libera araquidonato y deja un residuo de lisofosfolípido.
- II. la acción secuencial de una PI-PLC (fosfoinositol-fosfolipasa C) más digliceridolipasas (DGL) que genera AA y mono-acil-glicerol.
- III. intervención de una PLC específica, una DGL y digliceridocinas, fosfato inorgánico y ATP, que producen ácido fosfatídico (AF), el cual actúa como segundo mensajero provocando la liberación de Ca²⁺ de los depósitos intracelulares. A su vez el Ca²⁺ provoca la activación de una PLA₂ que moviliza finalmente el AA (Irvine 1982; Lapetina 1982).

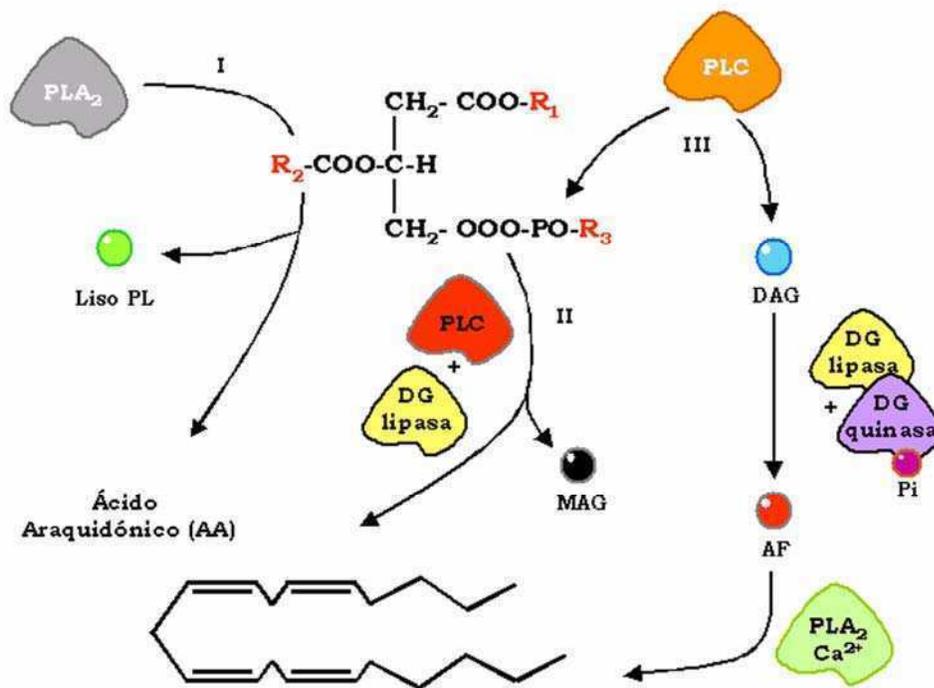


Figura 12.- Vías de síntesis de las PGs. PLA₂, fosfolipasa A₂; Liso PL, lisofosfolípido; PLC, fosfolipasa C; DG lipasa, digliceridolipasa; MAG, monoacilglicerol; DAG, diacilglicerol; AF, ácido fosfatídico.

Aunque el AA puede ser liberado por diversas fosfolipasas, las más estudiadas en tejido gestacional incluyen la PLA₂ secretoria (Tipo II y IV) y la PLA₂ citosólica (Rice, 1995). Estas, responden a diversos estímulos como lesiones

celulares, citoquinas y factores de crecimiento. La hidrólisis de los fosfolípidos parece ser la reacción limitante y por ende la más regulada en la formación de eicosanoides.

Una vez liberados, los ácidos grasos pueden sufrir distintos procesos, pero el AA libre sufre principalmente una oxidación enzimática que puede seguir dos vías separadas (Gimeno, 1985) (figura 13):

- la **vía metabólica cíclica** correspondiente a la etapa de formación de eicosanoides por ciclación dando lugar específicamente a las PGs y los tromboxanos.
- la **vía metabólica lineal** que incluye los procesos de metabolismo oxidativo a cargo de:
 - las *lipooxigenasas*, dando origen a los leucotrienos, las lipoxinas y los hidroxiácidos (HETEs) e hidroxiperoxiácidos (HPETEs).
 - las *epooxigenasas*, que dan origen a epoxiácidos, hidroperóxidos conjugados e hidroácidos conjugados.

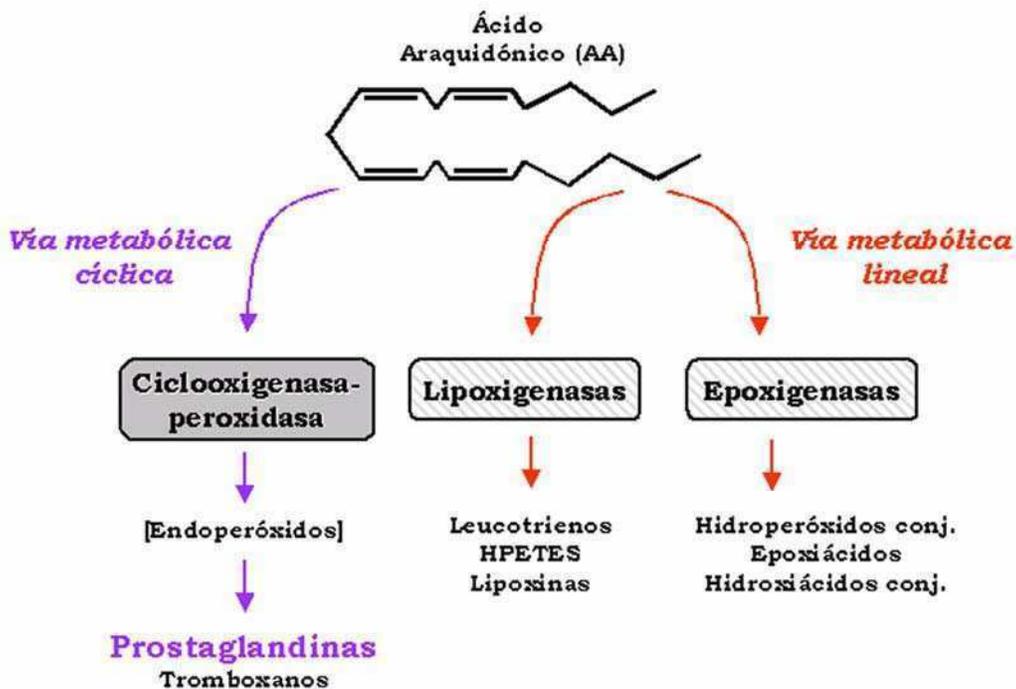


Figura 13.- Metabolización del ácido araquidónico.

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 enzima ampliamente distribuida en células y tejidos de mamíferos con excepción de los glóbulos rojos. Existe como homodímero y cada unidad tiene un peso molecular de aproximadamente 70 kDa (Wu, 1995).

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

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

Aunque la distribución de la COX es muy amplia, la transformación enzimática de los endoperóxidos en prostanoides 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 PGH₂ 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). Esta enzima es de expresión constitutiva pero regulada (Wu, 1995; Dong y Yallampalli, 1996b) y es una de las principales enzimas encargadas de la protección de las mucosas y del mantenimiento de la homeostasis celular (Whittle y col., 1980; Keneth, 1994).

La COX-2, por su parte, está selectivamente distribuida y se expresa, entre otros tejidos, en células endoteliales y macrófagos luego de la estimulación con LPS (Lee y col., 1992). Se induce también por citoquinas, factores de crecimiento, hormonas y oncogenes (Salvemini y col., 1993).

La secuencia de aminoácidos de la COX-2 en mamíferos posee aproximadamente un 60% de identidad con la de COX-1 y ambas tienen un tamaño de 600 aminoácidos en casi todas las especies. Por otro lado, existen muchas variantes de *splicing* especialmente estudiadas en el caso de la COX-1. Una de ellas, llamada “COX-3” consiste en el ARNm de la isoforma 1 que ha retenido un intrón. Esta variante de poca actividad ciclooxygenasa relativa, ha sido identificada en cerebro canino y humano (Chandrasekharan y col., 2002). También existen las llamadas *p*-COX-1 con deleciones parciales del sitio catalítico que, se sabe, no sintetizan prostaglandinas.

Los endoperóxidos lábiles, como el PGH₂, son transformados rápidamente en prostanoides con actividad biológica por acción de enzimas citoplásmicas específicas, o bien, en forma no enzimática.

Los 3 grandes grupos de mensajeros lipídicos generados son (figura 14):

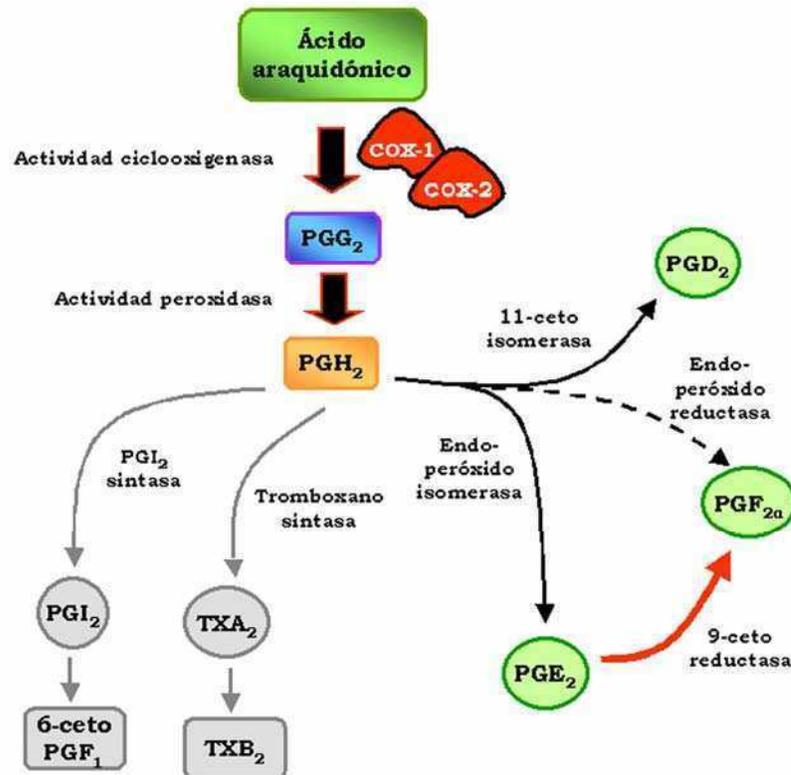


Figura 14.- Vía metabólica cíclica de transformación del AA en sus metabolitos activos.

- ✓ La prostaciclina (PGI_2), se sintetiza vía prostaciclina sintasa en el endotelio vascular y en las células del músculo liso. Se inactiva espontáneamente por hidrólisis (Katzung, 1992) y es un potente vasodilatador y anti-agregante plaquetario.
- ✓ El tromboxano A_2 (TXA_2), se forma por la acción de la tromboxano sintasa presente principalmente en plaquetas y macrófagos. Tiene efectos contrarios a la prostaciclina y, al igual que ella, se hidroliza rápidamente para formar el metabolito inactivo TXB_2 .
- ✓ Las prostaglandinas PGE_2 , PGD_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$. La $\text{PGF}_{2\alpha}$ se sintetiza tanto por vía enzimática como no enzimática. La PGE_2 se forma por la acción de la prostaglandina E sintasa en dos pasos: isomerización del endoperóxido y reducción. Hasta el momento se han identificado tres enzimas que sintetizan PGE_2 :

I. *PGESm-1* (Prostaglandina E Sintasa microsomal 1): clonada por primera vez en 1999 (Jakobsson y col., 1999), su actividad depende de la presencia de glutatión, pertenece a la superfamilia de proteínas MAPEG (**m**embrane-**a**ssociated **p**roteins involved in **e**icosanoid and **g**lutathione metabolism) (Pettersson y col., 2005) y su masa molecular es de 16 kDa. Su expresión se induce en varios tejidos por acción de citoquinas pro-inflamatorias o factores de crecimiento (Samuelsson y col., 2007) y por esta razón a veces se la denomina como la “*PGES* inflamatoria”.

II. *PGESm-2* (Prostaglandina E Sintasa microsomal 2): fue clonada en el año 2002 (Tanikawa y col., 2002) a partir de fracciones microsomales de corazón bovino y su actividad es independiente de glutatión (Watanabe y col., 1997). Es estructuralmente distinta a las otras dos isoformas, pesa 41 kDa y se expresa en varios tejidos incluyendo el cerebro (Watanabe y col., 1997).

III. *PGESc* (Prostaglandina E Sintasa citosólica): esta enzima de 23 kDa está presente en forma ubicua y constitutiva en el citosol de una variedad importante de tejidos y células (Tanioka y col., 2000). Trabajos

recientes muestran que su unión a la proteína Hsp90 o su fosforilación por la caseína quinasa II estaría modulando su actividad (Kobayashi y col., 2004; Tanioka y col., 2003). Es capaz de convertir el PGH₂ en PGE₂ proveniente de la actividad de la enzima COX-1 pero no de COX-2 (Tanioka y col., 2000).

En ciertos tejidos, la PGE₂ puede ser convertida en PGF_{2α} por acción de la 9-prostaglandina E₂-ceto-reductasa (EC 1.1.1.189, 9-PKR), en una reacción reversible. Las propiedades fisico-químicas de esta enzima se han descrito en varios tejidos de mamíferos como en el riñón del cerdo, la placenta humana y el cuerpo lúteo del conejo entre otros (Kankofer y col., 1999). La importancia biológica de la 9-PKR parecería estar relacionada con la regulación de los niveles de PGE₂ y PGF_{2α} y su proporción (PGE₂/PGF_{2α}) en las células. De esta manera, la proporción de estos mediadores más que la concentración alcanzada por cada uno podría ser crítica en múltiples funciones biológicas, como la contractilidad del miometrio, dado que ambas PGs ejercen efectos estimuladores potentes sobre el músculo liso (Gimeno y col., 1985).

5.2.2.- 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.

La aspirina (ácido acetilsalicílico), la indometacina y el ibuprofeno pertenecen a un grupo de fármacos conocidos como AINEs o anti-inflamatorios no esteroideos (Reece y col. 1996, Keneth 1994). Se los llama así para diferenciarlos de la otra gran familia de anti-inflamatorios, la formada por la cortisona y sus derivados, que se denominan esteroides o glucocorticoides. Los AINEs clásicos son uno o dos órdenes de magnitud más potentes en la inhibición de COX-1 que de COX-2, lo cual en general ocasiona lesiones gástricas. Debido a estas consecuencias no deseables, varios compuestos han sido desarrollados en busca de la inhibición selectiva de COX-2.

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

En la siguiente tabla se resumen las principales diferencias entre las dos isoformas de la COX.

	COX-1	COX-2
Expresión	Constitutiva, regulada	Inducible por citoquinas, factores de crecimiento, hormonas, oncogenes
Localización tisular	Generalizada	Macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, células de músculo liso.
Acción fisiológica	Protección de las mucosas, mantenimiento de las funciones y homeostasis normales	Ovulación, parto, situaciones patológicas particularmente inflamación
Glucocorticoides	No tienen efecto	Inhiben el proceso transcripcional y post-transcripcional
AINES clásicos: aspirina, indometacina, ibuprofeno.	Gran inhibición	Inhibición

5.2.3.- Catabolismo.

Un rasgo sobresaliente de los eicosanoides es la naturaleza transitoria de su existencia. El catabolismo de las PGs se produce primariamente en pulmones, hígado, riñones y placenta. Sin embargo, la expresión de la enzima encargada de inactivar inicialmente las PGs en tejidos periféricos sugiere un catabolismo local capaz de contribuir a la regulación de las mismas (Okita y Okita, 1996). El catabolismo *in situ* de las PGs permite una modulación rápida y directa de los mecanismos locales mediados por prostaglandinas.

La 15-hidroxi prostaglandina dehidrogenasa (15-PGDH) cataliza la oxidación del grupo 15-hidroxilo de las prostaglandinas y las convierte en metabolitos inactivos (Hansen, 1976). Este es el primer paso en la inactivación de las prostaglandinas (figura 15) y en general las concentraciones máximas de esta enzima se encuentran en bazo, pulmón y corteza renal. La expresión y actividad de la 15-PGDH también ha sido localizada en útero (Franchi, 1985), corion y trofoblasto placentar, mientras que en la preñez tardía también se encuentra presente en la decidua (Germain 1994; Cheung 1992). Los principales sustratos de la 15-PGDH son la PGE y la PGF.

El segundo paso en la degradación secuencial de las prostaglandinas es la reducción del doble enlace en la posición 13, por la 13,14-prostaglandina reductasa. Esta enzima es altamente específica y tiene una distribución tisular semejante a la de la 15-PGDH. El producto, la 13,14-dihidro-15-ceto-prostaglandina, forma metabolitos por β y ω oxidación, que son excretados por la orina (Okita y Okita, 1996).

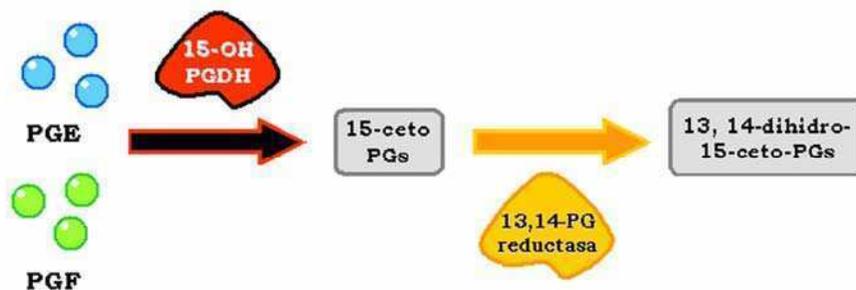


Figura 15.- Catabolismo de las prostaglandinas.

Se han descrito hasta el momento dos tipos de 15-PGDH:

- ✓ **Tipo I:** un homodímero NAD⁺ dependiente, inicialmente identificado en pulmón (Piper y col., 1970), cuyos sustratos primarios son las PGs y eicosanoides relacionados.

- ✓ **Tipo II:** una enzima citosólica monomérica NADP⁺ dependiente, descubierta en hígado humano (Lin y col., 1978), también llamada CR o Carbonil Reductasa. Esta enzima tiene una especificidad de sustrato mucho más amplia y posee un Km mucho más elevado por lo tanto, aparentemente no contribuye significativamente al catabolismo de las PGs (Tai y col., 2002). Sin embargo, la enzima CR tiene actividad 9-ceto-reductasa, siendo capaz de inactivar la PGE₂ convirtiéndola en PGF_{2α} (Terada y col., 2001).

Existen evidencias sobre la regulación de la expresión de la 15-PGDH uterina por esteroides sexuales (Matsuo y col., 1997; Greenland y col., 2000). El promotor del gen en ratón tiene elementos de respuesta a estrógenos y glucocorticoides. Durante la gestación en la mujer se han propuesto como reguladores positivos y negativos de su expresión, a la progesterona y el cortisol respectivamente (Greenland y col., 2000; Patel y col., 2002). La activación de la enzima durante casi la totalidad del periodo gestacional minimiza la contractibilidad miometrial uterina manteniendo controlados los niveles de PGs sintetizados por el amnios y el corion.

5.3.- Prostaglandinas y reproducción.

Las PGs son mediadores clave en los procesos de menstruación, ovulación e implantación, como también para el establecimiento y mantenimiento de la preñez y el inicio del parto (Arosh y col., 2004a y 2004b; Kang y col., 2005). Sin embargo, en procesos sépticos, las PGs son liberadas en grandes cantidades y tienen efectos abortivos (Aisemberg y col., 2007a) puesto que estimulan la contractilidad de miometrio.

Por sus propiedades uterotónicas y por la regulación positiva que ejercen sobre la expresión de los receptores a oxitocina (Blanks y Thornton, 2003), son utilizadas terapéuticamente para inducir el parto. Por esta razón, la PGE₂ y la PGF_{2α} pueden ser abortivas en las primeras semanas de embarazo (Katzung, 1992).

El dolor asociado a la menstruación o dismenorrea, es atribuido a un incremento en la síntesis de PGE₂ y PGF_{2α} por el endometrio. Por otro lado, se ha determinado también que la síntesis de PGF_{2α} uterina causa luteólisis y disminución de la producción de progesterona por parte del ovario (Auletta y col., 1973).

Se ha observado que ratones deficientes en COX-1, presentan retraso o dificultades al momento del parto, fenotipo que se revierte administrando PGF_{2α} (Gross y col., 2000). Sin embargo, el tratamiento con LPS induce la COX-2 y el parto procede incluso en estos animales, efecto que es bloqueado por el tratamiento con AINEs (Gross y col., 1998 y 2000).

Los ratones deficientes en COX-2 son infértiles. Casi ningún ovocito es fertilizado y en el caso de que ocurra fertilización, no hay implantación ni reacción decidual a nivel endometrial (Lim y col., 1997 y 1999; Davis y col., 1999).

5.4.- Prostaglandinas y endocannabinoides.

Como ya hemos mencionado anteriormente, los endocannabinoides participan en eventos fisiológicos como la implantación y el mantenimiento de la preñez (Wang y col., 2006b). Los componentes del sistema endocannabinoide (SEC) se han identificado y caracterizado en distintos tejidos gestacionales (Helliwell y col., 2004; Mitchell y col., 2008).

Por otro lado, está ampliamente documentado que las PGs juegan un papel crítico en múltiples aspectos de la preñez, incluyendo el parto a término y pre-término y que las membranas fetales tienen un rol fundamental en la producción intrauterina de PGs.

La relación entre los endocannabinoides y las PGs aún no es clara y varía según el tejido y la especie en estudio. Se ha informado que tanto los cannabinoides como la AEA estimulan la liberación de ácido araquidónico en varios tipos celulares (Diaz y col., 1994; Felder y col., 1992 y 1993; Wartmann y col., 1995; Hunter y Burstein, 1997; Chan y col., 1998) y este evento puede o no ocurrir vía la activación de receptores de cannabinoides.

Estudios recientes muestran que la AEA y la meta-AEA (un análogo sintético no hidrolizable de la AEA) inducen la expresión de COX-2 por mecanismos que involucran a los receptores CB y por mecanismos no mediados por estos receptores en células de cáncer de pulmón, en células de neuroglioma y en mastocitos (Gardner y col., 2003; Hinz y col., 2004a y b; Ramer y col., 2001 y 2003; Vannacci y col., 2004).

En cuanto a la producción de PGs, Someya y col. (2002) mostraron que la AEA induce la formación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en células de la línea celular PC12. Por otro lado, la AEA aumentaría la producción de PGE_2 en corion pero disminuiría los niveles de este mediador en decidua humana (Mitchell y col., 2008).

En resumen, más allá de los avances logrados en el entendimiento de los mecanismos moleculares del sistema endocannabinoide y su relación con el camino biosintético de las PGs, los mecanismos de diálogo entre ambos sistemas son un campo de exhaustiva investigación.

hipótesis y objetivos

Hipótesis y Objetivos

✘ En nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo murino de reabsorción embrionaria inducida por LPS (Ogando y col., 2003) que consiste en la administración de una única dosis de LPS (1 ug/g de peso) a hembras BALB/c en el día siete de gestación. La dosis de LPS utilizada produce 100 % de reabsorción embrionaria (RE) a las 24 h provocando la necrosis del embrión y de la mayor parte de la decidua. Los restos son expulsados 48 h después de haber administrado el LPS y la madre recupera su capacidad gestacional.

✘ El LPS es capaz de inducir la síntesis de anandamida (AEA) en linfocitos humanos (Maccarrone y col., 2001) y macrófagos murinos y también de aumentar la actividad de la NAPE-PLD, una de las enzimas que sintetiza AEA, en este último tipo celular (Liu y col., 2003). La AEA es importante en los procesos de implantación y desarrollo embrionario pero niveles elevados de esta molécula en el útero perjudican ambos procesos antes mencionados (Paria y col., 1996; Schmid y col., 1997).

✘ La RE inducida por LPS cursa con un incremento significativo en la producción decidual y uterina de NO, el cual alcanza su máximo nivel a las 6 h post-inyección. Este incremento es acompañado por un aumento en la expresión proteica de la NOSi en ambos tejidos (Ogando y col., 2003). También observamos por inmunohistoquímica infiltrados deciduales de macrófagos y granulocitos, NOSi y CD14 positivos que son parte del exudado. Hemos descrito recientemente que la AEA modula la producción de NO en la placenta de la rata (Cella y col., 2008).

✘ Las prostaglandinas (PG) son particularmente importantes en los eventos reproductivos por ser mediadores fundamentales en los procesos de menstruación, ovulación e implantación; también contribuyen al establecimiento y mantenimiento de la preñez y al inicio del parto (Arosh y col., 2004a y 2004b; Kang y col., 2005). Pero en situaciones de sepsis, las PGs son liberadas en grandes cantidades y tienen efectos abortivos puesto que estimulan la contractilidad del miometrio (Bygdeman y col., 2003; Tsatsanis y col., 2006). En este sentido, nuestro grupo ha demostrado que el LPS produce un aumento en los niveles de PGE₂ y PGF_{2α}, tanto en el útero como en la

decidua, y estos mediadores participarían de la RE inducida por la endotoxina (Aisemberg y col., 2007a). Estos resultados sugieren que la isoforma involucrada en el aumento de los niveles de estas prostaglandinas sería la COX-2.

✘ Someya y col. (2002) han demostrado que la AEA induce la formación de PGF_{2α} en células de la línea celular PC12. La AEA tiene un efecto dual sobre la producción de PGE₂ aumentándola en corion pero disminuyéndola en decidua humana (Mitchell y col., 2008). Si bien se ha reportado que tanto los cannabinoides como la AEA estimulan la liberación de ácido araquidónico en varios tipos celulares (Diaz y col., 1994; Felder y col., 1992 y 1993; Wartmann y col., 1995; Hunter y Burstein, 1997; Chan y col., 1998), la relación entre los endocannabinoides y las PGs aún no es clara.

En este contexto, nos planteamos la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS.

“La anandamida participa en la reabsorción embrionaria murina inducida por lipopolisacárido (LPS)”

OBJETIVOS.

Para la comprobación de la hipótesis propuesta decidimos realizar un abordaje *in vitro* de manera de estudiar el mecanismo por el cual la anandamida participa en el proceso antes mencionado y se plantearon los siguientes objetivos:

✘ Evaluar, en primera instancia, si el LPS modula la actividad y la expresión de algunos de los componentes del sistema endocannabinoide.

Considerando que en la RE inducida por el LPS tanto el sistema nitrérgico como el de las prostaglandinas están involucrados, nos propusimos:

- ✘ Analizar si la AEA modula la producción de NO y la expresión de las isoformas de la NOS.

- ✘ Determinar si la producción de NO inducida por LPS está modulada por la AEA.

- ✘ Investigar si la AEA modula la producción de prostaglandinas, particularmente la producción de PGE₂ y de PGF_{2α}, y la expresión de las enzimas que participan del metabolismo de estos mediadores.

materiales y métodos

1.- Drogas.

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

- Lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* 055:B5.
- Anticuerpos secundarios conjugados a fosfatasa alcalina.
- Antisueros de PGE₂ yPGF_{2α}.
- Nitrato Reductasa y Lactato Deshidrogenasa.
- R-(+)-Metanandamida.
- Hoescht 33342.
- NADPH.
- Naftil-etilendiamina (NEDA).
- Rojo Ponceau S.

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

La indometacina proviene de Laboratorios Montpellier.

El material radioactivo utilizado para los radioinmunoensayos (RIA), la síntesis de anandamida y la actividad de la hidrolasa de amidas de ácidos grasos fue obtenido de Amersham Corporation (Arlington Heights, II, USA) y Perkin Elmer:

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

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

Los anticuerpos utilizados para la detección de COX-1 y COX-2, el kit para la determinación del metabolito de PGE (Prostaglandin E Metabolite EIA Kit), el 1400W y el anticuerpo anti- *N*-araquidonil fosfatidiletanolamina fosfolipasa D (NAPE-PLD) fueron suministrados por Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA).

Los anticuerpos contra NOSi, NOSe, NOSn y PGESm-1 fueron provistos por BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA).

El antagonista del receptor de cannabinoides CB1, AM251, se adquirió en Tocris Cookson Inc. (Ellisville, MO, USA) y el de CB2, SR144528, fue gentilmente donado por Sanofi-Aventis.

El anticuerpo anti-nitrotirosina fue suministrado por Upstate Biotechnology Inc. (Lake Placid, NY, USA).

Los anticuerpos anti 15-PGDH y anti-FAAH fueron gentilmente donados por el Dr. Daniel Tai y los Dres. Cecilia Hillard y Benjamín Cravatt respectivamente.

Los insumos para cultivo: DMEM sin rojo fenol, el suero fetal bovino y el mix de antibiótico + antimicótico (Penicilina G 20 U/ml, Estreptomina 20 ug/ml, Amphotericina B 50 ng/ml) fueron suministrados por GIBCO Invitrogen Carlsbad, CA, USA).

Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

2.- Soluciones y medios.

• Líquido de centelleo para muestras acuosas y sólidas.

Optiphase HiSafe 3 de PerkinElmer.

• Buffer fosfato (PBS)

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

• Buffer de inhibidores para muestras de Western Blot.

PBS; EDTA 1 mM; aprotinina 2 µg/ml; leupeptina 20 µM; DTT 5 mM; STY2 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 Ponceau S.**

Rojo Ponceau 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 para PGs.**

K₂HPO₄•3H₂O 7,3 mM; KH₂PO₄ 2,7 mM; NaCl 154 mM; albúmina bovina 7,1 mM; azida sódica 15,4 mM. pH=7,4

• **Buffer TAE 50X.**

Tris base 24,2 g; ácido acético glacial 5,7 ml; EDTA 1,861 g. Llevar a 100 ml con agua destilada.

3.- Animales utilizados.

Se utilizaron hembras BALB/c y CD1 vírgenes de entre 8 y 12 semanas de edad (25-30 g de peso). Estas hembras se aparearon con machos adultos fértiles de la misma cepa. La cópula en ratones se comprueba por la presencia de un tapón vaginal detectado en la mañana del día siguiente, el cual en nuestro modelo fue designado como día 0 de preñez. La gestación tiene una duración de aproximadamente 19 días.

Los animales se mantuvieron bajo un régimen de luz:oscuridad 14h:10h, temperatura constante (23-25°C) y alimento y agua *ad libitum*. Los mismos fueron sacrificados por dislocación cervical.

4.- Técnicas.

4.1.- Cultivo de tejidos.

Luego de sacrificar los animales, se extrajeron los cuernos uterinos, se individualizaron los sitios de implantación y se separó el útero de la decidua. Los tejidos fueron inmediatamente pesados y cultivados de a pares en placas de 24 pozos conteniendo 500 μ l de DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibiótico/antimicótico al 1%. Los explantos fueron mantenidos en estufa gaseada (5% CO₂) a 37°C durante los tiempos de incubación mencionados en cada caso. Se recuperaron los sobrenadantes y los tejidos y se congelaron a -70°C hasta su utilización.

4.2.- Medición de NO₃+NO₂. Reacción de Griess.

La formación de NO producido por los tejidos puede cuantificarse a través de la medición de nitratos (NO₃) y nitritos (NO₂), dos productos primarios y no volátiles que genera el metabolismo del NO.

Una de las técnicas más utilizadas para su detección es la reacción de Griess, un método colorimétrico que permite detectar nitritos en distintos tipos de fluidos biológicos y experimentales como plasma, suero, orina y sobrenadantes de cultivo. El ensayo requiere de 2 pasos enzimáticos: el primero utiliza la Nitrato Reductasa dependiente de NADPH para reducir los nitratos a nitritos y poder estimar la producción total real. Como el NADPH interfiere con los reactivos que generan color en el ensayo, debe ser removido. Para ello, se utiliza la Lactato Deshidrogenasa que oxida al NADPH. Para el ensayo, 100 μ l de sobrenadante de cultivo se incubaron durante 30 minutos en agitación constante con 5 μ l de NADPH 2 mM y 5 μ l de Nitrato Reductasa (de *Aspergillus* 10 UI/ml). Luego se agregaron 10 μ l de Ácido pirúvico 100 mM y 10 μ l de

Lactato Deshidrogenasa (1000 U/ml). Finalmente, se adicionaron 50 µl de Ácido Sulfanílico (10 mg/ml) y se reveló agregando 50 µl de Naftil-etilendiamina (NEDA) (1 mg/ml) por 5 min en oscuridad y agitación constante. El producto coloreado se leyó a 540 nm. La concentración de NO₂ se dedujo de una curva estándar de nitritos que se realizó en paralelo a las muestras. Los resultados se expresaron como µM/mg de tejido (peso húmedo) (Grisham y col, 1996).

4.3.- RT-PCR

Las muestras de úteros y deciduas se homogeneizaron directamente en TRIZOL (Invitrogen, California, USA) manteniéndolas en frío. Se realizó la extracción del ARN total de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se retrotranscribió el material utilizando la enzima M-MLV (transcriptasa reversa, Invitrogen, California, USA). Las amplificaciones del ADNc se realizaron con los cebadores (primers) y las condiciones adecuadas para cada caso. Se realizaron controles negativos y en paralelo la RT-PCR de la β-actina como referente. Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 1,5 % con bromuro de etidio (1 mg/ml). Los geles se fotografiaron con cámara digital bajo luz UV y la intensidad de las bandas se cuantificó utilizando el programa Image J (Libre acceso, NIH). Las bandas correspondientes a cada ARNm se normalizaron contra la banda correspondiente a la actina.

Cebadores utilizados:

	Secuencia	Tamaño del producto
FAAH	5'-GAG ATG TAT CGC CAG TCC GT-3' (<i>f</i> forward) 5'-ACA GGC AGG CCT ATA CCC TT-3' (<i>r</i> reverse)	287 pb
CB1	5'-ACC TGA TGT TCT GGA TCG GA-3' (<i>f</i>) 5'-TGT TAT CTA GAG GCT GCG CA-3' (<i>r</i>)	450 pb
CB2	5'-CCG GAA AAG AGG ATG GCA ATG AAT-3' (<i>f</i>) 5'-CTG CTG AGC GCC CTG GAG AAC-3' (<i>r</i>)	479 pb
COX-1	5'-TGC ATG TGG CTG TGG ATG TCA TCA A-3' (<i>f</i>) 5'-CAC TAA GAC AGA CCC GTC ATC TCC A-3' (<i>r</i>)	449 pb

COX-2	5'-TCC TCC TGG AAC ATG GAC TC-3' (<i>f</i>) 5'-CCC CAA AGA TAG CAT CTG GA-3' (<i>r</i>)	320 pb
β -actina	5'-TGT TAC CAA CTG GGA CGA CA-3' (<i>f</i>) 5'-TCT CAG CTG TGG TGG TGA AG-3' (<i>r</i>)	392 pb
PGESm-1	5'-GGG TCC CAG GAA TGA GTA CA-3' (<i>f</i>) 5'-TTT CTG CTC TGC AGC ACA CT-3' (<i>r</i>)	237 pb
PGESm-2	5'-CAG GTA CCA AGG CTG GAT GT-3' (<i>f</i>) 5'-CAC CTG CAG GAT GAT GTA CG-3' (<i>r</i>)	201 pb
PGESc	5'-AAA ATC CAG GCG ATG ACA AC-3' (<i>f</i>) 5'-TTG GAA AGA CTG GGA GGA TG-3' (<i>r</i>)	194 pb
NAPE-PLD	5'-ATG AGA ACA GCC AGT CTC CA-3' (<i>f</i>) 5'-CCA TTT CCA CCA TCA GCG TC-3' (<i>r</i>)	407 pb
15-PGDH	5'-GTT CGT CCA GTG TGA TGT GG-3' (<i>f</i>) 5'-CAC CTC CGT TTT GCT TAC TCA-3' (<i>r</i>)	209 pb

4.4.- Western Blot.

4.4.1.- Procesamiento de las muestras.

Los úteros y las deciduas fueron homogenizados en buffer de inhibidores para muestras de WB, sonicados por 30 seg y centrifugados a 10000 x g durante 10 min. Los sobrenadantes se guardaron a -20°C previa determinación de los niveles proteicos de cada muestra por el método de Bradford (1976).

4.4.2.- Separación electroforética de las proteínas.

Para todos los western blots, las muestras se procesaron para su separación electroforética en buffer muestra y se hirvieron durante 5 min. La separación se realizó en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) según la técnica descrita por Laemmli (1970), sembrando 100 ug de proteína por calle. Las muestras se corrieron en geles cuyo porcentaje dependió del peso molecular de la proteína a detectar (NOSi, NOSe y NOSn: 7.5 %; COX, FAAH, NAPE-PLD y NT: 10 %, 15-PGDH y PGESm-1: 12 %). La electroforesis se llevó a cabo en buffer de corrida a amperaje constante y a temperatura ambiente.

4.4.3.- Electrotransferencia de las proteínas.

Finalizada la corrida las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μm utilizando el sistema de transferencia húmedo (Mini-Protean III de Bio-Rad) a voltaje constante y a 4°C durante 18 h (30 V) o 1 h y 30 min (100 V). Finalizada la transferencia las membranas se tiñeron con el colorante reversible Rojo Ponceau S durante 1 min para corroborar que la transferencia se realizó correctamente y que la cantidad de proteínas totales fue similar entre las calles sembradas. Luego se lavaron repetidamente con agua corriente y solución de lavado (TTBS), y se incubaron en solución de bloqueo (TBS con 5% de leche descremada) durante 1 h a temperatura ambiente.

4.4.4.- Detección inmunológica.

Posteriormente las membranas se lavaron para ser incubadas con los respectivos anticuerpos primarios durante 18 h a 4°C.

Anticuerpo	Dilución empleada
FAAH	1:100
NAPE-PLD	1:200
COX-1	1:200
COX-2	1:100
15-PGDH	1:200
NT	1:800
NOSi	1:100
NOSe	1:100
NOSn	1:200
PGESm-1	1:200

Los anticuerpos primarios son policlonales desarrollados en conejo y las diluciones de los mismos se realizaron en TBS. Luego de la incubación, las

membranas se lavaron tres veces por 10 min en TTBS y posteriormente se incubaron por 15 min con anticuerpo anti-actina (1:4000) y se volvieron a lavar. Luego las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario diluido en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Se utilizó un anti-IgG de conejo en una dilución 1/5000 acoplado a peroxidasa. 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.

4.4.5.- Identificación de las bandas proteicas.

Las membranas se revelaron por quimioluminiscencia y las bandas obtenidas se identificaron mediante un marcador de peso molecular y se verificó su peso molecular por su valor de relación de frentes (Rf: distancia recorrida en mm por la proteína a determinar/distancia recorrida en mm por la proteína patrón) aplicando una regresión logarítmica.

Las membranas se fotografiaron con máquina digital y la intensidad de las bandas se cuantificó utilizando el programa Image J. Las bandas correspondientes a cada proteína se normalizaron contra la banda correspondiente a la actina (42 kDa). Los resultados se expresaron como la densidad óptica de la proteína analizada relativa a la actina.

4.5.- Radioinmunoensayo (RIA).

Por esta técnica se determinó la cantidad de PGE₂ y PGF_{2α} (Jaffe y Behrman, 1974) liberada por el útero y la decidua utilizando antisueros específicos. Los niveles de PGs se determinaron directamente en los sobrenadantes de los cultivos.

Se preparó una solución madre del estándar respectivo (8000 pg/ml) a partir de la cual se hicieron diluciones seriadas al medio hasta llegar a 7,5 pg/ml para la curva de calibración. En tubos de propileno se adicionaron 0,1 ml de los estándares o de la muestra con el antisuero correspondiente (anti-PGE₂ o

anti-PGF_{2α}) reconstituido en buffer RIA y se incubaron por 30 min a 4°C. Posteriormente se agregó la prostaglandina marcada durante 1 h y finalmente una suspensión de carbón activado 1%-dextran 0,1%, que separa la prostaglandina unida de la libre. Las muestras se centrifugaron a 2000 x g durante 15 min a 4°C en centrífuga refrigerada (Sorvall RC-5B) y el sobrenadante se volcó en viales conteniendo 1 ml de líquido de centelleo para muestras acuosas.

La radioactividad se midió en un contador de centelleo beta. Luego de una transformación logarítmica los datos se expresaron como pg de prostaglandina/mg de peso húmedo. El método tiene una reactividad cruzada menor al 0,1% y una sensibilidad de 5 pg/tubo con una Ka= 1,5 x 10¹⁰ L/mol.

4.6.- Determinación de la actividad de la anandamida sintasa.

La síntesis de anandamida fue determinada, con modificaciones menores, según la técnica descrita previamente por distintos grupos (Ribeiro y col., 2009; Fernández Solari y col., 2004; Paria y col., 1996). 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 Tris/HCl 50 µM (pH=9) conteniendo etanolamina 20mM y una mezcla de [¹⁴C]-ácido araquidónico 40 µM y 20 nmoles de ácido araquidónico frío. La reacción se detuvo 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 puro.

Luego de llevar a sequedad, las muestras se resuspendieron en cloroformo y se sembraron en placas de cromatografía de capa delgada (TLC) Silica Gel 60 de aluminio con zona concentradora (Merk KgaA. Darmstadt, Germany). Las placas se corrieron en la fase orgánica de un sistema de solventes compuesto por acetato de etilo:hexano:ácidoacético: agua destilada (100:50:20:100 v/v). Los lípidos fueron visualizados por tinción con yodo, identificados por comigración con estándares de AA y AEA y raspados de la placa y cuantificados en un contador de centelleo líquido. Los Rf 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/h/mg de proteína.

Previamente se determinaron las condiciones óptimas de reacción (tiempo de incubación, concentración de proteínas, etc.).

4.7.- Determinación de la actividad de la hidrolasa de amidas de ácidos grasos (FAAH).

La actividad de la FAAH fue determinada 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 (1976). Se incubaron 100 µg de proteínas durante 15 minutos a 37°C en 200 µl de buffer Tris/HCl 50 mM (pH=8,5) que contenía [³H]-anandamida 100 µM 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 puro.

Luego de llevar a sequedad, las muestras se resuspendieron en cloroformo y se sembraron en placas de cromatografía de capa delgada (TLC) Silica Gel 60 de aluminio con zona concentradora (Merk KgaA. Darmstadt, Germany). 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 visualizados por tinción con yodo, identificados por co-migración con estándares de AA y etanolamida y raspados de la placa y cuantificados en un contador 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/mg de proteína.

Previamente se determinaron las condiciones óptimas de reacción (tiempo de incubación, concentración de proteínas, etc.).

4.8.- Cuantificación del metabolito de PGE₂ (PGEM).

La prostaglandina E₂ es producida por una gran variedad de células y puede ser rápidamente convertida por la 15-PGDH en 15-ceto-PGE₂ (metabolito biológicamente inactivo). La enzima 15-oxoprostaglandina Δ^{13} -reductasa transforma luego este metabolito en 13,14-dihidro-15-ceto-PGE₂ (PGEM), cuya producción fue determinada por la conversión del mismo en un derivado fácilmente cuantificable por EIA. Esta determinación se basa en un ensayo de competición entre el PGEM y un PGEM-acetilcolinesterasa (trazador) para un limitado número de sitios de unión al antisuero específico. Dado que las concentraciones del trazador son constantes, mientras que las del PGEM varían, las cantidades de trazador que pueden unirse cambian de forma inversamente proporcional a la concentración del PGEM. Cuando se adiciona el sustrato de la acetilcolinesterasa, el producto reacciona generando un fuerte color amarillo que es cuantificado espectrofotométricamente a 415 nm. La intensidad de color es proporcional a la cantidad de trazador unida a la placa, la cual es inversamente proporcional a las cantidades de PGEM presentes en la muestra. Los valores obtenidos fueron expresados como pg de PGEM/mg de tejido húmedo.

4.9.- Determinación de la actividad de 9-ceto-prostaglandina reductasa (9-PKR).

Los tejidos fueron pesados (\approx 100 mg) y homogeneizados a 4°C en buffer de homogenización (100 mM Na₂HPO₄, 1 mM EDTA, 10mM β -mercaptoetanol, 10% glicerol, pH=7,4). Los homogenatos fueron luego centrifugados a 10000 x g a 4°C durante 10 minutos. Los sobrenadantes fueron utilizados inmediatamente para ensayar la actividad enzimática, previa extracción de una alícuota para cuantificación de proteínas por el método de Bradford (1976). La mezcla de incubación contiene 60 μ l de muestra (sobrenadante), buffer de homogenización, 200000 dpm [³H]-PGE₂ y NADPH 3 mM. Esta mezcla se incubó a 37°C en agitación durante 30 minutos.

Al finalizar el tiempo de incubación las muestras se acidificaron con 100 μ l de

HCl 6 N para detener la reacción. Las prostaglandinas fueron extraídas 3 veces con acetato de etilo.

Luego de llevar a sequedad, las muestras se resuspendieron en cloroformo y se sembraron en placas de cromatografía de capa delgada (TLC) Silica Gel 60 de aluminio con zona concentradora (Merk KgaA. Darmstadt, Germany). Las placas se corrieron en la fase orgánica de un sistema de solventes compuesto por cloroformo:metanol:ácido acético: agua destilada (90:9:1:0,65). Las prostaglandinas fueron visualizadas por tinción con yodo, identificados por comigración con estándares y raspados de la placa y cuantificados en un contador de centelleo líquido. Como la [³H]-PGF_{2α} es rápidamente metabolizada a su metabolito, [³H]-PGFM, la actividad enzimática se expresó como fmol de cada mediador/mg de proteína/h.

4.10.- Determinación de la actividad de la sintasa de prostaglandina E₂ (PGES).

La actividad de la PGES fue determinada según lo descrito por Murakami y col. (2000) con modificaciones menores. Brevemente, los tejidos fueron homogeneizados en buffer Tris-HCl 10 mM (pH=8) y los homogenatos fueron luego centrifugados a 10000 x g a 4°C durante 10 minutos. Los sobrenadantes fueron utilizados inmediatamente para ensayar la actividad enzimática, previa extracción de una alícuota para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford (1976). Se incubaron 100 µg de proteínas con 2 µg de PGH₂ durante 60 segundos a 24°C en 0,1 ml de Tris-HCl 1 M (pH=8) conteniendo 2 mM de GSH. Las muestras se acidificaron con 20 µl de HCl 6 N para detener la reacción y las prostaglandinas fueron extraídas 3 veces con acetato de etilo.

Luego de llevar a sequedad, las muestras se resuspendieron en Buffer RIA de PGs y los niveles de PGE₂ se determinaron por radioinmunoensayo. La actividad enzimática se expresó como pg PGE₂ /mg de proteína/h.

4.11.- Inmunohistoquímica.

Se extrajeron los cuernos uterinos, se individualizaron los sitios de implantación y se separó el útero de la decidua. Los tejidos fueron fijados en solución de paraformaldehído al 4% toda la noche a 4°C. Se deshidrataron en gradiente creciente de alcoholes y se los incluyó en parafina. Se realizaron cortes de 4 μ m con micrótomo y se montaron en portaobjetos silanizados.

Se realizó una contra-coloración con hematoxilina durante 15 segundos para evaluar morfología del tejido. Se deshidrató y se montó en bálsamo de Canadá.

Para la realización de la técnica de tinción con Hoescht 33342, los tejidos fueron rehidratados e incubados con Hoescht 33342 (dilución de trabajo, 1:100; solución stock: 1 μ g/ml) durante 15 segundos. Los tejidos fueron luego montados en una mezcla de PBS:glicerol (1:9).

5.- 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 \pm SEM (error estándar de la media). Cuando $p < 0,05$ se consideraron significativas las diferencias entre las medias.

resultados

1.- El LPS modula la actividad y la expresión de algunos de los componentes del sistema endocannabinoide.

1.1.- Establecimiento de las condiciones óptimas de cultivo.

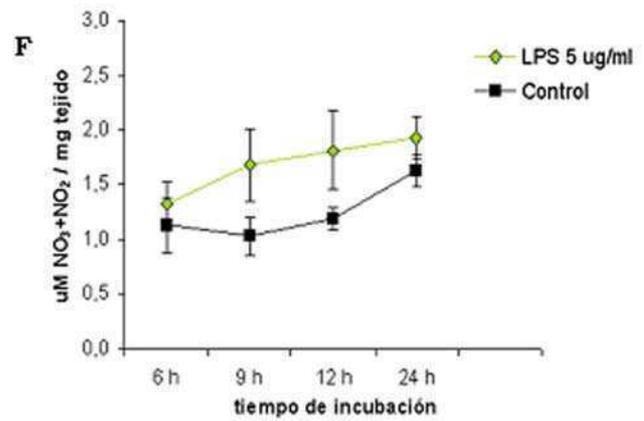
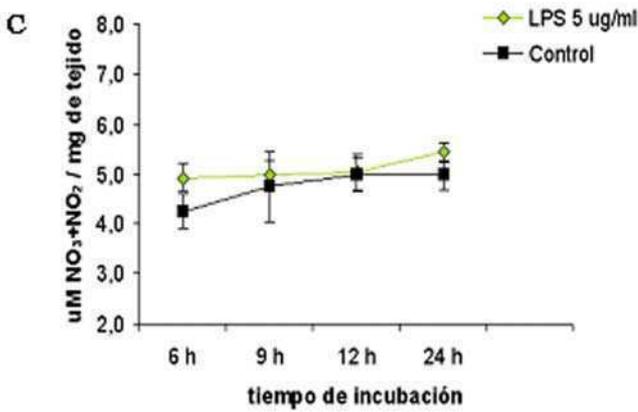
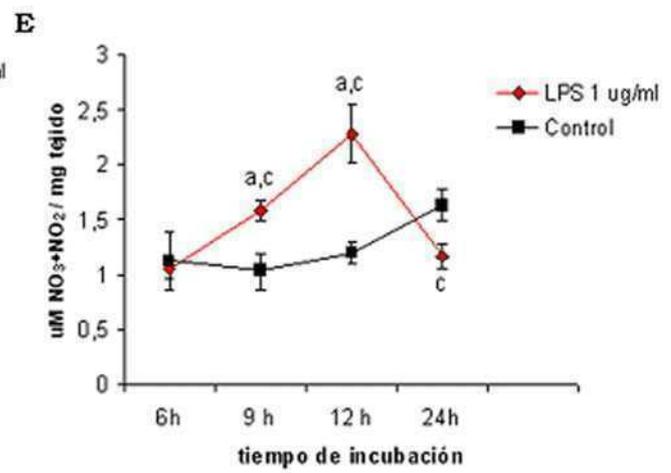
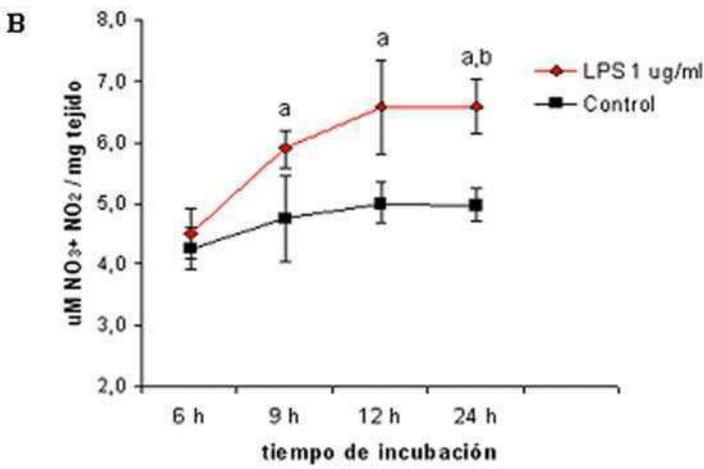
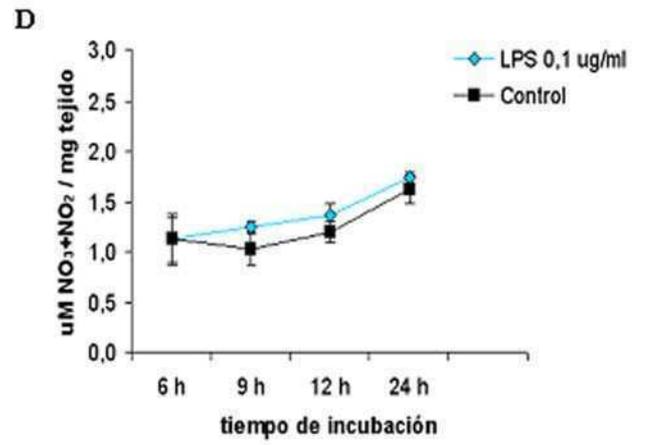
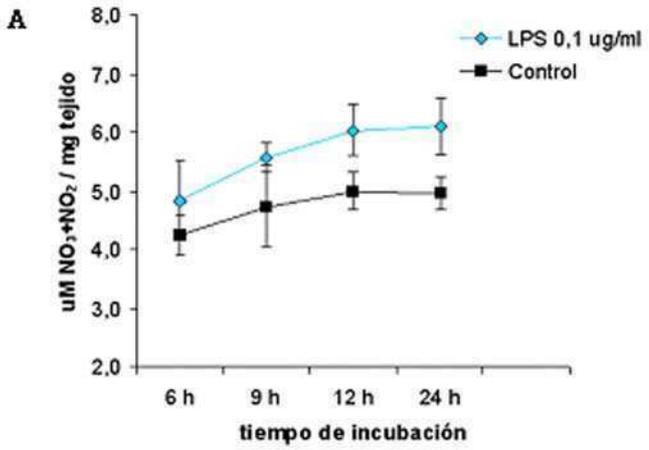
Los antecedentes planteados, sugieren que la AEA podría estar participando del efecto deletéreo del LPS sobre el tejido embrionario. Por esto, decidimos realizar un abordaje *in vitro* para estudiar si este endocannabinoide participa en el proceso antes mencionado y cual es su posible mecanismo de acción.

Teniendo en cuenta que el NO es uno de los mediadores que participa en el mecanismo de reabsorción embrionaria inducida por LPS, establecimos en una primera instancia las condiciones óptimas de cultivo realizando una curva concentración-respuesta del LPS sobre la producción de NO. El modelo experimental utilizado fue el siguiente: hembras BALB/c en el día 7 de gestación fueron sacrificadas, se extrajeron los cuernos uterinos, se individualizaron los sitios de implantación y se separó el útero de la decidua. Cada tejido fue incubado por separado como se detalló en la sección de *Materiales y Métodos* y se realizó una curva concentración-respuesta al LPS (0,1 ug/ml, 1 ug/ml y 5 ug/ml) a distintos tiempos determinando la producción de NO₃ + NO₂ en los sobrenadantes de cultivo por la técnica de Griess.

En la figura 1 podemos observar que la endotoxina produjo un aumento de la producción de NO en función del tiempo solamente con la concentración de LPS 1ug/ml. Para los **explantos uterinos**, la máxima producción de NO₃ + NO₂ fue a las 24 h de incubación con la endotoxina, mientras que para los **explantos de decidua**, la máxima producción fue a las 12 h de incubación. Por lo tanto, en los experimentos siguientes los tejidos fueron incubados con una concentración de LPS de 1 ug/ml durante 24 h y 12 h para los úteros y las deciduas respectivamente.

Útero

Decidua



1.2.- EL LPS modifica los niveles de ARNm de los receptores CB1 y CB2 .

A continuación, estudiamos si el LPS modificaba alguno de los componentes del SEC, condición necesaria para la participación de la AEA en el mecanismo de acción de la endotoxina.

Como se mencionó anteriormente, resultados previos de nuestro laboratorio muestran la presencia de CB1 y CB2 en el útero de ratón en la preñez tardía (Franchi y col., 2005). Fonseca y col. (2009) describieron la presencia de ambos receptores en la decidua mesometrial de rata en el día 10 de preñez. Por otro lado, los trabajos de Matias y col. (2002) y de Do y col. (2004) muestran que el LPS modula los niveles de CB1 y de CB2 en células dendríticas.

Nos propusimos estudiar los niveles de ARNm de CB1 y de CB2 en explantos de úteros y de deciduas incubados en presencia de LPS (1ug/ml) por 24 h y 12 h respectivamente.

Además de observar la expresión de CB1, describimos por primera vez la presencia del receptor CB2 en el útero de ratón durante la preñez temprana.

Nuestros resultados muestran que la incubación de los explantos uterinos con LPS produjo un aumento en los niveles del ARNm de CB1 mientras que no modificó los de CB2 (figura 2).

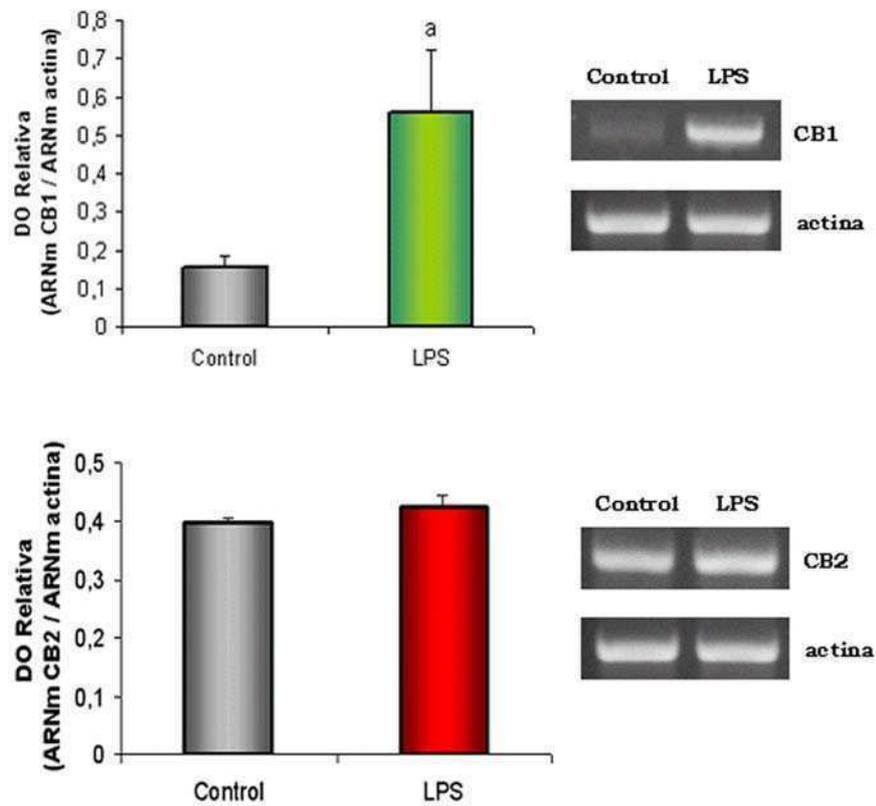


Figura 2.- Niveles de ARNm de CB1 y CB2 en el útero. Los explantos uterinos fueron incubados en ausencia/presencia de LPS (1ug/ml) durante 24 h. En la figura se muestra a la izquierda el análisis densitométrico de las bandas y a la derecha un gel representativo. Test de Student t. a, $p < 0,05$ vs control. Los valores representan el promedio \pm SEM, $n = 4$.

Por otro lado, observamos que la decidua de ratón expresa los 2 receptores de cannabinoides y que el LPS modificó los niveles de ARNm de ambos (figura 3).

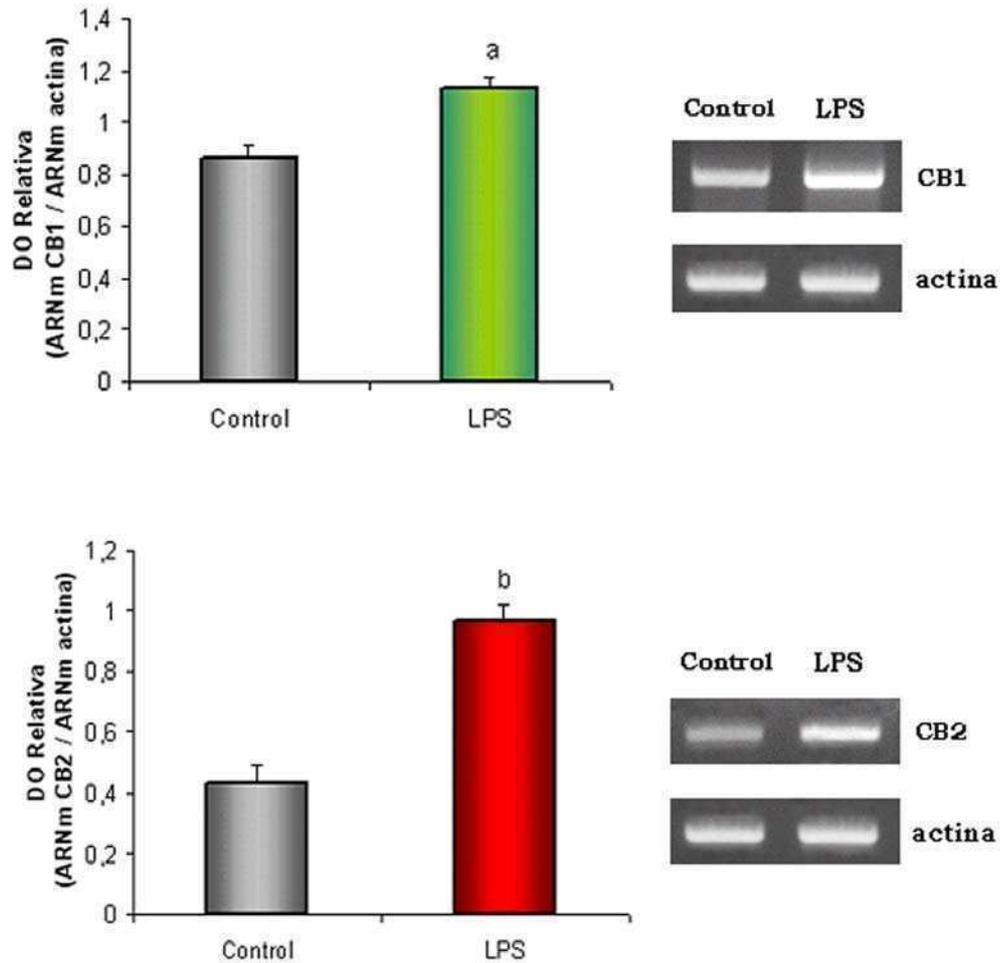


Figura 3.- Niveles de ARNm de CB1 y CB2 en la decidua. Los explantos deciduales fueron incubados en ausencia/presencia de LPS (1ug/ml) durante 12 h. En la figura se muestra a la izquierda el análisis densitométrico de las bandas y a la derecha un gel representativo. Test de Student t. a, $p < 0,05$ vs control; b, $p < 0,01$ vs control. Los valores representan el promedio \pm SEM, $n = 4$.

1.3.- El LPS aumenta la actividad de síntesis de la AEA y los niveles proteicos de la NAPE-PLD.

Se han propuesto al menos dos vías diferentes para la síntesis de AEA: la vía que involucra la AEA sintasa, donde esta enzima sintetiza AEA por condensación de ácido araquidónico libre (AA) y etanolamina; y la vía del NAPE, en la cual se sintetiza AEA principalmente por la acción de una enzima denominada NAPE-PLD.

Se ha descrito que el LPS es capaz de inducir la síntesis de AEA en linfocitos humanos (Maccarrone y col., 2001) y en macrófagos murinos y también de aumentar la actividad de la NAPE-PLD en este último tipo celular (Liu y col., 2003). Con estos antecedentes investigamos si el LPS modula la actividad de síntesis de AEA, vía la AEA sintasa, en el útero y la decidua murina. Para ello, explantos de úteros y de deciduas fueron incubados en presencia de LPS (1ug/ml) durante 24 h y 12 h respectivamente para luego ensayar la actividad de AEA sintasa por la técnica de radioconversión.

Observamos que en el caso de los **explantos uterinos**, la actividad de síntesis de AEA se incrementó cuando se incubaron estos tejidos con LPS (figura 4A). Sin embargo, en los **explantos de decidua** esta actividad no se modificó por la presencia de la endotoxina en el medio de cultivo (figura 4B).

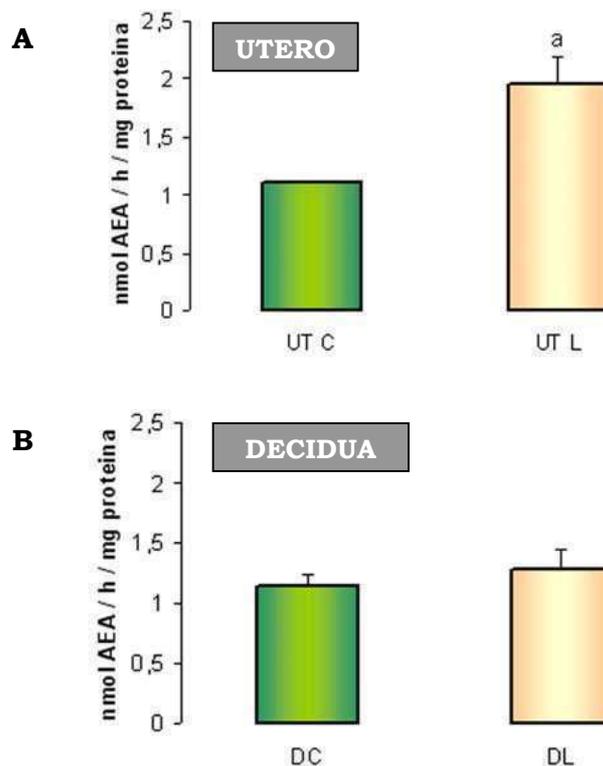


Figura 4.- Actividad de AEA sintasa.. A) Los explantos uterinos y B) de decidua fueron incubados en ausencia/presencia de LPS (1ug/ml) durante 24 h y 12 h respectivamente. UTC, úteros control; UTL, úteros incubados con LPS; DC, deciduas control; DL, deciduas incubadas con LPS. Test de Student t. a, $p < 0,05$ vs control. Los valores representan el promedio \pm SEM, $n = 5$.

El siguiente paso fue estudiar si la vía de la NAPE-PLD podría también estar modulada por el LPS. Para ello, explantos de úteros y de deciduas fueron incubados en presencia de LPS (1ug/ml) durante 24 h y 12 h respectivamente, para luego cuantificar los niveles de ARNm de la NAPE-PLD por la técnica de RT-PCR y la expresión proteica por la técnica de western blot.

En la figura 5 se observa que el LPS no modificó los niveles de ARNm de la NAPE-PLD en ninguno de los tejidos estudiados.

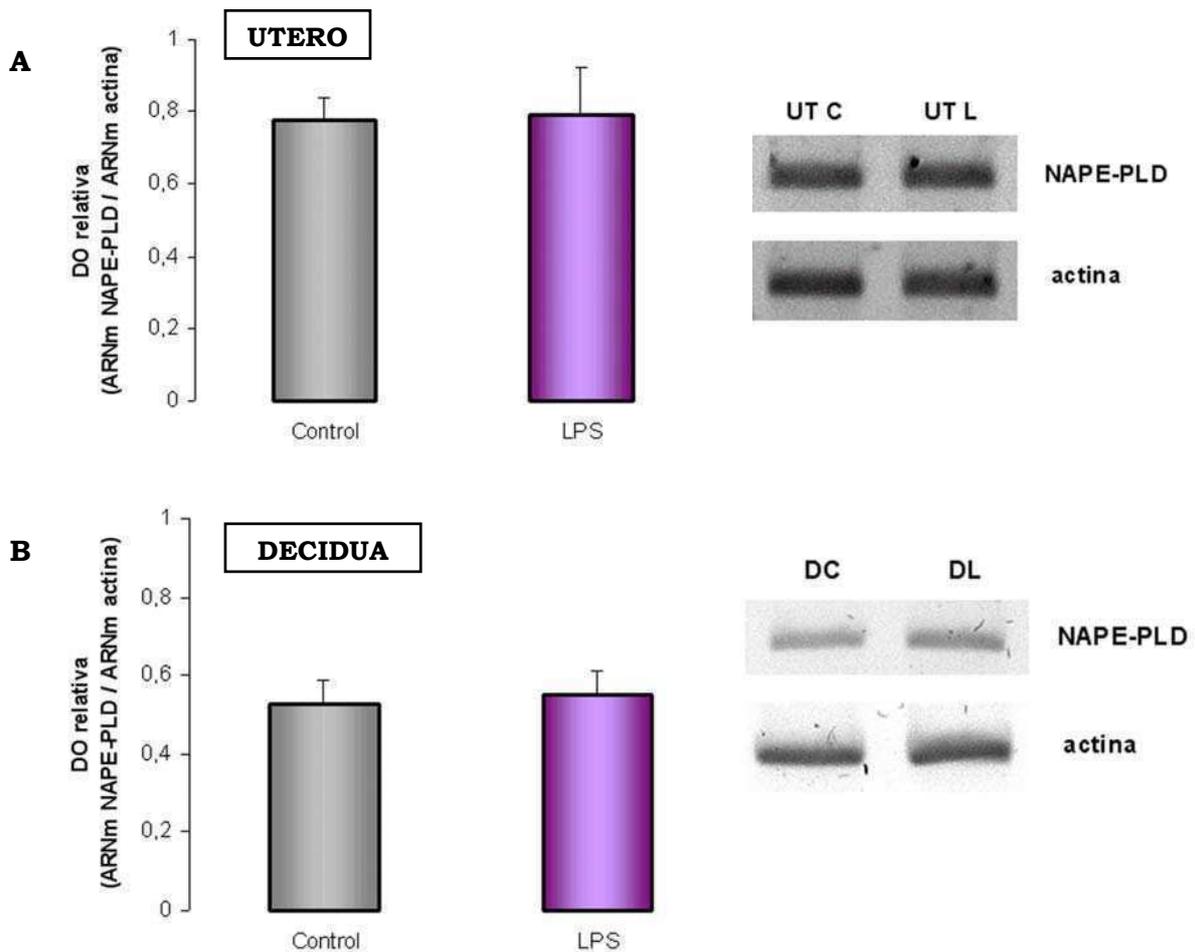


Figura 5.- Niveles de ARNm de la NAPE-PLD. A) Los explantos uterinos y B) de decidua fueron incubados en ausencia/presencia de LPS (1ug/ml) durante 24 h y 12 h respectivamente para luego realizar una PCR con primers específicos para la NAPE-PLD. En la figura se muestra a la izquierda el análisis densitométrico de las bandas y a la derecha un gel representativo. UTC, úteros control; UTL, úteros incubados con LPS; DC, deciduas control; DL, deciduas incubadas con LPS. Test de Student t. Los valores representan el promedio \pm SEM, n = 3.

Sin embargo, la incubación de cada uno de los tejidos con la endotoxina incrementó los niveles proteicos de esta enzima (figura 6).

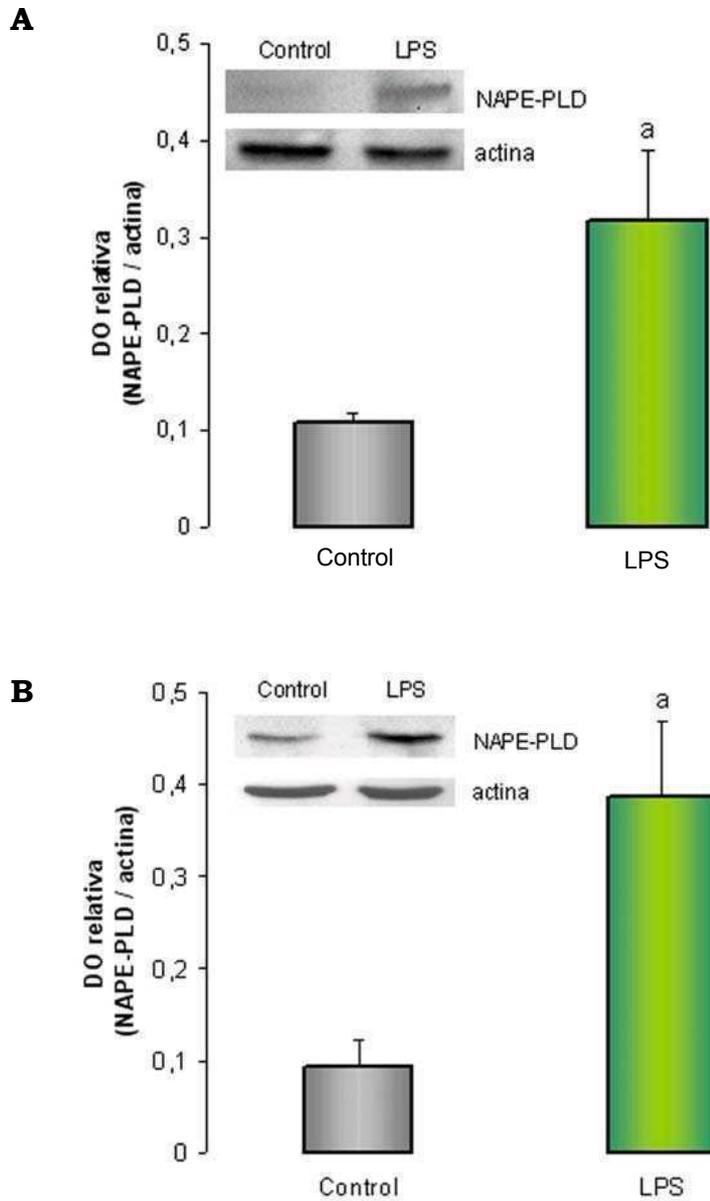


Figura 6.- Niveles proteicos de la NAPE-PLD. A) Los explantos uterinos y B) de decidua fueron incubados en ausencia/presencia de LPS (1ug/ml) durante 24 h y 12 h respectivamente para luego realizar un western blot con anticuerpos específicos para la NAPE-PLD. En la figura se muestra el análisis densitométrico de las bandas y un gel representativo. Test de Student t. a; $p < 0,05$ vs control. Los valores representan el promedio \pm SEM, $n = 3$.

1.4.- El LPS modula la expresión y la actividad de la FAAH.

Maccarrone y col. (2001) demostraron que el LPS disminuye la expresión de la FAAH y su actividad en linfocitos humanos; sin embargo, también se ha observado que la endotoxina es capaz de aumentar la expresión proteica y la actividad de la FAAH en una línea celular de macrófagos murinos (Liu y col., 2003). De acuerdo a estos antecedentes, el LPS modularía este componente del SEC de distintas maneras dependiendo del tipo celular estudiado.

Nos propusimos entonces analizar el efecto del LPS sobre la actividad, los niveles proteicos y los niveles del ARNm de la FAAH en explantos uterinos y de decidua incubados en ausencia/presencia de LPS (1ug/ml).

En la figura 7A, B y C se observa que la incubación de los **explantos uterinos** con LPS produjo una disminución no solo de la actividad de la FAAH sino también de sus niveles de ARNm y proteicos en este tejido.

Por el contrario, cuando los **explantos de decidua** se incubaron en presencia de LPS los niveles proteicos y de actividad de la FAAH se incrementaron (figura 7D y E). Además, no fue posible detectar ARNm de la FAAH probablemente debido a que el mensajero podría haberse degradado. Por ello, analizamos la expresión de este mensajero a las 3, 6 y 9 h de cultivo pero tampoco se detectaron niveles de ARNm para esta enzima (*no se muestra*); lo que sugiere que la endotoxina probablemente incremente tempranamente los niveles de ARNm de la FAAH (antes de las 3 h de cultivo) y esto se evidenciaría luego en un aumento de los niveles proteicos observados en la figura 7E. La decidua es un tejido particularmente sensible al LPS como ya lo observamos en los tratamientos *in vivo* (Ogando y col., 2003) y esto podría reflejarse en una mayor inestabilidad del ARNm de la FAAH en este tejido.

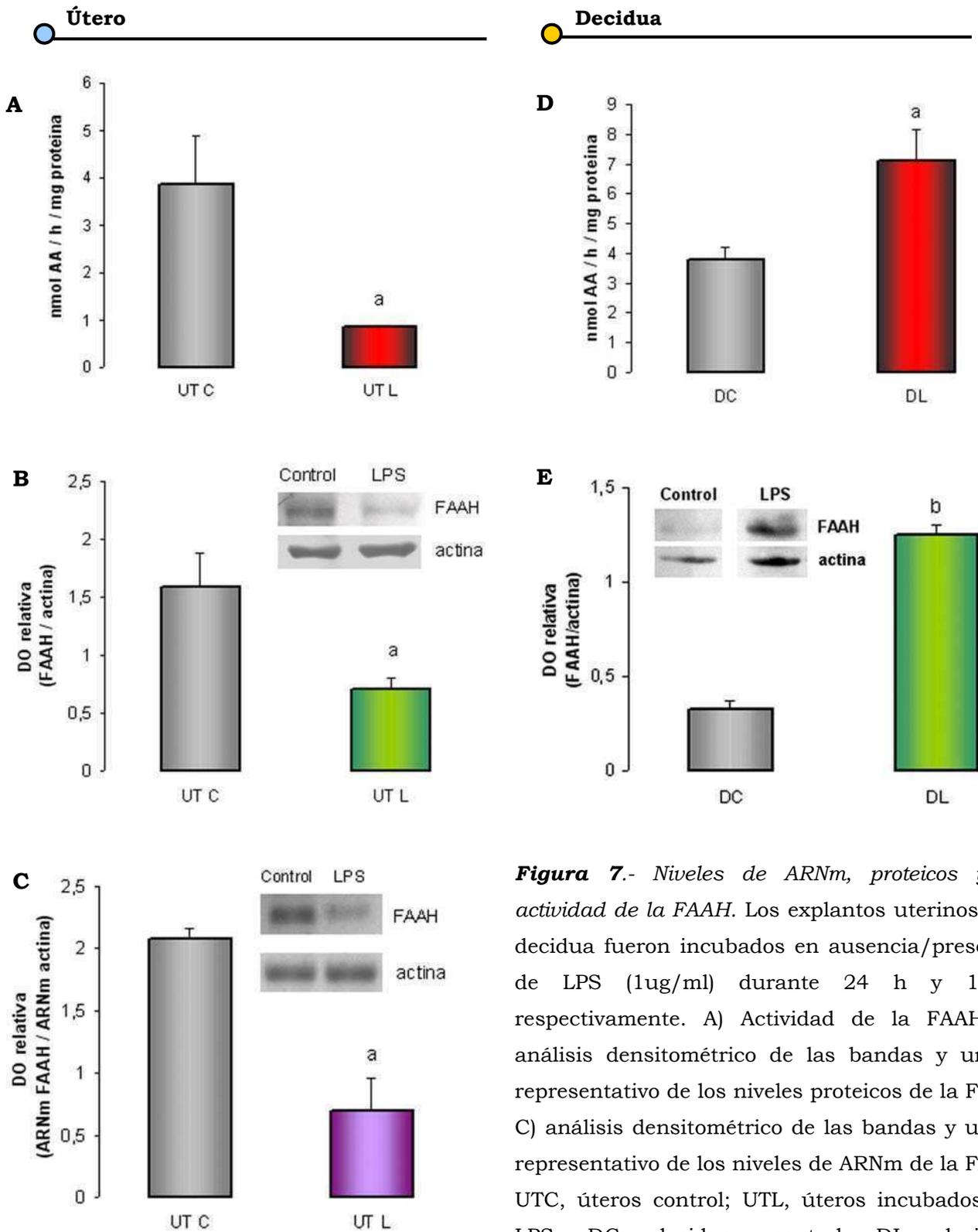


Figura 7.- Niveles de ARNm, proteicos y de actividad de la FAAH. Los explantos uterinos y de decidua fueron incubados en ausencia/presencia de LPS (1 μ g/ml) durante 24 h y 12 h respectivamente. A) Actividad de la FAAH; B) análisis densitométrico de las bandas y un gel representativo de los niveles proteicos de la FAAH; C) análisis densitométrico de las bandas y un gel representativo de los niveles de ARNm de la FAAH. UTC, úteros control; UTL, úteros incubados con LPS; DC, deciduas control; DL, deciduas incubadas con LPS. Test de Student t. a; $p < 0,05$ vs control; b; $p < 0,001$ vs control. Los valores representan el promedio \pm SEM, $n = 4$.

Estos resultados mostraron efectos antagónicos del LPS sobre los niveles de proteína y de actividad de la FAAH entre ambos tejidos estudiados, reflejando la especificidad de cada tejido para responder a la endotoxina.

Una posible explicación del efecto diferencial del LPS sobre la FAAH de estos tejidos podría basarse en que, siendo el útero y la decidua tejidos que se encuentran muy próximos espacialmente, la AEA acumulada en el útero (debido a un aumento en su síntesis y a una disminución en su degradación por el estímulo del LPS) podría difundir hasta la decidua sumándose a los efectos deletéreos del LPS sobre el tejido. Por otro lado, el estímulo producido por la AEA en la decidua podría disparar “*mecanismos de defensa*” que contribuyan a eliminar del microambiente a esta molécula que, en altas concentraciones, resulta tóxica para este tejido. Este tipo de mecanismos han sido sugeridos por Maccarrone y col. (2004) donde se propone que los blastocistos murinos liberan un compuesto lipídico capaz de activar a la FAAH uterina disminuyendo así los niveles de AEA en el sitio de implantación.

1.5.-La actividad de la FAAH inducida por el LPS está modulada por la AEA.

Teniendo en cuenta estos antecedentes y conociendo la naturaleza lipídica de la AEA, investigamos si este endocannabinóide podría modular la actividad y la expresión de la FAAH en explantos de decidua. Para ello, en los experimentos siguientes utilizamos un análogo sintético no hidrolizable de la AEA denominado meta-anandamida (m-AEA), el cual no puede ser clivado por acción de la FAAH. Se incubaron explantos de decidua en presencia de m-AEA 10^{-7} M durante 12 h y se evaluó la actividad de FAAH por radioconversión y los niveles de la enzima por western blot.

En la figura 8 observamos que tanto la actividad (A) como los niveles proteicos de la FAAH (B) se incrementaron cuando los explantos de decidua se incubaron en presencia de m-AEA.

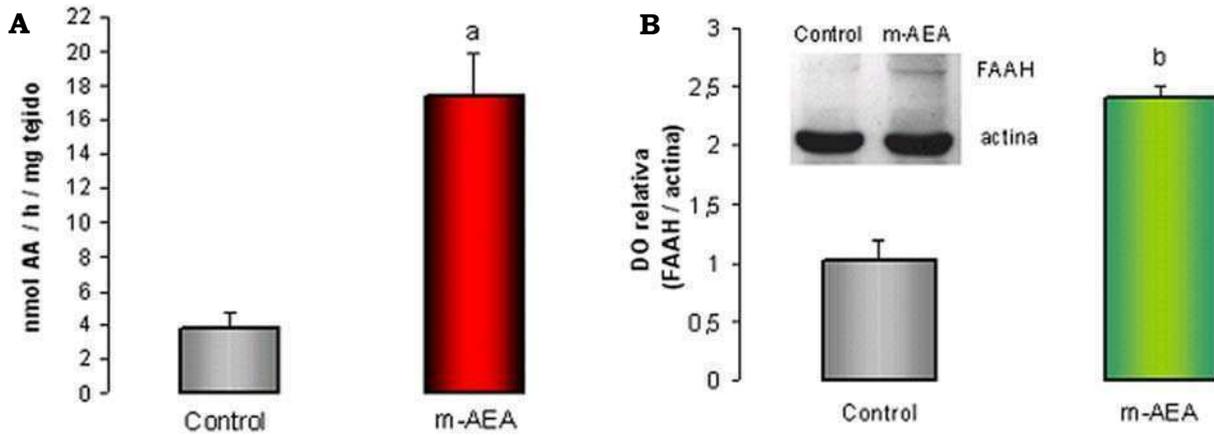


Figura 8.- Efecto de la m-AEA en la actividad y los niveles proteicos de la FAAH. Los explantos de decidua fueron incubados en ausencia/presencia de m-AEA (10^{-7} M) durante 12 h. A) Actividad de la FAAH; B) en la figura se muestra el análisis densitométrico de las bandas y un gel representativo. Test de Student t. a; $p < 0,01$ vs control, b; $p < 0,05$ vs control.. Los valores representan el promedio \pm SEM, $n = 4$.

Sabiendo que la AEA modula la actividad y los niveles proteicos de la FAAH en la decidua estudiamos si la inducción de la actividad de esta enzima por LPS estaba mediada por AEA. Para ello, incubamos explantos de decidua en presencia de LPS solo (1 μ g/ml) o LPS (1 μ g/ml) y distintas concentraciones de un antagonista específico del receptor CB1 (AM251) o del receptor CB2 (SR144528).

En la figura 9 se observa que tanto el antagonista AM251 (CB1) como el antagonista SR144528 (CB2) revirtieron el aumento de la actividad de la FAAH inducido por el LPS, indicando que la AEA está involucrada en el aumento de la actividad observado para esta enzima.

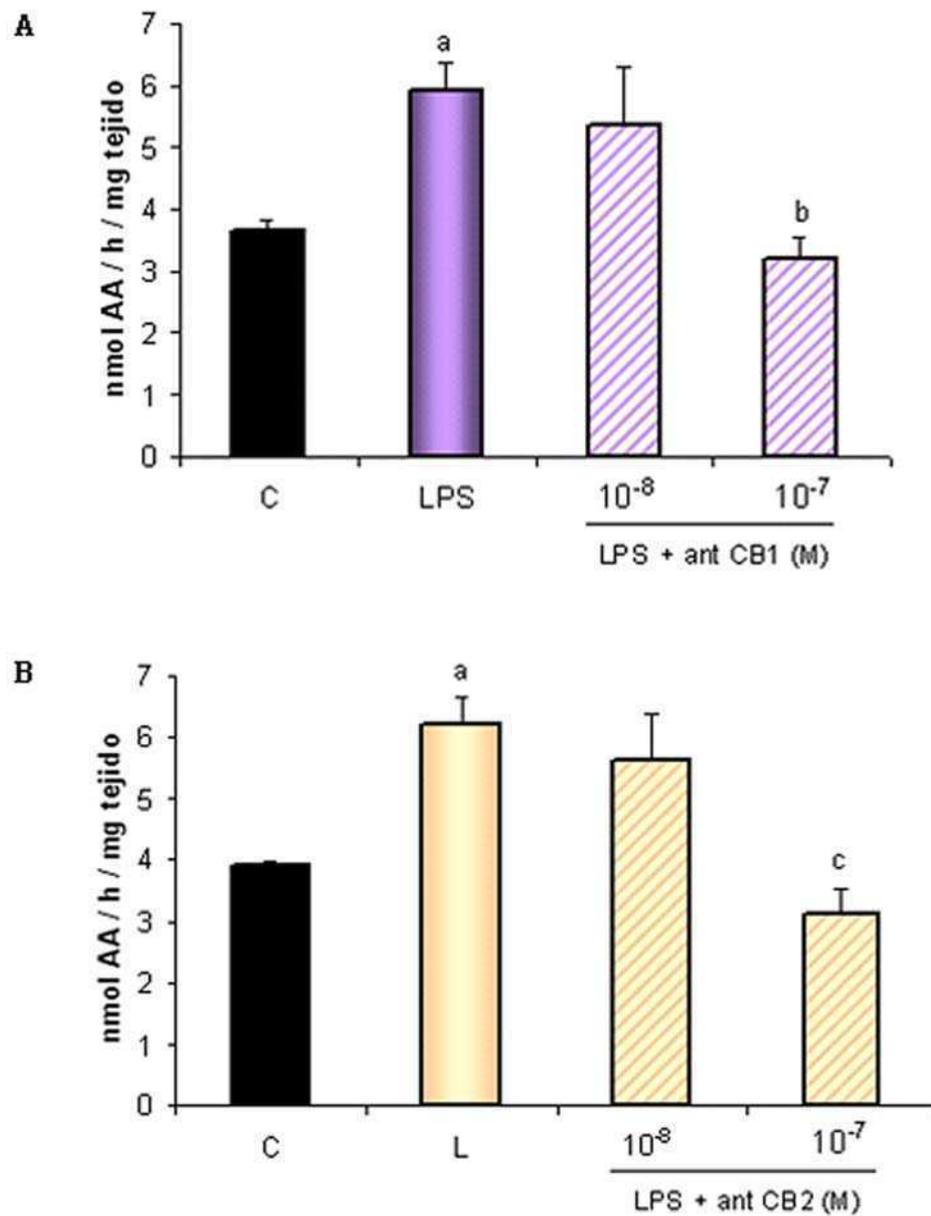


Figura 9.- El incremento en la actividad de la FAAH inducido por el LPS está mediado por la AEA. Los explantos de decidua fueron incubados en ausencia/presencia de LPS (1 ug/ml) y distintas concentraciones de A) un antagonista de CB1 (AM251) o de B) un antagonista de CB2 (SR144528). Test de ANOVA. a, $p < 0,01$ vs control; b, $p < 0,01$ vs LPS; c, $p < 0,001$ vs LPS. Los valores representan el promedio \pm SEM. $n = 5$.

2.- La AEA modula la producción de NO y la expresión de la NOSi.

Una vez determinado el efecto del LPS sobre el SEC del útero y de la decidua, comenzamos a estudiar la posible participación de la AEA en el mecanismo de acción de la endotoxina.

Como se mencionó en la introducción, se ha informado que la AEA aumenta la síntesis de NO en células endoteliales renales de rata (Deutsch y col., 1997) y en líneas celulares endoteliales humanas (Fimiani y col., 1999). Considerando que la RE inducida por LPS cursa con un incremento significativo en la producción decidua y uterina de NO, y que este mediador participa en la reabsorción embrionaria, nos propusimos estudiar si la AEA modula la producción de NO y la expresión de las isoformas de la NOS en ambos tejidos.

2.1. - Efecto de la AEA en la producción de NO.

Para evaluar el efecto de la AEA *in vitro* en la producción de NO, se realizó una curva concentración-respuesta a partir de explantos uterinos y de decidua incubados en presencia de distintas concentraciones de m-AEA (figura 10).

La figura 10A muestra que la m-AEA, incubada en concentraciones 10^{-7} M y 10^{-6} M produjo un aumento en la producción de $\text{NO}_3 + \text{NO}_2$ en los **explantos uterinos**.

Por otro lado, en la figura 10B se observa que, para todas las concentraciones ensayadas, la m-AEA también incrementó los niveles de $\text{NO}_3 + \text{NO}_2$ en los **explantos de decidua**.

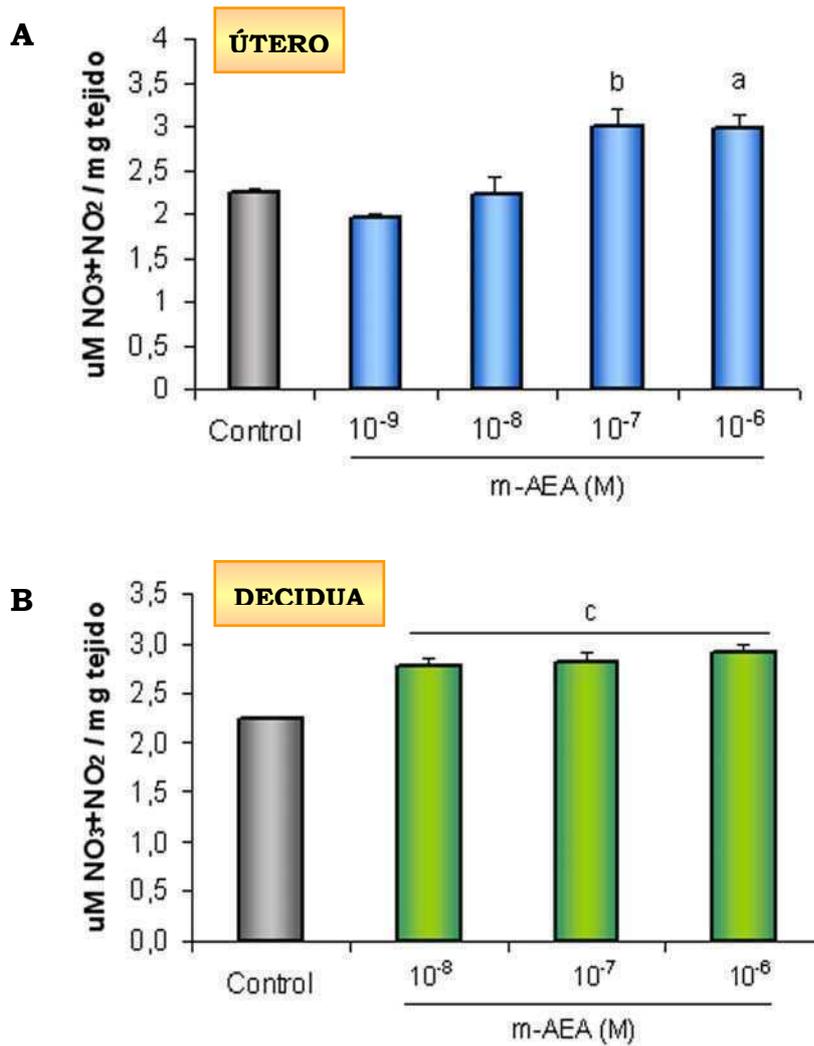


Figura 10.- Curva de producción de $\text{NO}_3 + \text{NO}_2$ de explantos incubados en presencia de distintas concentraciones de m-AEA. A) Explantos uterinos. Test de ANOVA. a, $p < 0,05$ vs control; b, $p < 0,01$ vs control; $n=5$. B) Explantos de decidua. Test de ANOVA. c, $p < 0,001$ vs control. Los valores representan el promedio \pm SEM, $n = 7$.

Esto concuerda con resultados previos de nuestro laboratorio donde hemos observado que la AEA modula la producción de NO en la placenta de la rata (Cella y col., 2008).

2.2.- Efecto de la AEA en la expresión de las isoformas de la NOS.

La síntesis de NO se produce a través de una familia de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS). Hasta el momento se han identificado y estudiado tres isoformas de la enzima NOS: la NOSe, la NOSn y la NOSi. El NO producido por esta última isoforma juega un rol importante en las respuestas del sistema inmune, en la patogénesis del shock por endotoxinas y en la destrucción tisular autoinmune. Dado que observamos un incremento en los niveles de $\text{NO}_3 + \text{NO}_2$ tanto en el útero como en la decidua, nos interesó estudiar el efecto de la AEA sobre los niveles proteicos de las 3 isoformas.

Encontramos que, tanto en cultivos de **explantos uterinos** como de **decidua**, la expresión de las isoformas NOSe y NOSn no se modificó cuando estos tejidos se incubaron con m-AEA (figura 11A y B).

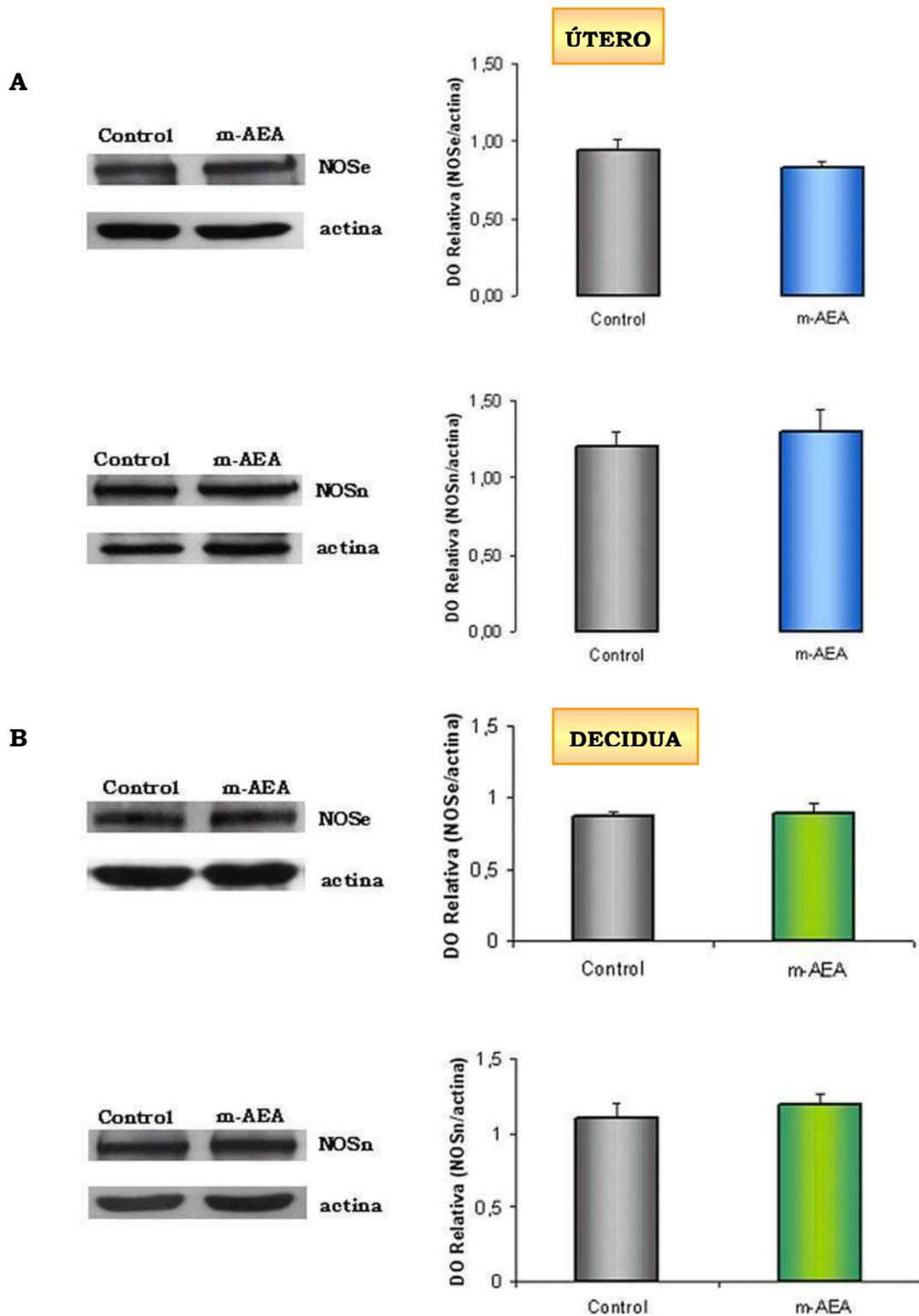


Figura 11.- Efecto de la m-AEA sobre los niveles proteicos de la NOSe y la NOSn. A) Los explantos uterinos y B) de decidua fueron incubados en presencia de m-AEA 10^{-7} M. Izquierda, western blot representativo; derecha análisis densitométrico de las bandas. Test de Student t. Los valores representan el promedio \pm SEM, n = 3.

Sin embargo, encontramos que tanto en cultivos de **explantos uterinos** como **de decidua**, la expresión de la NOSi se incrementó cuando estos tejidos se incubaron con m-AEA (figura 12).

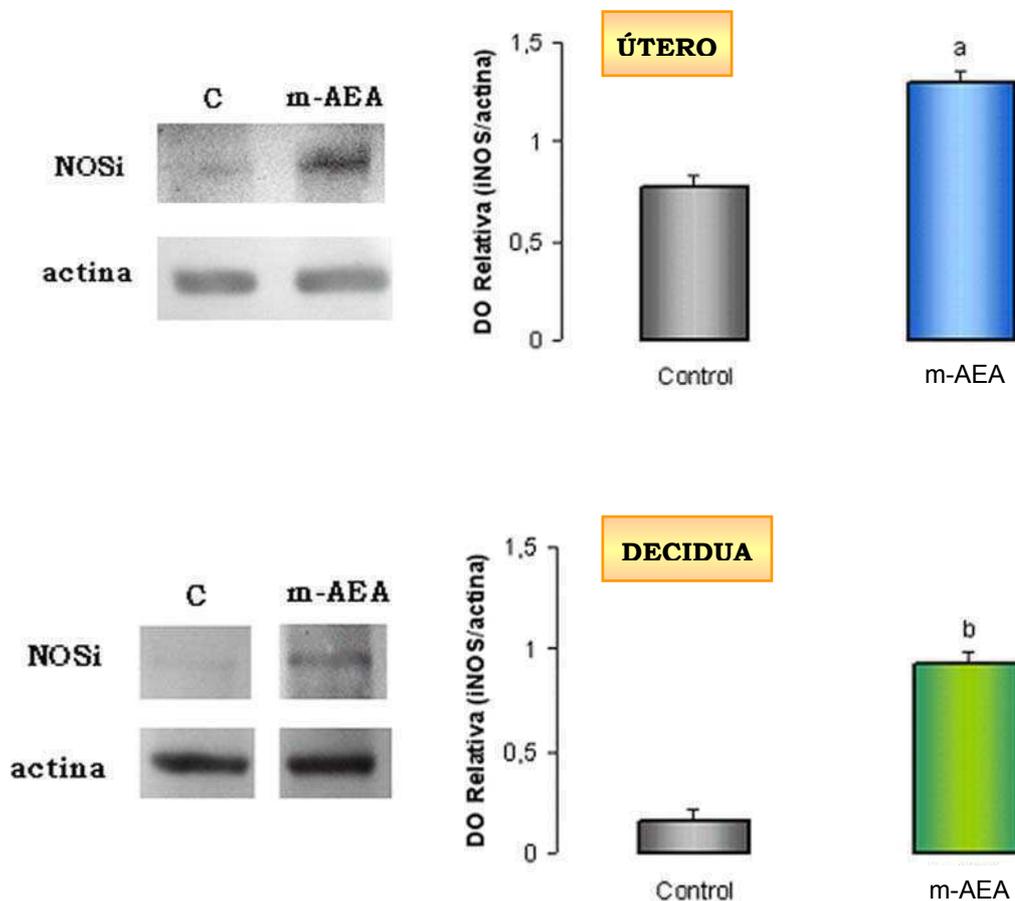


Figura 12.- Efecto de la m-AEA sobre los niveles proteicos de la NOSi. A) Los explantos uterinos y B) de decidua fueron incubados en presencia de m-AEA 10^{-7} M. Izquierda, western blot representativo; derecha, análisis densitométrico de las bandas. Test de Student t. a, $p < 0,05$ vs control; b, $p < 0,001$ vs control. Los valores representan el promedio \pm SEM, $n = 3$.

En base a estos resultados, quisimos verificar si la AEA induce la producción de NO vía la NOSi. Para ello, incubamos los úteros y las deciduas en presencia de m-AEA y un inhibidor selectivo de la NOSi, el 1400W. La figura 13 muestra que la producción de NO inducida por m-AEA fue revertida cuando los tejidos fueron co-incubados en presencia de la m-AEA y el 1400W, indicando que la isoforma inducible se encuentra involucrada en el efecto estimulador de la

AEA sobre la producción de $\text{NO}_3 + \text{NO}_2$ tanto en el útero como en la decidua murina.

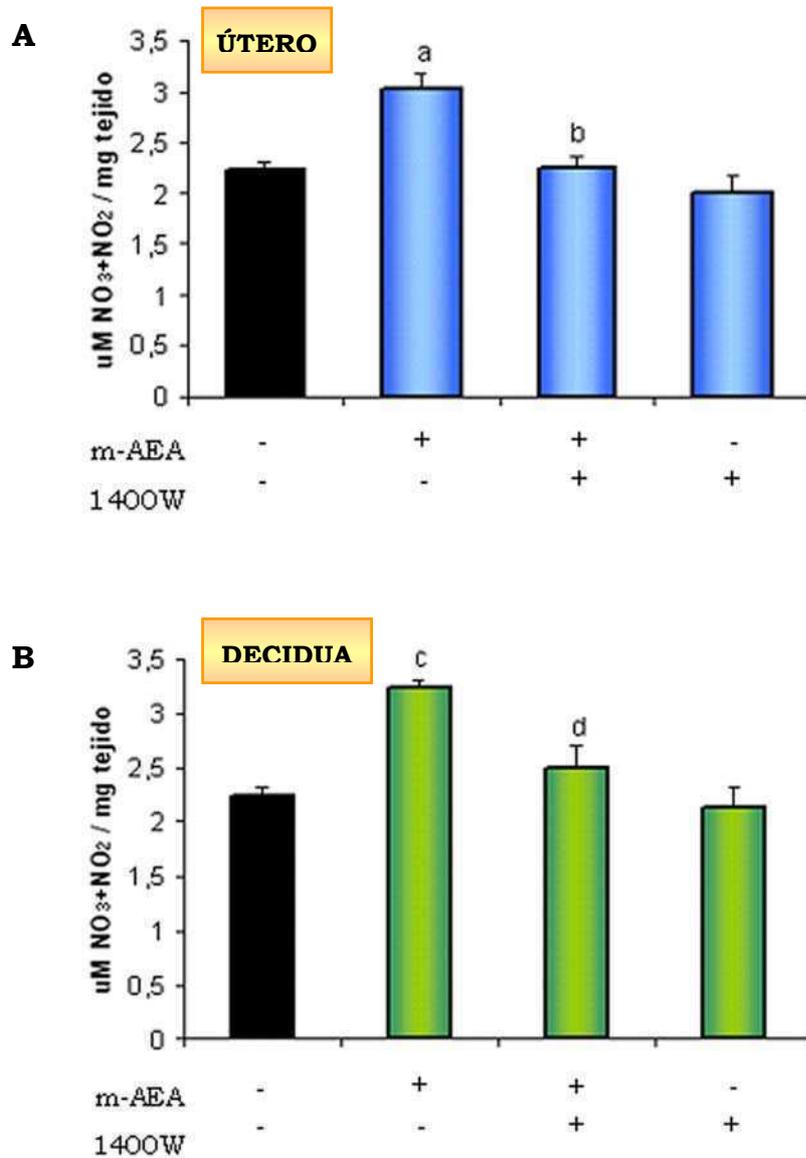


Figura 13.- La producción de $\text{NO}_3 + \text{NO}_2$ inducida por m-AEA ocurre por un mecanismo que involucra a la NOSi. Los explantos A) uterinos y B) de decidua fueron incubados en presencia de m-AEA 10^{-7}M y un inhibidor selectivo de la NOSi, el 1400W (0,1 uM). Test de ANOVA. a y c, $p < 0,001$ vs control; b y d, $p < 0,01$ vs m-AEA. Los valores representan el promedio \pm SEM, $n = 5$.

3.- La producción de NO inducida por LPS está mediada por la AEA.

Como se mencionó anteriormente, resultados previos de nuestro laboratorio muestran la presencia de CB1 y CB2 en el útero de ratón durante la preñez tardía (Franchi y col., 2005). Además, en la sección anterior, se demostró la presencia del ARNm de CB1 y CB2 en el útero y en la decidua murina en el día 7 de gestación. Dado que tanto la m-AEA como el LPS produjeron un aumento en la producción de NO en los tejidos estudiados, decidimos analizar si la producción de NO inducida por LPS estaba mediada por la AEA. Para esto, los explantos de útero y de decidua fueron incubados en presencia de LPS (1ug/ml), LPS y un antagonista selectivo del receptor CB1 (AM251) o LPS y un antagonista selectivo del receptor CB2 (SR144528).

Para el caso de los **explantos uterinos** se observa que la producción de NO inducida por LPS se revirtió cuando se incubaron los tejidos con LPS y el antagonista de CB1 (figura 14A). Sin embargo, no se observó reversión cuando los tejidos fueron incubados en presencia de LPS y el antagonista de CB2 (figura 14B).

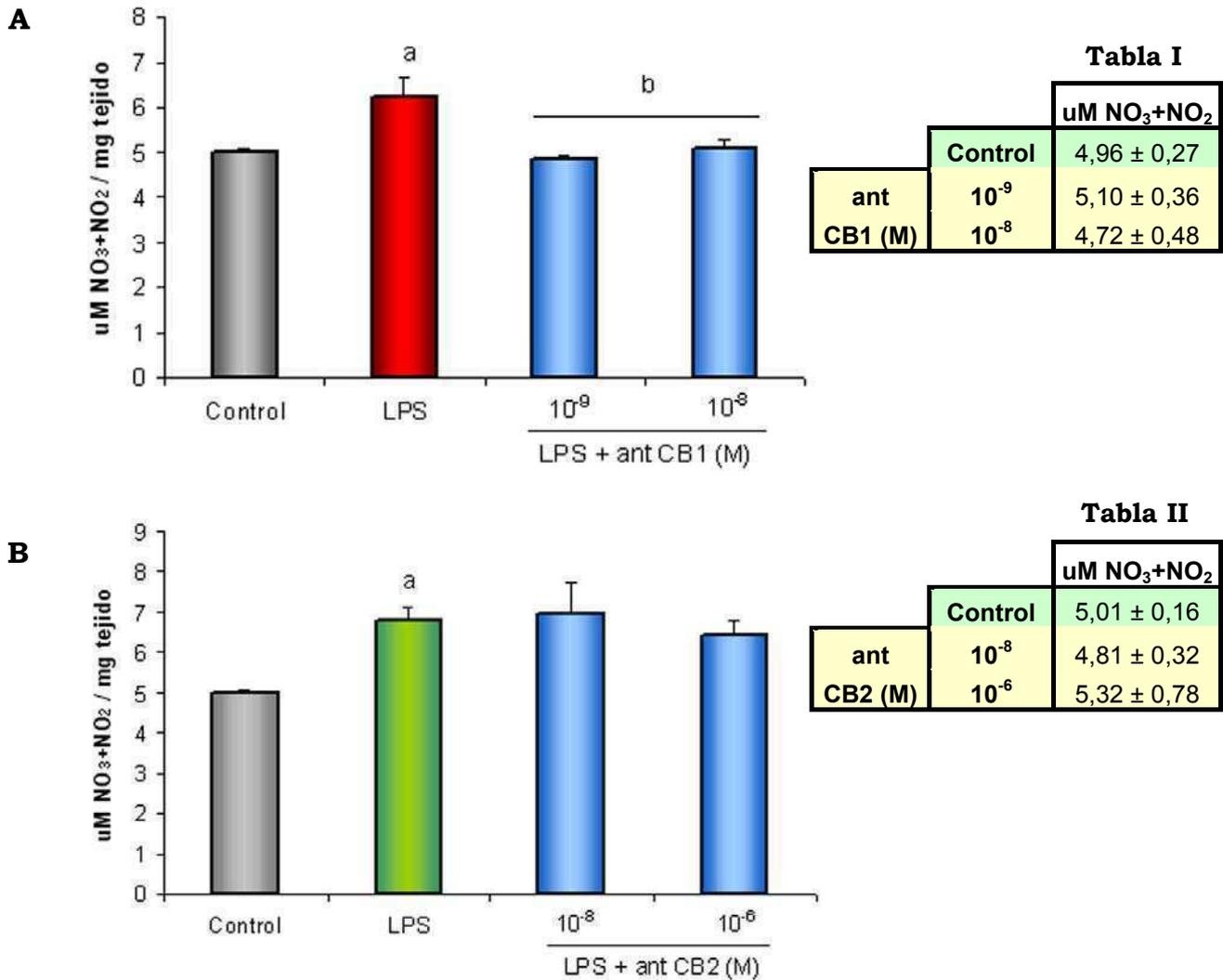


Figura 14.- La producción uterina de NO₃ + NO₂ inducida por LPS es revertida por la co-incubación con un antagonista de CB1 pero no de CB2. Los explantos uterinos fueron incubados en presencia de A) LPS (1ug/ml) y un antagonista de CB1 (AM251) o B) LPS y un antagonista de CB2 (SR144528). Test de ANOVA. a, p < 0,001 vs control; b, p < 0,001 vs LPS. Las tablas denotan los valores obtenidos utilizando los antagonistas solos. Los valores representan el promedio ± SEM, n = 5.

Para el caso de los **explantos de decidua** se observa que la producción de NO inducida por LPS se revirtió tanto cuando se incubaron los tejidos con LPS y el antagonista de CB1 (figura 15A) como cuando se incubaron los tejidos en presencia de LPS y el antagonista de CB2 (figura 15B).

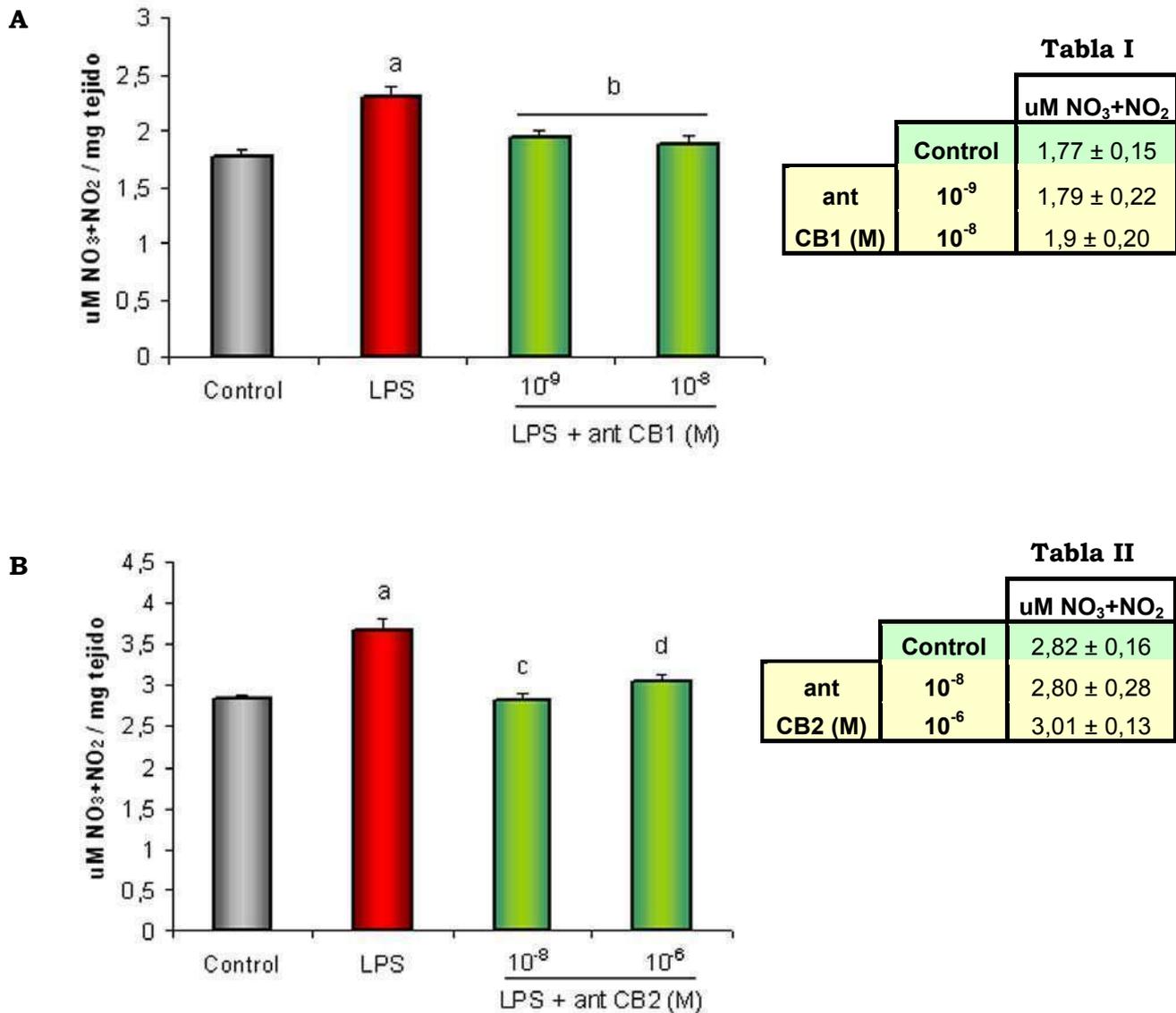


Figura 15.- La producción decidual de NO₃ + NO₂ inducida por LPS es revertida por la co-incubación con antagonistas de los receptores CB1 y CB2. Los explantos de decidua fueron incubados en presencia de A) LPS (1ug/ml) y un antagonista de CB1 (AM251) o B) LPS y un antagonista de CB2 (SR144528). Test de ANOVA. a, p < 0,01 vs control; b, p < 0,05 vs LPS; c, p < 0,001 vs LPS; d, p < 0,01 vs LPS. Las tablas denotan los valores obtenidos utilizando los antagonistas solos. Los valores representan el promedio ± SEM, n = 5.

En ninguno de los tejidos estudiados se observaron cambios en la síntesis de NO cuando se ensayó el efecto de los antagonistas “*per se*” (tablas I y II en las figuras 14 y 15).

Continuando con esta serie de experimentos, decidimos corroborar si el efecto de la AEA sobre la producción de NO estaba mediado por los receptores de cannabinoides. Para ello empleamos ratones *knock out* para el receptor CB1 (cepa CD1). Para estos experimentos, ratones salvajes (WT) y mutantes *knock out* (KO) para el receptor CB1 fueron sacrificados en el día 7 de gestación y los úteros y las deciduas se incubaron en presencia de m-AEA 10^{-6} M y 10^{-7} M respectivamente como se describió anteriormente.

En la figura 16 se observa que la m-AEA produjo un aumento en la producción de $\text{NO}_3 + \text{NO}_2$ en ambos tejidos en los animales salvajes de la cepa CD1. Sin embargo, no se observan diferencias significativas en la producción de $\text{NO}_3 + \text{NO}_2$ cuando se incubaron los tejidos de animales *knock out* con m-AEA. Esto sugiere entonces que la producción de NO inducida por m-AEA estaría mediada por CB1 en estos animales.

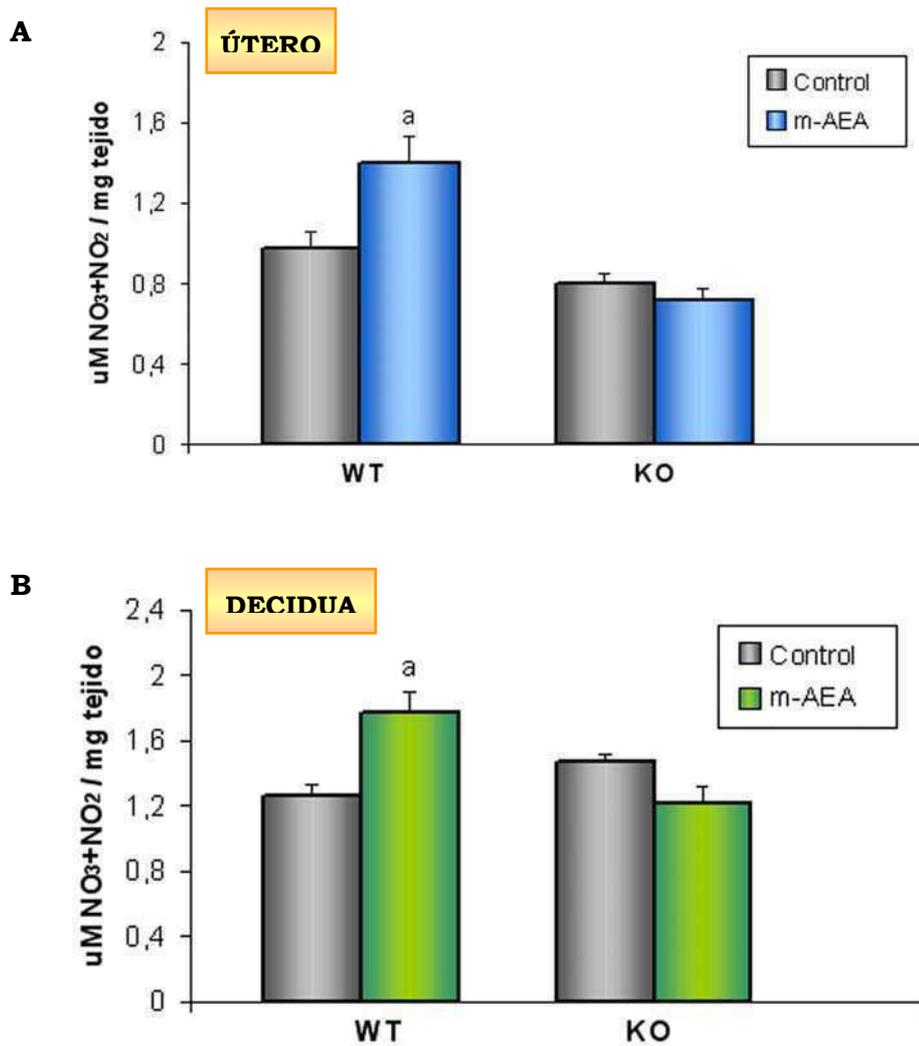


Figura 16.- Producción de NO₃ + NO₂ en ratones WT y KO para el receptor CB1. A) Explantos uterinos incubados en presencia de m-AEA 10⁻⁶M. B) Explantos de decidua incubados en presencia de m-AEA 10⁻⁷M. Test de Student t. a, p < 0,05 vs control. Los valores representan el promedio ± SEM, n = 5.

4.- El LPS produce daño tisular y nitración de proteínas.

Ogando y col. (2003) demostraron que el LPS produce daño tisular tanto en el útero como en la decidua y que este daño se atribuye principalmente al aumento en los niveles de NO. Nos propusimos estudiar, en primera instancia, el efecto deletéreo del LPS *in vitro* sobre ambos tejidos y para ello evaluamos la

morfología tisular de explantos uterinos y de decidua incubados con LPS en cortes teñidos por la técnica de hematoxilina y eosina (H&E).

Los tejidos control (figura 17A, úteros y 18A, deciduas) muestran que la estructura celular está intacta y se observa que la estructura del citoplasma y del núcleo se encuentra conservada. Por otro lado, los explantos tratados con LPS (figura 17B y 18B) muestran espacio irregular entre las células, disrupción celular, encogimiento celular y condensación de la cromatina.

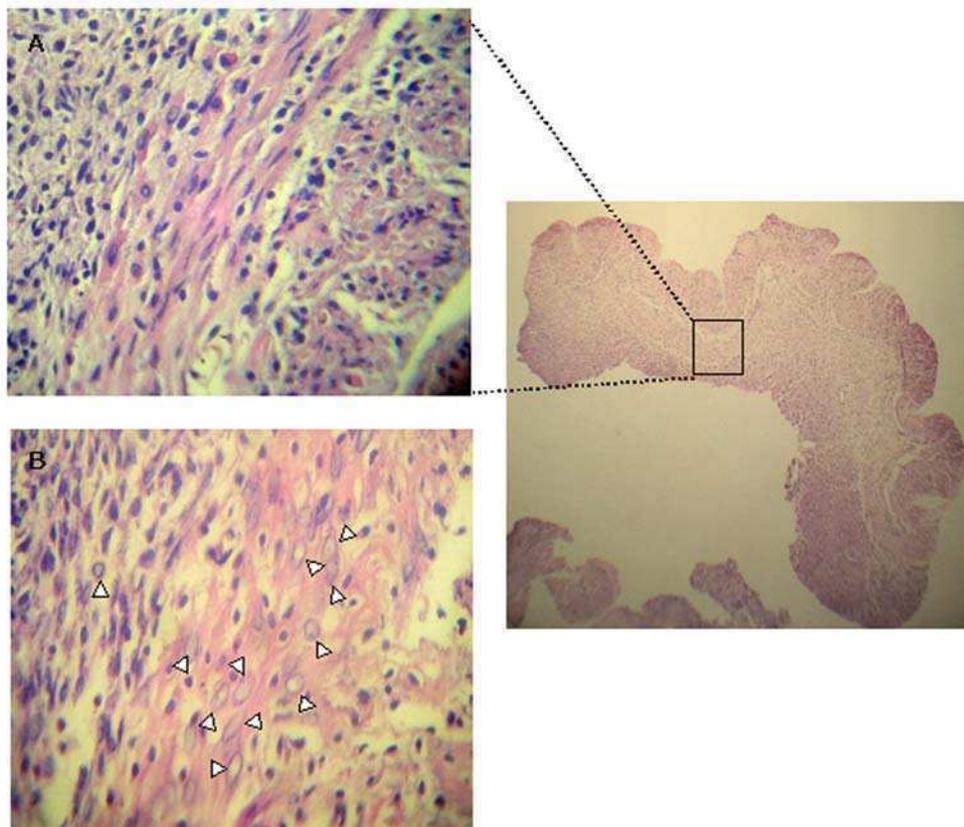


Figura 17.- Análisis histológico de los explantos uterinos tratados con LPS. Los explantos fueron incubados en presencia de A) medio o B) LPS (1ug/ml). Las secciones fueron evaluadas bajo el microscopio óptico y fotografiadas a distintos aumentos. Figura inicial, 64X; el resto de las figuras fueron fotografiadas a 640X. Las flechas indican células anormales.

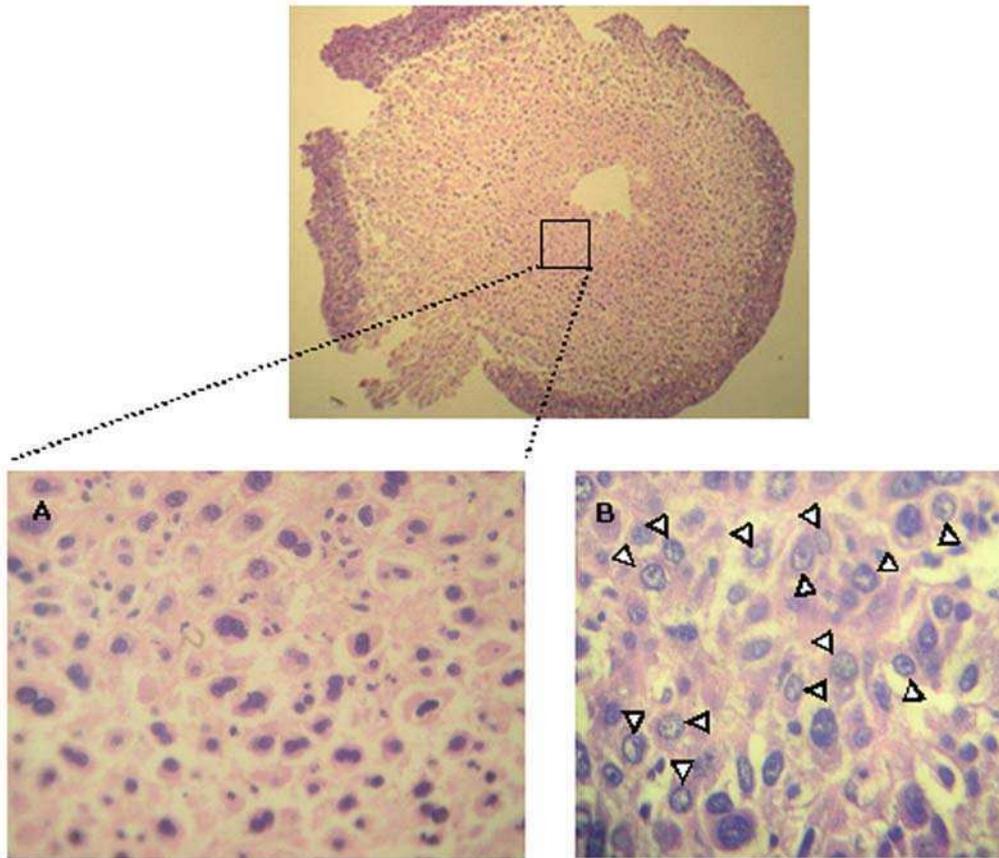


Figura 18.- Análisis histológico de los explantos de decidua tratados con LPS. Los explantos fueron incubados en presencia de A) medio o B) LPS (1ug/ml). Las secciones fueron evaluadas bajo el microscopio óptico y fotografiadas a distintos aumentos. Figura inicial, 64X; el resto de las figuras fueron fotografiadas a 640X. Las flechas indican células anormales.

Cuando estudiamos el efecto del LPS sobre la producción de NO en el tiempo en la **decidua** (figura 1B), esta producción cae luego de las 12 h de cultivo, alcanzando valores aún más bajos que los explantos de los cultivos control a las 24 h. En altas concentraciones, el NO afecta la viabilidad tisular probablemente por la presencia del peroxinitrito (ONOO⁻), un oxidante poderoso con efectos deletéreos diversos sobre el tejido. Este efecto deletéreo del NO fue observado previamente en nuestro laboratorio cuando se administró LPS *in vivo* (Aisemberg y col., 2007b).

En primer lugar, investigamos el daño tisular producido por el LPS en este tejido a las 24 h de cultivo. Para ello, analizamos las diferencias histológicas

entre las deciduas incubadas con LPS durante 24 h y las deciduas control por medio de las técnicas de tinción con hematoxilina y eosina (H&E) y con Hoescht 33342.

Se observa que las deciduas tratadas con LPS revelaron un aumento en la densidad celular (condensación nuclear), fragmentación y condensación de la cromatina así como la formación de pequeños cuerpos apoptóticos (figura 19 B y D).

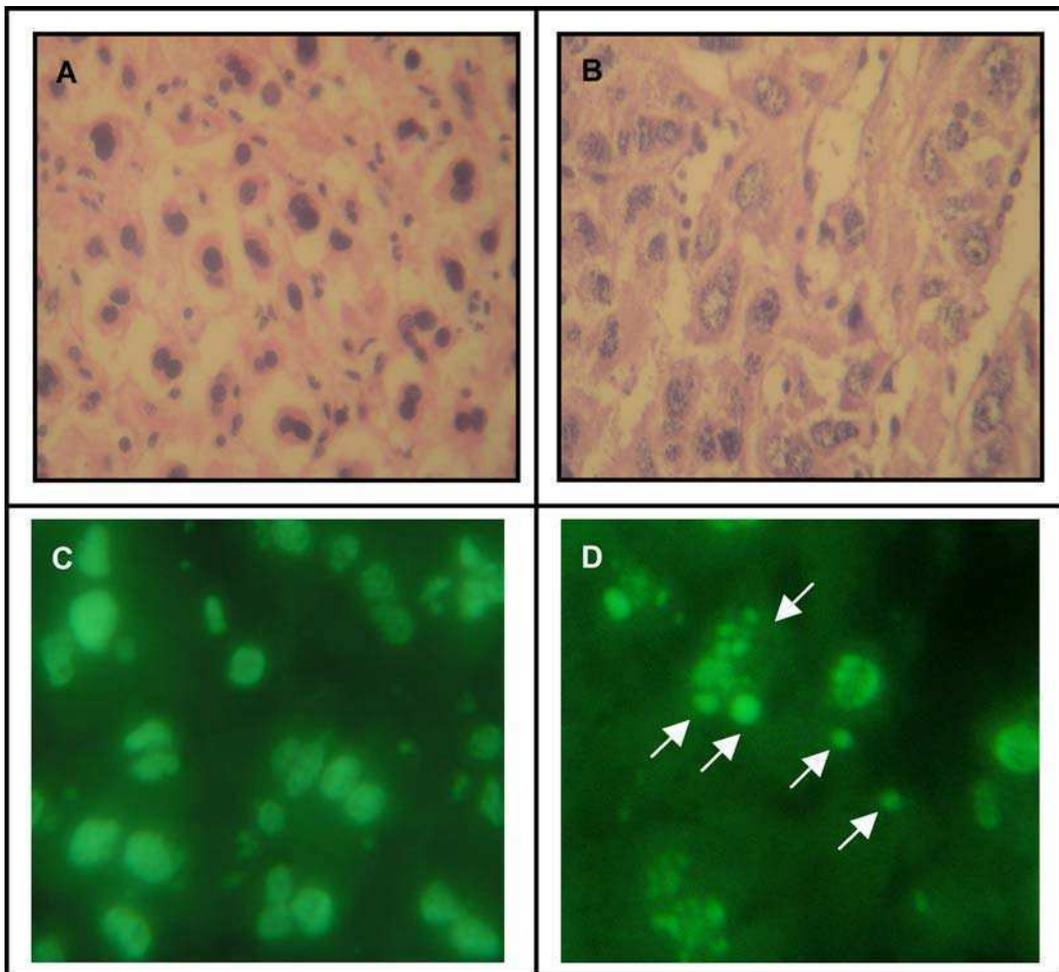


Figura 19.- Análisis histológico de los explantos de decidua incubados con LPS por 24 h. Los explantos fueron incubados en ausencia/presencia de LPS (1ug/ml) por 24 h. **Tinción con H&E:** A) control; B) LPS. **Tinción con Hoescht:** C) control; D) LPS. Las secciones fueron evaluadas bajo el microscopio óptico y fotografiadas a 640 X. Las flechas indican presencia de cuerpos apoptóticos.

Halliwell (1997) ha informado que durante los fenómenos inflamatorios aumenta la nitración de residuos tirosina (Tyr) de las proteínas y esta modificación en la estructura de las mismas alteraría su función. Además, la nitración se asocia con la producción de radicales libres que son poderosos oxidantes y que producen efectos deletéreos diversos sobre el tejido.

A continuación, analizamos la nitración de proteínas en residuos Tyr de explantos de decidua incubados en presencia de LPS (1 ug/ml) durante 6, 12 y 24 horas. La figura 20A muestra un western blot representativo de la inmunoreactividad contra las proteínas nitradas en Tyr. La figura 20B muestra el análisis densitométrico de las bandas donde se observa que la nitración aumenta con el tiempo en presencia del LPS.

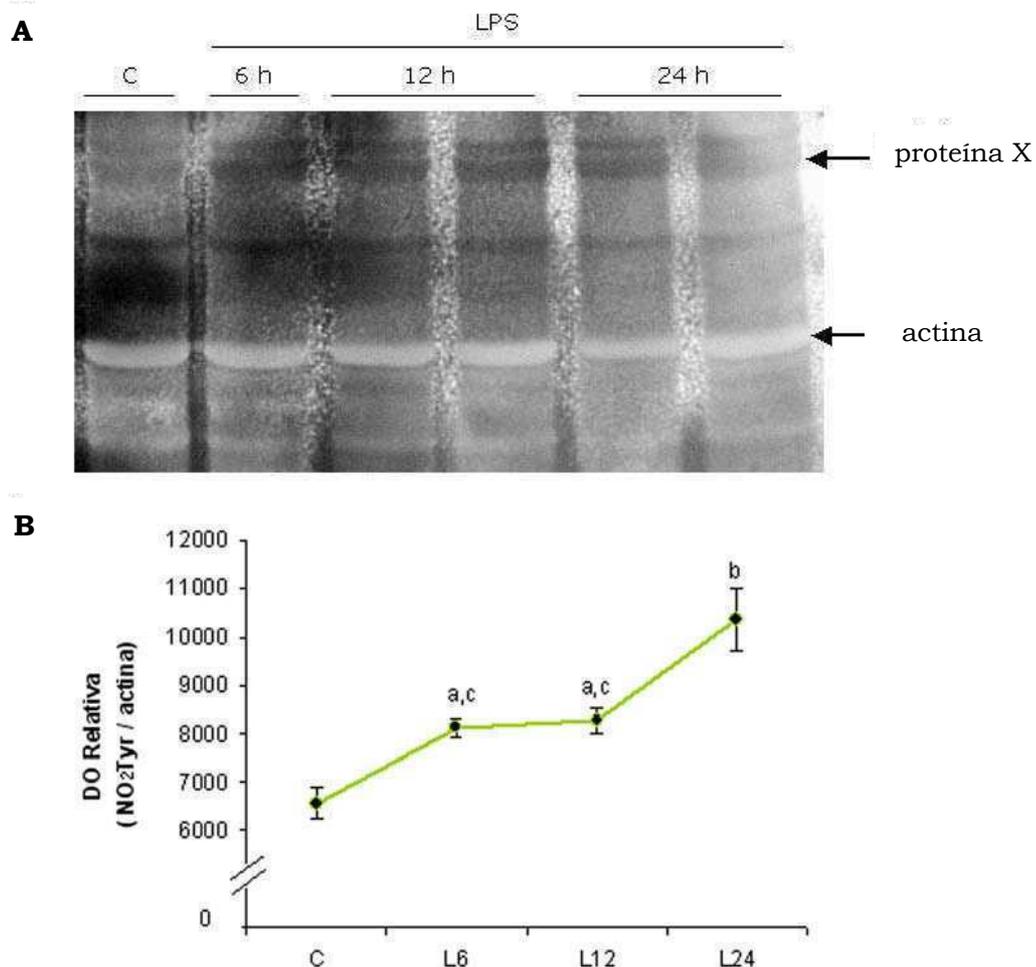


Figura 20.- Análisis de la nitración de proteínas en explantos de decidua. Los explantos fueron incubados en ausencia/presencia de LPS (1ug/ml) por 6, 12 y 24 h. A) Western Blot de las proteínas nitradas en Tyr; B) Análisis densitométrico de las bandas obtenidas. Test de ANOVA. a, $p < 0,05$ vs control; b, $p < 0,01$ vs control; c, $p < 0,05$ vs L24. Los valores representan el promedio \pm SEM, $n = 4$.

Este efecto del LPS *in vitro* sobre las deciduas es similar a lo observado cuando se indujo la reabsorción embrionaria con LPS, donde determinamos la alta sensibilidad de este tejido a la endotoxina (Aisemberg y col., 2007b; Ogando y col., 2003).

Como en nuestro modelo observamos que la producción de NO inducida por LPS está mediada por AEA, analizamos si esta molécula participa del efecto deletéreo del LPS sobre los tejidos estudiados. Para esto, los explantos de útero y de decidua fueron incubados en presencia de LPS (1ug/ml), LPS y un antagonista del receptor CB1 (AM251, 10^{-8} M) o LPS y un antagonista del receptor CB2 (SR144528, 10^{-6} M) y se analizó la morfología tisular por la técnica de tinción con hematoxilina y eosina.

Dado que nuestros resultados muestran que los efectos de la AEA en los **explantos uterinos** ocurren vía el receptor CB1, dichos explantos fueron incubados en presencia de LPS y AM251 solamente. En este caso, la incubación con la endotoxina y el antagonista revirtieron el efecto deletéreo del LPS sobre el tejido (figura 21C).

Por otro lado, los **explantos de decidua** fueron incubados con LPS y cada uno de los antagonistas por separado y en ambos casos, la estructura del tejido parece conservada observándose una reversión en el daño tisular (figuras 22C y D).

Estos resultados muestran que la AEA participa en el efecto deletéreo del LPS tanto sobre el útero como sobre la decidua.

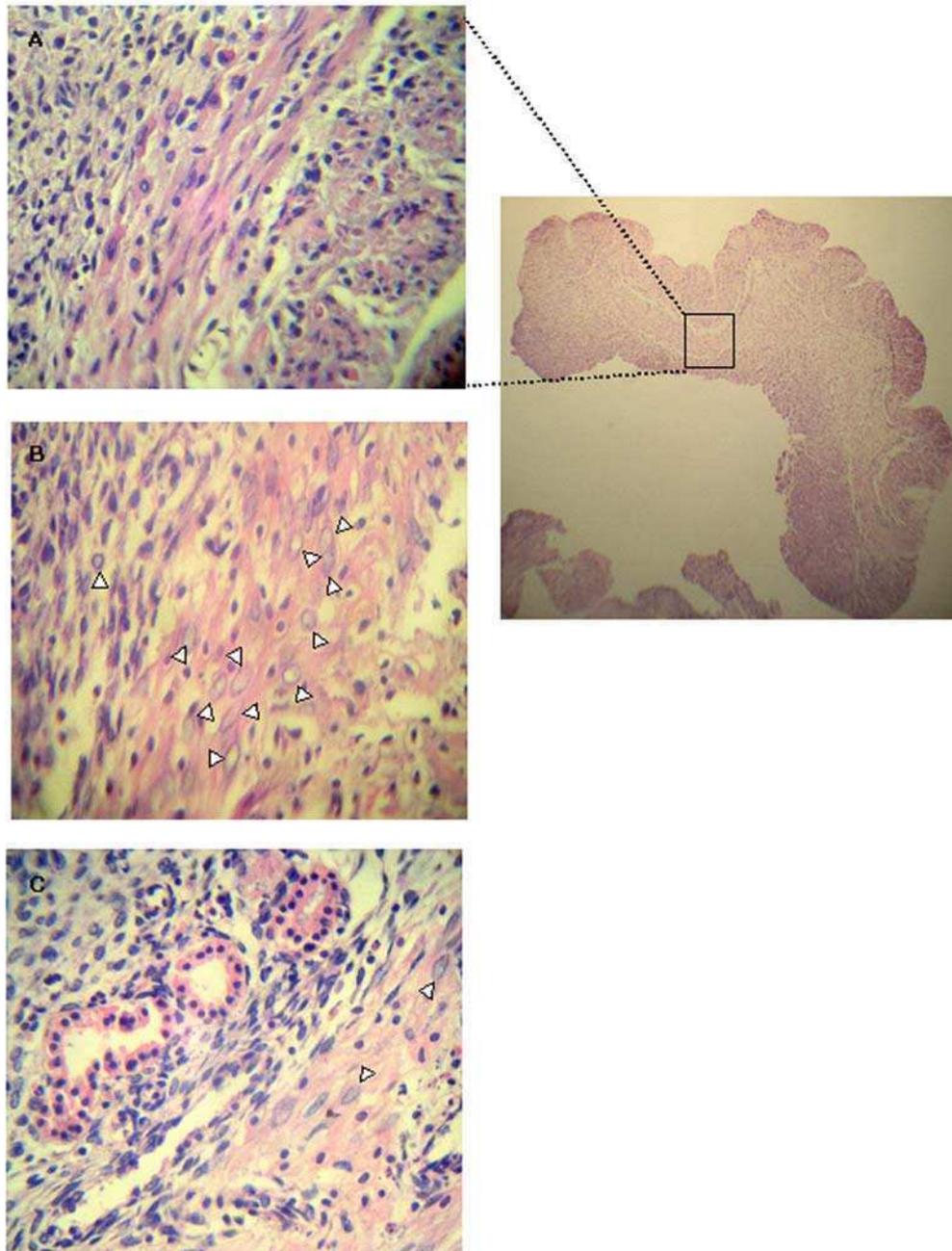


Figura 21.- Análisis histológico de los explantos uterinos tratados con LPS y un antagonista del receptor CB1. Los explantos fueron incubados en presencia de A) medio, B) LPS solo (1ug/ml) o C) LPS y un antagonista de CB1 (AM251, 10^{-8} M). Las secciones fueron evaluadas bajo el microscopio óptico y fotografiadas a distintos aumentos. Figura inicial, 64X; el resto de las figuras fueron fotografiadas a 640X. Las flechas indican células anormales.

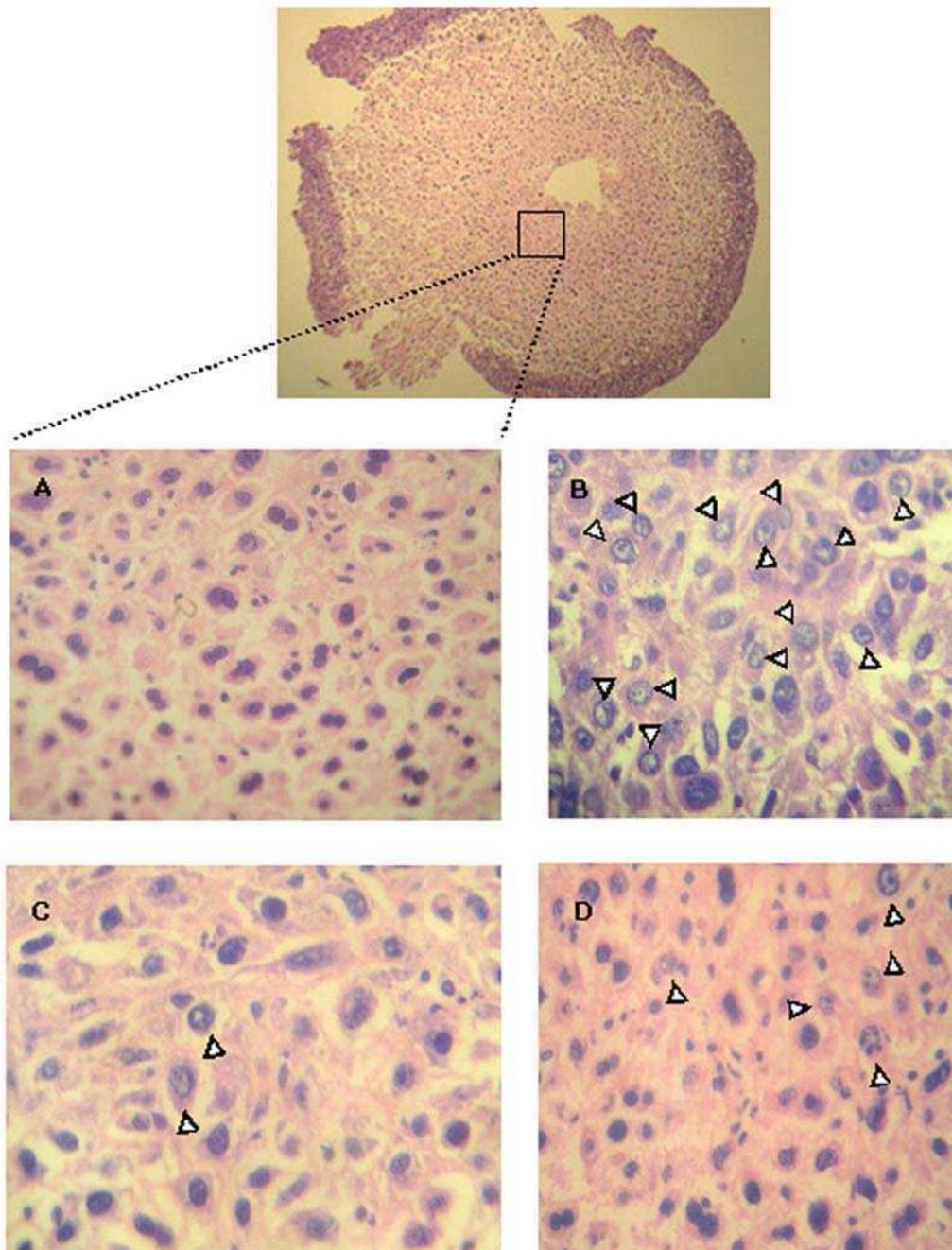


Figura 22.- Análisis histológico de los explantos de decidua tratados con LPS y antagonistas de los receptores CB1 y CB2. Los explantos fueron incubados en presencia de A) medio, B) LPS solo (1ug/ml), C) LPS y un antagonista de CB1 (AM251, 10^{-8} M) o D) LPS y un antagonista de CB2 (SR144528, 10^{-6} M). Las secciones fueron evaluadas bajo el microscopio óptico y fotografiadas a distintos aumentos. Figura inicial, 64X; el resto de las figuras fueron fotografiadas a 640X. Las flechas indican células anormales.

5.- La AEA modula la producción de PGE₂ y PGF_{2α} inducida por LPS.

En el proceso de RE inducida por el LPS están involucrados tanto el sistema nitrérgico como el de las prostaglandinas.

Como mencionamos anteriormente, nuestro grupo ha demostrado que el LPS produce un aumento en los niveles de PGE₂ y PGF_{2α}, tanto en útero como en decidua, y estos mediadores participan de la RE inducida por la endotoxina puesto que el tratamiento con inhibidores de las COX revierten la RE (Aisemberg y col., 2007a).

Por sus propiedades uterotónicas y por la regulación positiva que ejercen sobre la expresión de los receptores a oxitocina (Blanks y Thornton, 2003), las PGs son utilizadas terapéuticamente para inducir el parto. Por esta misma razón, la PGE₂ y la PGF_{2α} pueden ser abortivas en las primeras semanas de embarazo (Katzung, 1992).

Con el objeto de determinar si la producción de PGE₂ y PGF_{2α} inducida por el LPS está mediada por la AEA, explantos uterinos fueron incubados en presencia de LPS (1 ug/ml) o LPS y distintas concentraciones de un antagonista del receptor CB1 (AM251) o del receptor CB2 (SR144528) y se midieron los niveles de ambas PGs por RIA.

En la figura 23 puede observarse que el aumento de la síntesis de PGE₂ inducido por LPS sólo se alteró por la co-incubación con un antagonista de CB1 (AM251) en una concentración 10⁻⁸M, observándose un aumento significativo de la producción de esta PG con respecto al LPS. Por otro lado, la producción de PGE₂ inducida por LPS no se modificó cuando los explantos uterinos se co-incubaron con LPS y un antagonista de CB2 (SR144528) en ninguna de las concentraciones utilizadas. Estos resultados sugieren un efecto bloqueante de la AEA sobre el efecto del LPS en la producción de la PGE₂.

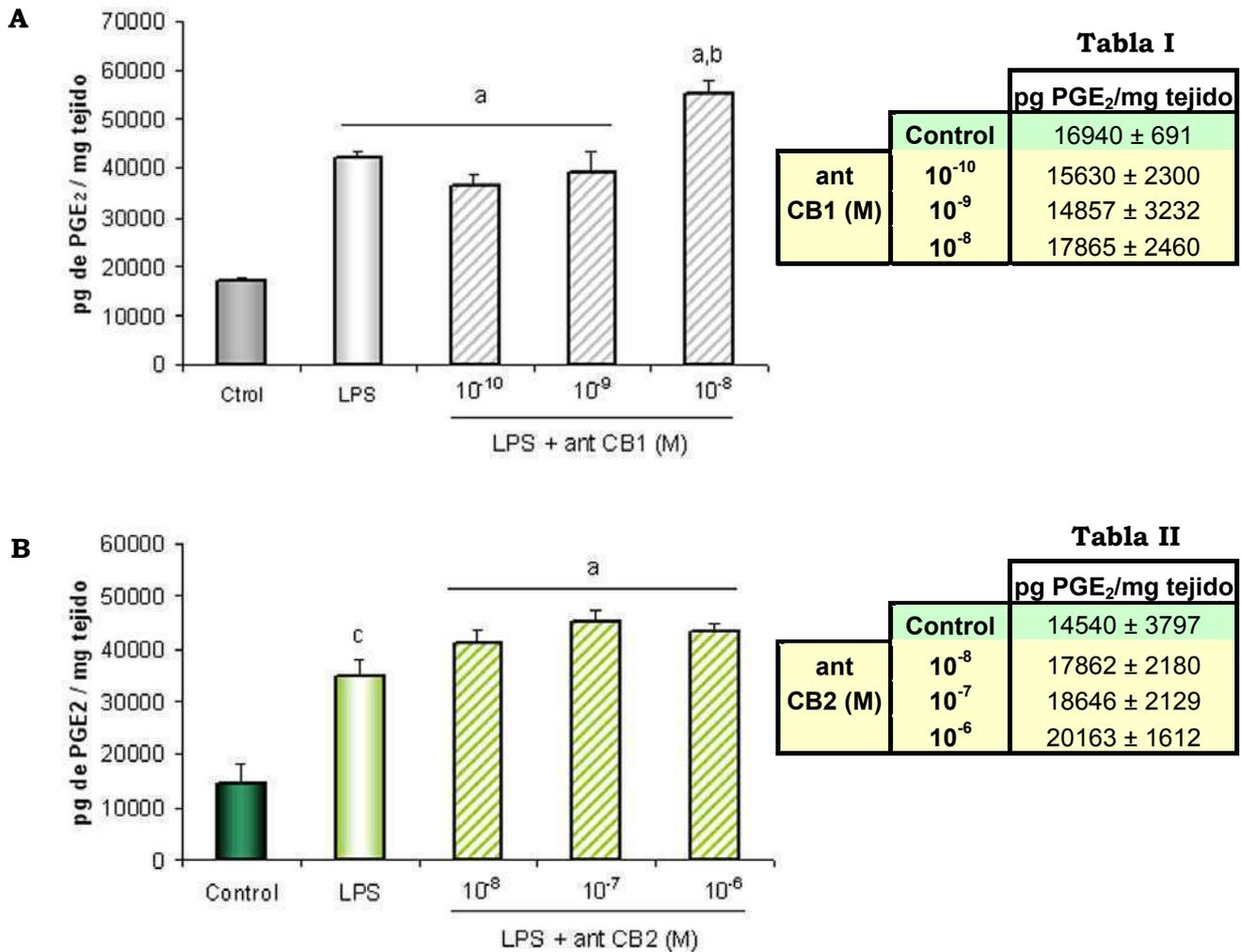


Figura 23.- Niveles de PGE₂. Los explantos uterinos fueron incubados en ausencia/presencia de LPS (1 ug/ml) y distintas concentraciones de A) un antagonista de CB1 (AM251) o B) un antagonista de CB2 (SR144528) durante 24 h. Test de ANOVA. a, $p < 0,001$ vs control; b, $p < 0,01$ vs LPS; c, $p < 0,01$ vs control. Las tablas denotan los valores obtenidos utilizando los antagonistas solos. Los valores representan el promedio \pm SEM, $n=6$.

Cuando estudiamos la producción de la PGF_{2 α} , (figura 24) observamos que el aumento en la producción de este mediador inducido por la endotoxina se revirtió cuando los explantos uterinos se co-incubaron tanto con el LPS y el antagonista del receptor CB1 como cuando se co-incubaron con el LPS y el antagonista de CB2. Esto sugiere que la producción de la PGF_{2 α} inducida por

LPS esta mediada por la AEA, y este efecto estaría mediado por ambos receptores de cannabinoides.

En ningún caso se observaron cambios en la síntesis de PGs cuando se ensayó el efecto de los antagonistas “*per se*” (tablas I y II en las figuras 23 y 24).

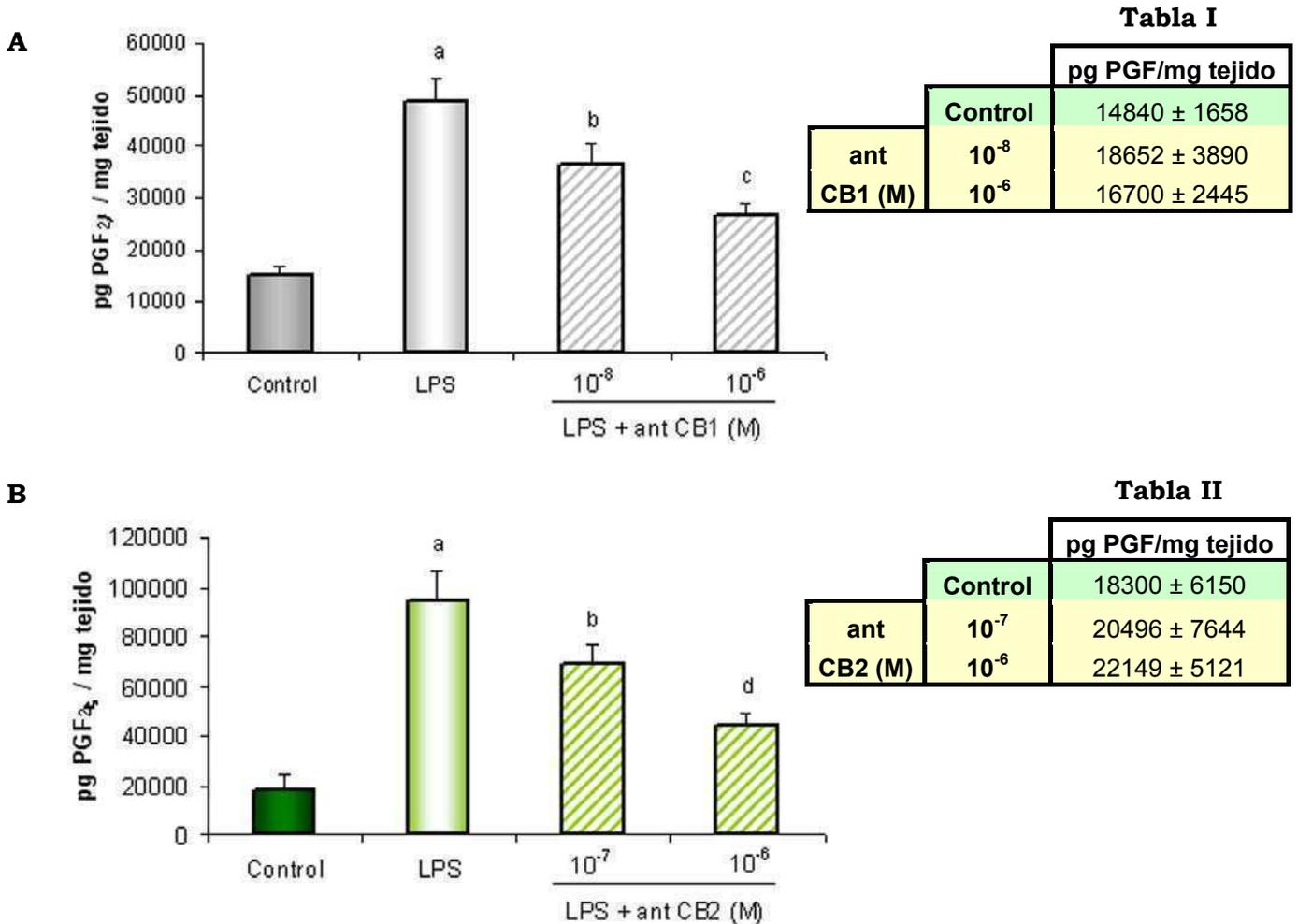


Figura 24.- Niveles de PGF_{2a}. Los explantos uterinos fueron incubados en ausencia/presencia de LPS (1 ug/ml) y distintas concentraciones de A) un antagonista de CB1 (AM251) o B) un antagonista de CB2 (SR144528) durante 24 h. Test de ANOVA. a, p<0,001 vs control; b, p<0,01 vs control; c, p<0,001 vs LPS; d, p<0,01 vs LPS. Las tablas denotan los valores obtenidos utilizando los antagonistas solos. Los valores representan el promedio ± SEM, n=5.

6.- La AEA modula la producción de PGE_2 y $PGF_{2\alpha}$ y los niveles de ARNm y proteicos de la COX-2.

Teniendo en cuenta que la producción de PGs inducida por el LPS está mediada por la AEA, nos propusimos estudiar el efecto de este endocannabinoide en distintos puntos del metabolismo de las PGs.

Como se mencionó anteriormente, Someya y col. (2002) mostraron que la AEA induce la formación de $PGF_{2\alpha}$ en células de la línea celular PC12. Por otro lado, la AEA aumenta la producción de PGE_2 en corion pero disminuye los niveles de este mediador en decidua humana (Mitchell y col., 2008). Con estos antecedentes evaluamos si la AEA es capaz de modular, en principio, la producción de PGE_2 y $PGF_{2\alpha}$ y la expresión de las isoformas de la COX en explantos uterinos.

En la figura 25 se observa que la incubación de los explantos en presencia de m-AEA produjo un aumento en la producción de $PGF_{2\alpha}$ y una disminución en la producción de PGE_2 .

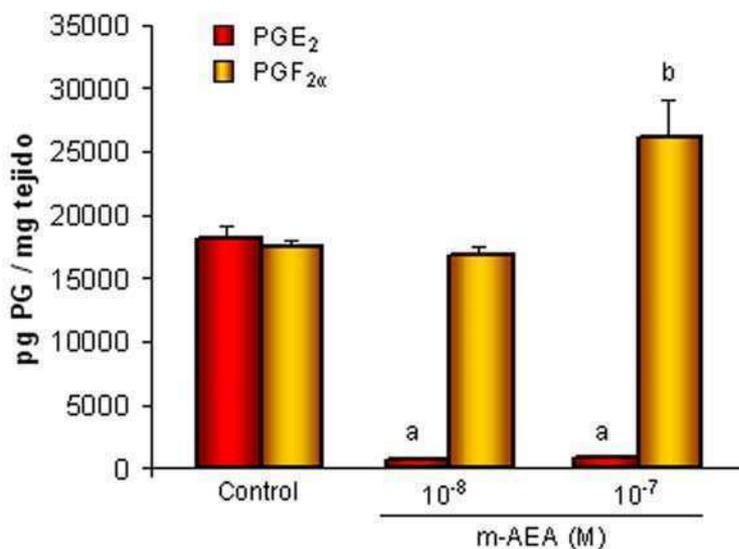


Figura 25.- Cuantificación de los niveles de PGE_2 y $PGF_{2\alpha}$. Los explantos uterinos fueron incubados en ausencia/presencia de distintas concentraciones de m-AEA por 24 h y se cuantificó la producción de ambas PGs por RIA. Test de Student t. a, $p < 0,001$ vs control; b, $p < 0,01$ vs control. Los valores representan el promedio \pm SEM, $n = 5$.

Por otro lado, la m-AEA aumentó significativamente los niveles de ARNm (figura 26B) y los niveles proteicos de la COX-2 (figura 27B) sin modificar los niveles de la COX-1 (figuras 26A y 27A).

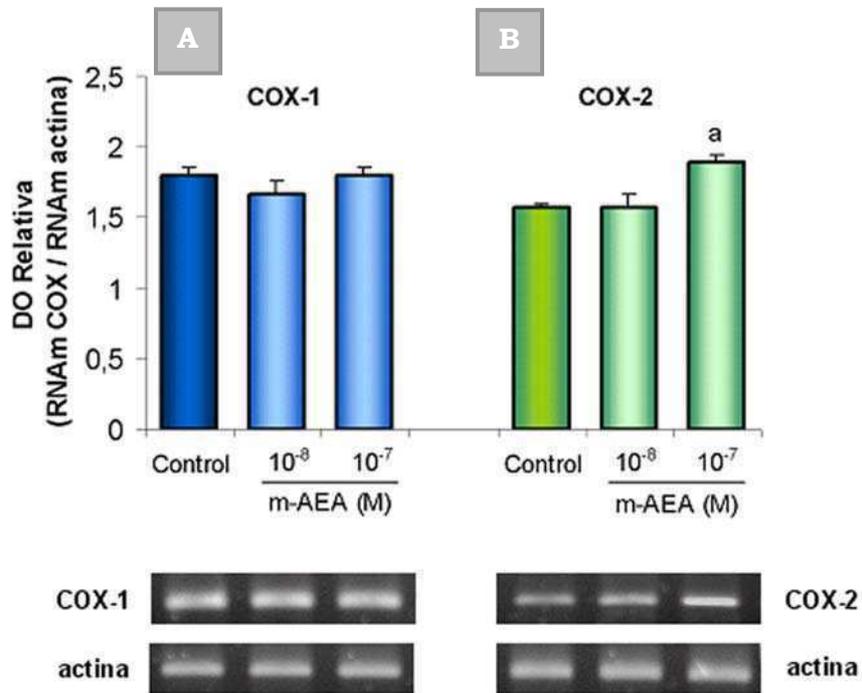


Figura 26.- Efecto de la m-AEA sobre los niveles de ARNm de la COX-1 y la COX-2. Los explantos uterinos fueron incubados en ausencia/presencia de distintas concentraciones de m-AEA por 24 h. A) ARNm de la COX-1; B) ARNm de la COX-2. Arriba, análisis densitométrico de las bandas. Abajo, gel representativo. Test de Student t. a, $p < 0,05$ vs control. Los valores representan el promedio \pm SEM, $n = 3$.

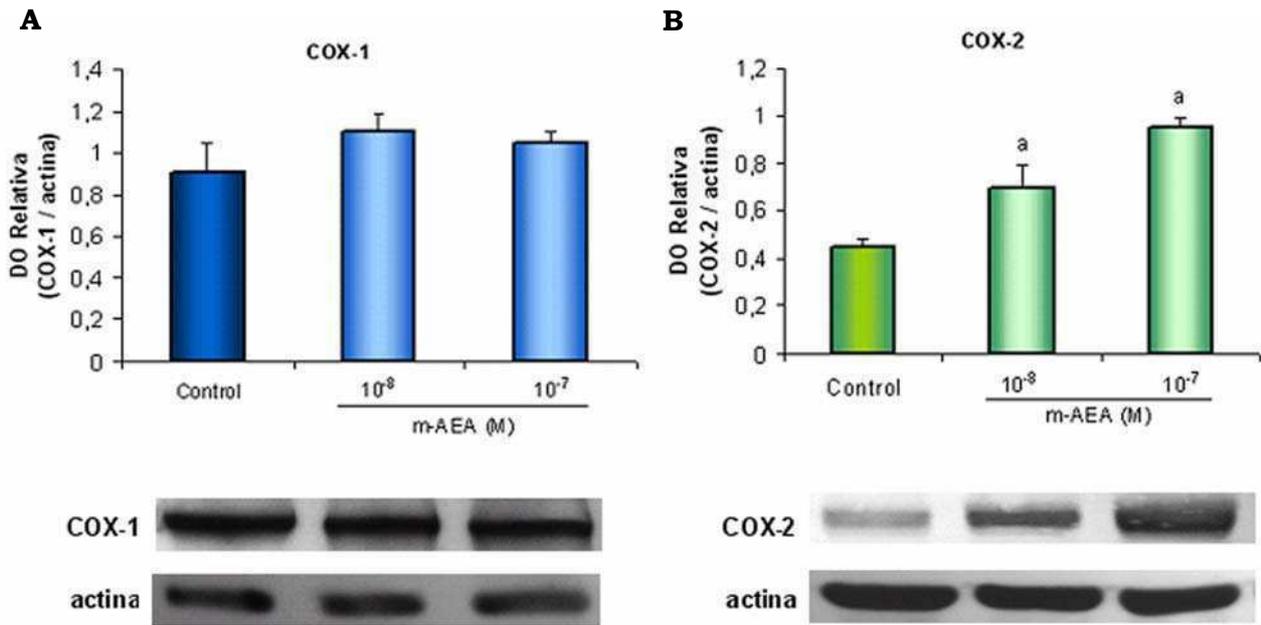


Figura 27.- Efecto de la m-AEA sobre los niveles proteicos de la COX-1 y la COX-2. Los explantos uterinos fueron incubados en ausencia/presencia de distintas concentraciones de m-AEA por 24 h. A) COX-1; B) COX-2. Arriba, análisis densitométrico de las bandas. Abajo, gel representativo. Test de Student t. a, $p < 0,001$ vs control. Los valores representan el promedio \pm SEM, $n = 3$.

7.- La AEA no modifica la actividad de la enzima que transforma PGE_2 en $PGF_{2\alpha}$, la 9-PKR.

Si bien el aumento en los niveles de la $PGF_{2\alpha}$ inducido por la m-AEA correlaciona con el incremento observado en los niveles de ARNm y proteicos de la COX-2, la modificación del mensajero y la expresión proteica de esta isoenzima no se condicen con la disminución de los niveles de la PGE_2 encontrados como consecuencia de la incubación de los explantos uterinos con la m-AEA.

En ciertos tejidos, la PGE_2 puede ser convertida en $PGF_{2\alpha}$ por acción de la 9-prostaglandina E_2 -ceto-reductasa (9-PKR), en una reacción reversible. Esta enzima se ha descrito en varios tejidos de mamíferos como el riñón del cerdo,

la placenta humana y el cuerpo lúteo del conejo entre otros (Kankofer y col., 1999).

Evaluamos entonces, si la AEA modifica la actividad de la 9-PKR en explantos uterinos incubados con m-AEA. La figura 28 muestra que, si bien existe actividad de la 9-PKR en el útero de ratón preñado, no se observaron cambios significativos en la actividad de esta enzima cuando los explantos se incubaron con la concentración de m-AEA utilizada, indicando que las modificaciones observadas en la síntesis de PGE_2 no se deben a cambios en la actividad de esta enzima.

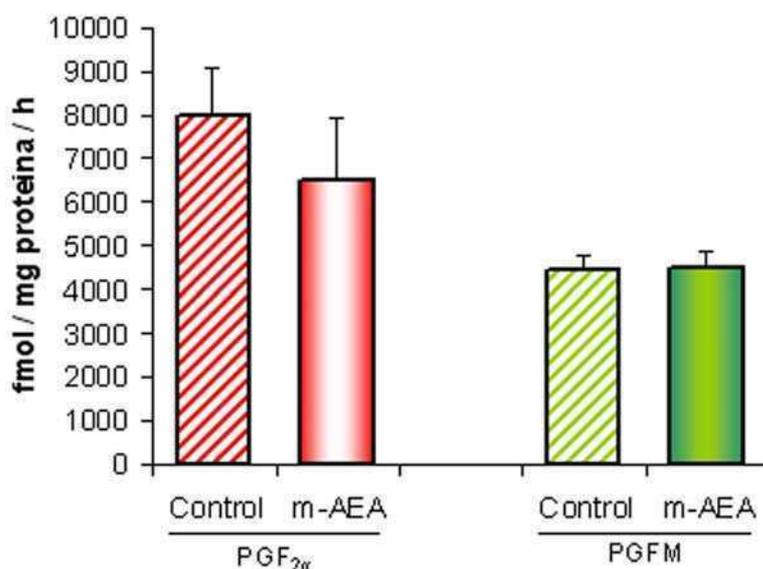


Figura 28.- Efecto de la m-AEA sobre la actividad de la 9-PKR. Los explantos uterinos fueron incubados en ausencia/presencia de m-AEA 10^{-7}M por 24 h. La actividad se expresa como fmol $\text{PGF}_{2\alpha}$ o su metabolito (PGFM)/mg de proteína /h. Test de Student t. Los valores representan el promedio \pm SEM, n =5.

8.- La AEA incrementa la producción del metabolito de PGE_2 pero no modifica los niveles de ARNm ni los niveles proteicos de la 15-PGDH.

Como se mencionó anteriormente, la 15-hidroxiprostaglandina dehidrogenasa (15-PGDH) cataliza la oxidación del grupo 15-hidroxilo de las prostaglandinas

y las convierte en metabolitos inactivos (Hansen, 1976). Este es el primer paso en la inactivación de las prostaglandinas y, aunque esta enzima se encuentra en casi todos los órganos, sus concentraciones máximas se observan en el bazo, el pulmón y la corteza renal. La expresión y actividad de la 15-PGDH también ha sido localizada en útero (Franchi, 1985).

Con el objeto de evaluar si la disminución en los niveles de PGE₂ se debe a un aumento en la actividad y/o la expresión de la 15-PGDH, incubamos explantos uterinos con distintas concentraciones de m-AEA y determinamos, en primera instancia, los niveles de ARNm y los niveles proteicos de esta enzima.

Observamos que la m-AEA, en las concentraciones utilizadas, no modificó los niveles del ARNm de la 15-PGDH (figura 29) ni tampoco los niveles proteicos de la enzima (figura 30).

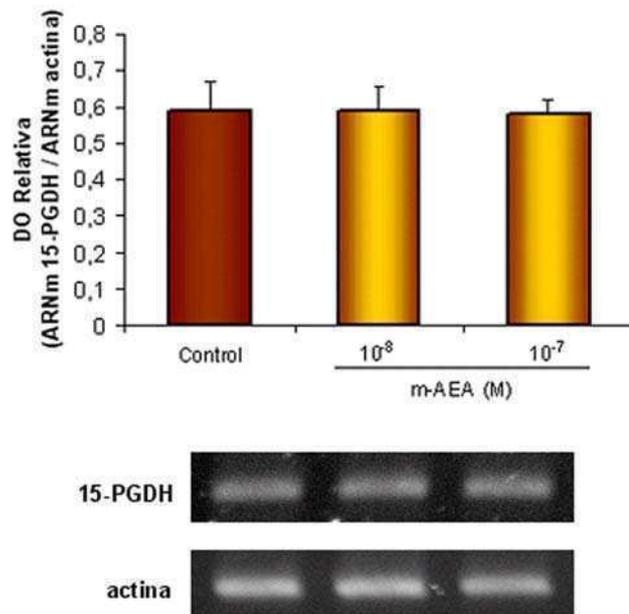


Figura 29.- Efecto de la m-AEA sobre los niveles de ARNm de la 15-PGDH. Los explantos uterinos fueron incubados en ausencia/presencia de m-AEA por 24 h. Arriba, se muestra el análisis densitométrico de las bandas y abajo, un gel representativo. Test de Student t. Los valores representan el promedio \pm SEM, n =3.

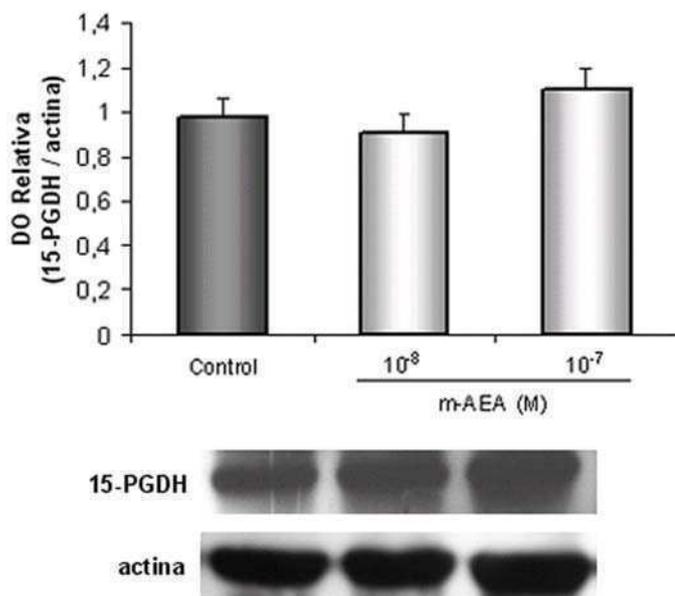


Figura 30.- Efecto de la m-AEA sobre los niveles proteicos de la 15-PGDH. Los explantos uterinos fueron incubados en ausencia/presencia de m-AEA por 24 h. Arriba, se muestra el análisis densitométrico de las bandas y abajo, un gel representativo. Test de Student t. Los valores representan el promedio \pm SEM, n =3.

A continuación, explantos uterinos fueron incubados con m-AEA por 24h y se cuantificaron los niveles del metabolito de PGE₂ (PGEM, metabolito inactivo) como se describió en la sección de *Materiales y Métodos*, y se midieron los niveles de PGE₂ en la misma muestra.

Como se mostró anteriormente (figura 25), los niveles de PGE₂ disminuyeron cuando los explantos uterinos fueron incubados en presencia de m-AEA (figura 31A); y al mismo tiempo, en la misma muestra, observamos que la m-AEA produce un aumento en los niveles del metabolito de PGE₂ (PGEM, figura 31B). Esto implica que la AEA podría ser responsable de los niveles disminuidos de la PGE₂ observados, probablemente debido a un incremento en la actividad de degradación de este mediador.

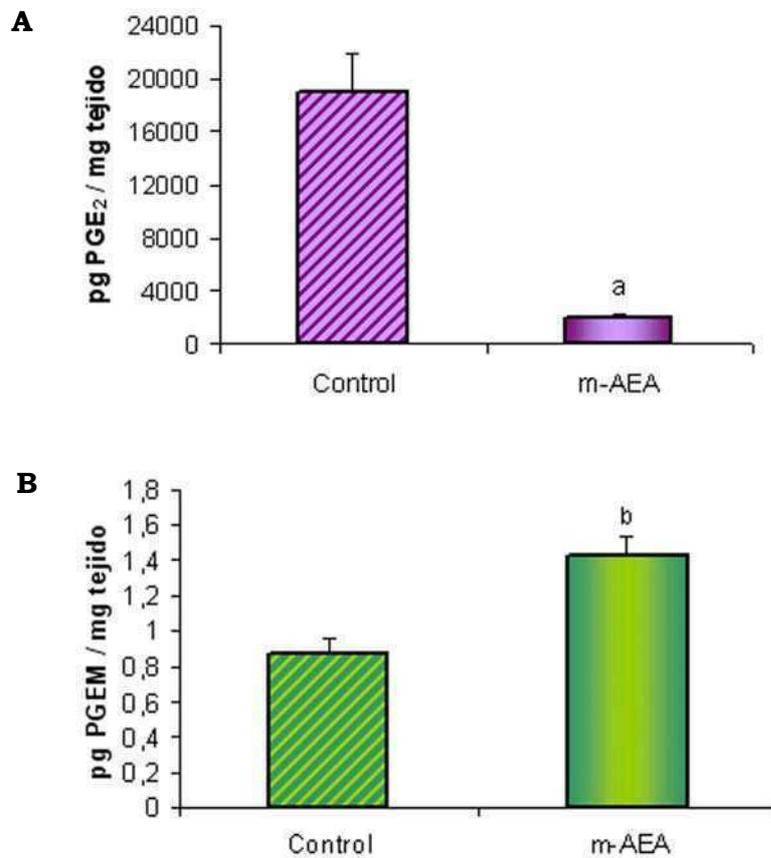


Figura 31.- Efecto de la m-AEA sobre los niveles de PGE₂ y PGEM. Los explantos uterinos fueron incubados en ausencia/presencia de m-AEA (10⁻⁷M) por 24 h. A) Producción de PGE₂; B) Producción del metabolito de PGE₂ (PGEM). Test de Student t. a, p<0,001 vs control; b, p<0,01 vs control. Los valores representan el promedio ± SEM, n =5.

9.- La AEA modifica la actividad de la Prostaglandina E Sintasa y los niveles de ARNm y proteicos de la Prostaglandina E Sintasa microsomal 1.

Como se detalló en la Introducción, la PGE₂ se forma a partir del PGH₂ por la acción de la prostaglandina E sintasa en dos pasos: isomerización del endoperóxido y su reducción.

Evaluamos entonces la actividad de síntesis de la PGE₂ como se describió en la sección *Materiales y Métodos*. Brevemente, los explantos uterinos se incubaron en presencia de m-AEA y m-AEA+Indometacina, para luego recuperar el tejido y medir la actividad de la PGE sintasa. Se utilizó Indometacina (un inhibidor no selectivo de las COX) para descartar la producción de PGE₂ proveniente de la síntesis *de novo* a partir de su sustrato, el AA, ya que se estaría evaluando también la actividad de las COXs.

Utilizando como sustrato el PGH₂, la actividad de la enzima se expresó como pg PGE₂/mg de proteína/h. En la figura 32 observamos que la m-AEA disminuyó la actividad de la PGES.

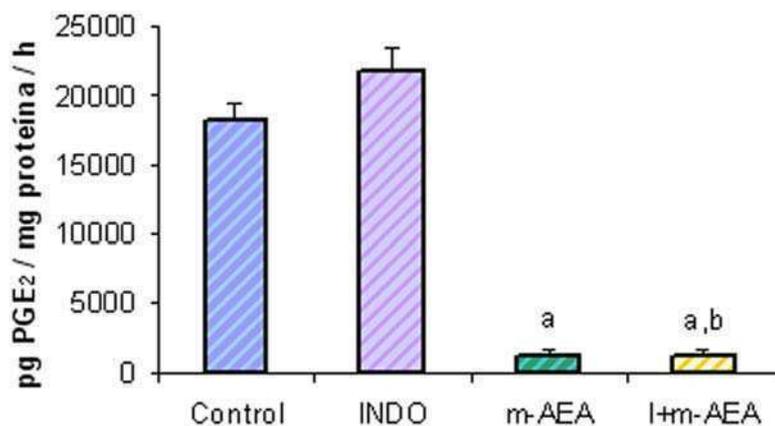


Figura 32.- Actividad de la PGES. Los explantos uterinos fueron incubados en ausencia/presencia de m-AEA (10⁻⁷M), Indometacina (10⁻⁶M) o m-AEA+Indo durante 24 h. Test de ANOVA. a, p<0,001 vs control; b, p<0,001 vs Indo. Los valores representan el promedio ± SEM, n=4.

Hasta el momento se han identificado tres enzimas que sintetizan PGE₂: la Prostaglandina E Sintasa microsomal 1 (PGESm-1), la Prostaglandina E Sintasa microsomal 2 (PGESm-2) y la Prostaglandina E Sintasa citosólica (PGESc). La expresión de estas enzimas también podría estar afectada por la presencia de la AEA. Decidimos estudiar si la m-AEA modula los niveles de ARNm de las 3 isoformas de la PGE₂ sintasa.

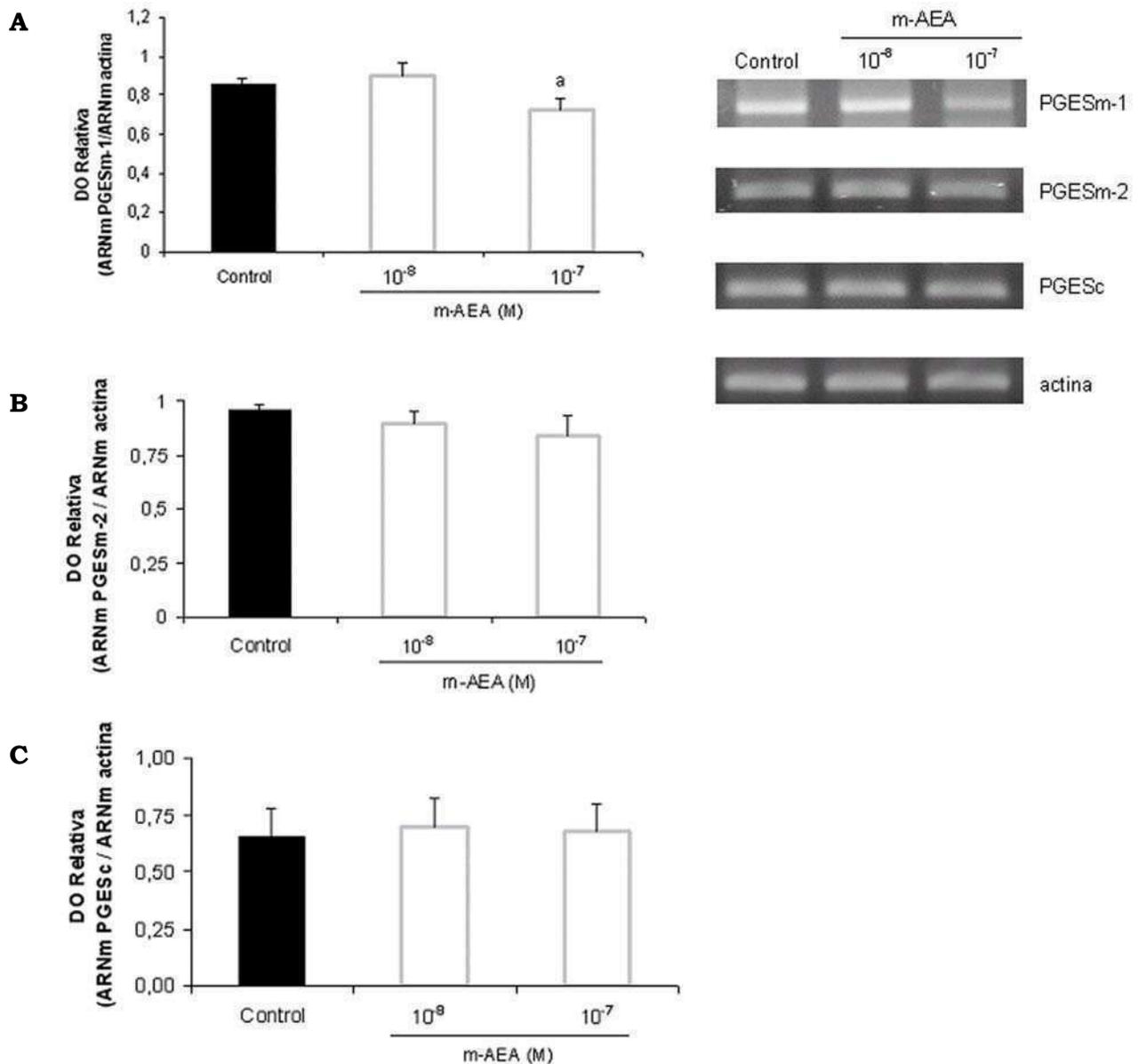


Figura 33.- Niveles de ARNm de las isoformas de la PGES. Los explantos uterinos fueron incubados en ausencia/presencia de m-AEA durante 24 h. En la figura se muestra a la izquierda el análisis densitométrico de las bandas y a la derecha un gel representativo. A) PGESm-1; B) PGESm-2; C) PGESc. Test de Student t. a, $p < 0,05$ vs control. Los valores representan el promedio \pm SEM, $n=4$.

En la figura 33 se observa que la m-AEA modificó solamente los niveles del ARNm de la PGESm-1, cuando los explantos uterinos fueron incubados en presencia de m-AEA 10^{-7} M.

Sabiendo que la expresión de la PGESm-1 se induce en varios tejidos por acción de citoquinas pro-inflamatorias o factores de crecimiento (Samuelsson y col., 2007) evaluamos si la AEA modificaba los niveles proteicos de esta enzima. La figura 34 muestra que la incubación de los explantos uterinos con m-AEA (10^{-7} M) disminuyó significativamente los niveles proteicos de la PGESm-1.

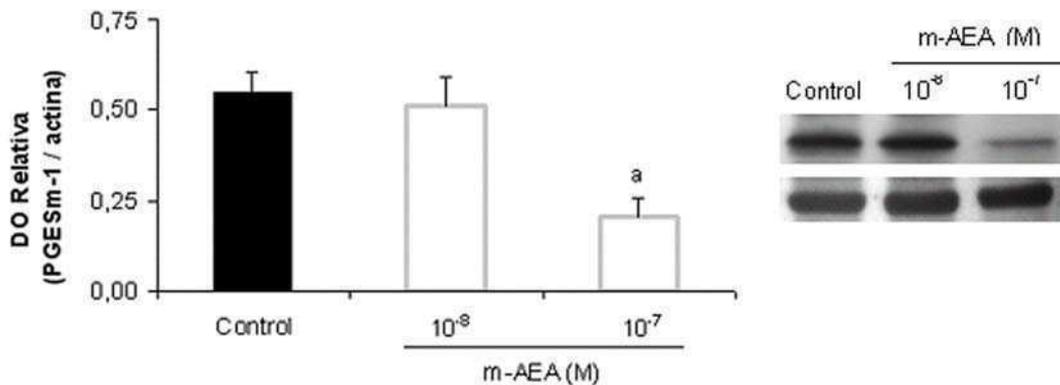


Figura 34.- Niveles proteicos de la PGESm-1. Los explantos uterinos fueron incubados en ausencia/presencia de m-AEA durante 24 h. En la figura se muestra a la izquierda el análisis densitométrico de las bandas y a la derecha un gel representativo. Test de Student t. a, $p < 0,05$ vs control. Los valores representan el promedio \pm SEM, $n=4$.

Los resultados expuestos en el punto 5 muestran que la producción de PGs inducida por el LPS está mediada por la AEA. Por otro lado, los resultados expuestos en los puntos 6, 7, 8 y 9 muestran que la AEA aumenta el ARNm y la expresión proteica de la COX-2 y la síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pero disminuye la de PGE_2 . Este efecto inhibitorio del endocannabinoide sobre los niveles medidos de PGE_2 podrían adjudicarse a un metabolismo incrementado por la actividad aumentada de la 15-PGDH y al descenso en los niveles de ARNm, la expresión proteica de la PGESm-1 y de la actividad de la PGE sintasa, enzima necesaria para la síntesis de PGE.

discusión

La reproducción en humanos representa una paradoja singular: si bien es crítica para la supervivencia de la especie, este proceso es marcadamente ineficiente considerando que la tasa de aborto temprano post-implantación es de alrededor del 30% en los embarazos comprobados (Clark y Chaouat, 1989).

Debido a que el 75% de las pérdidas representan fallas en la implantación, los embarazos en estos casos, no son reconocidos como tales y, por lo tanto, existe un importante subregistro donde la realidad en cuanto a pérdida de embarazos trasciende lo observado clínicamente ya que muchas mujeres nunca llegan a saber que han tenido un aborto. Esta situación sugiere que la tasa de aborto espontáneo real puede estar acercándose al 40% ó 50%. Se ha establecido que sólo el 50% ó 60% de las concepciones llegan a la semana 20 de gestación (Wilcox y col., 1988).

Si bien la pérdida temprana del embarazo o el aborto espontáneo generalmente no conlleva complicaciones para la salud física de la madre, sí va acompañada de un considerable estrés emocional que incluye sentimientos de ansiedad y depresión profunda que pueden extenderse hasta un año después del evento (Friedman y col., 1989; Neugebauer y col. 1992; Robinson y col. 1994). La situación se agrava aún más cuando estas pérdidas se producen a repetición, y cuando ante la consulta con el especialista, éste no puede asegurar la causalidad del aborto ni su tratamiento.

Esta evidencia muestra que el establecimiento y mantenimiento del embarazo es una situación mucho menos exitosa de lo que uno podría imaginar. Si bien las etiologías más comunes de las pérdidas gestacionales son las anomalías cromosómicas y los trastornos endocrinos e inmunes, un alto porcentaje de las mismas es de origen idiopático.

Las infecciones del tracto urinario (ITUs) son un hecho muy común durante el embarazo y se caracterizan por la presencia de una cantidad significativa de bacterias que colonizan parte o la totalidad del tracto urinario. Estas infecciones, sobre todo si cursan en forma asintomática, son uno de los factores de riesgo más importantes para la salud tanto materna como fetal. En los últimos años, las ITUs han sido consideradas una de las principales

causas de morbilidad ginecológica produciendo infertilidad, aborto y parto prematuro (Cram y col., 2002).

Las enterobacterias (pertenecientes al grupo Gram negativo (-), y productoras de LPS) son responsables de aproximadamente el 90% de las ITUs. El LPS es uno de los principales componentes de la membrana externa de estas bacterias y se sabe que actúa sobre las células a través del receptor de tipo Toll (TLR) 4 contribuyendo al desarrollo de una respuesta inflamatoria (Beutler y col., 2003), primariamente por la activación de macrófagos, la producción y secreción de citoquinas inflamatorias como el TNF- α y la liberación de prostanoïdes (Shackelford y col., 1995; Michalek y col., 1980; Michie y col., 1988; Spinass y col., 1991).

Trabajos previos de nuestro laboratorio permitieron establecer un modelo de reabsorción embrionaria murino inducido por LPS (Ogando y col., 2003; Aisemberg y col., 2007a) en el cual, la administración intraperitoneal de una única dosis de LPS de 1 μ g/g de peso a hembras BALB/c en el día 7 de preñez, produce 100 % de reabsorción embrionaria a las 24 h post-inyección. Esta única dosis produce además, la necrosis del embrión y de la mayor parte de la decidua. Los restos de los embriones reabsorbidos son expulsados 48 h después de haber administrado el LPS y la madre recupera su capacidad gestacional.

De estos estudios podemos destacar que la reabsorción embrionaria inducida por el LPS cursa con un incremento significativo en la producción decidua y uterina de NO, el cual alcanza su máximo nivel a las 6 h post-inyección. Las concentraciones elevadas de este mediador producen daño oxidativo mediado por el anión peroxinitrito, lo que se evidencia en el aumento en los niveles de nitración proteica. Por último, el incremento en la producción de NO es acompañado por un aumento en la expresión proteica de la NOSi en ambos tejidos y la administración del inhibidor de la actividad de esta isoenzima, la aminoguanidina, revierte completamente la reabsorción embrionaria inducida por la endotoxina (Ogando y col., 2003).

Por otro lado, en el proceso de reabsorción embrionaria también las prostaglandinas están involucradas. Nuestro grupo (Aisemberg y col., 2007a)

ha demostrado que el LPS produce un aumento en los niveles de PGE₂ y PGF_{2α}, tanto en el útero como en la decidua, y estos mediadores participan de la reabsorción embrionaria inducida por la endotoxina puesto que el tratamiento con inhibidores de las COX revierte este fenómeno.

En conjunto, estos antecedentes ponen en evidencia la importancia de la participación del NO y de las prostaglandinas en el proceso de reabsorción embrionaria inducido por el LPS.

Entre los factores que afectan negativamente las funciones reproductivas podemos mencionar, además de los ya descritos, el uso crónico de la marihuana como droga recreacional. Se ha informado que el consumo del Δ⁹-tetrahidrocannabinol y otros derivados de la marihuana producen restricción del crecimiento fetal y fallas en la preñez (Das y col., 1995; Pertwee y col., 1997).

Los endocannabinoides, como la AEA, son ligandos endógenos de los receptores de cannabinoides y mimetizan muchos de los efectos asociados al uso del cannabis. El sistema endocannabinoide (SEC), en las últimas décadas, se ha vuelto de gran interés debido a sus efectos pleiotrópicos. En especial, parece tener particular relevancia en eventos reproductivos puesto que los endocannabinoides han sido postulados como una importante señal de diálogo en la interfase materno-fetal. Como se mencionó en la introducción, niveles elevados de AEA en los sitios interimplantatorios se asocian con una inhibición de la proliferación del trofoblasto, mientras que niveles bajos de esta molécula en los sitios implantatorios producen el efecto contrario. De esta manera, un efecto dual de la AEA puede observarse dependiendo de su concentración local (Paria y col., 2000).

Por otro lado, se ha descrito que el LPS modula el SEC de distintas maneras dependiendo del tipo celular estudiado. En linfocitos humanos, Maccarrone y col. (2001) han demostrado que el LPS induce la síntesis de AEA y disminuye la expresión proteica y la actividad de la FAAH. Así mismo, Liu y col, (2003) han descrito que la endotoxina aumenta los niveles de AEA y la actividad de la NAPE-PLD en macrófagos murinos, y a su vez, aumenta los niveles de ARNm y la actividad de la FAAH en este tipo celular.

Si bien se han informado varios trabajos donde se describe la relación entre la anandamida y la producción de mediadores como el NO y las prostaglandinas, hay discrepancia entre el rol anti-inflamatorio o pro-inflamatorio que se le atribuye a esta molécula dependiendo del tejido y la especie estudiada (Ortega y col., 2005; Correa y col., 2009; Sugamura y col., 2009; Cernak y col., 2004).

Como hemos mencionado anteriormente, trabajos previos de nuestro laboratorio muestran que la anandamida modula la producción de NO en la placenta de rata (Cella y col., 2008). Hallazgos de otros investigadores muestran que este endocannabinóide aumenta la síntesis de NO en células endoteliales renales de rata (Deutsch y col., 1997) y en líneas celulares endoteliales humanas (Fimiani y col., 1999).

En cuanto a la producción de PGs, Someya y col. (2002) observaron que la AEA induce la formación de PGF_{2α} en células de la línea celular PC12. Por otro lado, la AEA aumenta la producción de PGE₂ en corion pero disminuye los niveles de este mediador en decidua humana (Mitchell y col., 2008).

Estos antecedentes nos permitieron plantear nuestra hipótesis de trabajo: la anandamida participa en la reabsorción embrionaria inducida por el lipopolisacárido.

Para demostrar esta hipótesis decidimos realizar un abordaje ***in vitro*** de manera de estudiar el mecanismo por el cual la anandamida participaría en la reabsorción embrionaria.

Para determinar las condiciones experimentales del trabajo, en primer lugar realizamos una curva concentración-respuesta del LPS sobre la producción de NO en explantos de útero y de decidua de ratones de día 7 de gestación, teniendo en cuenta que esta molécula es uno de los mediadores que participa en el mecanismo de reabsorción embrionaria inducida por LPS. Las concentraciones utilizadas (0,1 ug/ml, 1 ug/ml y 5 ug/ml) fueron seleccionadas teniendo en cuenta la bibliografía (Liu y col., 2003; Maccarrone y col., 2001; Do y col., 2004; Matias y col., 2002) y establecimos las

condiciones óptimas de cultivo para el resto de los experimentos. La concentración de LPS elegida fue de 1 ug/ml ya que la misma fue la única concentración que produjo un incremento significativo de la producción de NO en el tiempo (figura 1B). La producción máxima de NO₃ + NO₂ se produjo a las 24 h de incubación para los explantos uterinos y a las 12 h de incubación para los explantos de decidua (figura 1B). Por lo tanto, en los experimentos siguientes los tejidos fueron incubados a los tiempos mencionados.

En primer lugar estudiamos el efecto del LPS sobre el SEC ya que la participación de la AEA en el mecanismo de acción de la endotoxina debería estar asociada a modificaciones en alguno(s) de los componentes del sistema endocannabinoide.

Por ello, investigamos en primera instancia si los receptores de cannabinoides CB1 y CB2 están regulados por el tratamiento con LPS. Estudiamos entonces el efecto de la endotoxina sobre los niveles de ARNm de los receptores CB1 y CB2. Así como lo detectamos en la preñez tardía (Franchi y col., 2005), observamos la expresión de CB1 y describimos por primera vez la presencia del receptor CB2 en el útero de ratón en la preñez temprana. Los resultados muestran un efecto estimulador del LPS sobre los niveles del ARNm de CB1 tanto en el útero como en la decidua, mientras que los niveles del ARNm de CB2 sólo se incrementaron en los explantos de decidua (figuras 2 y 3).

El paso siguiente consistió en determinar si el LPS modificaba las dos principales vías de síntesis de la anandamida. Para ello, estudiamos la actividad de la AEA sintasa y los niveles de ARNm y proteicos de la NAPE-PLD. Observamos que el LPS aumentó la actividad de la AEA sintasa sólo en el caso de los explantos uterinos (figura 4A), no observándose cambios en la decidua (figura 4B).

Cuando estudiamos la expresión de la NAPE-PLD, no observamos diferencias significativas en los niveles de ARNm de esta enzima, pero sí en la expresión proteica de la misma, al incubar el útero y la decidua con LPS (figuras 5 y 6).

Estos resultados muestran que la incubación con la endotoxina aumentaría la síntesis de AEA tanto en el útero como en la decidua, vía la AEA sintasa y la

NAPE-PLD, lo que contribuiría a un mayor nivel de AEA en el sitio de implantación. Esto concuerda con otros trabajos donde se informa que el LPS induce la síntesis de AEA en linfocitos humanos (Maccarrone y col., 2001) y macrófagos murinos (Liu y col., 2003).

Algunos investigadores sostienen que el “tono” y la actividad biológica de la AEA *in vivo* son regulados por la actividad de la FAAH, enzima que degrada este endocannabinoide (Cravatt y col., 2003). Tomando en cuenta esto y considerando que la concentración de AEA está regulada no sólo por su síntesis sino también por su degradación, estudiamos si esta última estaba afectada por el tratamiento *in vitro* con LPS. Para ello, determinamos el efecto del LPS sobre la actividad, los niveles proteicos y los niveles del ARNm de la FAAH. Observamos que la incubación con el LPS produce una disminución no solo de la actividad de la FAAH sino también de sus niveles de ARNm y proteicos en el útero de ratón (figura 7). Esto concuerda con los resultados del grupo de Maccarrone y col. (2001) quienes demostraron que la endotoxina disminuye la expresión de la FAAH y su actividad en linfocitos humanos.

Los resultados obtenidos hasta aquí sugieren que el LPS incrementaría los niveles uterinos de AEA, promoviendo su síntesis y disminuyendo su degradación.

Por otro lado encontramos, por primera vez, actividad y expresión de la FAAH en la decidua y a su vez, observamos que los explantos incubados en presencia de LPS muestran un incremento significativo de los niveles proteicos y de la actividad de esta enzima (figura 7). Sin embargo, no fue posible detectar ARNm de la FAAH probablemente debido a que el ARNm podría haberse degradado. Por ello, analizamos la expresión de este mensajero a las 3, 6 y 9 h de cultivo pero tampoco fue posible, en nuestras condiciones experimentales, detectar el ARNm para esta enzima (*no se muestra*). La decidua es un tejido muy sensible al LPS como ya lo observamos en los tratamientos *in vivo* (Ogando y col., 2003) y esto podría reflejarse en una mayor inestabilidad del ARNm de la FAAH. Es posible entonces que la endotoxina incremente los niveles de ARNm de esta enzima antes de las 3 h de cultivo, lo que se evidenciaría luego en un aumento de los niveles proteicos observados en la figura 7.

Como mencionamos en los resultados, el LPS presenta efectos antagónicos sobre los niveles de proteínas y de actividad de la FAAH entre el útero y la decidua, reflejando la especificidad de cada tejido para responder a la endotoxina. Además, siendo el útero y la decidua tejidos que se encuentran muy próximos espacialmente, la AEA acumulada en el útero (debido a un aumento en su síntesis y a una disminución en su degradación inducidos por el LPS) podría difundir hasta la decidua sumándose a los efectos deletéreos del LPS sobre el tejido. El estímulo producido por la AEA en la decidua podría disparar “*mecanismos de defensa*” que contribuyan a eliminar la propia AEA del microambiente la cual, en altas concentraciones, resulta tóxica para este tejido. Maccarrone y col. (2004) han informado que los blastocitos murinos liberan un compuesto capaz de activar la FAAH uterina disminuyendo así los niveles de AEA (que son blastotóxicos) y favoreciendo la implantación. Si bien no se ha identificado este compuesto, se sabe que es de naturaleza lipídica.

Teniendo en cuenta estos antecedentes y nuestros resultados, y conociendo la naturaleza lipídica de la AEA, nos propusimos estudiar si este endocannabinoide podría modular la actividad y la expresión de la FAAH en los explantos de decidua. Para ello, utilizamos un análogo no hidrolizable de la AEA, la m-AEA, y como observamos en la figura 8, la m-AEA incrementó tanto la actividad como la expresión proteica de la FAAH, indicando que la decidua reaccionaría ante el aumento de los niveles de AEA aumentando su propia degradación.

Para evaluar si el incremento de la actividad de la FAAH decidual inducida por el LPS está mediada por la AEA (figura 9), incubamos dicho tejido en presencia de LPS y antagonistas de los receptores de cannabinoides. Nuestros resultados muestran que el incremento observado con la endotoxina se revierte co-incubando los tejidos con LPS y un antagonista de CB1 o con LPS y un antagonista de CB2. Estos resultados muestran por primera vez que la AEA participa de la regulación de su propio metabolismo y que ambos receptores de cannabinoides estarían mediando este efecto.

Estudios previos han demostrado que los niveles séricos elevados de AEA van en detrimento de un embarazo exitoso (Wang y col., 2006b; Habayeb y col., 2002; Maccarrone y col., 2000b). De hecho, se ha propuesto que los niveles de

AEA en sangre podrían ser utilizados como marcadores tempranos de aborto espontáneo, puesto que mujeres cuyos embarazos terminaron en un aborto espontáneo presentan niveles elevados de AEA plasmática respecto de aquellas cuyos embarazos llegaron a término (Wang y col., 2006b; Habayeb y col., 2002). Cabe destacar que los efectos de la AEA parecen estar regulados principalmente por su degradación por la FAAH. Maccarrone y col. (2000b) observaron que linfocitos maternos de mujeres que han sufrido abortos espontáneos presentan niveles y actividad reducidos de la FAAH respecto de las que tienen un embarazo exitoso, sugiriendo que la FAAH linfocitaria podría utilizarse también como marcador de aborto espontáneo.

Trabucco y col. (2009) han informado que mujeres cuyos embarazos terminaron en un aborto espontáneo presentan niveles proteicos elevados de CB1 y bajos niveles de FAAH en placentas de primer trimestre respecto de aquellas cuyos embarazos llegaron a término.

Estos hallazgos son coincidentes con las alteraciones del SEC observadas en el presente trabajo que muestran que, en los explantos uterinos los niveles elevados de CB1 y la disminución en la actividad y los niveles de ARNm y proteicos de la FAAH, junto con el incremento en la actividad de síntesis de AEA podrían producir un aumento de los niveles de este endocannabinoide.

En la decidua observamos que el LPS aumentó los niveles del ARNm de CB1 y de CB2 y también los niveles proteicos de la NAPE-PLD, pero la actividad y la expresión proteica de la FAAH se encuentra aumentada.

Aunque no hemos medido directamente los niveles de AEA, nosotros proponemos que **el LPS podría estar elevando los niveles de este endocannabinoide en ambos tejidos estudiados**. Como mencionamos anteriormente, la AEA acumulada en el útero podría originarse por un aumento en su síntesis conjuntamente con una disminución en su degradación por el estímulo del LPS.

Por otro lado, en la decidua, la endotoxina incrementa los niveles proteicos de la NAPE-PLD (enzima que sintetiza AEA) y a la vez, aumenta la actividad y la expresión proteica de la FAAH promoviendo la eliminación de la AEA

(proveniente del útero más la producida por la propia decidua), que en altas concentraciones resulta tóxica para este tejido. El balance síntesis/degradación es el que determinará si los niveles de AEA se encuentran elevados. Esta paradoja ha sido descrita por el grupo de Liu y col. (2003) donde muestran que lo mismo ocurre cuando una línea celular de macrófagos murinos se incubaba con LPS. Estos autores observaron que la endotoxina incrementa tanto la síntesis de AEA (actividad de la NAPE-PLD) como su degradación (actividad de la FAAH). Como se ha informado que los endocannabinoides derivados de macrófagos son mediadores importantes en la hipotensión asociada al shock inducido por LPS (Varga y col., 1998), el grupo postula que a pesar de que la actividad de la FAAH está aumentada, la AEA circulante es suficiente para inducir una respuesta hipotensiva significativa. Esta hipótesis fue comprobada cuando la respuesta hipotensiva generada por la exposición al LPS se ve potenciada en macrófagos FAAH (-/-).

Una vez determinado el efecto del LPS sobre el SEC del útero y de la decidua, comenzamos a estudiar la posible participación de la AEA en el mecanismo de acción de la endotoxina.

Considerando que la RE inducida por LPS cursa con un incremento significativo en la producción decidua y uterina de NO, y que este mediador participa en la reabsorción embrionaria, nos propusimos estudiar en primer lugar si la AEA era capaz de modular la producción de NO y la expresión de las isoformas de la NOS en ambos tejidos.

Nuestros resultados muestran que la m-AEA aumentó la producción de NO (figura 10) e incrementó significativamente la expresión proteica de la NOS_i (figura 12) en ambos tejidos estudiados. Ninguna de las otras isoformas de la NOS, la NOS_e y la NOS_n, modificaron su expresión cuando ambos tejidos fueron incubados en presencia de m-AEA (figura 11).

Teniendo en cuenta que sólo la NOS_i parece estar modulada por la AEA, decidimos comprobar si en la producción de NO inducida por AEA participaba la NOS_i. La figura 13 muestra que la producción de NO inducida por m-AEA se redujo significativamente cuando los tejidos fueron co-incubados en

presencia del 1400W (un inhibidor selectivo de la NOSi), indicando que la enzima involucrada en el efecto de la AEA es la isoforma inducible.

Debido a que en nuestro sistema tanto la AEA como el LPS aumentan la producción de NO, evaluamos si la producción de NO inducida por LPS estaba mediada por la AEA.

En ambos tejidos estudiados observamos que la producción de NO inducida por el LPS está mediada por la AEA. La participación del receptor CB1 en el efecto de la AEA en el útero, fue demostrado tanto por la incubación con un antagonista de este receptor (AM251, figura 14A) como por la utilización de animales *knock out* (CB1 -/-, Figura 16A). En ambos estudios se observa que el efecto del LPS fue revertido, ya sea tanto por el bloque farmacológico como por la delección del gen del receptor. Así mismo, no se observó ningún cambio cuando los explantos uterinos fueron co-incubados con LPS y un antagonista del receptor CB2 (SR144528, figura 14B) indicando que sólo el receptor CB1 es el involucrado en la inducción de la síntesis de NO por LPS en este tejido.

Nuestros resultados sugieren que en la decidua de animales de la cepa BALB/c, tanto CB1 como CB2 participan del efecto estimulador del LPS sobre la producción de NO (figuras 15 y 16). Sin embargo, en la decidua de los animales *knock out* para el receptor CB1, el efecto estimulador de la m-AEA sobre la producción de NO parecería estar mediado exclusivamente por este receptor ya que no se observó ningún efecto de la m-AEA sobre la producción de NO en estos animales.

Cabe destacar que los animales *knock out* para el receptor CB1 pertenecen a la cepa CD1, con lo que esta diferencia podría atribuirse a diferencias entre cepas. Hungund y col. (2000) han informado que las cepas murinas C57BL/6 y DBA/2 tienen preferencias distintas por el consumo de alcohol y que el receptor CB1 parecería tener un rol importante en este efecto. Ellos observaron que ambas cepas expresan dicho receptor en el cerebro pero presentan diferencias en la densidad y la afinidad del receptor por su ligando, y sugieren que la distinta preferencia por el consumo de alcohol se debe a estas discrepancias.

Estos resultados nos permiten concluir que en ambos tejidos estudiados, **la AEA induce la producción de NO vía la NOSi y que la producción de NO inducida por LPS está mediada por este endocannabinoide.**

Trabajos previos de nuestro laboratorio (Ogando y col., 2003) demostraron que el LPS produce daño tisular tanto en el útero como en la decidua y que este daño se atribuye principalmente al aumento en los niveles de NO. Estudiamos entonces, el efecto deletéreo del LPS sobre ambos tejidos y para ello evaluamos la morfología tisular de explantos uterinos y de decidua incubados con LPS en cortes teñidos por la técnica de hematoxilina y eosina (H&E).

Los resultados muestran que el LPS tiene un efecto deletéreo sobre los tejidos estudiados. Observamos que en los tejidos control (figura 17A, úteros y 18A, deciduas) la estructura celular está intacta y se observa que la estructura del citoplasma y del núcleo se encuentra conservada. Por otro lado, en los tejidos tratados con LPS (figura 17B y 18B) se observó espacio irregular entre las células, disrupción celular, encogimiento celular y condensación de la cromatina.

Como ya se ha mencionado previamente, en los explantos de decidua, la producción de NO disminuyó luego de las 12 h de incubación con el LPS, y a las 24 h alcanzó valores menores a los de las deciduas control (figura 1B). En altas concentraciones, el NO afecta la viabilidad tisular probablemente por la presencia del peroxinitrito (ONOO⁻), un oxidante poderoso con efectos deletéreos diversos sobre el tejido.

En base a estos resultados, estudiamos el daño tisular producido por el LPS en las deciduas, analizando las diferencias histológicas entre las deciduas incubadas con LPS durante 24 h y las deciduas control por medio de las técnicas de tinción con H&E y con Hoescht 33342. Observamos que el tratamiento con la endotoxina parecería inducir no solo la necrosis tisular sino también apoptosis, hecho que se evidencia por la presencia de cuerpos apoptóticos (figura 19).

Halliwell (1997) ha informado que durante los fenómenos inflamatorios aumenta la nitración de residuos tirosina (Tyr) de las proteínas y esta

modificación en la estructura de las mismas alteraría su función. Además, la nitración se asocia con la producción de radicales libres que son poderosos oxidantes y que producen diversos efectos deletéreos sobre el tejido.

El $\bullet\text{NO}$ reacciona con el anión superóxido (O_2^-) para formar especies citotóxicas como el peroxinitrito (ONOO^-). Si bien la nitración de proteínas se utiliza como un marcador *in vivo* de la producción de ONOO^- , varios grupos (Eiserich y col., 1998; Wu y col., 1999) han informado que el nitrito (NO_2^- , el principal producto generado en el final de la vía metabólica del NO), puede ser oxidado por peroxidasas de distinto origen para formar la especie reactiva NO_2 , la cual es altamente reactiva con residuos Tyr (Eiserich y col., 1996). De hecho, Pfeiffer y col. (1998; 2000) han informado en un estudio *in vitro*, que el ONOO^- tiene una eficiencia de nitración pobre y se ha sugerido que la vía de la mieloperoxidasa podría contribuir de manera importante a la producción de 3-nitrotirosinas ($\text{NO}_2\text{-Tyr}$) *in vivo* (Halliwell y col., 1997; Eiserich y col., 1998).

A pesar de que las proteínas están típicamente compuestas por un 4% de residuos Tyr, la nitración está confinada sólo a algunos de estos residuos y sólo a proteínas específicas (Radi, 2004).

Así mismo, en nuestro modelo de RE inducido por LPS observamos que la endotoxina produce nitración de residuos tirosina (Tyr) de las proteínas (Aisemberg col., 2007b).

Estos antecedentes nos llevaron a pensar que la disminución en la producción de NO_2 (que nosotros medimos como $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ por la técnica de Griess) observada en los explantos de decidua a las 24 h de incubación con la endotoxina podría deberse a un aumento en la nitración de las proteínas. Para comprobar esta hipótesis, analizamos la nitración en Tyr de las proteínas por western blot y observamos que el LPS produce un incremento en la nitración proteica de manera tiempo-dependiente (figura 20), observándose un importante aumento entre las 12 h y las 24 h de incubación.

A continuación, como en nuestro modelo observamos que la producción de NO está mediada por AEA, nos propusimos estudiar si esta molécula participa del efecto deletéreo del LPS sobre los tejidos analizados. Para ello, evaluamos la

morfología tisular de ambos tejidos incubados con LPS y antagonistas de los receptores de cannabinoides.

En las figuras 21 y 22 podemos observar que los explantos uterinos tratados con LPS muestran signos de necrosis y este efecto parece revertirse vía el receptor CB1. En el caso de los explantos deciduales, este efecto parecería revertirse tanto vía el receptor CB1 como el receptor CB2.

Estos resultados muestran que la AEA participaría en el daño tisular inducido por el LPS.

El hecho de que al menos en parte, el daño tisular producido por el tratamiento *in vitro* con LPS pueda ser revertido por la co-incubación con un antagonista de los receptores de cannabinoides muestra que estos compuestos son parte del mecanismo por el cual la endotoxina induce la destrucción de los tejidos y probablemente la reabsorción embrionaria.

Además de los resultados presentados en este trabajo de tesis, se ha informado que la AEA aumenta la síntesis de NO en otros tejidos. Varios grupos han reportado que la AEA podría jugar un rol importante en el control del “tono” vascular ya que se ha observado que las células endoteliales renales de rata y los macrófagos pueden liberarla (Bisogno y col., 1997; Deutsch y col., 1997). Un mecanismo parácrino de vasodilatación en el shock endotóxico inducido por LPS se ha documentado en ratas (Varga y col., 1998) donde la AEA derivada de macrófagos parece ser responsable de la activación de los receptores CB1 en la vasculatura. Maccarrone y col. (2000a) también informaron que la activación de los receptores CB1 por acción de la AEA produjo un aumento en la actividad y la expresión de la NOSi en células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC).

Estos antecedentes y nuestros resultados nos llevan a proponer un mecanismo de acción: el LPS podría estar incrementando los niveles de AEA en el útero y en la decidua, lo que a su vez produciría un aumento de la producción de NO vía la NOSi. Teniendo en cuenta que resultados previos de nuestro laboratorio (Ogando y col. 2003) demostraron que el LPS produce daño tisular tanto en el útero como en la decidua y que este daño se atribuye

principalmente al aumento en los niveles de NO, la AEA estaría participando del efecto deletéreo de la endotoxina en los tejidos analizados.

La RE producida por infección o aborto séptico es un mecanismo de defensa para la madre. El sentido biológico es impedir que el patógeno alcance los tejidos maternos y se produzca un foco para la proliferación del microorganismo. De esta forma se interrumpe la preñez y se preserva a la madre para futuras gestaciones. Varios autores han informado que las PGs son las responsables de desencadenar las contracciones uterinas necesarias para la expulsión fetal (Romero y col., 1994). En particular, la PGE₂ y la PGF_{2α} son potentes estimuladores de la contractilidad miometrial y son producidas por los tejidos reproductivos durante el parto (Vane, 1973; Gu, 1990). Ambas, están estrechamente asociadas al desarrollo de la respuesta inflamatoria.

A continuación, estudiamos la posible participación de la AEA en la producción uterina de prostaglandinas inducida por el LPS.

Considerando: 1) que la RE inducida por LPS cursa con un incremento significativo en la producción de PGE₂ y PGF_{2α}, 2) que las PGs participan en la reabsorción embrionaria inducida por la endotoxina ya que el tratamiento con inhibidores de las ciclooxigenasas previene la RE (Aisemberg y col., 2007a) y 3) que las PGs son moléculas que contribuyen al aumento de la contractilidad del miometrio (lo que las convierte en importantes inductoras del aborto), investigamos en los ***explantos uterinos***, la participación de la AEA en la producción de estas prostaglandinas inducida por el LPS.

En primer lugar, nuestros resultados muestran que el aumento de la síntesis de PGE₂ inducida por LPS sólo se alteró por la co-incubación con un antagonista de CB1 (10⁻⁸M), observándose un aumento significativo de la producción de esta PG con respecto al LPS (figura 23A). Por otro lado, la producción de PGE₂ inducida por LPS no se modificó cuando los explantos uterinos se co-incubaron con LPS y un antagonista de CB2 en ninguna de las concentraciones utilizadas (figura 23B). Estos resultados sugieren un efecto bloqueante de la AEA sobre el efecto del LPS en la producción de la PGE₂, siendo éste el primer efecto anti-inflamatorio de la AEA observado en nuestro modelo experimental.

Cuando estudiamos la producción de la $\text{PGF}_{2\alpha}$, (figura 24) observamos que el aumento en la producción de este mediador inducido por la endotoxina se revierte cuando los explantos uterinos se co-incubaron tanto con el antagonista del receptor CB1 (AM251) como con el antagonista del receptor CB2 (SR144528). Estos resultados sugieren que la AEA participa en el efecto del LPS sobre la producción de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ y este efecto parecería estar mediado por ambos receptores de cannabinoides.

Hasta aquí los resultados obtenidos sugieren que la participación de la AEA en el efecto del LPS es específica de la PG evaluada. Estos resultados nos permiten postular que si bien la AEA se encuentra involucrada en la modulación de las prostaglandinas por el LPS, las vías y los efectos difieren dependiendo de cada prostaglandina.

La relación entre los endocannabinoides y las PGs aún no es clara y varía según el tejido y la especie en estudio. Como ya mencionamos anteriormente, la AEA induce la formación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en células de la línea celular PC12 (Someya y col., 2002). Por otro lado, Mitchell y col. (2008) demostraron que la AEA aumenta la producción de PGE_2 en corion pero disminuye los niveles de este mediador en decidua humana. Estudios recientes muestran que la AEA y la meta-AEA inducen la expresión de COX-2 por mecanismos que involucran a los receptores CB (Gardner y col., 2003; Hinz y col., 2004a y b).

Con estos antecedentes y habiendo demostrado que, en nuestro modelo de reabsorción embrionaria el LPS indujo la COX-2 (Aisemberg y col., 2007a), estudiamos si la AEA modula la producción de PGE_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$ y la expresión de las isoformas de la COX en explantos uterinos. La incubación de los explantos en presencia de m-AEA produjo un aumento en la producción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y una disminución de la producción de PGE_2 (figura 25).

Estos resultados muestran efectos antagónicos de la AEA sobre la producción de PGs que reflejan que la AEA modula diferencialmente las vías de síntesis de PGE_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$ y, además, concuerdan con los resultados descriptos en el punto anterior donde el efecto del LPS sería reforzado en el caso de la PGE_2 cuando se bloquearon los receptores de AEA. En el caso de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ los niveles de este mediador disminuyeron cuando se bloquearon ambos receptores.

Por otro lado, la m-AEA aumentó significativamente los niveles de ARNm (figura 26) y los niveles proteicos de la COX-2 (figura 27) sin modificar los niveles de la COX-1 (figuras 26 y 27).

El aumento en los niveles de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ inducido por la AEA correlaciona con el incremento observado en los niveles de ARNm y proteicos de la COX-2. Sin embargo, la modificación del mensajero y la expresión proteica de esta isoenzima no se conciben con la disminución de los niveles de la PGE_2 encontrados. Por esta razón, investigamos los efectos de la AEA en distintos puntos de la vía metabólica de las PGs.

En ciertos tejidos, la PGE_2 puede ser convertida en $\text{PGF}_{2\alpha}$ por acción de la 9-prostaglandina E_2 -ceto-reductasa en una reacción reversible. Las propiedades de esta enzima se han descrito en varios tejidos de mamíferos, entre ellos tejidos reproductivos (Kankofer y col., 1999; Schlegel y col., 1984). Decidimos estudiar, en primera instancia, si la AEA modula la actividad de la 9-PKR. Hallamos que la actividad de la 9-PKR es detectable en el útero de ratón preñado pero no está modulada por la AEA en las concentraciones estudiadas (figura 28). Esto indicaría que los niveles bajos de PGE_2 observados no se deben a cambios en la actividad de la 9-PKR.

Como los niveles de PGE_2 están determinados por el balance entre su síntesis y su degradación, nos propusimos analizar la conversión de la PGE_2 al metabolito inactivo 15-ceto- PGE_2 por acción de la 15-PGDH. Para ello, investigamos las posibles alteraciones en la expresión del ARNm y de la proteína de esta enzima y en la síntesis del metabolito de PGE_2 luego del tratamiento con m-AEA.

Las figuras 29, 30 y 31 muestran que, si bien la m-AEA no modifica los niveles de ARNm ni los niveles proteicos de la 15-PGDH, sí produce un incremento significativo en la producción del metabolito inactivo (PGEM). Esto sugiere que los niveles bajos de PGE_2 observados podrían deberse, al menos en parte, a un aumento en la actividad de degradación de este mediador inducido por la AEA.

Como se mencionó anteriormente, la PGE_2 se forma a partir del PGH_2 por la acción de la prostaglandina E sintasa en dos pasos: isomerización del

endoperóxido y su reducción. A continuación, evaluamos el efecto de la AEA sobre la actividad de la PGE sintasa (PGES), enzima que sintetiza la PGE₂. Nuestros resultados muestran que la m-AEA produjo una disminución en la conversión del PGH₂ a PGE₂, indicando una menor actividad de la PGES ya que, como estos estudios se realizaron en presencia de Indometacina (un inhibidor no selectivo de las COX), se descartan los posibles efectos sobre las ciclooxigenasas (figura 32).

Hasta el momento se han identificado tres isoformas de la PGES: la Prostaglandina E Sintasa microsomal 1 (PGESm-1), la Prostaglandina E Sintasa microsomal 2 (PGESm-2) y la Prostaglandina E Sintasa citosólica (PGESc). Estudiamos entonces si la AEA modifica la expresión del ARNm de alguna de las 3 isoenzimas. Encontramos que la m-AEA produjo una disminución de los niveles de ARNm de PGESm-1 mientras que no se vio modificada la expresión del mensajero de las restantes isoformas (figura 33). Por esta razón, investigamos los niveles proteicos de la PGESm-1, por medio de la técnica de western blot y encontramos que la m-AEA disminuyó dichos niveles (figura 34). Estos resultados muestran un efecto de la m-AEA sobre la expresión proteica y el mensajero de la PGESm-1 y sobre la actividad de la PGES, sugiriendo que la disminución observada en los niveles de PGE₂ podría deberse a una mayor metabolización de este mediador y a una menor conversión de PGH₂ en esta PG.

De lo observado en esta parte concluimos que la producción de PGs inducida por el LPS estaría mediada por la AEA. La m-AEA incrementa los niveles de ARNm y la expresión proteica de la COX-2 y la síntesis de PGF_{2α} pero disminuye la de la PGE₂.

Además, el efecto inhibitorio de la AEA sobre los niveles medidos de PGE₂ podría adjudicarse a un metabolismo incrementado por la actividad de la 15-PGDH y por el descenso en los niveles de ARNm y la expresión proteica de la PGESm-1 y de la actividad de la PGE sintasa, enzima necesaria para la síntesis de PGE.

Los resultados descriptos en este trabajo de tesis y trabajos previos de nuestro laboratorio (Aisemberg y col., 2007a) muestran que el LPS produce un

aumento tanto en los niveles de PGE₂ como de PGF_{2α}. Sin embargo, se ha informado que la relación PGE₂/PGF_{2α} parece ser más importante que la concentración que cada uno de estos mediadores alcanza por separado en determinados fenómenos biológicos. A saber, una relación PGE₂/PGF_{2α} alterada se ha descrito como uno de los factores involucrados en la retención de las membranas fetales en el ganado (Gross y col., 1987; Slama y col., 1993).

En nuestro caso particular y en trabajos previos de nuestro laboratorio (Aisemberg y col., 2007a) donde se estudia la participación de la PGE₂ y de la PGF_{2α} en la reabsorción embrionaria inducida por el LPS, los niveles medidos de estos mediadores muestran siempre un predominio de la PGF_{2α} por sobre la PGE₂. La diferencia entre la cantidad de PGF_{2α} y de PGE₂ que llega al útero podría tener un rol importante en la contracción miometrial. Es conocido que la PGF_{2α} media las contracciones miometriales asociadas con el inicio del parto (Wiqvist y col., 1983). Por otro lado, se cree que la PGE₂ ejercería una acción opuesta a la de la PGF_{2α}, a favor del establecimiento de la preñez. Aunque esto no es tan claro, Slater y col. (2006) realizaron experimentos *in vitro* incubando miometrio humano en presencia de PGE₂ y observaron que este mediador produjo un efecto anti-inflamatorio y relajante en ese tejido.

Si bien nuestros resultados muestran que la AEA disminuye la síntesis de PGE₂, el estímulo con LPS es lo suficientemente importante como para generar un incremento significativo en los niveles de este mediador.

Cabe destacar que en este trabajo de tesis, hemos descrito como la AEA modula la actividad de síntesis y de degradación de la PGE₂. No hemos evaluado como el LPS actúa sobre estos dos procesos. De hecho, la bibliografía disponible sobre las características de la PGESm-1 la describe como una enzima que se induce durante procesos inflamatorios, como el tratamiento con LPS, y que se acopla a la actividad de la COX-2 para incrementar la síntesis de PGE₂ (Kubota y co., 2005; Murakami y col., 2000; Murakami y col., 2004; Samuelsson y col., 2007). Sin embargo, aunque la co-expresión de estas dos enzimas ocurre en la mayoría de los eventos inflamatorios, éste no siempre es el caso. Un ejemplo de esto se observa en ratones portadores de tumores, que muestran una elevada cantidad de citoquinas pro-inflamatorias en

circulación, y que expresan niveles hipotalámicos de COX-2 elevados con respecto a los ratones control, pero que no presentan modificaciones en la expresión de la PGESm-1 (Pecchi y col., 2008). Además, en nuestro laboratorio hemos demostrado que el LPS *in vivo* disminuye tanto la actividad como la expresión proteica de la 15-PGDH (Aisemberg y col., 2007a), contribuyendo a aumentar los niveles de PGs.

Si bien no medimos directamente la concentración de AEA, nosotros proponemos que el LPS podría aumentar los niveles de este endocannabinoide tanto en el útero como en la decidua del ratón. La AEA uterina, cuyos niveles estarían determinados por un aumento de su síntesis y una inhibición de su degradación inducido por el LPS, produciría un aumento en la producción de NO vía la NOSi en este tejido. A su vez, produciría un incremento en la expresión de la COX-2 y la síntesis de PGF_{2α} y una disminución de los niveles de PGE₂. La regulación negativa de la AEA sobre este mediador se compensaría con el estímulo del LPS y el resultado final del balance síntesis/degradación culminaría con un aumento en la producción de PGE₂. El incremento en la síntesis de estas PGs contribuiría a la contracción miometrial que favorece la expulsión de los fetos en un proceso de sepsis.

Por otro lado, una de las hipótesis que surgen en base a nuestros resultados es que los niveles de AEA en la decidua estarían determinados por un aumento en la expresión de la enzima que sintetiza la AEA (NAPE-PLD). Aunque la actividad de la FAAH en este tejido esté aumentada, inferimos que la AEA remanente es capaz de contribuir al efecto deletéreo del LPS puesto que la producción de NO inducida por LPS se revierte cuando se co-incuban los tejidos con la endotoxina y los antagonistas de los receptores CB1 y CB2.

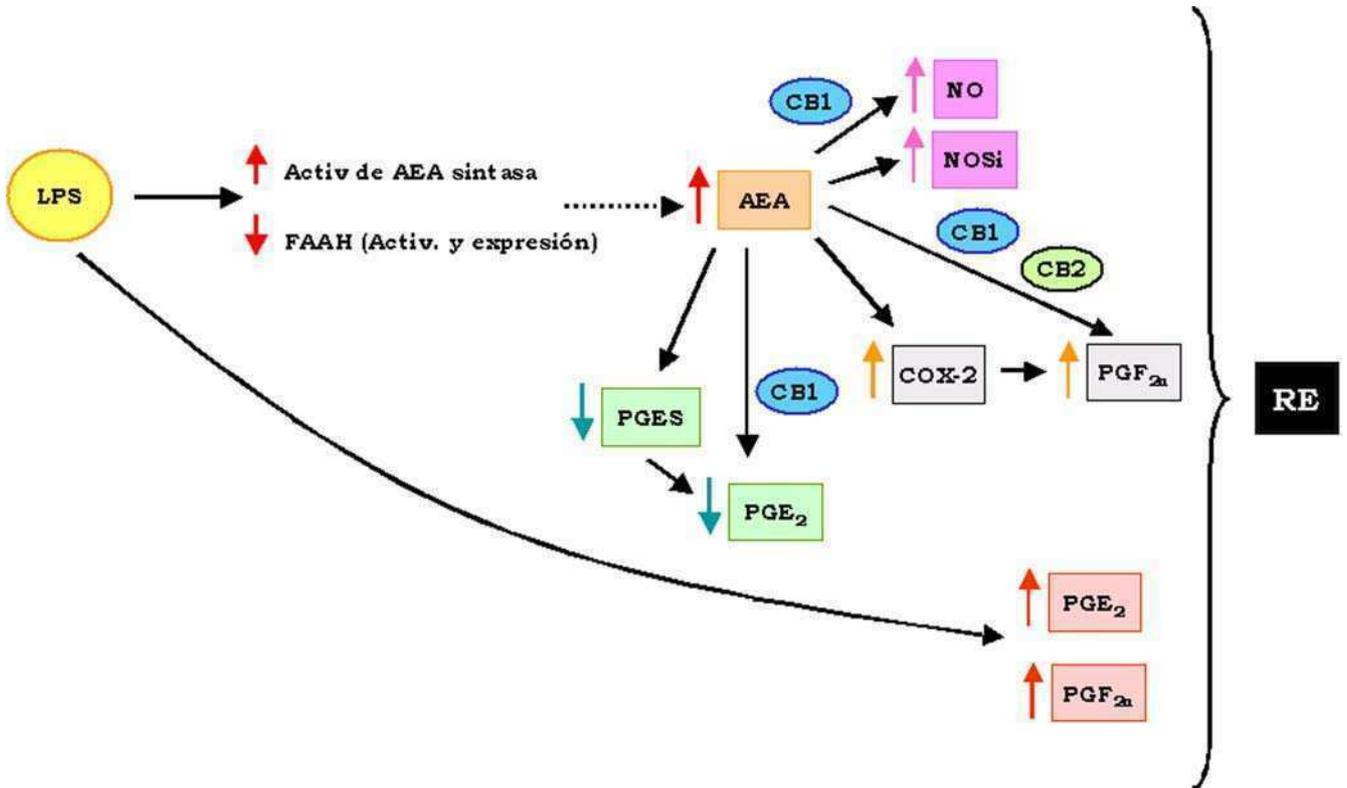
Los resultados presentados sugieren que la preñez es un proceso finamente regulado y que los sistemas involucrados en la misma tienen acciones diversas en situaciones normales o patológicas. En cada paso de este proceso se requiere la participación de distintos sistemas que lo regulan en forma endócrina, parácrina, yuxtácrina y autócrina.

Nosotros hemos estudiado particularmente el SEC, que junto con el NO y las PGs participan en el mecanismo de reabsorción embrionaria inducida por el

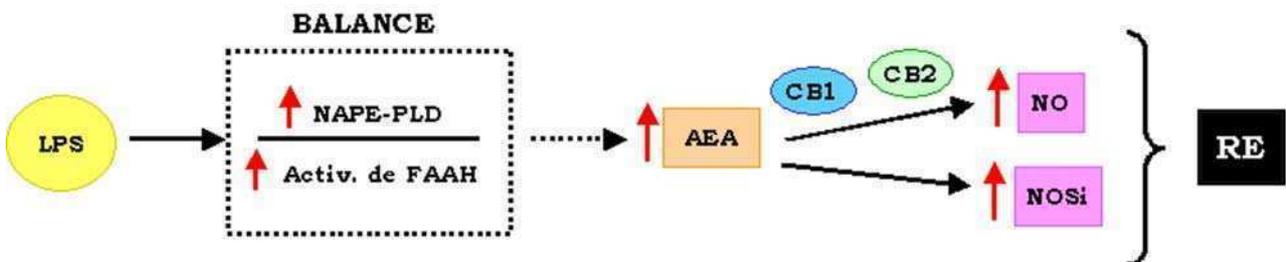
LPS. En este trabajo de tesis proponemos que la endotoxina podría incrementar los niveles de AEA en los tejidos estudiados y este endocannabinoide aumentaría la síntesis de NO y de PGs en estos tejidos, participando del efecto deletéreo conocido del LPS (esquema). Los múltiples mecanismos que se ponen en juego en la respuesta a la infección dan cuenta de lo complicado que resulta el abordaje terapéutico de esta patología.

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

UTERO



DECIDUA



conclusiones

- ✓ Ambos receptores de cannabinoides (CB1 y CB2) están presentes en el útero y en la decidua de ratón en la preñez temprana. El LPS aumenta la expresión de CB1 tanto en el útero como en la decidua mientras que la expresión de CB2 se incrementa solamente en la decidua.
- ✓ El LPS aumenta la síntesis de AEA uterina e incrementa la expresión de la NAPE-PLD en el útero y en la decidua de ratón en el día 7 de preñez.
- ✓ La endotoxina produce una disminución no solo de la actividad de la FAAH sino también de sus niveles de ARNm y proteicos en el útero de ratón.
- ✓ El LPS incrementa la actividad de la FAAH en la decidua y este incremento está mediado por la AEA. A su vez, la AEA modula positivamente la actividad de la FAAH.
- ✓ La AEA participa en la inducción de la síntesis de NO por LPS modulando la actividad y la expresión de la NOSi, tanto en el útero como en la decidua.
- ✓ La AEA incrementa la actividad y la expresión de la COX-2 uterina aumentando los niveles de PGF_{2α}. Además, el efecto positivo del LPS sobre la síntesis de PGF_{2α} está mediado por la AEA.
- ✓ LA AEA disminuye los niveles de PGE₂, probablemente porque incrementa su degradación aumentando la actividad de la 15-PGDH y disminuye su síntesis inhibiendo la actividad de la PGES y los niveles de ARNm y proteicos de la PGESm-1.
- ✓ La AEA participa en los mecanismos implicados en el daño tisular ejercido por LPS sobre el útero y la decidua.

referencias

- **Adam O y Wolfram G.** 1984. Effect of different linoleic acid intakes on prostaglandin biosynthesis and kidney function in man. *Am J Clin Nutr.* 40: 763–770.
- **Aisemberg J, Ogando D, Ribeiro LM y Franchi.** 2007b. Participation of NO and peroxy nitrite anion in embryonic resorption due to LPS. *En Advances in Chemistry and Biology of Nitric Oxide.* Pp: 227-240. Ed: Research Singpost. Trivandrum, Kerala, India.
- **Aisemberg J, Vercelli CA, Billi S, Ribeiro ML, Ogando, D, Meiss R, McCann SM, Rettori V y Franchi AM.** 2007a. Nitric oxide mediates prostaglandin deleterious effect on lipopolysaccharide-triggered murine fetal resorption. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:7534–7539.
- **Alderton WK, Cooper CE y Knowles RG.** 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 357 (Pt 3):593-615.
- **Ali M, Buhimschi I, Chwalisz K y 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.
- **Arosh JA, Banu SK, Chapdelaine P, Madore E, Sirois J y Fortier MA.** 2004a. Prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling in corpus luteum: a basis for autoregulation of luteal function. *Endocrinology.* 145(5):2551-2560.
- **Arosh JA, Banu SK, Kimmins S, Chapdelaine P, MacLaren LA y Fortier MA.** 2004b. Effect of interferon- γ on prostaglandins biosynthesis, transport, and signaling at the time of maternal recognition of pregnancy en the cattle: evidence of polycrine actions of prostaglandin E2. *Endocrinology.* 145:5280-5293.
- **Auletta FJ, Speroff L y Caldwell BV.** 1973. Prostaglandin F2a-induced steroidogenesis and luteolysis in the primate corpus luteum. *J Clin Endocrinol Metab.* 36: 405-407.
- **Baker D, Pryce G, Davies WL y Hiley CR.** 2006. In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci* 27:1-4.
- **Bari M, Battista N, Fezza F, Finazzi-Agro A y 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 y 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 y Crow JP.** 1993. Pathological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite formation. *Biochem Soc Trans.* 21(2):330-334.
- **Beckman JS.** 1996a. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem Res Toxicol.* 9: 836-844.
- **Beckman JS.** 1996b. The physiological and pathological chemistry of nitric oxide. En *Nitric Oxide: Principles and Actions.* Pp: 1-82. Ed: Lancaster JR, Orlando, Florida, USA.
- **Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A y Piomelli D.** 1997. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science.* 277(5329):1094-1097.
- **Beutler B, Hoebe K, Du X y Ulevitch RJ.** 2003. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J Leukocyte Biol.* 74:479-485.
- **Bisogno T, Maurelli S, Melck D, De Petrocellis L y Di Marzo V.** 1997. Biosynthesis, uptake, and degradation of anandamide and palmitoylethanolamide in leukocytes. *J Biol Chem.* 272:3315-3323.
- **Blanks AM y Thornton S.** 2003. The role of oxytocin in parturition. *BJOG* 110 Suppl 20:46-51.
- **Boveris A, Costa LE, Cadenas E y 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.
- **Buhimschi I, Ali M, Jain V, Chwalisz K y Garfield RE.** 1996. Differential regulation of nitric oxide in the rat uterus and cervix during pregnancy and labour. *Hum Reprod.* 11(8):1755-1766.
- **Butler AR, Megson IL y Wright PG.** 1998. Diffusion of nitric oxide and scavenging by blood in the vasculature. *Biochim Biophys Acta.* 1425: 168-176.

- **Bygdeman M.** 2003. Pharmacokinetics of prostaglandins. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 17:707–716.
- **Calignano A, La Rana G, Giuffrida A y Piomelli D.** 1998. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature.* 394:277-281.
- **Carney ST, Lloyd ML, MacKinnon SE, Newton DC, Jones JD, Howlett AC y Norford DC.** 2009. Cannabinoid regulation of nitric oxide synthase I (nNOS) in neuronal cells. *J Neuroimmune Pharmacol.* 4:338–349.
- **Carrera MC, Riobo N, Lisdero C y Poderoso JJ.** 1999. El óxido nítrico y las óxido nítrico sintasas. *Antioxidantes y Calidad de Vida* 6: 5.
- **Cella M, Leguizamón GF, Sordelli M, Cervini M, Guadagnoli T, Ribeiro ML, Franchi AM y Farina MG.** 2008. Dual effect of anandamide on rat placenta nitric oxide synthesis. *Placenta.* 29(8):699–707.
- **Cernak I, Vink R, Natale J, Stoica B, Lea PM 4th, Movsesyan V, Ahmed F, Knoblach SM, Fricke ST y Faden AI.** 2004. The “dark side” of endocannabinoids: a neurotoxic role for anandamide. *J Cereb Blood Flow Metab.* 24:564–578.
- **Chan GCK, Hinds TR, Impey S y Storm DR.** 1998. Hippocampal neurotoxicity of Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *J Neurosci.* 18: 5322– 5332.
- **Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS y Simmons DL.** 2002. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99 (21):13926-13931.
- **Cheung PY, Walton JC, Tai HH, Riley SC y Challis JR.** 1992. Localization of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase in human fetal membranes, decidua and placenta during pregnancy. *Gynecol Obstet Invest.* 33:142-146.
- **Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ y Gusovsky F.** 1999. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem.* 274 (16):10689-10692.
- **Clark DA y Chaouat G.** 1989. What do we know about spontaneous abortion mechanisms? *Am J Reprod Immunol.* 19(1): 28-37.
- **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 y 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.
- **Correa FG, Mestre L, Docagne F, Borrel J y Guaza C.** 2009. The endocannabinoid anandamide: from immunomodulation to neuroprotection. Implications for multiple sclerosis. *Vitam Horm.* 81:207-230.
- **Cram LF, Zapata MI, Toy EC y Baker B 3rd.** 2002. Genitourinary infections and their association with preterm labor. *Am Fam Phys.* 65 241-248.
- **Cravatt BF y Lichtman AH.** 2003. Fatty acid amide hydrolase: an emerging therapeutic target in the endocannabinoid system. *Curr Opin Chem Biol.* 7:469-475.
- **Das SK, Paria BC, Chakraborty I y Day SK.** 1995. Cannabinoid ligand-receptor signalling in the mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:4332-4336.
- **Davis BJ, Lennard DE, Lee CA, Tiano HF, Morham SG, Wetsel WC y Langenbach R.** 1999. Anovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandin E2 and interleukin-1 beta. *Endocrinology.* 140(6):2685-2695.
- **Day N, Sambamoorthi U, Taylor P, Richardson G, Robles N, Jhon Y, Scher M, Stoffer D, Cornelius M y Jasperse D.** 1991. Prenatal marijuana use and neonatal outcome. *Neurotoxicol Teratol.* 13: 329-334.
- **Deutsch DG y 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 HHO, Das SK, Dey SK, Arreaza G, Thorup C, Stefano G y Moore LC.** 1997. Production and physiological actions of anandamide in the vasculature of the rat kidney. *J Clin Invest.* 100:1538-1546.
- **Devane WA y 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 y 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 y 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 y 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 y 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.
- **Diaz S, Specter S, Vanderhoek JY y Coffey RD.** 1994. The effect of delta-9-tetrahydrocannabinol on arachidonic acid metabolism in human peripheral blood mononuclear cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 268: 1289-1296.
- **Do Y, McKallip RJ, Nagarkatti M y Nagarkatti P.** 2004. Activation through cannabinoid receptors 1 and 2 on dendritic cells triggers NF- κ B-dependent apoptosis: novel role for endogenous and exogenous cannabinoids in immunoregulation. *J Immunol.* 173:2373-2382.
- **Dong YL y Yallampalli C.** 1996a. Interaction between nitric oxide and prostaglandin E2 pathways in pregnant rat uteri. *Am J Physiol.* 270 (3 Pt 1): E471-E476.
- **Dong YL, Gangula PR y Yallampalli C.** 1996b. Nitric oxide synthase isoforms in the rat uterus: differential regulation during pregnancy and labour. *Journal of Reproduction and Fertility.* 107:249-254.
- **Eccles JC y Magladery JW.** 1937. Rhythmic responses of smooth muscle. *J Physiol.* 90 (1): 68-99.
- **Edgemond WS, Hillard CJ, Falck JR, Kern CS y 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.

- **Eiserich JP, Cross CE, Jones AD, Halliwell B y van der Vliet A.** 1996. Formation of nitrating and chlorinating species by reaction of nitrite with hypochlorous acid. A novel mechanism for nitric oxide-mediated protein modification. *J Biol Chem.* 271:19199-19208.
- **Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B y van der Vliet A.** 1998. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature.* 391:393-397.
- **Farina M, Ribeiro ML y Franchi A.** 2001. Nitric oxide synthases in pregnant uterus. *Reproduction.* 121:403-407.
- **Felder CC, Briley EM, Axelrod J, Simpson JT, Mackie K y Devane WA.** 1993. Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90:7656-7660.
- **Felder CC, Veluz JS, Williams HL, Briley EM y Matsuda LA.** 1992. Cannabinoid agonists stimulate both receptor- and non-receptor-mediated signal transduction pathways in cells transfected with and expressing cannabinoid receptor clones. *Mol Pharmacol.* 42: 838-845.
- **Fernandez-Solari J, Scorticati C, Mohn C, De Laurentiis A, Billi S, Franchi A, McCann SM y 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.
- **Fimiani C, Mattocks D, Cavani F, Salzet M, Deutsch DG, Pryor S, Bilfinger TV y Stefano GB.** 1999. Morphine and anandamide stimulate intracellular calcium transients in human arterial endothelial cells: coupling to nitric oxide release. *Cell Signal.* 11:189-193.
- **Fonseca BM, Correia-da-Silva G, Taylor AH, Konje JC, Bell SC y Teixeira NA.** 2009. Spatio-temporal expression patterns of anandamide-binding receptors in rat implantation sites: evidence for a role of the endocannabinoid system during the period of placental development. *Reprod Biol Endocrinol.* 7:121-134.
- **Förstermann U, Schmidt SHH, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD y Nakame M.** 1991. Isoforms of nitric oxide synthase.

Characterization and purification of different cell types. *Biochem Pharmacol.* 42: 1849-1857.

- **Franchi A, Billi S y Cella M.** 2005. Regulation of anandamide synthesis and cannabinoid receptors (CB1/CB2) expression during pregnancy in the mouse uterus. 2005 Symposium on the Cannabinoids, Burlington, Vermont, International Cannabinoid Research Society, p. 171.
- **Franchi AM, Chaud M, Rettori V, Suburo A, Mc Cann SM y 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.
- **Franchi AM, Faletti A, Gimeno MF y Gimeno AL.** 1985. Influence of sex hormones on prostaglandin dehydrogenase activity in the rat uterus. *Prostaglandins.* 29(6):953-960.
- **Fried PA, Watkinson B y Willan A.** 1984. Marijuana use during pregnancy and decreased length of gestation. *Am J Obstet Gynecol.* 150: 23-27.
- **Friedman T y Gath D.** 1989. The psychiatric consequences of spontaneous abortion. *Br J Psychiatr.* 155:810-813.
- **Gaoni Y 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 y Dubinett SM.** 2003. Methanandamide increases COX-2 expression and tumor growth in murine lung cancer. *FASEB J.* 17:2157-2159.
- **Gebremedhin D, Lange AR, Campbell WB, Hillard CJ y Harder DR.** 1999. Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca²⁺ channel current. *Am J Physiol.* 276:H2085-2093.
- **Gerard CM, Mollereau C, Vassart G y Parmentier M.** 1991. Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J.* 279 (Pt 1):129-134.
- **Germain AM, Smith J, Casey ML y MacDonald PC.** 1994. Human fetal membrane contribution to the prevention of parturition: uterotonin degradation. *J Clin Endocrinol Metab.* 78:463-470.
- **Gewaltig MT y Kojda G.** 2002. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc Res.* 55(2):250-260.

- **Ghafourifar P y Richter C.** 1997. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett.* 418(3):291-296.
- **Giang DK y Cravatt BF.** 1997. Molecular characterization of human and mouse fatty acid amide hydrolases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(6):2238-2242.
- **Gimeno A, Gimeno M, Lazzari M y Terraño A.** 1985. Prostaglandinas y compuestos relacionados. Ed: El Ateneo. Argentina.
- **Giulivi C, Poderoso JJ y 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 y Deutsch DG.** 2003. Evidence against the presence of an anandamide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(7):4269-4274.
- **Greenland KJ, Jantke I, Jenatschke S, Bracken KE, Vinson C y Gellersen B.** 2000. The human NAD⁺-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase gene promoter is controlled by Ets and activating protein-1 transcription factors and progesterone. *Endocrinology.* 141:581-597.
- **Grisham MB, Johnson GG y Lancaster JR Jr.** 1996. Quantification of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Methods Enzymol.* 268:237-246.
- **Grisham MB, Jourd'heuil D y Wink DA.** 1999 Nitric oxide I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol.* 276: 315-321.
- **Gross G, Imamura T y Muglia LJ.** 2000. Gene knockout mice in the study of parturition. *J Soc Gynecol Investig.* 7(2):88-95.
- **Gross GA, Imamura T, Luedke C, Vogt SK, Olson LM, Nelson DM, Sadovsky Y y Muglia LJ.** 1998. Opposing actions of prostaglandins and oxytocin determine the onset of murine labor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(20):11875-11879.
- **Gross TS, Williams WF, Manspeaker JE, Lewis GS y Russek-Cohen E.** 1987. Bovine placental prostaglandin synthesis in vitro as it relates to placental separation. *Prostaglandins.* 34:903-917.
- **Gu W, Rice GE y Thorburn GD.** 1990. Prostaglandin E2 and F2 alpha in midpregnant rat uterus and at parturition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 40(1):27-30.

- **Guo Y, Wang H, Okamoto Y, Ueda N, Kingsley PJ, Marnett LJ, Schmid HH, Das SK, Dey SK.** 2005. N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D is an important determinant of uterine anandamide levels during implantation. *J Biol Chem.* 280(25), 23429-23432.
- **Habayeb OM, Bell SC y Konje JC.** 2002. Endogenous cannabinoids: metabolism and their role in reproduction. *Life Sci.* 70(17):1963-1977.
- **Habayeb OM, Taylor AH, Finney M, Evans MD y Konje JC.** 2008. Plasma anandamide concentration and pregnancy outcome in women with threatened miscarriage. *JAMA.* 299(10):1135-1136
- **Halliwell B.** 1997. What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peronitrate formation *in vivo*? *FEBS Lett.* 411:157-160.
- **Ham AW.** 1970. *Tratado de Histología.* Nueva Editorial Interamericana S. A. México. pp 1025.
- **Hansen HS.** 1976. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase. A review. *Prostaglandins.* 12: 647-679.
- **Helliwell RJ, Chamley LW, Blake-Palmer K, Mitchell MD, Wu J, Kearn CS y Glass M.** 2004. Characterization of the endocannabinoid system in early human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 89:5168-5174.
- **Henry DJ y Chavkin C.** 1995. Activation of inwardly rectifying potassium channels (GIRK1) by co-expressed rat brain cannabinoid receptors in *Xenopus* oocytes. *Neurosci Lett.* 186:91-94.
- **Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR y Rice KC.** 1990. Cannabinoid receptor localization in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(5):1932-1936.
- **Hinz B, Ramer R, Eichele K, Weinzierl U y Brune K.** 2004a. Upregulation of cyclooxygenase-2 expression is involved in R(+)-methanandamide-induced apoptotic death of human neuroglioma cells. *Mol Pharmacol.* 66:1643-1651.
- **Hinz B, Ramer R, Eichele K, Weinzierl U y Brune K.** 2004b. R(+)-methanandamide-induced cyclooxygenase-2 expression in H4 human neuroglioma cells: possible involvement of membrane lipid rafts. *Biochem Biophys Res Commun.* 324:621-626.

- **Huang PL, Dawson TM, Bredt DS, Snyder SH y Fishman MC.** 1993. Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell.* 75 (7): 1273-1286.
- **Hungund BL y Basavarajappa BS.** 2000. Distinct differences in the cannabinoid receptor binding in the brain of C57BL/6 and DBA/2 mice, selected for their differences in voluntary ethanol consumption. *J Neurosci Res.* 60(1):122-128.
- **Hunter SA y Burstein SH.** 1997. Receptor mediation in cannabinoid stimulated arachidonic acid mobilization and anandamide synthesis. *Life Sci.* 60: 1563–1573.
- **Ignarro LJ.** 1991. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. *Biochem Pharmacol.* 41 (4): 485-490.
- **Irvine RF.** 1982. How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells. *Biochem J.* 204: 3-16.
- **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.
- **Izumi H y Garfield RE.** 1995. Relaxant effects of nitric oxide and cyclic GMP on pregnant rat uterine longitudinal smooth muscle. *Eur J Obst Gynecol Reprod Biol.* 60:171-180.
- **Jakobsson PJ, Thoren S, Morgenstern R y Samuelsson B.** 1999. Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathion-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(13):7220-7225.
- **Kajii T, Ferrier A, Niikawa N, Takahara H, Ohama K y Avirachan S.** 1980. Anatomic and chromosomal anomalies in 639 spontaneous abortuses. *Hum Genet.* 55(1):87-98.
- **Kang J, Chapdelaine P, Parent J, Madore E, Laberge PY y Fortier MA.** 2005. Expression of human prostaglandins transporter in the human endometrium across the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 90:2308-2313.
- **Kankofer M y Wierciński J.** 1999. Prostaglandin E₂ 9-keto reductase from bovine term placenta. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 61(1):29–32.

- **Katzung BG.** 1992. The Eicosanoids: Prostaglandins, Thromboxanes, Leukotrienes and Related Compounds. En: Basic and clinical Pharmacology. Eds. Appleton & Lange. Pp. 264 Norwalk, Connecticut.
- **Keneth K.** 1994. Inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase. *Adv Pharmacol.* 33:179.
- **Kleinfeld RG y O'Shea JD.** 1983. Spatial and temporal patterns of deoxyribonucleic acid synthesis and mitosis in the endometrial stroma during decidualization in the pseudopregnant rat. *Biol Reprod.* 28(3):691-702.
- **Kobayashi T, Nakatani Y y Tanioka T.** 2004. Regulation of cytosolic prostaglandin E synthase by phosphorylation. *Biochem J.* 381(Pt 1):59-69.
- **Kobzik L, Reid MB, Bredt DS y Stamler JS.** 1994. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature.* 372 (6506): 546-548.
- **Kolodny RC, Masters WH, Kolodner RM y Toro G.** 1974. Depression of plasma testosterone levels after chronic intensive marihuana use. *N Engl J Med.* 290: 872-874.
- **Krinke GJ.** 2004. En: The laboratory mouse. Ed: Hans Hedrich, Elsevier Academic Press, pp 162-163.
- **Kruszka KK y Gross RW.** 1994. The ATP- and CoA-independent synthesis of arachidonoyl ethanolamide. A novel mechanism underlying the synthesis of the endogenous ligand of the cannabinoid receptor. *J Biol Chem.* 269(20):14345-14348.
- **Kubota K, Kubota T, Kamei D, Murakami M, Kudo I, Aso T y Morita I.** 2005. Change in prostaglandin E synthases (PGESs) in microsomal PGES-1 knockout mice in a preterm delivery model. *J Endocrinol.* 187:339-345.
- **Kuehl Jr. FA y Egan RW.** 1980. Prostaglandins, arachidonic acid and inflammation. *Science.* 210: 978-984.
- **Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- **Lapetina EG.** 1982. Platelet-activating factor stimulates the phosphatidylinositol cycle. Appearance of phosphatidic acid is associated with the release of serotonin in horse platelets. *J Biol Chem.* 257: 7314-7317.

- **Ledent C, Vaugeois JM, Schiffmann SN, Pedrazzini T, El Yacoubi M, Vanderhaeghen JJ, Costentin J, Heath JK, Vassart G y Parmentier M.** 1997. Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature*. 388(6643):674–678.
- **Lee SH, Soyoola E, Chanmugam P, Hart S, Sun W, Zhong H, Liou S, Simmons D y Hwang D.** 1992. Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J Biol Chem*. 267(36):25934-25938.
- **Lim H, Ma L, Ma WG, Maas RL y Dey SK.** 1999. Hoxa-10 regulates uterine stromal cell responsiveness to progesterone during implantation and decidualization in the mouse. *Mol Endocrinol*. 13(6):1005-1017.
- **Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM y Dey SK.** 1997. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell*. 91(2):197-208.
- **Lin AH, Bienkowski MJ y Gorman RR.** 1989. Regulation of prostaglandin H synthase mRNA levels and prostaglandin biosynthesis by platelet-derived growth factor. *J Biol Chem*. 264: 17379-17383.
- **Lin YM y Jarabak J.** 1978. Isolation of two proteins with 9-ketoprostaglandin reductase and NAP-linked 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase activities and studies on their inhibition. *Biochem Biophys Res Comm*. 81:1227-1234.
- **Liu J, Bátkai S, Pacher P, Harvey-White J, Wagner JA, Cravatt BF, Gao B y Kunos G.** 2003. Lipopolysaccharide induces anandamide synthesis in macrophages via CD14 / MAPK / phosphoinositide 3-kinase/NF- κ B independently of platelet activating factor. *J Biol Chem*. 278:45034–45039.
- **Liu J, Wang L, Harvey-White J, Osei-Hyiaman D, Razdan R, Gong Q, Chan AC, Zhou Z, Huang BX, Kim HY y Kunos G.** 2006. A biosynthetic pathway for anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(36):13345-13350.
- **Liu WM, Duan EK y Cao YJ.** 2002. Effects of anandamide on embryo implantation in the mouse. *Life Sci*. 71:1623-1632.
- **Maccarrone M y Finazzi-Agro A.** 2003. The endocannabinoid system, anandamide and the regulation of mammalian cell apoptosis. *Cell Death Differ*. 10:946-955.

- **Maccarrone M, Bari M, Lorenzon T, Bisogno T, Di Marzo V y Finazzi-Agrò A.** 2000a. Anandamide uptake by human endothelial cells and its regulation by nitric oxide. *J Biol Chem.* 275(18):13484-13492.
- **Maccarrone M, De Felici M, Klinger FG, Battista N, Fezza F, Dainese E, Siracusa G y Finazzi-Agrò A.** 2004. Mouse blastocysts release a lipid which activates anandamide hydrolase in intact uterus. *Mol Hum Reprod.* 10(4):215-221.
- **Maccarrone M, De Petrocellis L, Bari M, Fezza F, Salvati S, Di Marzo V y Finazzi-Agrò A.** 2001. Lipopolysaccharide downregulates fatty acid amide hydrolase expression and increases anandamide levels in human peripheral lymphocytes. *Arch Biochem Biophys.* 393(2):321-328.
- **Maccarrone M, Fiori A, Bari M, Granata F, Gasperi V, De Stefano ME, Finazzi-Agrò A y Strom R.** 2006. Regulation by cannabinoid receptors of anandamide transport across the blood-brain barrier and through other endothelial cells. *Thromb Haemost.* 95:117-127.
- **Maccarrone M, Valensise H, Bari M, Lazzarin N, Romanini C y Finazzi-Agro A.** 2000b. Relation between decreased anandamide hydrolase concentrations in human lymphocytes and miscarriage. *Lancet.* 355(9212): 1326-1329.
- **Mackie K y Hille B.** 1992. Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:3825-3829.
- **Mackie K, Lai Y, Westenbroek R y Mitchell R.** 1995. Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci.* 15:6552-6561.
- **Matias I, Pochard P, Orlando P, Salzet M, Pestel J y Di Marzo V.** 2002. Presence and regulation of the endocannabinoid system in human dendritic cells. *Eur J Biochem.* 269:3771-3778.
- **Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC y Bonner TI.** 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature.* 346(6284): 561-564.
- **Matsuo M, Ensor CM y Tai HH.** 1997. Characterization of the genomic structure and promoter of the mouse NAD⁺-dependent 15-

- hydroxyprostaglandin dehydrogenase gene. *Biochem Biophys Res Comm.* 235:582-586.
- **McFarland MJ, Porter AC, Rakhshan FR, Rawat DS, Gibbs RA y 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 y Di Marzo V.** 1998. Endocannabinoids. *Eur J Pharmacol.* 359(1):1-18.
 - **Mechoulam, R.** 1986. *Cannabinoids as medicinal agents.* Ed; CRC Press: Boca Raton, Florida. pp. 1-19.
 - **Merlie JP, Fagan D, Mudd J y 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.
 - **Michalek SM, Kiyono H, Babb JL y McGhee JR.** 1980. Inheritance of LPS nonresponsiveness and elevated splenic IgA immune responses in mice orally immunized with heterologous erythrocytes. *J Immunol.* 125(5):2220-2224.
 - **Michie HR, Manogue KR, Spriggs DR, Revhaug A, O'Dwyer S, Dinarello CA, Cerami A, Wolff SM y Wilmore DW.** 1988. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N Engl J Med.* 318(23):1481-1486.
 - **Mitchell MD y Trautman MS.** 1993. Molecular mechanisms regulating prostaglandin action. *Mol Cell Endocrinol.* 93(2):C7-C10 .
 - **Mitchell MD, Sato TA, Wang A, Keelan JA, Ponnampalam AP y Glass M.** 2008. Cannabinoids stimulate prostaglandin production by human gestational tissues through a tissue- and CB1-receptor-specific mechanism. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 294:E352-E356.
 - **Munro S, Thomas KL y 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.
- **Murakami M y Kudo I.** 2004. Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E₂-biosynthetic pathway. *Prog Lipid Res.* 43(1):3-35.
- **Murakami M, Naraba H, Tanioka T, Semmyo N, Nakatani S, Kojima F, Ikeda T, Fueki M, Ueno A, Oh-ishi S y Kudo I.** 2000. Regulation of prostaglandin E₂ biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E₂ synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem.* 275(42):32783-32792.
- **Muzio M, Natoli G, Saccani S, Levrero M y Mantovani A.** 1998. The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J Exp Med.* 187(12):2097-2101.
- **Nathan C.** 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cell. *FASEB J.* 6: 3051-3064.
- **Neal HV y Rand HW.** 1943. *En: Comparative anatomy.* Ed: Blakinston's son & Co, Inc. USA.
- **Neugebauer R, Kline J, O'Connor P, Shrout P, Johnson J, Skodol A, Wicks J y Susser, M.** 1992. Depressive symptoms in women in the six months after miscarriage. *Am J Obstet Gynecol.* 166:104–109.
- **O'Banion MK, Winn V y Young DA.** 1992. cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4888-4892.
- **Ogando DG, Paz D, Cella M y Franchi AM.** 2003. The fundamental role of increased production of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced embryonic resorption in mice. *Reproduction.* 125(1):95-110.
- **Okamoto Y, Wang J, Morishita J y Ueda N.** 2007. Biosynthetic pathways of the endocannabinoid anandamide. *Chem Biodiver.* 4(8):1842-1857.
- **Okita RT y Okita JR.** 1996. Prostaglandin-metabolizing enzymes during pregnancy: characterization of NAD⁺-dependent prostaglandin dehydrogenase, carbonil reductase, and cytochrome P450-dependent prostaglandin omega-hydroxylase. *Critical Rev Biochem Mol Biol.* 31:101-126.

- **Olofsson J y Leung PCK.** 1994. Auto/paracrine role of prostaglandins in corpus luteum function. *Mol Cell Endocrinol.* 100:87–91.
- **Ortega-Gutiérrez S, Molina-Holgado E y Guaza C.** 2005. Effect of anandamide uptake inhibition in the production of nitric oxide and in the release of cytokines in astrocyte cultures. *Glia.* 52(2):163-168.
- **Pacher P, Beckman JS y Liaudet L.** 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 87:315-424.
- **Padykula HA.** 1981. Shifts in uterine stromal cells populations during pregnancy and regression. En: *Cellular and Molecular Aspects of Implantation.* Glasser SR, Bullock DWw.Eds: New York, Plenum Press. Pp, 197-216.
- **Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE y Epstein SE.** 1990. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *New Engl J Med.* 323 (1): 22-29.
- **Paria BC y Dey SK.** 2000. Ligand-receptor signalling with endocannabinoids in preimplantation embryo development and implantation. *Chem Phys Lipids.* 108(1-20)211-20.
- **Paria BC, Das SK y Dey SK.** 1995. The preimplantation mouse embryo is a target for cannabinoid ligand-receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:9460-9464.
- **Paria BC, Deutsch DD y 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.
- **Patel FA y Challis JRG.** 2002. Cortisol/progesterone antagonism in regulation of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase activity and mRNA levels in human chorion and placental trophoblasts cells at term. *J Clin Endocrinol Metab.* 87:700-708.
- **Patricelli MP y Cravatt BF.** 2001. Proteins regulating the biosynthesis and inactivation of neuromodulatory fatty acid amides. *Vitam Horm.* 62: 95-131.
- **Pecchi E, Dallaporta M, Jean A, Thirion S y Troadec JD.** 2008. mPGES-1 knock out mice are resistant to cancer-induced anorexia despite de absence of central mPGES-1 up-regulation in wild type anorexic mice. *J Neuroimmunol.* 199 (1-2): 104-114.

- **Pertwee RG.** 1997. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther.* 74:129-180.
- **Pettersson PL, Thoren S y Jakobsson PJ.** 2005. Human microsomal prostaglandin E synthase 1: a member of the MAPEG protein superfamily. *Methods Enzymol.* 401:147-161.
- **Pfeiffer S y Mayer B.** 1998. Lack of tyrosine nitration by peroxynitrate generated at physiological pH. *J Biol Chem.* 273:27280-27285.
- **Pfeiffer S, Schmidt K y Mayer B.** 2000. Dityrosine formation outcompetes tyrosine nitration at low steady-state concentrations of peroxynitrite. Implications for tyrosine modification by nitric oxide/superoxide *in vivo*. *J Biol Chem.* 275:6346-6352.
- **Piccinni, MP.** 2006. T cells in normal pregnancy and recurrent pregnancy loss. *Reprod Biomed Online.* 13(6):840-844.
- **Piomelli D, Giuffrida A, Calignano A y Rodriguez de Fonseca F.** 2000. The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol Sci.* 21(6):218-224.
- **Piper PJ, Vane JR y Wyllie JH.** 1970. Inactivation of prostaglandins by the lungs. *Nature.* 225:600-604.
- **Pollock JS, Forstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M y 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.
- **Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B y Beutler B.** 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* 282(5396):2085-2088.
- **Qazi QH, Mariano E, Milman DH, Beller E y Crombleholme W.** 1985. Abnormalities in offspring associated with prenatal marijuana exposure. *Dev Pharmacol Ther.* 8: 141-148.
- **Radi R.** 2004. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(12):4003-4008.
- **Ramer R, Brune K, Pahl A y Hinz B.** 2001. R(+)-Methanandamide induces cyclooxygenase-2 expression in human neuroglioma cells via a

- non-cannabinoid receptor-mediated mechanism. *Biochem Biophys Res Commun.* 286:1144–1152.
- **Ramer R, Weinzierl U, Schwind B, Brune K y Hinz B.** 2003. Ceramide is involved in R(+)-methanandamide-induced cyclooxygenase-2 expression in human neuroglioma cells. *Mol Pharmacol.* 64:1189–1198.
 - **Reece MS, Mc Gregor JA, Allen KG, Mathias M y Harris M.** 1996. Prostaglandins in selected reproductive tissues in preterm and full term gestations. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 55:303-307.
 - **Rees DD, Palmer RM y Moncada S.** 1989. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86 (9): 3375-3378.
 - **Ribeiro ML, Vercelli CA, Sordelli MS, Farina MG, Cervini M, Billi S y Franchi AM.** 2009. 17β -oestradiol and progesterone regulate anandamide synthesis in the rat uterus. *Reprod Biomed Online.* 18(2):209-218.
 - **Rice G.** 1995. Secretory type II phospholipase A2 and the generation of intrauterine signals. *Reprod Fertil Dev.* 7(6):1471-1479.
 - **Robinson GE, Stirtzinger R, Stewart DE y Ralevski E.** 1994. Psychological reactions in women followed for 1 year after miscarriage. *J Reprod Infant Psychol.* 12:31–36.
 - **Romero R, Mazor M, Munoz H, Gomez R, Galasso M y Sherer DM.** 1994. The preterm labor syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* 734:414-29. Review.
 - **Rubinstein L y Forbes TR.** 1963. Maintenance of pregnancy with subcutaneous pellets of progesterone in ovariectomized mice. *Proc Soc Exp Biol Med.* 113:1043-1046.
 - **Salter M, Knowles RG y Moncada S.** 1991. Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent nitric oxide synthases. *Federation of European Biochemical Societies.* 291(1):145-149.
 - **Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG y Needleman P.** 1993. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(15):7240-7244.
 - **Samuelsson B, Granstrom E, Green K, Hamberg M y Hammarstrom S.** 1975. Prostaglandins. *Ann Rev Biochem.* 44:669–695.

- **Samuelsson B, Morgenstern R y Jakobsson PJ.** 2007. Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. *Pharmacol Rev.* 59(3):207-224.
- **Sawzdargo M, Nguyen T, Lee DK, Lynch KR, Cheng R, Heng HH, George SR y O'Dowd BF.** 1999. Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 64:193-198.
- **Schlegel W, Kruger S y Korte K.** 1984. Purification of prostaglandin E₂-9-ketoreductase from human decidua vera. *FEBS Lett.* 171:141-144.
- **Schmid HH, Schmid PC y Natarajan V.** 1990. N-acylated glycerophospholipids and their derivatives. *Prog Lipid Res.* 29(1):1-43.
- **Schmid PC, Paria BC, Krebsbach RJ, Schmid HH y 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 y 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.
- **Shackelford R, Adams DO y Johnson SP.** 1995. IFN-gamma and lipopolysaccharide induce DNA binding of transcription factor PU.1 in murine tissue macrophages. *J Immunol.* 154(3):1374-1382.
- **Sherwood RA, Keating J, Kavvadia V, Greenough A y Peters TJ.** 1999. Substance misuse in early pregnancy and relationship to fetal outcome. *Eur J Pediatr.* 158:488-492.
- **Simpson JL.** 1980. Genes, chromosomes, and reproductive failure. *Fertil Steril.* 33(2):107-116.
- **Sladek SM y 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.
- **Slama H, Vaillancourt D y Goff AK.** 1993. Metabolism of arachidonic acid by caruncular and allantochorionic tissues in cows with retained fetal membranes (RFM). *Prostaglandins.* 45:57-75.
- **Slater D, Astle S, Woodcock N, Chivers J, de Wit N, Thornton S, Vatish M y Newton R.** 2006. Anti-inflammatory and relaxatory effects

- of prostaglandin E₂ in myometrial smooth muscle. *Mol Hum Reprod.* 12(2):89-97.
- **Smith WL y Marnett LJ.** 1991. Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochem Biophys Acta.* 1083: 1-17.
 - **Smith WL.** 1989. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem J.* 259: 315–324.
 - **Someya A, Horie S y Murayama T.** 2002. Arachidonic acid release and prostaglandin F_{2α} formation induced by anandamide and capsaicin in PC12 cells. *Eur J Pharmacol.* 450:131-139.
 - **Spinas GA, Bloesch D, Keller U, Zimmerli W, y Cammisuli S.** 1991. Pretreatment with ibuprofen augments circulating tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, and elastase during acute endotoxemia. *J Infect Dis.* 163(1):89-95.
 - **Springall DR, Riveros-Moreno V, Buttery L, Suburo A, Bishop AE, Merrett M, Moncada S y Polak JM.** 1992. Immunological detection of nitric oxide synthase(s) in human tissues using heterologous antibodies suggesting different isoforms. *Histochemistry.* 98(4): 259-266.
 - **Sugamura K, Sugiyama S, Nozaki T, Matsuzawa Y, Izumiya Y, Miyata K, Nakayama M, Kaikita K, Obata T, Takeyama M y Ogawa H.** 2009. Activated endocannabinoid system in coronary artery disease and antiinflammatory effects of cannabinoid 1 receptor blockade on macrophages. *Circulation.* 119(1):28-36.
 - **Sugiura T, Kobayashi Y, Oka S y 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 y 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, Ishima Y 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.

- **Szallasi A y Blumberg PM.** 1999. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev.* 51:159-212.
- **Tai HH, Ensor CM, Tong M, Zhou H y Yan F.** 2002. Prostaglandins catabolizing enzymes. *Prost Other Lipid Med.* 68-69:483-493.
- **Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K y Akira S.** 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity.* 11(4):443-451.
- **Tanikawa N, Ohmiya Y y Ohkubo H.** 2002. Identification and characterization of a novel type of membrane-associated prostaglandin E synthase. *Biochem Biophys Res Commun.* 291(4):884-889.
- **Tanioka T, Nakatani Y y Kobayashi T.** 2003. Regulation of cytosolic prostaglandin E synthase by 90-kDa heat shock protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 303(4):1018-1023.
- **Tanioka T, Nakatani Y, Semmyo N, Murakami M y Kudo I.** 2000. Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. *J Biol Chem.* 275(42):32775-32782.
- **Terada T, Sugihara Y, Nakamura K, Sato R, Sakuma S, Fujimoto Y, Fujita T, Inazu N y Maeda M.** 2001. Characterization of multiple Chinese hamster carbonyl reductases. *Chem Biol Interact.* 130-132(1-3):847-861.
- **Trabucco E, Acone G, Marenga A, Pierantoni R, Cacciola G, Chioccarelli T, Mackie K, Fasano S, Colacurci N, Meccariello R, Cobellis G, Cobellis L.** 2009. Endocannabinoid system in first trimester placenta: low FAAH and high CB1 expression characterize spontaneous miscarriage. *Placenta.* 30:516-522.
- **Tsai AL, Sanduja R y Wu KK.** 1991. Evidence for two pools of prostaglandin H synthase in human endothelial cells. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.* 21A:141-144.
- **Tsatsanis C, Androulidaki A, Venihaki M y Margioris AN.** 2006. Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. *Int J Biochem Cell Biol.* 38:1654-1661.
- **Ueda N, Yamamoto K, Kurahashi Y, Yamamoto S, Ogawa M, Matsuki N, Kudo I, Shinkai H, Shirakawa E y Tokunaga T.** 1995. Oxygenation of arachidonylethanolamide (anandamide) by

- lipoxygenases. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.* 23:163-165.
- **Vane JR y Williams KI.** 1973. The contribution of prostaglandin production to contractions of the isolated uterus of the rat. *Br J Pharmacol.* 48(4):629-39.
 - **Vannacci A, Giannini L, Passani MB, Di Felice A, Pierpaoli S, Zagli G, Fantappie O, Mazzanti R, Masini E y 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.* 311:256– 264.
 - **Varga K, Wagner JA, Troy Bridgen D y Kunos G.** 1998. Platelet- and macrophage-derived endogenous cannabinoids are involved in endotoxin-induced hypotension. *FASEB J.* 12:1035-1044.
 - **Vodovotz Y, Russel D, Xie QW, Bogdan C y Nathan CF.** 1995. Vesicle membrane association of nitric oxide synthase in primary mouse macrophages. *J. Immunol.* 154: 2914-2925.
 - **Vreugdenhil AC, Rousseau CH, Hartung T, Greve JW, van 't Veer C y Buurman WA.** 2003. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein mediates LPS detoxification by chylomicrons. *J Immunol.* 170(3):1399-1405.
 - **Wan M, Cravatt BF, Ring HZ, Zhang X y 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 y Dey SK.** 2006a. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet.* 7: 185-199.
 - **Wang H, Dey SK y Maccarrone M.** 2006b. Jekyll and Hyde: two faces of cannabinoid signalling in male and female fertility. *Endocrinol Rev.* 27(5):427-448.
 - **Wang H, Guo Y, Wang D, Kingsley PJ, Marnett LJ, Das SK, DuBois RN y Dey SK.** 2004. Aberrant cannabinoid signaling impairs oviductal transport of embryos. *Nat Med.* 10:1074–1080.
 - **Wartmann M, Campbell D, Subramanian A, Burstein SH y Davis RJ.** 1995. The MAP kinase signal transduction pathway is activated by the endogenous cannabinoid anandamide. *FEBS Lett.* 359: 133– 136.

- **Watanabe K, Kurihara K, Tokunaga Y y Hayaishi O.** 1997. Two types of microsomal prostaglandin E synthase: glutathione-dependent and – independent prostaglandin E synthases. *Biochem Biophys Res Commun.* 235(1):148-152.
- **Wen PZ, Warden C, Fletcher BS, Kujubu DA, Herschman HR y Lulis AJ.** 1993. Chromosomal organization of the inducible and constitutive prostaglandin synthase/cyclooxygenase genes in mouse. *Genomics.* 15: 458-460.
- **Wenger T, Toth BE, Juaneda C, Leonardelli J y 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 y 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 y Vane JR.** 1980. Selective inhibition of prostaglandin production in inflammatory exudates and gastric mucosa. *Nature.* 284: 271-273.
- **Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF, Baird DD, Schlatterer JP, Canfield RE, Armstrong EG y Nisula BC.** 1988. Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med.* 1988. 319(4):189-194.
- **Wiqvist N, Lindblom B, Wikland M, Wilhelmsson L.** 1983. Prostaglandins and uterine contractility. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl.* 113:23–29.
- **Wu KK.** 1995. Molecular regulation and augmentation of prostacyclin biosynthesis. *Agents Actions Suppl.* 45:11.
- **Wu W, Chen Y y Hazen SL.** 1999. Eosinophil peroxidase nitrates protein tyrosyl residues. Implications for oxidative damage by nitrating intermediates in eosinophilic inflammatory disorders. *J Biol Chem.* 274(36):25933-25944.
- **Wurfel MM, Kunitake ST, Lichenstein H, Kane JP y Wright SD.** 1994. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS. *J Exp Med.* 180(3):1025-1035.
- **Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL y 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, Garfield RE y Byam-Smith M.** 1993. Nitric oxide inhibits uterine contractility during pregnancy but not during delivery. Endocrinology. 133 (4): 1899-1902.
- **Yamaji K, Sarker KP, Kawahara K, Iino S, Yamakuchi M, Abeyama K, Hashiguchi T y Maruyama I.** 2003. Anandamide induces apoptosis in human endothelial cells: its regulation system and clinical implications. Thromb Haemost. 89:875-884.
- **Yu M, Ives D y Ramesha CS.** 1997. Synthesis of prostaglandin E2 ethanolamide from anandamide by cyclooxygenase-2. J Biol Chem. 272(34):21181-21186.