

Tesis Doctoral

# Participación del sistema endocannabinoide en el sitio de implantación y de las células infiltrantes en la reabsorción embrionaria inducida por LPS

Wolfson, Manuel Luis

2014-03-25

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Wolfson, Manuel Luis. (2014-03-25). Participación del sistema endocannabinoide en el sitio de implantación y de las células infiltrantes en la reabsorción embrionaria inducida por LPS. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Wolfson, Manuel Luis. "Participación del sistema endocannabinoide en el sitio de implantación y de las células infiltrantes en la reabsorción embrionaria inducida por LPS". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-03-25.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**Participación del sistema endocannabinoide en el sitio de  
implantación y de las células infiltrantes en la reabsorción  
embrionaria inducida por LPS.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos  
Aires en el área **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Manuel Luis Wolfson**

**Directora de tesis: Ana María Franchi.**

**Directora asistente de tesis: Claudia Alejandra Vercelli.**

**Consejero de estudios: Dante Paz.**

**Lugar de trabajo: Laboratorio de Fisiopatología de la Preñez y el Parto, Centro de  
Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO) CONICET-UBA.**

**Buenos Aires, 2014**

## **“Participación del sistema endocannabinoide en el sitio de implantación y en las células infiltrantes en la reabsorción embrionaria inducida por LPS.”**

Se ha demostrado una estrecha asociación entre el aborto y cambios en el sistema endocannabinoide (SEC) en linfocitos periféricos de mujeres. En un modelo murino de reabsorción embrionaria (RE) inducida por LPS estudiamos la participación del SEC tanto del sitio de implantación como de las células inmunes infiltrantes y su posible regulación por progesterona (P).

En este modelo observamos niveles plasmáticos elevados del principal endocannabinoide, anandamida (AEA). Por otro lado encontramos que la RE inducida por LPS era mucho menor en ratones transgénicos deficientes en el receptor de cannabinoides tipo 1, como así también la disminución de los niveles séricos de P. Demostramos la presencia del SEC en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de ratón y que la actividad de la enzima metabolizante de la AEA (hidrolasa de amidas de ácidos grasos, FAAH) de las PBMC de ratones preñados es mayor que la de los ratones no preñados. Asimismo observamos un efecto protector de la P sobre la actividad de la FAAH y que el mismo estaba mediado por los receptores clásicos de esta hormona (PR). Encontramos que el 70% de las PBMC estudiadas son linfocitos T, demostramos la presencia de los PR en estas células.

Por otro lado el LPS incrementó tanto los niveles de óxido nítrico (NO), como de la enzima que lo sintetiza (NOSi). La P abolió el incremento inducido por el LPS, actuando a través de los receptores de glucocorticoides.

Durante la RE, la decidua es infiltrada por células del sistema inmune, sufre importantes daños y finalmente es expulsada. Investigamos el efecto de la infiltración leucocitaria sobre la actividad de FAAH en las deciduas mediante un sistema de cocultivo. Cuando las deciduas de animales controles se cultivaron en presencia de PBMC provenientes de animales preñados tratados con LPS, la actividad de la FAAH decidual disminuyó, efecto que fue revertido por la coadministración de P o la de un inhibidor selectivo de la NOSi, aminoguanidina. Asimismo observamos un aumento en la nitración de las proteínas deciduales y específicamente de la FAAH cuando las decidua se co-cultivaban junto a las PBMC de animales tratados con LPS y que este efecto fue revertido por la P. Este trabajo demuestra que el SEC participa en la RE inducida por LPS y que los cambios

de este sistema en la decidua están influenciados tanto por las células inmunes infiltrantes como por alteraciones en el sistema endócrino.

---

**Palabras claves:**

Reabsorción embrionaria - Lipopolisacárido - Sistema endocannabinoide - Células mononucleares de sangre periférica - Progesterona - Anandamida - Óxido nítrico

## **“Participation of the endocannabinoid system in the implantation site and infiltrating cells in LPS-induced embryonic resorption”**

A close association between abortion and changes of the endocannabinoid system (eCS) in peripheral lymphocytes of women has been demonstrated. In a murine model of LPS-induced embryonic resorption (EmR), we studied the involvement of eCS in the site of implantation and in the infiltrating immune cells and its possible regulation by progesterone (P).

We observed an elevated anandamide (AEA) plasma levels, a major endocannabinoid, in this model. On the other hand, we found that the LPS-induced less EmR in cannabinoid receptor 1 (CB1) knock-out mice, together with a lower drop of P plasma levels. We showed the presence of eCS in murine peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and that the PBMC's fatty acid amide hydrolase activity (FAAH, the main catalytic enzyme for AEA) from pregnant mice was higher than from non pregnant mice. Moreover, we observed that P, via its classical receptors for this hormone (PR), has a protective effect on FAAH activity. Given that the 70% of PBMC are lymphocytes, we demonstrated the presence of PR in this subpopulation.

Furthermore, LPS produced an increased levels of both nitric oxide (NO) and inducible NO synthase (iNOS). Interestingly, P abolished these LPS effects acting through glucocorticoid receptors.

During EmR, decidua is infiltrated with immune system cells, suffers important damage and is finally expelled. Using a co-culture system, we investigated the effects of leukocytary infiltration on decidual FAAH activity. When deciduas from control mice were cultured in presence of PBMC from LPS-treated animals, decidual FAAH activity was abolished. This effect was reverted by the co-administration of P or aminoguanidine (a selective inhibitor of iNOS). When deciduas were co-cultured with PBMC from LPS treated mice, we observed an increase in decidual protein nitration and particularly in FAAH enzyme; an effect that was reverted by P.

This work shows that the eCS is involved in the LPS-induced EmR and that changes in the decidua are influenced both by infiltrating immune cells as well as by alterations in the endocrine system.

---

### **Keywords:**

Embryonic resorption - Lipopolysaccharide - Endocannabinoid system - Peripheral blood mononuclear cells - Progesterone - Anandamide - Nitric oxide

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

**Wolfson M.L.**, Aisemberg J., Salazar A.I., Dominguez Rubio A.P., Vercelli C.A., Franchi A.M. “*Progesterone reverts LPS-reduced FAAH activity in murine peripheral blood mononuclear cells by a receptor-mediated fashion.*” *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2013; 5;381(1-2):97-105.

## **Agradecimientos**

*Al CONICET, la ANCyPT por las becas y los subsidios que hicieron posible esta tesis.*

*A la UBA, por haberme formado como científico tanto en mi carrera de grado como en este doctorado.*

*A Ana, por acompañarme estos años no solo como jefa, sino como persona. Por todo lo que me enseñaste, por el lugar que me diste, por la paciencia. Gracias.*

*A Ramonita, porque siempre estás ahí para ayudarnos, lástima que ya casi no preparas mate.*

*A Mari, Lauchi y Sil porque siempre le ponen la mejor onda y siempre pude contar con ustedes.*

*A Maki, por tus TOC y porque siempre estás para cualquier cosa.*

*A Clau, por tu gran apoyo y ayuda para poder haber hecho esta tesis.*

*A Juli, porque desde que entré tu ayuda fue incondicional, por las caminatas, los mates y las charlas.*

*A las chicas, Turi, Pau y Vicki, porque hacen al labo mucho más divertido. Vicki tus chistes son lo más.*

*A las nuevas incorporaciones del labo, las Julis, Vicki y Maga.*

*A Fer, por haberme ayudado tantas veces con el inglés, los mates y teres, un gran copiloto.*

*A Maria Gracia, por ser una gran compañera y amiga. Por las tardes de escritura con Simón.*

*A klauchi y Juli B. porque siempre es lindo subir al 124 y tomarse unos mates.*

*A Mikita, Jime y Cyn por su ayuda cuando la necesite y simpatía. Gracias Jime por dejarme abrazarte cuando te saludo.*

*A Legui, porque tus visitas siempre son divertidas y sos un gran tipo.*

*A Silvia, porque aunque ya no estés en el labo me ayudaste en mis primeros pasos.*

*A Ani, Patri, Noe, Cris, Ale e Isa porque sin ustedes nuestro laburo sería aún más complicado.*

*A Sara, Pachi, Estela por todo lo que hacen por nosotros.*

*A Dani, Marce, Enzo y Eduardo, por el cuidado diario de los animales.*

*A los Pérez Leirós, por los congresos compartidos.*

*A Ruth, Cali y Rochi, por haberme escuchado y ayudado con mis experimentos.*

*A Vale Rettori, por su cariño y sus enseñanzas.*

*A los Rettori, por los mates, porque siempre están al lado para pedirles una mano.*

*A Cora por haberme ayudado a hacer el RIA de progesterona.*

*A Paco y Cami, por tantas charlas de pasillo.*

*A Gabriel Rabinovich y su grupo por su asesoramiento.*

*A Heather Bradshaw por la medición de los niveles plásmaticos de AEA.*

*A todo el CEFyBO, donde siempre me sentí muy cómodo.*

*A Ana Adamo porque aunque ya no trabajo en el quinto siempre que pudiste me ayudaste.*

*A mis amigos de la facu, porque sin ustedes todo hubiese sido más difícil y aburrido, porque siempre estuvieron para ayudarme a resolver los quilombos científicos y personales, además de festejar siempre que hubo motivo. Charlas, cursadas... Son muchos espero no olvidarme ninguno, aunque lo dudo. Die, Nico U., Cris, Rafa, Peter, Marquitos, Mati (aunque ahora seas médico), Maria Gracia, Guille R., Axel, Chechu, Belén, Nico R., Toti, Caro, Mica, Gas, Mechi, Cami, Agos, Charly, Cami y a todos los que seguro me olvidé de poner.*

*A Guille B. y Eli porque lo que importa es la cerveza.*

*A Gure, ¿estás bien Juan?*

*A mis amigos de la vida, Agus, Mati, Santi porque siempre estuvieron.*

*A Carla por haber leído parte de la tesis sin entender demasiado, pero poniéndole la mejor de las ondas.*

*A mis papás por todo lo que me dieron, a mis hermanos porque no imagino mi vida sin ellos. Por soportarme que no es poca cosa. A Ari y Marie, porque ya son parte de la familia. A mis sobrinos porque son lo más.*

*A los Ezcurra porque me hicieron parte de la familia. A mi otro sobrino que también es lo más.*

*A Pauli, por aguantarme, acompañarme, estar. Te amo.*

*Y a todos los que colaboraron para que esta tesis fuera posible,*

*GRACIAS!!!*



## Abreviaturas

---

2-AG:	2-araquidonil glicerol	mg:	miligramo/s
5HT:	Serotonina	ML:	Músculo liso
AA:	Ácido araquidónico	NADP:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
AEA:	Anandamida	NADPH:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
AF:	Ácido fosfatídico	NAPE:	N-araquidonil-fosfatidiletanolamina
AG:	Aminoguanidina	NAPE-PLC:	N-acil- fosfatidiletanolamina fosfolipasa C
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero	NAPE-PLD:	N-acil- fosfatidiletanolamina fosfolipasa D
ATP:	Adenosín trifosfato	NF-kB:	Factor nuclear kappa Beta
CB1:	Receptor de cannabinoides tipo 1	NMDA:	N-metil-D-aspartato
CB2:	Receptor de cannabinoides tipo 2	NO:	Óxido nítrico
CB3:	Receptor de cannabinoides tipo 3	NOS:	Óxido nítrico sintasa
COX-1:	Ciclooxigenasa-1	NOSe:	NO sintasa endotelial
COX-2:	Ciclooxigenasa-2	NOSi:	NO sintasa inducible
DAG:	Diacilglicerol	NOSmt:	NO sintasa mitocondrial
DG lipasa:	Digliceridolipasa	NOSn:	NO sintasa neuronal
DGL:	Digliceridolipasas	ONOO-:	Peroxinitrito
EDTA:	Ácido etilendiaminetetracético	PBMC:	Células mononucleares de sangre periférica
FAAH:	Hidrolasa de amidas de ácidos grasos	pAEA:	Fosfo-anandamida
GC:	Guanilato ciclasa	PGE2:	Prostaglandina E2
GCs:	Guanilato ciclasa soluble	Pi:	Fósforo inorgánico
GMP:	Guanosín monofosfato	PI-PLC:	Fosfoinositol-fosfolipasa C
GMPC:	Guanosín monofosfato cíclico	PK:	Proteín quinasa
GSH:	Glutación reducido	PLA2:	Fosfolipasa A2
GTP:	Guanosín trifosfato	PLC:	Fosfolipasa C
h:	hora/s	PLD:	Fosfolipasa D
HDL:	Lipoproteína de alta densidad	RE:	Reabsorción embrionaria
ITU:	Infección del tracto uterino	RIA:	Radioinmunoensayo
kDa:	kilo Daltons	SEC:	Sistema endocannabinoide
LBP:	Proteína de unión al LPS	Seg:	Segundos
LGL:	Linfocitos grandes granulados	THC:	Tetrahidrocannabinol
LH:	Hormona luteinizante	TLC:	Cromatografía en capa delgada
Liso PL:	Lisofosfolípido	TLR:	Receptor de tipo toll
LPS:	Lipopolisacárido	TRPV1:	Receptor de vanilloides tipo 1
MAG:	Monoacilglicerol	TRPV4:	Receptor de vanilloides tipo 4

# Índice

---

## Introducción.

1

---

<b>1. Relevancia del tema en estudio.</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Definición</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Causas</b>	<b>1</b>
<b>1.3. Efectos</b>	<b>2</b>
<b>1.4. Estadísticas</b>	<b>3</b>
<b>1.5. Importancia</b>	<b>3</b>
<b>2. Animales de experimentación.</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Características generales</b>	<b>4</b>
<b>2.2. Características reproductivas</b>	<b>5</b>
<b>2.3. Tejidos en estudio</b>	<b>6</b>
<b>3. Reabsorción embrionaria.</b>	<b>12</b>
<b>3.1. Modelos de reabsorción embrionaria</b>	<b>12</b>
<b>4. El lipopolisacárido.</b>	<b>13</b>
<b>4.1. Receptores</b>	<b>14</b>
<b>4.2. Nuestro modelos de RE</b>	<b>15</b>
<b>5. El óxido nítrico.</b>	<b>17</b>
<b>5.1. Vías de síntesis</b>	<b>18</b>
<b>5.1.1. Clasificación y características de las isoformas de la NOS</b>	<b>19</b>
<b>5.2. Mecanismo de acción del NO</b>	<b>21</b>
<b>5.3. El óxido nítrico en nuestro modelo de RE</b>	<b>24</b>
<b>6. El sistema Endocannabinoide.</b>	<b>25</b>
<b>6.1. Los endocannabinoides</b>	<b>25</b>

<b>6.2. Mecanismo de acción de los EC</b>	<b>27</b>
<b>6.2.1. Receptores de cannabinoides</b>	<b>27</b>
<b>6.3. Metabolismo de AEA</b>	<b>29</b>
<b>6.3.1. Síntesis de AEA</b>	<b>29</b>
<b>6.3.2. Transporte de AEA</b>	<b>31</b>
<b>6.3.3. Degradación de AEA</b>	<b>31</b>
<b>6.4. Endocannabinoides y reproducción</b>	<b>32</b>
<b>6.5. Endocannabinoides y LPS</b>	<b>33</b>
<b>6.6. Los Endocannabinoides y el óxido nítrico</b>	<b>34</b>
<b>7. La progesterona.</b>	<b>35</b>
<b>7.1. Receptores de progesterona</b>	<b>35</b>
<b>7.2. Progesterona y preñez</b>	<b>37</b>
<b>7.2. La progesterona y el sistema inmune</b>	<b>38</b>
<b>Hipótesis y Objetivos</b>	<b>41</b>
<hr/>	
<b>Materiales y métodos</b>	<b>44</b>
<hr/>	
<b>1. Drogas y reactivos.</b>	<b>44</b>
<b>1.1. Anticuerpos utilizados</b>	<b>45</b>
<b>2. Soluciones y medios.</b>	<b>45</b>
<b>3. Animales.</b>	<b>47</b>
<b>3.1. Tratamientos de los animales</b>	<b>47</b>
<b>4. Purificación PBMC.</b>	<b>52</b>
<b>5. Co-cultivos PBMC y deciduas.</b>	<b>53</b>

<b>6. Citoemtría de flujo.</b>	<b>54</b>
<b>7. Medición de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>+ NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Reacción de Griess.</b>	<b>55</b>
<b>8. Inmunofluorescencia.</b>	<b>56</b>
<b>9. Purificación de Linfocitos T.</b>	<b>57</b>
<b>10. Genotipificación de ratones.</b>	<b>58</b>
<b>11. Western Blot.</b>	<b>59</b>
<b>12. Inmunoprecipitación de FAAH.</b>	<b>61</b>
<b>13. Determinación de la actividad de la hidrolasa de amidas de ácidos grasos (FAAH).</b>	<b>62</b>
<b>14. Radioinmunoensayo (RIA) para cuantificar la concentración de progesterona.</b>	<b>63</b>
<b>15. Medición de endocannabinoides por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) acoplada a espectrometría de masa (ME).</b>	<b>64</b>
<b>16. RT-PCR.</b>	<b>65</b>
<b>17. Análisis de la reabsorción embrionaria (RE).</b>	<b>67</b>
<b>18. Análisis de infiltración leucocitaria.</b>	<b>67</b>
<b>19. Medición de la actividad de la sintasa de óxido nítrico</b>	<b>68</b>
<b>20. Análisis estadísticos de los datos.</b>	<b>69</b>

<b>Resultados</b>	<b>70</b>
<hr/>	
<b>1. Participación del SEC en la RE inducida por LPS.</b>	<b>70</b>
<b>1.1. Efecto del LPS sobre los niveles plasmáticos de AEA.</b>	<b>70</b>
<b>1.2. Efecto de la AEA en la RE.</b>	<b>71</b>
<b>1.3. Participación del receptor de cannabinoides tipo I (CB1) en la RE inducida por LPS.</b>	<b>71</b>
<b>1.3.1. Control del genotipo de los ratones silvestres y de los ko-CB1.</b>	<b>71</b>
<b>1.3.2. Participación del CB1 en la RE inducida por LPS.</b>	<b>72</b>
<b>1.3.3. Efecto del LPS sobre la progesterona plasmática de ratones ko-CB1.</b>	<b>74</b>
<b>2. El SEC de las murinas y su posible modulación por LPS. Papel de la P sobre estos efectos de la endotoxina en estas células.</b>	<b>75</b>
<b>2.1. Presencia del SEC en las PBMC murinas y su posible modulación por LPS.</b>	<b>75</b>
<b>2.2. Papel de la P sobre el efecto del LPS sobre la FAAH en las PBMC.</b>	<b>77</b>
<b>3. Efecto del LPS sobre el sistema nitrérgico, y el posible papel protector de la P.</b>	<b>81</b>
<b>4. Analizar la presencia de los receptores nucleares de P en las PBMC.</b>	<b>83</b>
<b>5. Los linfocitos T entre las PBMC.</b>	<b>86</b>
<b>6. Analizaar la tasa de infiltración leucocitaria inducida por LPS en ratones ko-CB1.</b>	<b>88</b>
<b>7. Estudiar el efecto de las células inmunes infiltrantes sobre la decidua en la RE inducida por LPS.</b>	<b>89</b>

**Discusión** **98**

---

**Conclusiones** **118**

---

**Referencias** **120**

---



## **Introducción.**

---

### **1.- Relevancia del tema en estudio.**

#### **1.1.- Definición.**

La palabra aborto proviene del latín *abortus*, que a su vez deriva del término *aborior*. Este concepto se utilizaba para referirse a lo opuesto a *orior*, o sea, lo contrario a nacer. Desde el punto de vista gineco-obstétrico, hace referencia a la interrupción de un embarazo en desarrollo antes de la semana veinte de gestación o con fetos de un peso menor a 500 g. Esto implica la pérdida gestacional previa al desarrollo de un feto capacitado para la vida extrauterina en forma independiente.

Particularmente la expresión aborto espontáneo se refiere a la pérdida del embrión en desarrollo en ausencia de cualquier tipo de intervención quirúrgica o médica, aunque, dependiendo de las circunstancias, esta puede ser necesaria posteriormente para asegurar la seguridad física de la mujer.

#### **1.2.- Causas.**

Existen numerosas causas que pueden provocar la pérdida temprana de la gestación. Entre las más comunes se encuentran la trisomía autosómica, la monosomía X y las malformaciones estructurales (Kajii y col., 1980; Simpson, 1980). Su incidencia es de aproximadamente un 50 % del total de los embarazos y un 6 % de los abortos espontáneos a repetición. Las anomalías cromosómicas también pueden producir un saco gestacional que no contiene feto alguno, ya sea porque el embrión no se formó o porque se reabsorbió precozmente.

Otros factores asociados a la causalidad del aborto espontáneo son las anormalidades anatómicas



del tracto reproductivo femenino (Pandey y col., 2005). Entre ellas se encuentran: el útero septado o el unicornio, los fibromas uterinos y el síndrome de Asherman (Li y col., 2002).

También están directamente asociadas al aborto las alteraciones endócrinas del tipo diabetes mellitus insulino-dependiente no controlada (Dorman y col., 1999), hipotiroidismo, insuficiencia hormonal en fase lútea y poliquistosis ovárica. Asimismo, tanto fallas a nivel de los mecanismos inmunológicos como las enfermedades auto-inmunes pueden causar abortos, ejemplo de esto son las pérdidas gestacionales en mujeres que padecen síndrome antifosfolipídico o lupus eritematoso sistémico (Cervera y Balasch, 2008).

Por otro lado, los factores infecciosos asociados al desencadenamiento del aborto espontáneo representan un capítulo aparte. El mecanismo de interrupción puede dispararse debido a tres posibles focos de infección: endometrial crónica que interfiere con la implantación, infección fetal causante de mortandad fetal o de malformaciones incompatibles con la vida y corioamnionitis.

Las infecciones más conocidas relacionadas con abortos espontáneos son: rubéola, brucelosis, listeriosis, micoplasma, ureaplasma, chlamydia, sífilis, primo infección por herpes genital, citomegalovirus, toxoplasmosis y malaria. Además, las mujeres con VIH (virus de la inmunodeficiencia humana) sintomáticas presentan mayor incidencia de interrupciones debido a las infecciones concomitantes.

### **1.3.- Efectos.**

El aborto espontáneo provoca dolor físico menor y sus síntomas son de poca gravedad, prácticamente la única complicación es la hemorragia genital, la cual puede ser resuelta con relativa facilidad en cualquier institución médica, con bajo riesgo para la vida de la madre.

Sin embargo, el aborto trae consigo un gran dolor psicológico que no termina sino que se inicia con la pérdida fetal. Las mujeres pueden experimentar shock, negación, angustia prolongada y

depresión profunda. Por otro lado, para aquellas parejas que sufren de pérdidas gestacionales repetidas (abortos recurrentes), el estrés emocional causado por cada aborto es acumulativo y ésta patología termina siendo causal de sensación de pérdida del control sobre sus opciones reproductivas y de gran infelicidad.

#### **1.4.- Estadísticas.**

Se ha informado que la pérdida precoz del embarazo es la complicación más frecuente de la gestación. El aborto espontáneo ocurre en el 20% de todos los embarazos comprobados (Agarwal y col., 2012). Lo observado clínicamente omite los casos subclínicos, dado que muchos abortos ocurren antes o coinciden con el siguiente período menstrual, y no se manifiestan más que por un sangrado anormal o abundante, por lo cual muchas mujeres nunca llegan a saber que han tenido un aborto. Teniendo en cuenta estos datos, las tasas de aborto espontáneo pueden estar acercándose al 40% o 50%. Datos epidemiológicos indican que el riesgo de un nuevo aborto después de uno espontáneo es del 24%, pero asciende a un 40% después de 4 abortos consecutivos.

#### **1.5.- Importancia.**

La mayor parte de los trabajos evidencian que las etiologías más frecuentes en las mujeres con tres o más abortos son los trastornos endocrinos y las alteraciones en el sistema inmune y que en un elevado porcentaje el origen es idiopático (Cunningham y col., 2002).

La ausencia de una terapéutica adecuada para el aborto lleva a la necesidad de determinar los mecanismos involucrados en el desencadenamiento y desarrollo del mismo, como también a intentar definir más claramente la inmuno-regulación tanto en embarazos normales como patológicos. Conocer cómo puede ser la aceptación o el rechazo del embrión concebido por la futura mamá y particularmente determinar qué infecciones y cómo provocan la pérdida del embrión son necesidades esenciales.

El hecho de que un feto que posee tanto antígenos maternos como paternos pueda sobrevivir pone en evidencia la existencia de mecanismos protectores muy precisos que evitan el rechazo, y que permiten que la madre continúe con la homeostasis perfecta de su sistema inmune. Es por esto que nació la inmunología reproductiva, con el objetivo de estudiar la tolerancia materno-fetal, la interfase y la inmunidad de los tractos reproductivos.

## **2.- Animales de experimentación.**

### **2.1.- Características generales.**

Alrededor del 90% de los animales utilizados en investigación son roedores, principalmente ratones y ratas. Los animales de laboratorio son biomodelos experimentales que tienen cualidades necesarias para dar respuesta al cuestionamiento de cómo estudiar las enfermedades que afectan al hombre, a la especie que se está estudiando, y a las demás especies productivas y domésticas. Las ratas y ratones están entre los que responden más uniformemente a esos requerimientos, son de fácil manejo y poseen las características zootécnicas adecuadas. Este trabajo se llevó a cabo utilizando ratones de la cepa albina BALB/c y de la cepa CD1, pertenecientes a la especie *Mus musculus*.

Variadas son las características que han hecho del género *Mus* un modelo biológico y biomédico muy utilizado en investigación. En primer lugar, su talla apropiada para la crianza y manipulación. Los animales adultos miden entre 9 y 12 cm y pueden alcanzar un peso de entre 25 y 35 gramos, según el sexo. Segundo, poseen requerimientos mínimos de espacio y alimentación como también de temperatura y humedad para su mantenimiento y reproducción. Tercero, son lo suficientemente longevos (viven en promedio alrededor de 24 meses), se reproducen durante todo el año, los períodos de gestación y destete son breves, y las camadas numerosas. Asimismo, son mamíferos euterianos como el hombre, con quien comparten el 99% del genoma y su sistema inmune es muy

similar al de los seres humanos.

## **2.2.- Características reproductivas.**

El ciclo reproductivo del ratón es estral. Lo más característico de este tipo de ciclo es la manifestación de receptividad sexual por parte de las hembras por períodos limitados. La ovulación es un proceso espontáneo y predecible ya que el estro conductual coincide con el pico pre-ovulatorio de hormona luteinizante. Las hembras son poliéstricas continuas, esto significa que presentan ciclos consecutivos durante todo el año que sólo son interrumpidos por períodos gestacionales.

El ciclo está dividido en 4 fases: estro, metaestro, diestro y proestro, que duran entre 4 y 5 días. El estro también suele llamarse fase de “celo” y se define como el periodo de receptividad sexual, al final del cual se produce la ovulación. El metaestro o fase luteínica se corresponde con el desarrollo inicial del cuerpo lúteo que pasa a ser activo durante el diestro. El período de crecimiento folicular, que se inicia con la regresión del cuerpo lúteo y culmina con la aparición del estro, se denomina proestro. Cada fase del ciclo puede ser identificada mediante un extendido vaginal, según el aspecto del epitelio que se descama. Los ciclos son dependientes de los niveles de hormonas circulantes y por ello son muy sensibles a los cambios ambientales de temperatura, humedad y luz-oscuridad.

Tanto las hembras como los machos son sexualmente maduros a los 50-60 días de edad. La cópula, que se produce durante el estro, puede comprobarse al día siguiente por la presencia de un tapón vaginal. El mismo consiste en una sustancia viscosa del eyaculado que solidifica en la vagina y dura aproximadamente 12 h. Este tapón actúa principalmente como barrera mecánica que ayuda a que el esperma permanezca dentro.

Dependiendo de la cepa utilizada, el período gestacional del ratón varía, pudiendo durar entre 19 y 21 días a partir de la cópula. En las cepas aquí utilizadas, BALB/c y CD1, la gestación se prolonga durante 19 días, al final de la cual paren entre 6 y 14 crías. Una vez que las crías han nacido, la

hembra devora la placenta, ayudando la salida de la cría y estimulando la eliminación del líquido de las vías respiratorias.

A diferencia de lo que ocurre en la mujer, los ovarios en el ratón son indispensables para el mantenimiento de la gestación hasta el parto, ya que son los principales productores de la hormona progesterona. La ovariectomía en cualquier etapa de la gestación o la insuficiente secreción ovárica de progesterona, indefectiblemente interrumpen la preñez ya que el aporte placentario es limitado (Rubinstein y Forbes, 1963).

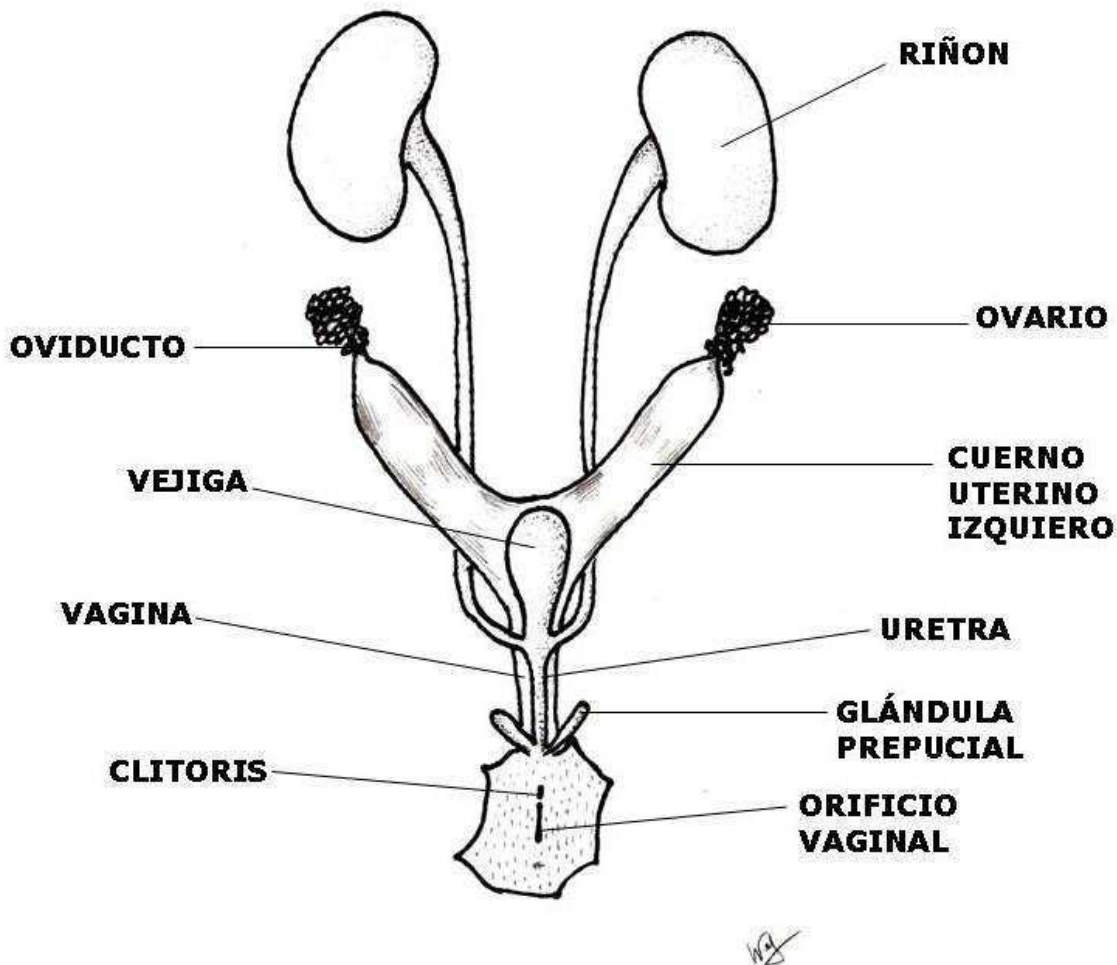
### **2.3.- Tejidos en estudio.**

- El útero.

Anatómicamente, el útero murino es un órgano bicórneo o dúplex que comienza en el oviducto y recorre la cavidad abdominal dorsal (Neal y col., 1943). Consiste en dos largos cuernos, que se unen sólo externamente hacia el final ya que, aunque parecen estar unidos, se mantienen separados por un septo medio. Cada uno de ellos desemboca por sus respectivos conductos cervicales en el extremo superior de la vagina (Figura 1).

Histológicamente, el útero de una hembra está constituido por tres capas de tejido diferentes. La externa o serosa, la media muscular o miometrio y la mucosa interna o endometrio (Ham y col., 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).



*Figura 1. Sistema urogenital del ratón.*

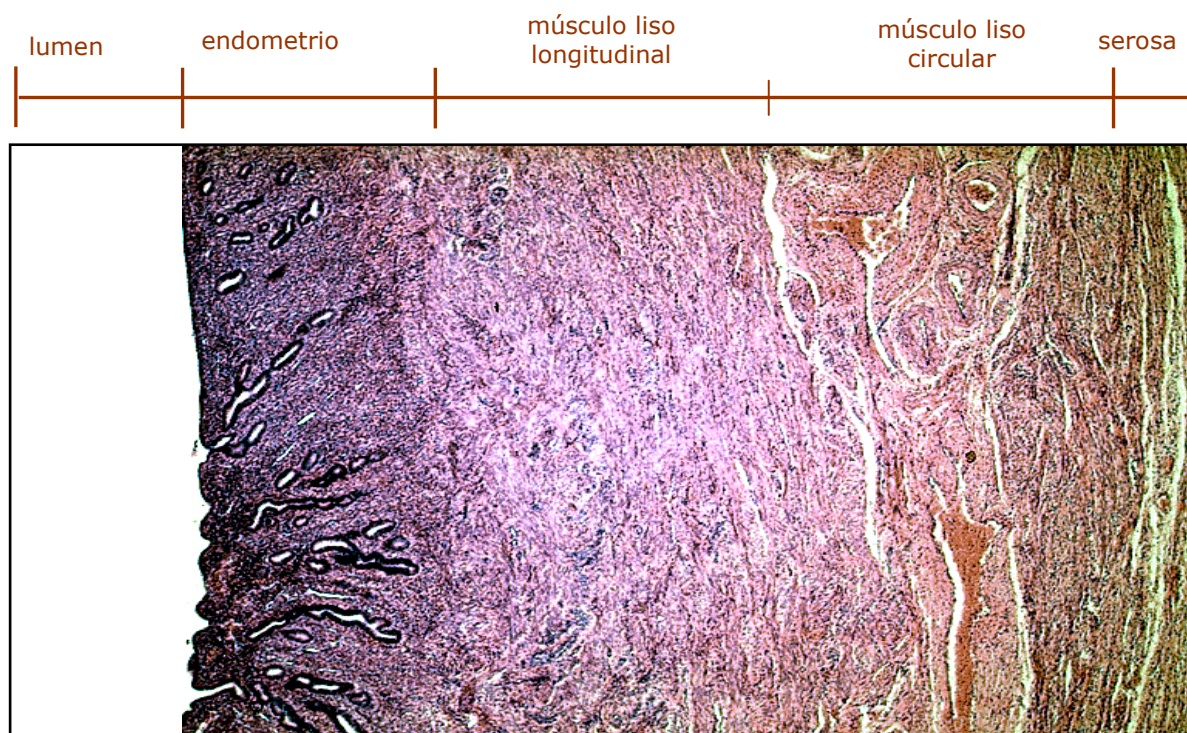
– La sección media muscular está compuesta por músculo liso dispuesto en una capa interna circular y una externa longitudinal al eje mayor del útero. Entre ambas capas hay tejido conectivo bien definido formado por fibras de colágeno, fibroblastos y células inmunes (Ham y col., 1970).

El músculo liso, también conocido como visceral o involuntario, se divide en dos grupos dependiendo de sus características electrofisiológicas. Aquellos llamados unitarios, que poseen actividad espontánea, y los llamados multiunitarios, que se caracterizan por tener fibras organizadas en unidades motoras activables por un nervio motor extrínseco (Eccles y col., 1937). El miometrio es un tejido de tipo unitario cuya actividad contráctil está coordinada y regulada por mediación

nerviosa. El órgano se halla innervado por terminaciones de tipo colinérgicas y adrenérgicas del sistema nervioso autónomo.

– La capa más interna o la expuesta a la luz uterina es el endometrio o mucosa. Está formada por una capa epitelial y un estroma. El epitelio es cilíndrico simple y el estroma es una lámina propia de gran espesor. En el estroma se hallan incluidas las glándulas tubulares simples, cuyos conductos, atravesando la superficie epitelial, se abren en la luz del útero y cuyas porciones más profundas casi alcanzan al miometrio.

El endometrio se divide en 3 capas histológicas y funcionalmente distintas. La más profunda, adyacente al miometrio, es el estrato basal que alimenta y sustenta a todo el endometrio. Le sigue una ancha capa de tejido estromal esponjoso adyacente a una capa superficial compacta y delgada. Estas últimas dos 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 2).



*Figura 2. Corte transversal de útero de ratón.*

- La decidua.

El útero sufre profundos cambios en respuesta a la implantación del embrión. El estroma endometrial se modifica radicalmente para formar la decidua en un proceso denominado decidualización.

La formación de la decidua deja a los embriones 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 completamente determinadas, se cree que es un componente crítico de la respuesta materna al embrión. Esto ocurre en parte porque controla la naturaleza invasiva del trofoblasto, y también porque juega un papel paracrino y autocrino importante, tanto para la madre como para el feto.

El proceso de decidualización comienza en las células estromales lindantes a los blastocistos implantados, pero pronto la transformación se extiende a gran parte del endometrio. Su avance produce 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.

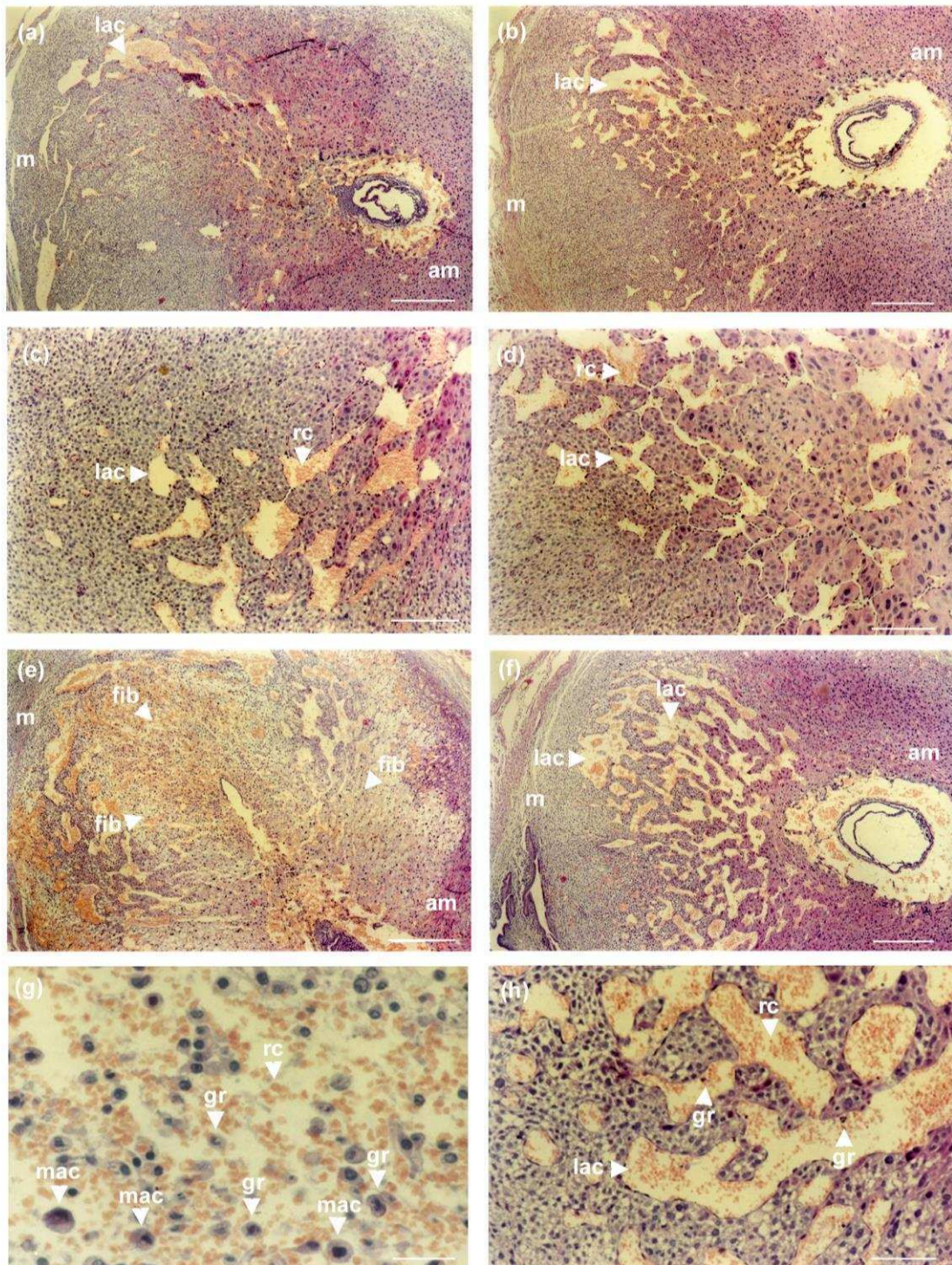
La decidualización es un fenómeno endocrino dependiente de progesterona. Bajo su influencia, las células fusiformes del estroma se diferencian en dos tipos: células pre-deciduales grandes, redondeadas, con núcleo hipocromático y abundante citoplasma, y células más pequeñas con abundante contenido granular en el citosol. Estudios inmunohistoquímicos han revelado que los gránulos contienen y producen relaxina (Dunn y col., 2003). 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 la fibronectina y la laminina, también son necesarios.

Aunque el estroma uterino contiene varios tipos celulares que probablemente tienen distintas funciones en la decidualización (Padykula y col., 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 infiltrantes: macrófagos y linfocitos grandes granulados (LGL) que tienen su origen en la médula ósea y se acumulan en el endometrio (Ogando y col., 2003) (Figura 3).

En la actualidad se sabe que si se introduce un cuerpo extraño en el útero de un roedor tratado con progesterona se produce una intensa reacción decidual denominada deciduoma, y que la diferenciación de las células del estroma se puede reproducir experimentalmente en cultivo (Tang y col., 1994; Sengupta y Ghosh, 2003). Sin embargo, en presencia de un blastocisto implantado o implantándose, o de células trofoblásticas en co-cultivo, se producen reacciones nuevas, más profundas e intensas, que requieren de la participación de otros mensajeros hormonales y celulares. Es necesaria, entonces, una interacción trofoblasto-endometrio para completar el proceso de decidualización.



**Figura 3.** Cortes histológicos de sitios de implantación de ratones con diferentes tratamientos. Ratones BALB/c hembra fueron inyectados en el día 6 o 7 de preñez con PBS (control), aminoguanidina (AG, un inhibidor de la enzima que sintetiza óxido nítrico), lipopolisacárido (LPS) o LPS más AG, y se sacrificaron 6 h después. Los sitios de implantación se fijaron y se

*tiñeron las secciones con hematoxilina-eosina. (a) Imagen con bajo aumento de un sitio control, donde se muestran grandes lagunas (lac) en la decidua mesometrial (m). (b) Vista a bajo aumento de animales tratados con AG, con morfología similar al control. (c, d) Detalle de lagunas deciduales de los animales control y tratados con AG, respectivamente. (e, g) El LPS produce una gran fibrinólisis (fib) y la infiltración de la decidua mesometrial. Los infiltrados fueron identificados como granulocitos (gr) y macrófagos (mac). (f, h) El tratamiento con AG inhibe la infiltración y la fibrinólisis producida por LPS. am: decidua antimesometrial; rc (red cells): glóbulos rojos. Las barras de escala representan (a, b) 200  $\mu\text{m}$ , (c, d) 100  $\mu\text{m}$ , (e, f) 160  $\mu\text{m}$  y (g, h) 80  $\mu\text{m}$  (Ogando y col., 2003).*

### **3.- Reabsorción embrionaria.**

#### **3.1.- Modelos de reabsorción embrionaria.**

Clark y colaboradores propusieron por primera vez, en 1980, la cruce murina alogeneica CBA/J x DBA/2 como modelo de aborto espontáneo. En ella, el desarrollo de un inapropiado perfil de citoquinas en la interfase materno-fetal se correlaciona con un alto índice de reabsorción embrionaria. Ha sido muy utilizada para el estudio de los aspectos inmunológicos implicados en la reproducción, ya que representa un modelo de aborto por respuesta local inflamatoria exacerbada (Clark y col., 1980).

La tasa de reabsorción espontánea en esta cruce es de un 20-40% y puede ser incrementada al 60% por la administración intraperitoneal de ácido policitidílico (Poli I:C, por su nombre en inglés Polyinosinic:polycytidylic acid), una molécula sintética de ARN doble cadena capaz de activar macrófagos y células natural killer (De Fougerolles y Baines, 1987; Cavanaugh y col., 1996; Shimada y col., 2003). El incremento en la tasa de reabsorción por Poli I:C parece imitar, en curso y citopatología, a lo que se observa cuando simplemente se cruzan hembras CBA/J con machos

DBA/2 (Duclos y col., 1994 y 1995).

Algunos estudios han demostrado que el aborto por desbalance inmunológico es dependiente de factores ambientales, como los lipopolisacáridos (LPS) bacterianos (Clark y col., 2002 y 2004). Este componente de la pared de las bacterias gram-negativas es causante de muerte fetal y aborto en animales (Zahl y Bjerknes, 1943) y está implicado en el mecanismo de parto pre-término en humanos (Romero y col., 1988; Cox y col., 1988). Desde hace algunos años es común su uso en modelos animales de parto pre-término, administrado ya sea por vía intraperitoneal o directamente mediante incisión en el cuerno uterino (Elovitz y col., 2004; Xu y col., 2007; Wang y Hirsch, 2003; Hirsch y Muhle., 2002; Cella y col., 2010).

Está extensamente descrito que el LPS induce una marcada respuesta inflamatoria mediada primariamente por la activación de macrófagos, la transcripción de citoquinas inflamatorias como el TNF- $\alpha$  y la liberación de prostanoïdes (Shachelford, 1995; Michalek y col., 1980; Michie y col., 1988; Spinass y col., 1991).

Como ya se mencionó, de las ventajas de usar un modelo experimental en ratón podemos enumerar su corta preñez (19 a 22 días), su genoma, que está ampliamente estudiado, y su sistema inmunológico que no solo está bien estudiado, sino que además es similar al encontrado en humanos. Además, los ratones son fáciles de manipular y existen diversas y sencillas vías de administración de drogas y de agentes pro-inflamatorios e infecciosos (Elovitz y col., 2006)

#### **4.- El lipopolisacárido.**

Las bacterias gram-negativas poseen una membrana externa además de la pared formada por peptidoglicanos. Esta membrana está compuesta principalmente por lipopolisacáridos (LPS), los cuales constituyen un importante factor de virulencia (Narita, 2011). Por esto es que su sola

presencia justifica que se denomine a la membrana externa, generalmente, capa de lipopolisacáridos o simplemente LPS.

Cuando las bacterias gram-negativas se multiplican o mueren, los lipopolisacáridos se liberan unidos a otras proteínas bacterianas o de forma libre. Una vez en el torrente sanguíneo, se disponen en agregados debido a su naturaleza anfipática (Maeshima y col, 2013) y sólo se presenta como monómero gracias a la acción de la proteína plasmática LBP o “LPS Binding Protein”. El LBP transfiere lípidos y cataliza el pasaje del LPS desde los agregados al receptor CD14, soluble o de membrana. También transfiere la endotoxina a fosfolípidos, especialmente a lipoproteínas de alta densidad (HDL, del inglés High Density Lipoprotein) (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. Las células que no poseen el receptor CD14 son blanco del complejo CD14 soluble/LPS. Este mecanismo permite que células, como las endoteliales o epiteliales, que no expresan CD14 puedan responder a la endotoxina (Henneke y Golenbock, 2002).

#### **4.1.- Receptores.**

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-fosfatidilinositol, 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 TLR (receptores tipo Toll, las siglas por su denominación en inglés: “Toll Like Receptors”) como posibles transmisoras de la señal del LPS, en particular el TLR4 (Anderson, 2000; Beutler, 2000). Su nombre tiene origen en la similitud que presentan a nivel génico con los genes Toll identificados en *Drosophila melanogaster*. Evidencias tales como que los ratones *knock-out* de TLR4 no responden al LPS (Takeuchi y col., 1999) o la observación de que la cepa C3H/HeJ,

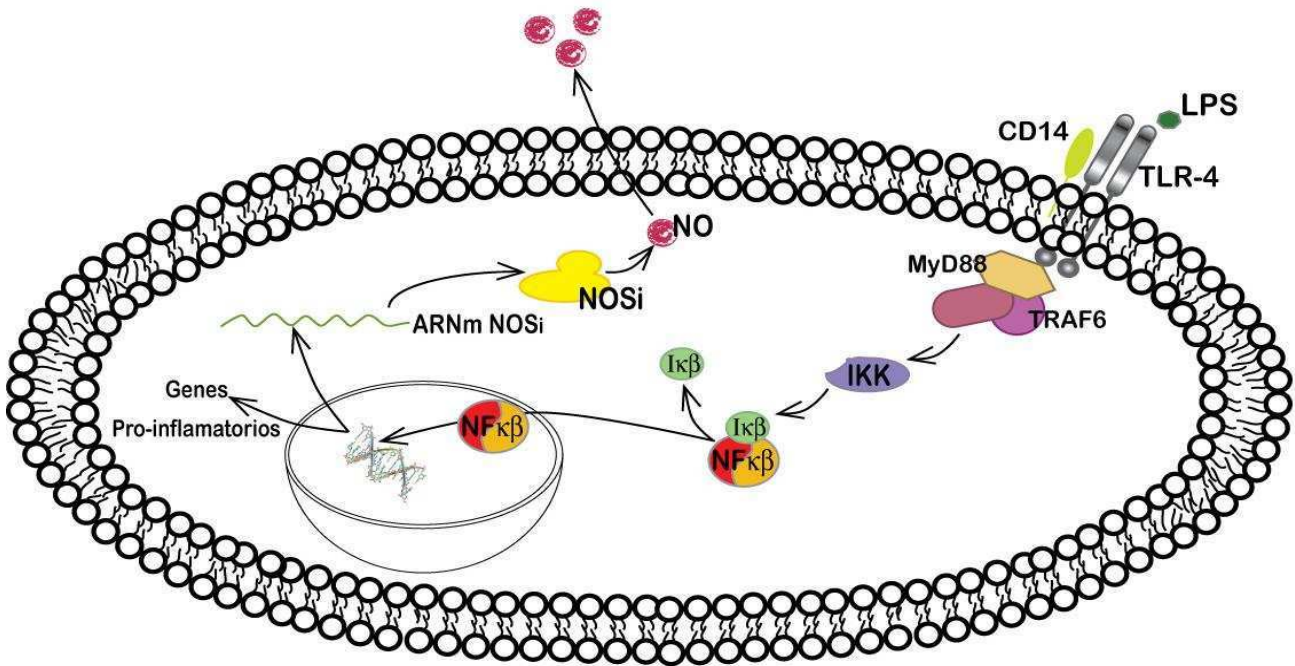
LPS-resistente, tiene una mutación puntual en el gen *Tlr4* (Poltorak y col., 1999), lo involucran directamente con esta vía.

La señal emitida por el TLR4 provoca el reclutamiento secuencial de MyD88 (Factor 88 de diferenciación mieloide, las siglas por su denominación en inglés: myeloid differentiation factor 88), una molécula adaptadora, y de IRAK (Quinasa asociada al receptor de interleuquina-1, las siglas por su denominación en inglés: interleukin-1 receptor-associated kinase) (Figura 4). Esta última finalmente interacciona con TRAF6 (Factor 6 asociado al receptor de TNF, las siglas por su denominación en inglés: TNF receptor-associated factor 6) promoviendo la activación celular vía el factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ 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).

#### **4.2.- Nuestro modelo de RE.**

En nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo murino de reabsorción embrionaria inducida por LPS (Ogando y col., 2003). El modelo consiste en la administración de una única dosis de LPS por vía intraperitoneal, de 1  $\mu$ g/g de peso, a hembras BALB/c en el día siete de gestación. Dado que la implantación en el ratón es un evento que se produce durante el quinto día de gestación, este es un modelo de RE post-implantatorio. Sin embargo, puede ser considerado un modelo de RE temprana, ya que la administración de la endotoxina ocurre sólo unas horas después de iniciado el proceso de gastrulación del embrión.

La administración de la toxina produce 100% de reabsorción embrionaria a las 24 h. La reabsorción como tal es un proceso que involucra tanto la destrucción, como la asimilación parcial del tejido. En nuestro modelo observamos que el tratamiento con LPS produce la necrosis total del embrión y de la mayor parte de la decidua. Los restos son expulsados 24 h después, es decir a las 48 h de haberse administrado el LPS. Sin embargo se observa una zona de la decidua que no ha sido totalmente necrosada y permanece pegada al útero (Ogando y col., 2003).



**Figura 4. Transducción de señales de la vía LPS-TLR4.**

El LPS también produce efectos sistémicos en las hembras tratadas. Por ejemplo a las 2 h del tratamiento se observa disminución de la ingesta de alimento, inactividad, postura agachada, pilo-erección y diarrea. Todos síntomas típicos, que se desarrollan seguidamente a la infección bacteriana o viral aguda y que forman parte del mantenimiento de la homeostasis inflamatoria. Luego de transcurridas las 48 h, el proceso de RE finaliza y la hembra recupera su capacidad gestacional. La RE producida por infección o aborto séptico es un mecanismo de defensa para la madre, de esta forma se interrumpe la preñez y se la preserva para futuras gestaciones.

Además, al igual de lo que ocurre en nuestro modelo de RE, el aborto espontáneo en la mujer no está asociado a mortalidad materna.

El hecho de que el LPS produzca reabsorción embrionaria a dosis que no son letales demuestra la elevada sensibilidad de los tejidos reproductivos a este tipo de moléculas pro-inflamatorias. Nuestro modelo muestra que la unidad feto-placentaria murina es extremadamente sensible al LPS durante

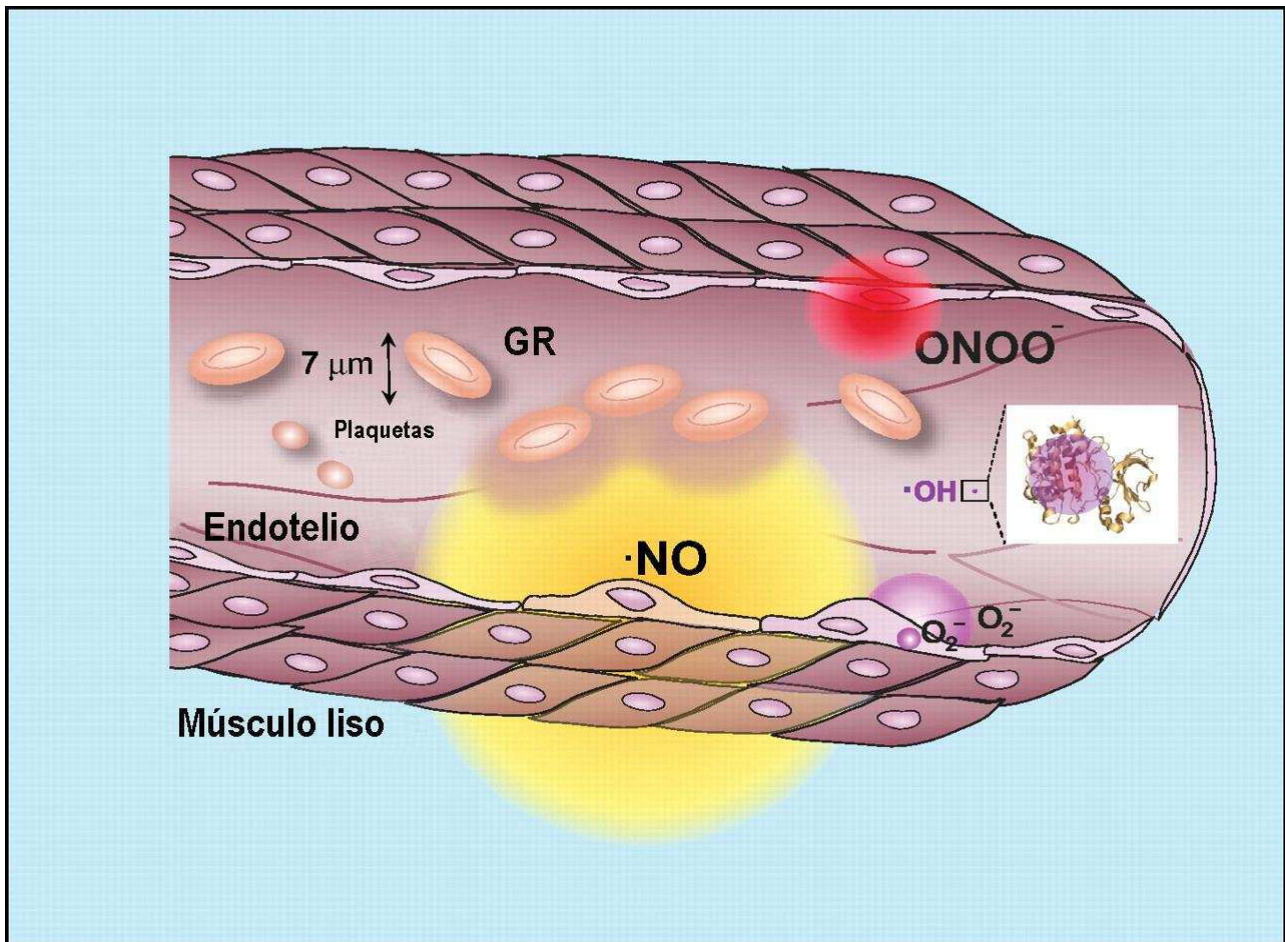
la preñez temprana. El tratamiento con la endotoxina en estadios más avanzados de la gestación provoca retardo del crecimiento embrionario y parto prematuro. Dosis veinte veces mayores son necesarias para producir shock séptico en roedores (Karima y col, 1999).

## **5.- El óxido nítrico.**

El óxido nítrico (NO) es una molécula gaseosa, inestable, producida por diversos tipos celulares como músculo liso, células mesangiales, neuronas, plaquetas, macrófagos, fibroblastos y células epiteliales, entre otras (Zhai y col., 2013; Timothy, 1995; Cooke y col., 2013; Sugiyama y col., 2013). Posee múltiples funciones, participando en diferentes procesos fisiológicos como por ejemplo la apoptosis, la citotoxicidad, la vasodilatación, la antiagregación plaquetaria y la neurotransmisión (Burke y col., 2013; Pacher y col., 2007; Cooke y col., 2013).

El NO tiene un efecto dual, actuando tanto en situaciones fisiológicas como patológicas. Por ejemplo, puede actuar como secuestrador de radicales libres e inactivar al radical superóxido, previniendo la citotoxicidad celular (Cooke y Tsao, 1993). En otras circunstancias, el NO puede reaccionar con el anión superóxido y generar peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), compuesto que tiene un alto poder oxidante (Beckman y Crow, 1993). Debido a que existen mecanismos fisiológicos que disminuyen la concentración del anión superóxido y del NO, éstos no se consideran particularmente tóxicos (Beckman, 1996a y 1996b). El radical superóxido es rápidamente neutralizado por las altas concentraciones de la enzima superóxido dismutasa (SOD), mientras que el NO difunde rápidamente a través de las membranas celulares, ingresando en los glóbulos rojos (Butler y col., 1998) donde es convertido en nitratos por la acción de la oxihemoglobina (Figura 5). Por esto la vida media del NO es menor de 30 segundos.



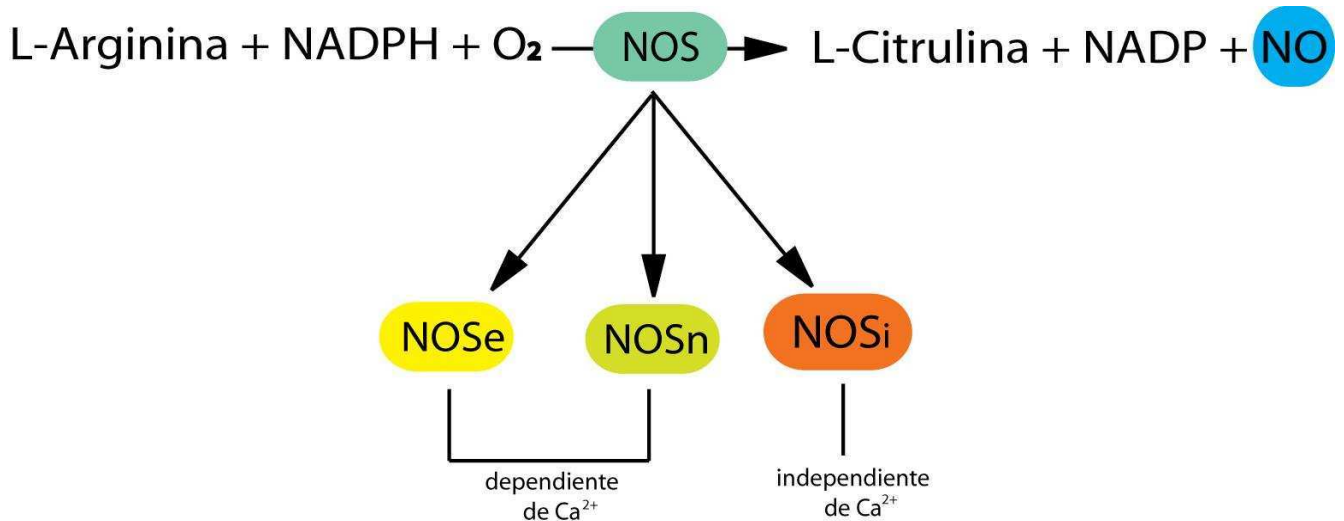


*Figura 5. Difusión celular del NO (Pacher y col., 2007).*

### 5.1.- Vías de síntesis.

Esta molécula es sintetizada por una familia de enzimas llamadas óxido nítrico sintasas (NOS, por sus nombre en inglés: Nitric Oxide Synthases), de las cuales se conocen tres isoformas ampliamente estudiadas, y se las denominó según el orden en que fueron descubiertas o el tejido en el que fueron detectadas.

Los sustratos de estas enzimas son el aminoácido L-arginina, el oxígeno molecular y la Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y actúan convirtiendo la L-arginina en L-citrulina y NO en cantidades equimolares (Figura 6).



**Figura 6. Biosíntesis del NO e isoformas de la NOS.**

### 5.1.1.- Clasificación y características de las isoformas de la NOS.

Las isoformas de la NOS son codificadas por genes distintos y, en un comienzo, fueron divididas en constitutivas (NOS endotelial o NOSe y NOS neuronal o NOSn) e inducible (NOSi) (Figura 6). Sin embargo, actualmente se sabe que la expresión de la NOSe y la NOSn también puede ser inducida y que en algunos tejidos la NOSi parece expresarse constitutivamente (Baylis y col., 1999; Alderton y col., 2001).

Una nueva clasificación de las isoenzimas de la NOS se basa en su dependencia al calcio. Tanto la NOSe como la NOSn son reguladas por calcio y calmodulina, mientras que la NOSi se une fuertemente a calmodulina y, por lo tanto, es relativamente independiente de calcio (Alderton y col., 2001).

- NOSn (también NOS I).

Fue la primer isoforma descrita, originalmente en cerebro, de allí la nomenclatura “n” (neuronal) o “b” (del inglés “brain”). Al momento, esta isoforma fue encontrada en diferentes tejidos incluyendo los reproductivos femeninos (Alí y col., 1997). Es un homodímero y cada subunidad tiene una masa molecular de aproximadamente 150-160 kDa.

- NOS<sub>i</sub> (también NOS II).

Se la descubrió en macrófagos y posee un peso molecular de aproximadamente 125-130 kDa. Se la nombró como la isoforma inducible debido a que es activada por productos bacterianos como el LPS y el ácido lipoteico, citoquinas (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-2) y otros mediadores inflamatorios (Lowestein y col., 1993). Su expresión está altamente asociada a una respuesta inflamatoria (Stefano y Kream, 2011). A diferencia de la NOS<sub>n</sub>, esta isoforma es calcio-independiente y, una vez activada, genera NO en grandes cantidades y por largos períodos (Pacher y col., 2007).

- NOS<sub>e</sub> (también NOS III).

Fue la tercera en ser descrita, y se identificó originalmente en el endotelio de los vasos sanguíneos (Pollock y col., 1991), y luego en el pulmón y en el 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, su actividad catalítica depende de calcio/calmodulina (Förstermann y col., 1991).

Las enzimas calcio dependientes son sensibles a los quelantes de Ca<sup>2+</sup> 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).

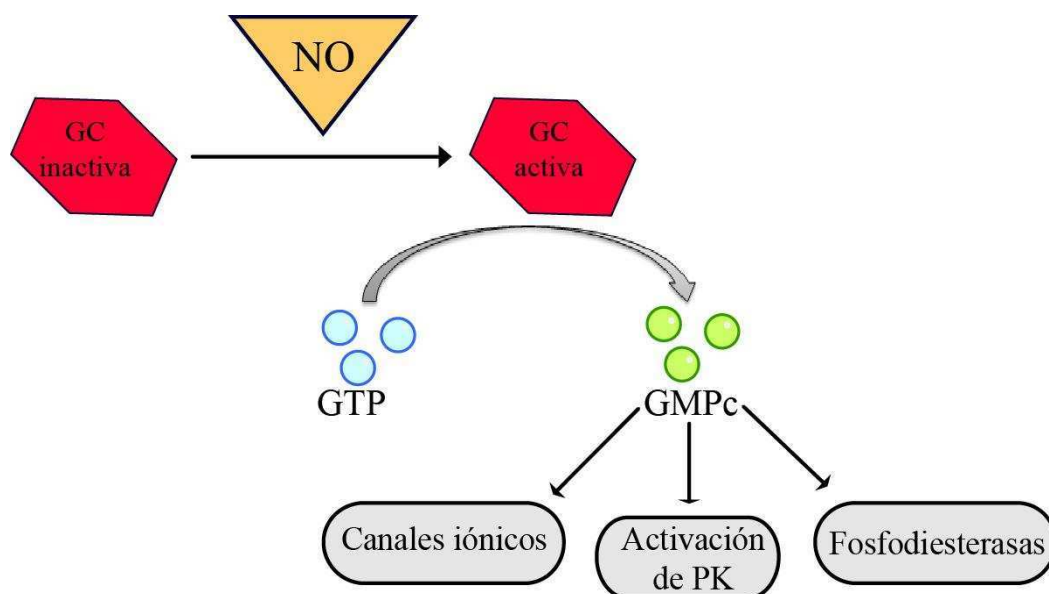
- NOS<sub>mt</sub> (NOS mitocondrial).

Por otro lado, se ha postulado la existencia de una cuarta isoforma, llamada NOS mitocondrial (Brookes, 2004). 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).

## 5.2.- Mecanismo de acción del NO.

El NO, a través de la activación de una guanilato ciclasa soluble (GCs), produce la formación de guanosina monofosfato cíclico (GMPc), un segundo mensajero. Si bien las guanilato ciclasas (GC) pertenecen a una familia, solo las isoformas solubles que contienen un grupo hemo son blanco de la activación por NO. El NO tiene una alta afinidad de unión y reactividad por el complejo de hierro reducido ( $\text{Fe}^{2+}$ ) que conforma al hemo. La unión del NO a este grupo modifica su conformación, alterando la actividad de la enzima (Ignarro, 1991). De esta manera, la enzima GCs es activada por el NO, produciendo GMPc a partir de guanosina trifosfato (GTP). La actividad del segundo mensajero GMPc finaliza por la rápida conversión a GMP y esta reacción es catalizada por varias fosfodiesterasas (Figura 7).



**Figura 7. Mecanismo de acción del NO.**

Este segundo mensajero, GMPc, participa de la activación de proteínas quinasas dependientes de GMPc, fosforilasas de diferentes proteínas de membrana del retículo sarcoplásmico, entre las que se

encuentran canales de potasio, un sistema proteico llamado IP3-IRAG y un polipéptido llamado fosfolambam. La activación de estas tres vías lleva a una disminución de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  que resulta en una inhibición de la vasoconstricción (Gewaltig y Kojda, 2002).

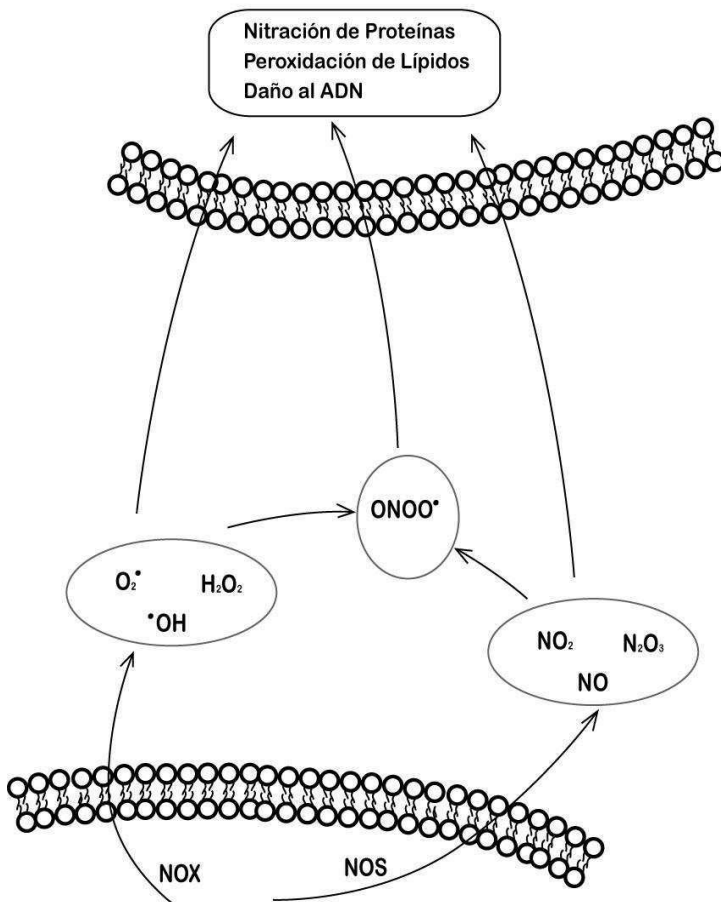
Entre otras actividades mediadas por el GMPc encontramos la relajación muscular, la inhibición del crecimiento de células del músculo liso, la prevención de la agregación plaquetaria y la adhesión de los neutrófilos a las células endoteliales (Murad, 1994; Gewaltig y Kojda, 2002).

Distintos estudios sugieren que el NO también puede producir efectos biológicos activando vías que no dependen de GC (Vila-Petroff y col., 1999; Russwurm y col., 2013).

Los múltiples efectos del NO pueden ser producidos en forma directa o por la combinación con el  $\text{O}_2$  y el anión superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) para formar especies reactivas de gran poder oxidativo (Figura 8) (Grisham y col., 1999). El  $\bullet\text{O}_2^-$  es considerado como un efectivo agente secuestrador de óxido nítrico, perdiéndose la actividad biológica del NO, y generando el radical peroxinitrito ( $\bullet\text{OONO}$ ) como consecuencia de la interacción. El  $\bullet\text{OONO}$  es una molécula con una potente actividad citotóxica y pro-inflamatoria (Virag y col., 2002; Beckman y col., 1990; Salvemini y col., 1998; Misko y col., 1998).

El  $\bullet\text{OONO}$  reacciona con los residuos de las proteínas produciendo la nitración de las mismas (Figura 8). La nitración es una modificación covalente que resulta de la adición de un grupo nitro ( $-\text{NO}_2$ ) a uno de los dos orto-carbonos equivalentes del anillo aromático del aminoácido tirosina (Eiserich y col., 1998). Esta modificación post-traducciona puede alterar el funcionamiento de las enzimas. Por este motivo está asociada con numerosas situaciones fisiopatológicas como: infecciones pulmonares, inflamación ocular y del sistema nervioso, shock séptico, cáncer, rechazo en trasplantes y diferentes desórdenes neurológicos (Szabó y col., 2007; Pacher y col., 2007; Seija y col., 2012). Aunque normalmente las proteínas están compuestas por un 4% de residuos tirosina, solo algunos de estos residuos de algunas proteínas específicas son capaces de ser nitrados (Radi,

2004).



**Figura 8. Formación del radical peroxinitrito.**

La nitración de una enzima puede causar tanto una ganancia como una pérdida en su actividad (Cassina y col., 2000; Vadseth y col., 2004; Balafanova y col., 2002). Existen varios ejemplos de pérdida de actividad por nitración, uno de ellos es la manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) mitocondrial, la enzima que normalmente mantiene controlados los niveles de superóxido. Como consecuencia de este fenómeno, se produce una acumulación de peroxinitrito (Radi y col., 2002) que podría nitrar y alterar otras proteínas y receptores, perpetuando y/o amplificando el daño inicial, que finalizaría con la interrupción del metabolismo mitocondrial. Otro ejemplo, a nivel cardiovascular, es la nitración de la prostaciclina sintasa. Una disminución en su actividad genera una pérdida de la protección contra la trombogénesis, la hipertensión y la aterogénesis, favoreciendo la acumulación de tromboxano A<sub>2</sub>, un potente pro-trombótico y vasoconstrictor

(Davidge, 2001; Dogne y col., 2005; Grosser y col., 2006). En pacientes con sepsis se ha observado que la NOSi se encuentra nitrada (Lanone y col., 2002), induciendo un cambio conformacional que impacta a nivel de la dimerización y produce disminución de su actividad catalítica.

Por el contrario, Beharka y col. (2002) y Aisemberg y col. (2007) proponen que la cicloxigenasa 2 (COX-2), la isoforma inducible de la enzima que sintetiza prostaglandinas, al nitrarse aumenta su actividad. Otros, postulan que el peroxinitrito inhibe la enzima a través de la nitración de sus tirosinas (Boulos y col., 2000; Deeb y col., 2002; Upmacis y col., 1999; Trostchansky y col., 2007).

### **5.3.- El óxido nítrico en nuestro modelo de RE.**

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 produce un aumento en la síntesis 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 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; Buhimichi y col., 1996).

En nuestro modelo de RE inducida por LPS se observa un incremento 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 la técnica de 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 de 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.

## **6.- El sistema endocannabinoide.**

En el año 1964 se aisló el  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC), principal compuesto psicoactivo de la planta *Cannabis sativa* (Mechoulam y col., 1964). Esta molécula es un cannabinoide que ejerce sus efectos vía receptores específicos.

Los endocannabinoides (EC) son mediadores lipídicos que incluyen amidas, ésteres y éteres de ácidos grasos de cadena larga poli-insaturada que participan de diferentes procesos biológicos actuando como agonistas endógenos de estos receptores (Battista y col. 2012).

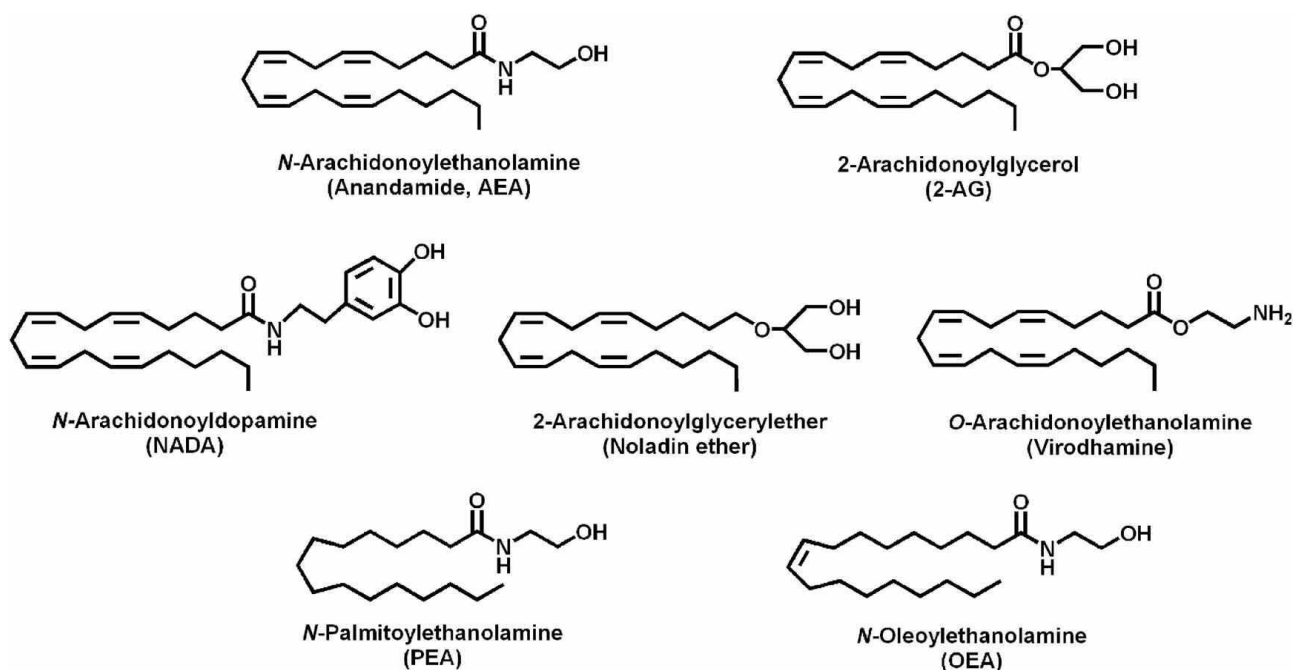
El sistema endocannabinoide (SEC) es considerado un nuevo sistema de señalización que participa en una gran variedad de eventos fisiológicos. Sus principales componentes son los EC, las enzimas de síntesis y degradación de los mismos, y los receptores específicos (Pagotto y col. 2006).

### **6.1.- Los endocannabinoides.**

Varios EC han sido descritos hasta el momento, entre los más estudiados se encuentran la N-



araquidoniletanolamina (anandamida; AEA) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG). La familia de EC incluye otras moléculas lipídicas derivadas de ácidos grasos poli-insaturados tales como la O-araquidonilamina (virodamina), la noladin éter y la N-araquidonildopamina (NADA), además de N-acil-etanolaminas relacionadas, tales como la palmitoiletanolamina (PEA) y la oleoiletanolamina (OEA) (Battista y col., 2012) (Figura 9).



**Figura 9. Estructuras moleculares de los diferentes endocannabinoides.**

La AEA fue aislada por primera vez en el año 1992, a partir de un extracto lipídico obtenido de cerebro de cerdo (Devane y col. 1992). Luego fue demostrado que esta molécula es un potente agonista de los receptores de cannabinoides tipo 1 (CB1) y tipo 2 (CB2), con un efecto específico, a diferencia de otras amidas y ésteres derivados del ácido araquidónico (Childers y col., 1994; Pinto y col., 1994).

Entre los efectos fisiológicos conocidos de la AEA se encuentran la hipotermia, la anti-nocicepción, la vasodilatación y la anti-inflamación a nivel de sistema nervioso central (Zygmunt y col., 1999). Además, esta molécula ha sido implicada en otros procesos fisiológicos como la analgesia, la

reproducción, la regulación del tono vascular y procesos patológicos como la obesidad, el cáncer, la esquizofrenia y la esclerosis múltiple (Pacher y col., 2006).

## **6.2.- Mecanismo de acción de los EC.**

En un comienzo, se mantenía la hipótesis que los cannabinoides ejercían sus efectos mediante interacciones inespecíficas con lípidos de la membrana plasmática (Roth and Williams 1979). Sin embargo, a principios de los años '90, fueron identificados y clonados receptores que son blancos farmacológicos del THC y otros cannabinoides (Matsuda y col., 1990; Gerard y col., 1991; Munro y col., 1993). Estos receptores fueron denominados receptores de cannabinoides (CBs).

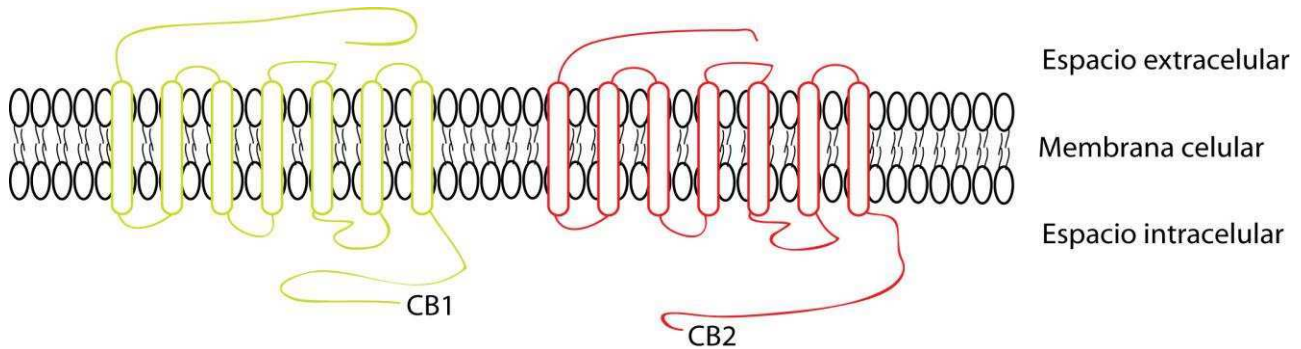
Los EC, en particular la AEA, son agonistas de los receptores CBs, de los receptores vanilloides tipo 1 (TRPV1) y de los receptores nucleares PPAR $\gamma$  (por su denominación en inglés: peroxisome proliferator-activated receptor\_gamma) (Battista y col. 2012).

### **6.2.1.- Receptores de cannabinoides (CBs).**

Hasta el momento, se han descrito y clonado dos subtipos de receptores CBs: CB1 y CB2 (Figura 10). Ambos pertenecen a la superfamilia de receptores de membrana acoplados a proteína G (GPCR). Como otros GPCRs, los CBs contienen un dominio extracelular glicosilado, siete dominios  $\alpha$ -hélice transmembrana y un dominio carboxi-terminal intracelular. Sus respuestas funcionales son mediadas por proteínas que unen GTP y que son sensibles a la toxina pertussis (Gi/o) (Matsuda y col., 1990; Devane y col., 1992; Munro y col., 1993).

Los receptores CB1 fueron caracterizados por primera vez en cerebro de rata (Devane y col. 1988). En un primer momento se creía que estos eran expresados únicamente en el sistema nervioso central y periférico (Matsuda y col., 1990), sin embargo también se demostró que están presentes en otros tejidos. En particular, con respecto al sistema reproductor, estos receptores fueron descritos en diversos tipos celulares y tejidos, entre ellos testículo de vertebrados (Cobellis y col., 2006),

espermatozoides bovinos (Gervasi y col., 2009), oocitos (Peralta y col., 2011), embriones preimplantatorios (Schuel, 2006), tejido muscular del oviducto murino (Wang y col. 2004), placenta humana (Aban y col., 2013), membranas fetales y miometrio (Taylor y col. 2007).



**Figura 10. Receptores de CBs: CB1 y CB2.**

Los receptores CB2 fueron caracterizados por primera vez en macrófagos de la zona marginal del bazo y se encuentran principalmente en células del sistema inmune (Munro y col. 1993). Sin embargo, se ha encontrado el transcrito de dicho receptor en placenta y células del trofoblasto en ratas (Buckley y col., 1998), en espermatozoides (Gervasi y col. 2009) y en ovario (El-Talatini y col., 2009).

Recientemente ha sido descrito un nuevo receptor de cannabinoides denominado GPR55, que podría ser el receptor CB3, aunque aún no ha sido denominado así. Este es, hasta el momento, un receptor huérfano que no estaría acoplado a proteína Gi o Gs (Moriconi y col., 2010; Baker y col., 2006; Sawzdargo y col., 1999).

Los receptores de vanilloides (TRPV1) son canales de cationes no selectivos que pertenecen a la superfamilia de canales iónicos receptores de potencial transitorio (TRP, por su denominación en inglés: transient receptor potential) (Caterina y col., 1997). Los receptores TRPV1, como otros miembros de la familia TRP, se caracterizan por poseer seis dominios de paso transmembrana con los dominios amino-terminal y carboxi-terminal largos e intracelulares (Gunthorpe y col. 2002).

Los receptores TRPV1 se encuentran altamente expresados en neuronas sensoriales, con una

moderada expresión en otros tejidos y órganos tales como páncreas, cerebro, hígado, vejiga, riñón, intestino, células endoteliales y linfocitos, entre otros (O'Neil and Brown 2003). Además, la expresión de TRPV1 ha sido informada en placenta de roedores (Cella y col. 2008) y en espermatozoides de porcinos y bovinos (Maccarrone y col. 2005, Gervasi y col. 2011).

### **6.3.- Metabolismo de AEA.**

La actividad biológica de la AEA depende de su control metabólico, llevado a cabo tanto por las vías biosintéticas como por las catabólicas y oxidativas. Además, la captación celular de AEA y el tráfico intracelular de la misma son pasos críticos en este proceso (Maccarrone y col. 2010).

Los EC son moléculas que se producen principalmente “a demanda” a partir de precursores que forman parte de los fosfolípidos de la membrana plasmática (Muccioli y col., 2010; Maccarrone y col., 2010).

#### **6.3.1.- Síntesis de AEA.**

Se han descrito diferentes rutas metabólicas para la síntesis de AEA (Figura 11) (Maccarrone y col., 2010). La enzima N-Acil-transferasa (NAT) cataliza la transferencia de araquidonato de una fosfatidilcolina al grupo amino de una fosfatidiletanolamina de fosfolípidos de membrana por un mecanismo dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , formando el precursor de membrana N-Acil-fosfatidil-etanolamida (NAPE) (Di Marzo y col., 1994; Cadas y col., 1997). La principal vía de síntesis de AEA es a partir de este precursor y es catalizada por la enzima N-Acil-fosfatidil-etanolamida fosfolipasa D (NAPE-PLD). En el año 1994, el grupo de Di Marzo describió que la formación y liberación de AEA ocurre mediante el clivaje de NAPE, por una fosfodiesterasa con propiedades similares a la de la fosfolipasa D (PLD) (Di Marzo y col., 1994). Esta enzima fue identificada y descrita como una nueva PLD con actividad específica para producir N-Acil-etanolamidas (Petersen and Hansen, 1999). Años más tarde, el grupo de Okamoto denominó a esta enzima como NAPE-PLD ya que confirmó que la misma es la principal responsable de la formación de AEA y de otras N-Acil-

etanolaminas endógenas como OEA y PEA (Okamoto y col., 2004). En los últimos años han sido propuestas vías de síntesis alternativas de AEA a partir del precursor de membrana NAPE. La enzima fosfolipasa C (PLC) puede clivar NAPE y producir fosfo-AEA (p-AEA) que luego es desfosforilada por una fosfatasa (Liu y col., 2006). También la fosfolipasa A2 secretora (sPLA2) puede hidrolizar NAPE a N-Araquidonil-liso-fosfatidiletanolamina (liso-NAPE) que luego es hidrolizada a AEA por la enzima liso-fosfolipasa D (Liso-PLD) (Sun y col., 2004). Finalmente, la molécula precursora NAPE puede ser desacilada por el complejo enzimático  $\alpha/\beta$ -hidrolasa 4 (ABH4), generando glicero-fosfo-AEA (gli-p-AEA) que luego es clivada a AEA por una fosfodiesterasa (Simon and Cravatt, 2006).

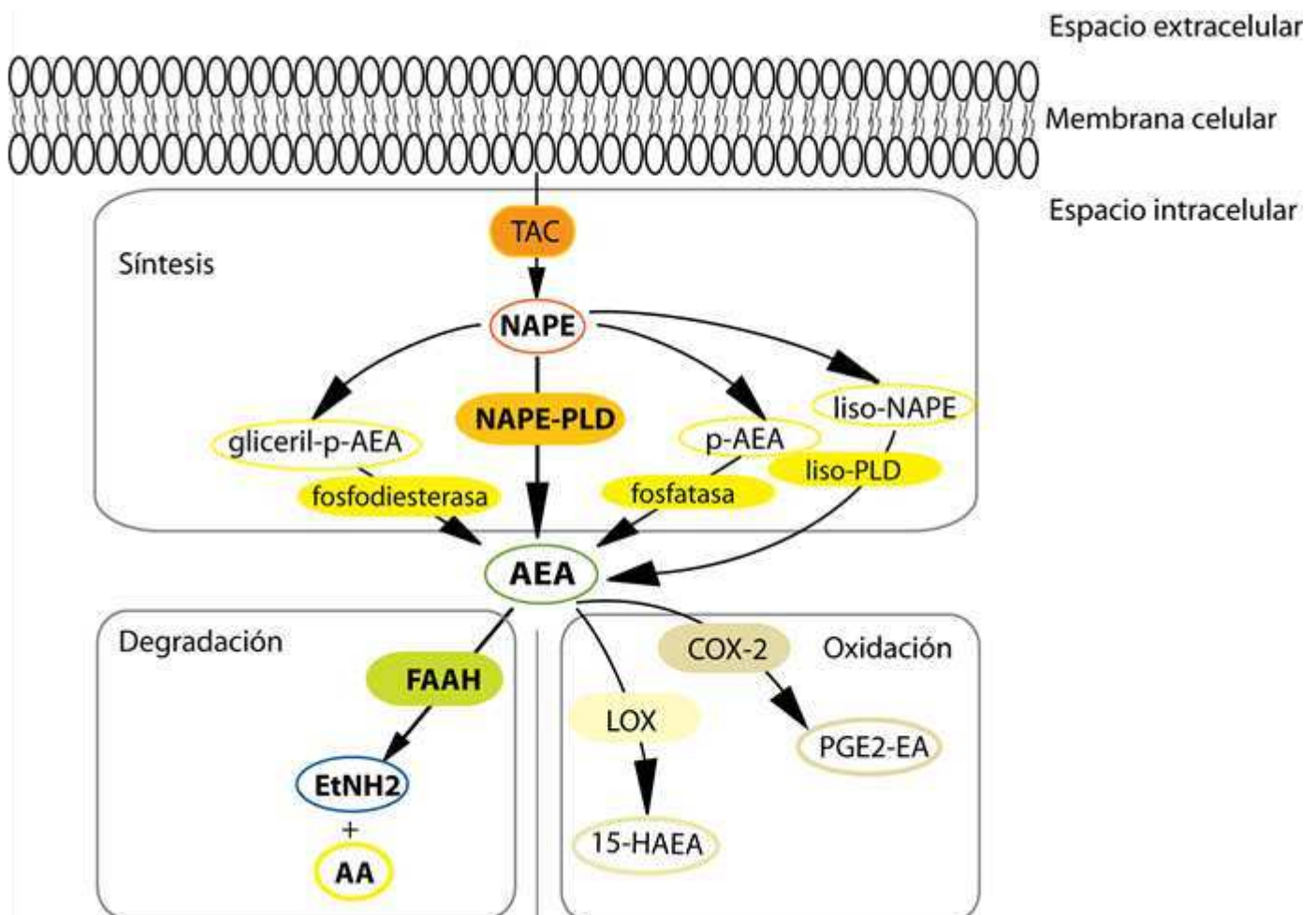


Figura 11. Metabolismo de AEA. Figura modificada de Maccarrone y col. (2010).

Luego de sintetizada, la AEA es liberada al espacio extracelular, por un mecanismo que aún no ha sido dilucidado totalmente, en donde puede actuar en forma autocrina o paracrina (Piomelli y col., 2000).

### **6.3.2.- Transporte de AEA.**

Dado que la AEA puede activar diferentes vías de señalización a través de receptores y que los sitios activos de estos receptores pueden ser tanto extracelulares como intracelulares (Maccarrone y col., 2010), es importante tener en cuenta el transporte y la captación de la AEA cuando se quieren analizar las diferentes vías de señalización de esta molécula.

Existen diversas hipótesis que explican el transporte de la AEA a través de la membrana plasmática, entre ellas: 1) por difusión pasiva a través de la membrana, la cual puede ser asistida por la formación de complejos AEA-colesterol (Di Pascuale y col., 2009); 2) por transporte facilitado por un posible transportador que aún no ha sido clonado EMT (Hillard y jarrahian, 2003) y 3) por endocitosis mediada por caveolina (Yates y Barker, 2009).

Por otro lado, recientemente se ha descripto que la AEA puede ser almacenada intracelularmente en adiposomas, y que los mismos podrían encontrarse asociados a las enzimas que catabolizan AEA (Maccarrone y col., 2010). Este podría ser un paso de regulación metabólica de esta molécula que controle y mantenga un “tono” de AEA adecuado en la célula (Maccarrone y col. 2010).

### **6.3.3.- Degradación de AEA.**

Existen varias vías de degradación de AEA (Figura 11), la principal se caracteriza por la hidrólisis de la misma a ácido araquidónico y etanolamina, catalizada por la enzima de membrana conocida como hidrolasa de amidas de ácidos grasos (FAAH, por su denominación en inglés: fatty acid amide hydrolase) (Cravatt y col., 1996). La FAAH se encuentra anclada a las membranas intracelulares (Maccarrone y col., 2010) y tiene un peso molecular de 63kDa. Fueron descriptas dos isoformas de

esta enzima: FAAH-1 y FAAH-2, sin embargo esta última fue hallada en humanos, elefantes y conejos, pero no en roedores (Wei y col., 2006).

Esta enzima cumple un papel fundamental en mantener el tono fisiológico de AEA. Se ha informado que ratones deficientes (KO) para el gen de la NAPE-PLD tienen niveles normales de AEA (Liu y col., 2008). Sin embargo, tanto en ratones KO para el gen de FAAH como en ratones salvajes tratados con inhibidores de esta enzima, se observa un aumento de los niveles endógenos de AEA en el sistema nervioso central (Cravatt y col., 2001; Kathuria y col., 2003; Lichtman y col., 2004), y en tejidos periféricos (Cravatt y col., 2004).

Asimismo, otra vía de metabolización de la AEA es la oxidación (Figura 11). La AEA puede ser oxidada a 15-hidroxi-AEA (15-HAEA) tanto por el complejo citocromo P450, como por la enzima 15-lipo-oxigenasa (15-LOX) (Bornheim y col., 1995; Ueda y col., 1995). Además, la AEA puede ser oxidada por la enzima ciclo-oxigenasa-2 (COX-2) a prostaglandina E2-etanolamida (PGE2-EA), perteneciente a los compuestos conocidos como prostamidas (Yu y col. 1997).

#### **6.4.- Endocannabinoides y reproducción.**

Dado que la marihuana es la droga recreativa más utilizada y que entre el 10 y el 20% de las mujeres embarazadas la consumen (Park y col., 2004), se han realizado varios estudios para conocer los efectos del cannabis durante la preñez. En humanos, el consumo de cannabis durante el embarazo ha sido asociado con bajo peso al nacer (Sherwood y col., 1999; Zuckerman 1989), parto prematuro (Fried y col., 1984), restricción del crecimiento intrauterino, presencia de anomalías congénitas y muerte perinatal entre otras patologías (Fergusson y col., 2002). Además, estudios realizados en animales demostraron que el THC causa abortos en monos *Rhesus* (Asch y col., 1986), y produce aumento de muerte intrauterina y pérdida de peso fetal en ratones (Abel y Dintcheff, 1986).

El SEC se encuentra presente en gran parte de los tejidos reproductivos, y participa tanto en

procesos fisiológicos como patológicos durante la preñez (Sun y Dey, 2012). Dentro de los procesos fisiológicos podemos enumerar la fecundación, el desarrollo embrionario preimplantatorio, el transporte oviductal, la implantación, la decidualización, la placentación y la regulación del parto. Por ejemplo, en roedores es necesaria una regulación fina de los niveles uterinos de EC para una correcta implantación, ya que se requieren bajos niveles de EC en los sitios de implantación y altos niveles en los intersitios (Wang y col., 2007). Además, se sabe que concentraciones altas de AEA inhiben la formación de la zona de anclaje del blastocisto, mientras que concentraciones bajas producen diferenciación y crecimiento del trofoblasto *in vitro* (Schmid y col., 1997). Estos antecedentes indican que tanto en el útero como en el blastocito es necesario un control de los niveles de los EC para una correcta implantación (Sun y Dey, 2012).

Por otro lado, se conoce que mujeres con abortos espontáneos presentan menores niveles de proteína y mensajero de FAAH en linfocitos de sangre periférica así como también menor actividad de esta enzima respecto a mujeres con embarazos exitosos (Maccarrone y col., 2000). Coincidentemente, el grupo de Habayeb (2008) encontró que mujeres con abortos recurrentes presentan niveles plasmáticos de AEA mayores que los de mujeres con embarazos que llegan a término. En la misma línea se determinó, en un grupo de mujeres que fueron sometidas a tratamientos de fecundación *in vitro*, que las pacientes con un embarazo a término presentaron mayores niveles en la actividad de FAAH en linfocitos de sangre periférica y menores niveles plasmáticos de AEA respecto a las pacientes cuyo embarazo no llegó a término (Maccarrone y col., 2002a). Asimismo, los niveles de FAAH periféricos están disminuidos en mujeres que presentan embarazos ectópicos (Gebeh y col., 2013).

### **6.5.- Endocannabinoides y LPS.**

Se ha observado que sangre completa de pacientes con sepsis posee menores niveles de ARN mensajero de FAAH respecto a sangre completa de pacientes sanos (Tanaka et al. 2007). En estudios *in vitro* se ha descrito que el LPS disminuye tanto la actividad como la expresión



(proteína y mensajero) de FAAH y aumenta los niveles de AEA en linfocitos humanos de sangre periférica (Maccarrone y col., 2001).

Además, la incubación con progesterona *in vitro*, induce un aumento de los niveles de actividad de FAAH en linfocitos humanos, y este efecto podría estar mediado por los receptores clásicos de esta hormona (Maccarrone y col., 2001).

En nuestro laboratorio, hemos demostrado que los EC participan en los mecanismos desencadenados por el LPS en la reabsorción embrionaria en ratón en el día 7 de gestación, como son el aumento del óxido nítrico, las prostaglandinas y el daño tisular, tanto en decidua como en útero (Vercelli y col., 2009a y 2009b ).

#### **6.6.- Los endocannabinoides y el óxido nítrico.**

Se ha informado que el tratamiento con 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 NOS<sub>n</sub> en células de la línea celular N18TG2 (neuroblastoma murino).

En nuestro laboratorio hemos observado que la anandamida modula la producción de NO en placenta de rata (Cella y col., 2008). Además, encontramos que el aumento de la producción de NO en útero y decidua inducido por LPS está mediado por AEA (Vercelli y col, 2009a; 2009b).

Estos datos sugieren que la anandamida podría estar participando del efecto deletéreo del LPS sobre el útero, el tejido embrionario y la interfase materno-fetal.

## **7.- La progesterona.**

La progesterona (P) es una hormona esteroidea clave para el desarrollo y funcionamiento de los tejidos reproductivos, así como también participa en la excitabilidad neuronal del sistema nervioso central de los mamíferos (Graham y Clarck, 1997; Burrows, 1951). Los progestágenos junto con los estrógenos, forman el binomio hormonal femenino por excelencia.

Esta hormona esteroidea es producida por las glándulas suprarrenales, el cuerpo lúteo del ovario y la placenta (Messinis, 2006; Hill y col., 2011). En algunas especies, incluyendo la humana, la producción de P es sostenida por la placenta durante la gestación (Tan y col., 2012). A diferencia de lo que ocurre en las mujeres, en los roedores -excepto en los cobayos- los ovarios son indispensables para el mantenimiento de la gestación, ya que son los principales productores de la hormona progesterona durante toda la preñez. La ovariectomía en cualquier etapa o la insuficiente secreción ovárica de progesterona, indefectiblemente interrumpen la preñez ya que el aporte placentario es limitado (Rubinstein y Forbes, 1963).

La P es sintetizada a partir de colesterol mediante una reacción enzimática en dos pasos. Primero el colesterol dentro de la mitocondria es convertido en el esteroide intermediario pregnenolona, en una reacción catalizada por la enzima citocromo P-450. Luego, a partir de pregnenolona por acción de la 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogena/ $\Delta$ 5-4 isomerasa es producida la P. El 30% de la P circulante viaja unida a una proteína transportadora, la transcortina o CB6, una globulina de origen hepático.

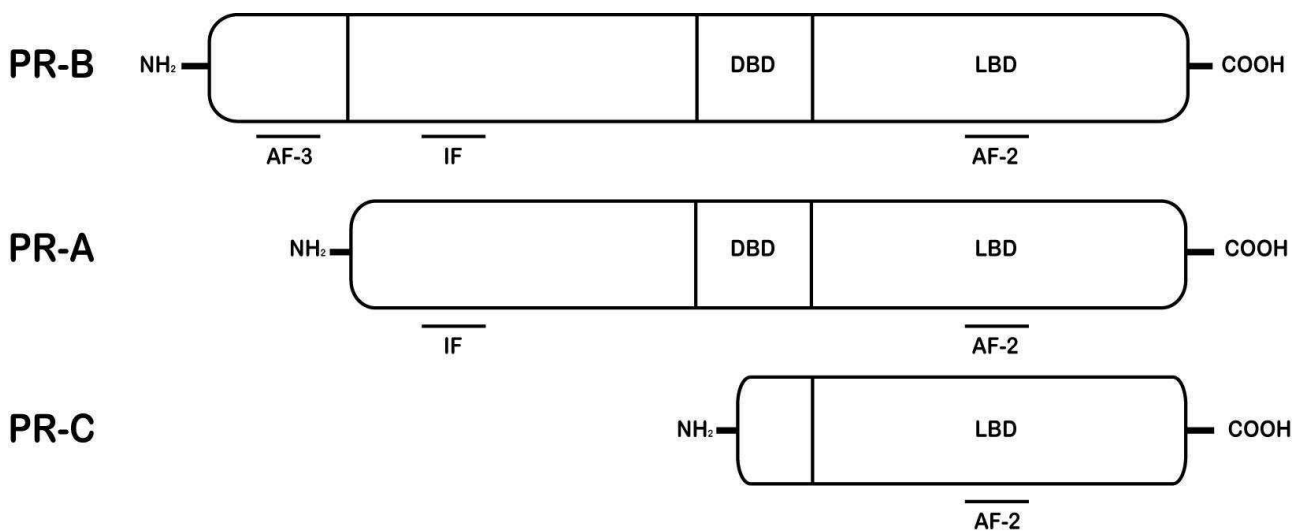
El mecanismo de acción de la P ha sido motivo de estudio desde hace varias décadas, siendo el mecanismo clásico su acción genómica. Sin embargo, también ha sido descrito un mecanismo de acción de la P a través de la activación de receptores de membrana.

### **7.1.- Receptores de progesterona.**

La acción genómica de la P es llevada a cabo por los llamados receptores clásicos de progesterona

(PR). Se conocen 3 isoformas de estos: PR-A, PR-B y PR-C, todos miembros de la superfamilia de receptores nucleares que son factores de transcripción.

Tanto en roedores como en humanos, los PR son producto del mismo gen, pero son el resultado de la transcripción bajo promotores alternativos (Kastner y col., 1990; Kraus y col., 1993) o de la traducción a partir de diferentes codones de iniciación (Figura 12) (Conneely y col., 2000).



**Figura 12. Receptores clásicos de progesterona.**

Respecto a las isoformas, PR-B tiene un adicional de 165 aminoácidos en su N-terminal que corresponde al dominio de transactivación o activación funcional AF3. Este dominio extra le permite unirse a una serie de co-activadores que no son reclutados eficientemente por PR-A. Existen evidencias de que cuando ambas isoformas coexisten, PR-A actúa como un potente represor de PR-B (Tan y col., 2012). Por su parte, PR-C posee un dominio de unión al ADN (DBD) truncado lo que lo hace inactivo. Se ha propuesto que PR-C constituye una isoforma inhibitoria que participaría en el momento del parto (Wei y col., 1996; Condon y col., 2006).

En contraste a la acción genómica de la P, existen efectos que han sido catalogados como de tipo no genómico, por su rápida acción (Losel y col., 2003). Por ejemplo, los canales de  $K^+$  de la membrana

de linfocitos T son bloqueados por acción directa de la P, de forma rápida y reversible. Esto provoca la inhibición de vías que dependen de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular, entre ellas la expresión del gen de la IL-12. Esto indica que la progesterona podría estar actuando a través de un receptor de membrana acoplado a proteína G, los cuales fueron clonados recientemente y se los ha denominado mPR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  (Gellersen y col., 2009).

## **7.2.- Progesterona y preñez.**

La P, hormona esencial no solo para el establecimiento sino también para el mantenimiento de la preñez, es parte del cambio hormonal que caracteriza la preñez.

Esta hormona induce tanto la proliferación como la diferenciación y decidualización de las células del endometrio, favoreciendo el ambiente para la implantación (Young, 2013). Además, contribuye a la inhibición de las contracciones uterinas, disminuye las conexiones gap, estimula la actividad de la óxido nítrico sintasa uterina y regula la secreción de citoquinas (Ragusa y col., 2004; Astle y col., 2003).

Por otro lado se han descrito efectos de la P sobre la ovulación y el desarrollo de la glándula mamaria. Sin embargo, los mecanismos por los cuales esta hormona ejerce estos efectos son diversos y en algunos casos no han sido totalmente esclarecidos.

Las concentraciones séricas de P en la mujer se incrementan significativamente y de forma lineal conforme avanzan las semanas de gestación. Este aumento favorece la adaptación del sistema materno-fetal a cambios directos sobre los blancos específicos de la hormona o a su biotransformación a otros esteroides como andrógenos y estrógenos, producidos por la unidad funcional feto-placentaria.

El estado de quiescencia del útero durante la gestación es asociado a los altos niveles de P circulante. En la mayoría de los mamíferos, el cambio del estado de quiescencia uterino a un estado

activado capaz de responder a los estímulos contráctiles durante el trabajo de parto se encuentra asociado a una disminución brusca de los niveles de P circulante. En particular en ratones, se observó que el inicio del parto está asociado a un aumento del metabolismo de la progesterona en el útero y en el cérvix (Condon y col., 2004; Mahendroo y col., 1999) y un aumento en la expresión de PR-A y PR-C (Condon y col., 2006; Mesiano y col., 2002). En cambio, en humanos esto no sucede, dado que los niveles de P se encuentran elevados incluso durante el parto, hasta la expulsión de la placenta. Un posible mecanismo propuesto para la inhibición de la acción de la P es un cambio en la proporción de las isoformas de PR, donde la isoforma predominante en mujeres que no han entrado a trabajo de parto es la PR-B, mientras que en las parturientas la isoforma es PR-A (Oh y col., 2005).

### **7.3.- La progesterona y el sistema inmune.**

El embarazo es una condición única que garantiza el desarrollo de un organismo independiente con diferente perfil antigénico al de la madre. La regulación del aspecto inmunológico materno está en constante estudio, sin embargo es evidente que las moléculas producidas por las células deciduales y del trofoblasto tienen una importante participación en esta aceptación.

En particular, la progesterona contribuye de forma preponderante e integral en funciones de tolerancia inmunológica que permiten la supervivencia del feto. Los tipos celulares que median la implantación, son susceptibles a los efectos de la P debido a la creciente producción de la hormona y sus receptores durante el embarazo. El efecto de la P sobre estas células promueve la tolerancia, regulando el reconocimiento de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad paternos, la polaridad de las células T efectoras, la sensibilidad de las células presentadoras de antígeno y suprimiendo la actividad de los macrófagos (Szekeres-Bartho y col., 2005; King y col., 1998; Thellin y col., 2000).

Es importante mencionar, que diferentes estudios han concluido que la IL-12, el INF- $\gamma$  y el INF- $\alpha$

promueven la diferenciación de las células T vírgenes hacia el fenotipo Th1, siendo dañinas para el embarazo. Por otro lado, la IL-4 determina la polarización de las células hacia el perfil Th2 evitando el rechazo. Sin embargo, el mecanismo regulatorio de la secreción de estas interleuquinas en la interfase materno-fetal aún está en estudio.

Los trabajos del laboratorio húngaro dirigido por Szekeres-Bartho (Mico y col., 2011) señalan que los efectos inmunomoduladores de la P son mediados por una proteína llamada factor bloqueante inducido por progesterona o PIBF. Este factor es sintetizado por acción de la P en linfocitos de mujeres gestantes sanas. El aumento de PIBF, bloquea la acción de la PLA<sub>2</sub> con lo cual no se libera AA y no hay síntesis de prostaglandinas ni leucotrienos, hecho que conduce también a la disminución de la producción de IL-12 dependiente de esta vía. En paralelo se inhibe la actividad de las células NK o natural killer, que son activadas por IL-12.

La síntesis de PIBF se ve favorecida por la sobreexpresión de los receptores de P en linfocitos activados de la decidua y el trofoblasto. Trabajos en ratones y mujeres utilizando RU-486, un reconocido antiprogestágeno, corroboran la importancia de la P sobre la producción de PIBF (Kalinka y Szekeres-Bartho, 2005; Joachim y col., 2003; Salomón y col., 2005). Diversos experimentos *in vivo* e *in vitro* muestran que los linfocitos activados y tratados con PIBF producen citoquinas tipo Th2: IL-3, 4 y 10, capaces de suprimir la diferenciación a Th1. El mecanismo propuesto involucra la interacción del PIBF con las proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción (STATs), que juegan un rol clave en la vía de síntesis y señalización de las citoquinas en general (Szekeres-Bartho y Polgar, 2010).

Por otra parte, el proceso de polarización celular es un evento regulado por la activación y/o inhibición del factor nuclear NF- $\kappa$ B, uno de los principales inductores de genes inflamatorios. Este factor activado, transloca al núcleo e induce la expresión de varias citoquinas como IL-1, 2, 6, 8 y TNF- $\alpha$ , entre otras. Hay trabajos que muestran la capacidad de la P para inducir la producción de I $\kappa$ -B, el inhibidor endógeno de NF- $\kappa$ B (Wissink y col., 1998). También se propone una competencia

del complejo hormona-receptor y el NF- $\kappa$ B por un sitio de unión al ADN o por la unión a cofactores (McKay y col., 1999).

## **Hipótesis y Objetivos**

---



## Hipótesis y Objetivos

---

En nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo murino de reabsorción embrionaria (RE) inducida por una única dosis de LPS a hembras BALB/c en el día 7 de gestación (Ogando y col., 2003). En este modelo se produce un 100% de RE a las 24h de haber administrado el LPS. A las 48h los restos son expulsados y la madre recupera su capacidad gestacional. Observamos también un aumento en la producción de óxido nítrico (NO) y de prostaglandinas (PGs) (Ogando y col., 2003; Aisemberg y col., 2007), y una gran infiltración leucocitaria (Ogando y col., 2003). Además, la administración de la endotoxina provoca una disminución significativa de los niveles séricos de progesterona (P) y la suplementación con esta hormona previene la RE (Aisemberg y col., 2013).

Numerosos estudios muestran que los endocannabinoides, especialmente la anandamida (AEA), son necesarios en los procesos de implantación y desarrollo embrionario, pero altos niveles en el útero son perjudiciales para ambos procesos (Paria y col., 1996; Schmid y col., 1997).

Las mujeres con abortos recurrentes tienen menores niveles de actividad de la enzima hidrolasa de amidas de ácidos grasos (FAAH), que degrada la anandamida, en linfocitos de sangre periférica (Maccarrone y col., 2010) y elevados niveles de anandamida (AEA) en plasma (Taylor y col., 2011). Se ha informado además que niveles bajos de FAAH y altos de AEA están asociados a fallas en el embarazo en un grupo de mujeres que fueron sometidas a fertilización *in vitro* (FIV) (Maccarrone y col., 2002). Asimismo en mujeres que presentan embarazos ectópicos se observan altos niveles plasmáticos de varios endocannabinoides (Gebeh y col., 2013).

En linfocitos humanos tratados *in-vitro* con LPS se observó una disminución en la actividad de FAAH y en consecuencia un aumento en los niveles de AEA (Maccarrone y col., 2001). La P, hormona esencial para el establecimiento y mantenimiento de la preñez, es capaz de modular

positivamente la actividad de FAAH en cultivos de linfocitos humanos.

En nuestro laboratorio hemos demostrado *in-vitro* que la AEA participa de varios de los mecanismos inducidos por LPS, como el aumento de la síntesis de NO y de las PGs tanto en útero como en la decidua (Vercelli y col., 2009a y 2009b). Asimismo, la incubación con LPS del tejido uterino y decidual del día 7 de gestación produce un alto grado de desorganización tisular que es revertida mediante la co-incubación con un antagonista del receptor CB1 (Vercelli y col., 2009a y 2009b).

### **Hipótesis:**

*“El sistema endocannabinoide de las células inmunes infiltrantes así como del sitio de implantación participan en los mecanismos involucrados en el desencadenamiento de la reabsorción embrionaria inducida por LPS, cumpliendo la progesterona un papel protector en estos procesos.”*

### **Objetivo general:**

Estudiar la participación del sistema endocannabinoide tanto del sitio de implantación como de las células inmunes infiltrantes en la reabsorción embrionaria inducida por LPS y su posible regulación por progesterona.

Para lo cual se plantearon los siguientes objetivos particulares:

### **Objetivos particulares:**

- Evaluar la participación del sistema endocannabinoide en la reabsorción embrionaria inducida por LPS.

- Estudiar el sistema endocannabinoide de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por su sigla en inglés *peripheral blood mononuclear cell*) murinas y su posible modulación por LPS. Determinar el papel de la progesterona sobre los efectos de la endotoxina en estas células.
- Analizar si el LPS modula al sistema nitrérgico de las PBMC, y el posible efecto protector de la progesterona ante la endotoxina.
- Estudiar el efecto local de las células inmunes infiltrantes sobre el sistema endocannabinoide de la decidua en la reabsorción embrionaria inducida por LPS.



---

## Materiales y métodos:

---

### 1.- Drogas y reactivos.

El lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* 055:B5, los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rabano picante (HRP), la nitrato reductasa y lactato deshidrogenasa, el Hoescht 33342, el NADPH, la Naftil-etilendiamina (NEDA), el HISTOPAQUE-1083 y el Rojo Ponceau S fueron obtenidos de **Sigma Chemical Co.** (St. Louis, USA).

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

El antagonista de los receptores de progesterona (PR) RU-486, mifepristone, fue provisto por BIOMOL (**Enzo Life Sciences, Miami, FL, USA**) y el Lonaprizan (ZK230211) fue gentilmente donado por la empresa **Bayer-Schering (Germany)**. La dexametasona fue provista por Laboratorios Sidus (Buenos Aires, Argentina).

El Pan T Cell Isolation Kit II mouse fue adquirido en **Miltenyi Biotec GmbH** (Bergisch Gladbach, Alemania).

El material radioactivo utilizado fue obtenido de **Perkin Elmer**:

- [5,6,8,9,11,12,14,15-<sup>3</sup>H]-anandamida (172,4 Ci/mmol, 100 µCi/ml)
- [1,2,6,7-<sup>3</sup>H]-progesterona (115Ci/mmol, 1 mCi/ml)

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

Los insumos para cultivo: DMEM sin rojo fenol y el mix de antibiótico + antimicótico (Penicilina G 20 U/ml, Estreptomina 20 µg/ml, Amphotericina B 50 ng/ml) fueron suministrados por **GIBCO** (Invitrogen Carlsbad, CA, USA). El suero fetal bovino fue provisto por Internegocios (Internegocios SA, Mercedes, Bs.As., Argentina)

Las placas de sílica gel 60 de aluminio con zona concentradora para cromatografía en placa delgada (TLC) se obtuvieron en **Merck** (Darmstadt, Alemania)

Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

### **1.1.- Anticuerpos primarios utilizados.**

El anticuerpo anti-PR hPRa7 fue suministrado por **Thermo Scientific** (Kalamazoo, USA).

El anticuerpo anti-PR C-19 fue adquirido de **Santa Cruz** (California, USA).

Los anticuerpos anti-NAPE-PLD (ab77474) y anti-CB1 fueron suministrados por **Abcam Inc.** (Cambridge, MA, USA).

El anti-CB2 en Biomol (**Enzo Life Sciences, Miami, FL, USA**).

El anticuerpo anti-FAAH fue gentilmente donado por el laboratorio del Dr. Benjamín Cravatt.

El anticuerpo anti-NOSi fue provisto por **BD Biosciences** (Franklin Lakes, NJ, USA).

El anticuerpo anti-nitrotirosina fue adquirido en **Millipore** (Billerica, USA).

El anticuerpo anti-actina fue suministrado por **Sigma Chemical Co.** (St Louis, MI, USA).

Los anticuerpos utilizados para citometría de flujo:

- el CD3 y los controles de isotipo fueron obtenidos en **BD Biosciences** (Franklin Lakes, NJ, USA).

- el F4/80, el Ly66 y el CD49b (DX5) fueron adquiridos en **eBioscience** (San Diego, USA).

### **2.- Soluciones y medios.**

- Líquido de centelleo para muestras acuosas.

Optiphase HiSafe 3 de PerkinElmer.

- Buffer fosfato (PBS)

NaCl 136,9 mM + KCl 2,68 mM + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47 mM + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 8 mM.

- PBS-T

PBS + Tween 20 (0,1%)

- Buffer de inhibidores para muestras de Western Blot.

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

- Buffer muestra de WB.

Azul de bromofenol 0,3% (p/v) + Buffer Tris 0,5 M (pH=6,8) + SDS 1% (p/v) + β-mercaptoetanol 5% (v/v) + glicerol 10% (v/v).

- Buffer RIPA.

Tris-HCl 50 mM (pH=7,4) + Tritón X-100 1% + NaCl 150mM + EDTA 1mM + Deoxicolato de sodio 0,25% (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)

- Buffer lisis para extracción de ADN:

Tris-HCl 100mM (pH=8,0) + EDTA 5mM (pH=8,0) + SDS 0,2% + NaCl 200mM

- Medio de cultivo completo:

DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y con 1% de antibiótico/antimicótico

- Buffer A (inmunoprecipitación)

10 ml buffer Trizma (7,35 g Trizma base para 100 ml, pH=7.4); 7,5 ml NaCl 1M; 5 ml detergente (0,29 g Trizma base, 10 ml de Igepal, 5 mg de Nadeoxycholate, para 100 ml); 50 µl Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 M. Llevar con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a un volumen final 50 ml.

- Buffer B (inmunoprecipitación)

10 ml buffer Trizma (7,35 g Trizma base para 100ml, pH=7.4); 25 ml de NaCl 1M; 0,5 ml de detergente; 25  $\mu$ l  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 M. Llevar con  $\text{H}_2\text{O}_2$  a un volumen final 50 ml.

- Buffer C (inmunoprecipitación)

10 ml buffer Trizma (7,35 g Trizma base para 100ml, pH=7.4); 0,25 ml de detergente. 25  $\mu$ l  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 M. Llevar con  $\text{H}_2\text{O}_2$  a un volumen final 50 ml.

### 3.- Animales.

Los ratones utilizados fueron hembras de las cepas:

-BALB/c vírgenes de entre 8 y 12 semanas de edad (25-30 gr de peso).

-CD1 silvestres (wt) y deficientes para el gen CB1 (ko) de entre 8 y 12 semanas de edad (28-32gr de peso).

Algunas de estas hembras fueron utilizadas vírgenes y el resto de estas hembras se aparearon con machos adultos fértiles de la misma cepa. La cópula en ratones se comprueba por la presencia de tapón vaginal detectado en la mañana del día siguiente, el cual en nuestro modelo fue considerado como día 0 de preñez.

Bajo nuestras condiciones de cuidado en el 50% de los casos es criterio de predicción de preñez y la gestación tiene una duración de 19-20 días. Los animales se mantuvieron bajo un régimen de 12 h luz/12 h oscuridad, temperatura constante (23-25°C), alimento y agua *ad libitum*.

#### 3.1.- Tratamientos de los animales.

##### CD1:

*Análisis de la tasa de RE:*

Animales preñados en día 7 de gestación fueron inyectados con distintas dosis de LPS (0,5 y 1  $\mu$ g/g de peso) y fueron sacrificados 48 h después (Figura 13 A).

*Evolución de la preñez de los ratones ko-CB1:*

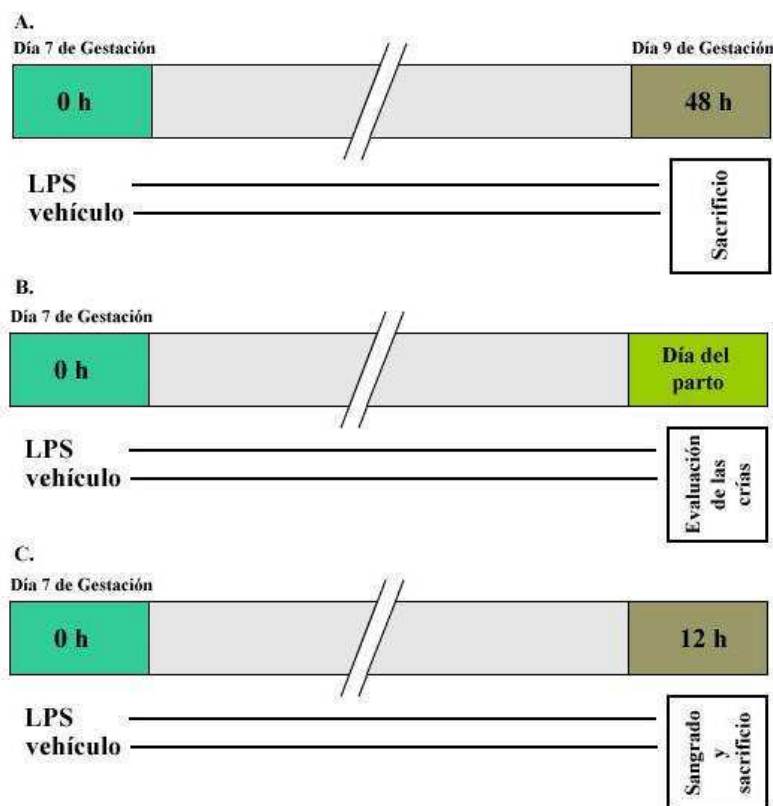


Animales preñados en día 7 de gestación fueron inyectados con LPS 0,5 µg/g de peso y se los mantuvo hasta el final de la gestación.

Para cada animal: i) se registró el día del parto y ii) se realizó el seguimiento del peso promedio de las crías de la camada hasta los 2 meses de edad (Figura 13 B).

#### *Niveles séricos de P:*

Animales preñados en día 7 de gestación fueron inyectados con LPS 0,5 µg/g de peso y fueron sangrados 12 h después del LPS para aislar el suero (Figura 13 C).

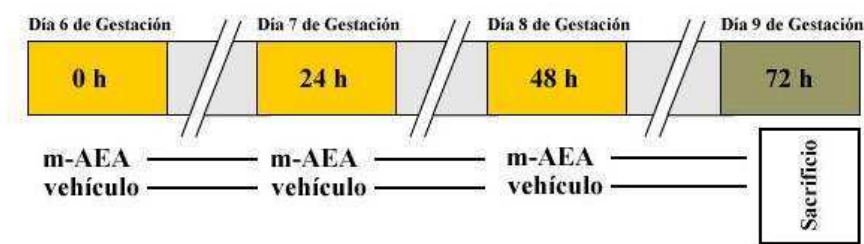


**Figura 13. Tratamientos ratones CDI. A.- Análisis de la tasa de RE. B.- Evolución de la preñez de los ratones ko-CBI. C.- Niveles séricos de P.**

#### **BALB/c:**

##### *Análisis de la tasa de RE inducida por m-AEA:*

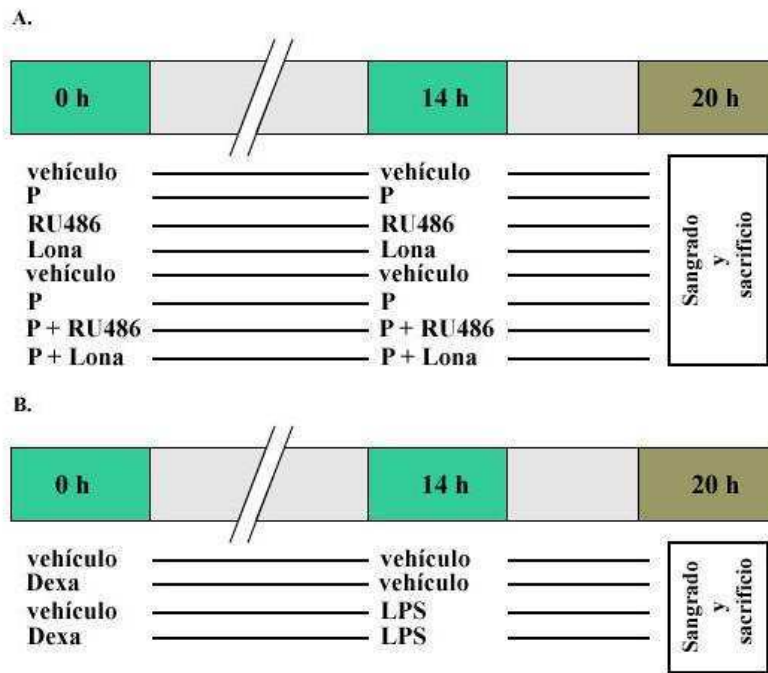
Animales preñados fueron inyectados con dos o tres dosis de m-AEA 0,03 µg/g de peso y fueron sacrificados 48 h después (Figura 14).



**Figura 14. Tratamientos ratones BALB/c para el análisis de la tasa de RE inducida por m-AEA**

*Ratones no preñados:*

(i) **control**: las hembras recibieron una inyección intra-peritoneal (i.p.) de vehículo y 14 h después una nueva inyección i.p. de vehículo (ii) **RU486 / Lonaprisan / Progesterona**: las hembras recibieron una inyección i.p. de RU486 o Lonaprisan (LONA) o progesterona (P, sub-cutánea [s.c.]) y luego de 14 h se les administró una nueva dosis; (iii) **LPS**: las hembras recibieron una inyección i.p. de vehículo y 14 h después se les administró i.p. una inyección de LPS; (iv) **LPS + P**: hembras recibieron una inyección s.c. de P y luego de 14 h se les administró una inyección de LPS y una segunda dosis de P; (v) **LPS + P + RU486**: hembras recibieron una inyección s.c. de P y una inyección i.p. de RU486, luego de 14 h se les administró LPS y una segunda dosis de P y RU486; (vi) **LPS + P + LONA**: hembras recibieron una inyección s.c. de P y una inyección i.p. de LONA, luego de 14 h se les administró una inyección de LPS y una segunda dosis de P y de LONA. Los animales fueron sacrificados 6 h después de la administración de LPS (Figura 15 A); (vii) **Dexa**: las hembras recibieron una inyección i.p. de dexametasona (Dexa) y 14 h después una inyección i.p. de vehículo; (viii) **LPS + Dexa**: las hembras recibieron una inyección i.p. de dexametasona (Dexa) y 14 h después una inyección i.p. de LPS. Los animales fueron sacrificados 6 h después de la administración de LPS. (Figura 15 B)



**Figura 15. Tratamientos ratones BALB/c no preñados. A.- Esquema de dosis P y antagonistas de P. B.- Esquema de dosis Dexa.**

*Ratones preñados en día 7 de gestación:*

(i) **control:** las hembras recibieron una inyección intra-peritoneal (i.p.) de vehículo y 2 h después una nueva inyección i.p. de vehículo; (ii) **LPS:** hembras recibieron una inyección i.p. de vehículo y 2 h después se les administró una inyección i.p. de LPS; (iii) **RU486:** hembras recibieron una inyección i.p. de RU486 y 2 h después una inyección i.p. de vehículo; (iv) **LPS + RU486:** hembras recibieron una inyección i.p. de RU486 y 2 h después se les administró una inyección i.p. de LPS. (v) **P:** hembras recibieron una inyección s.c. de P y 2 h después una inyección i.p. de vehículo; (vi) **LPS + P:** hembras recibieron una inyección s.c. de P y 2 h después se les administró una inyección i.p. de LPS. Los animales fueron sacrificados 6 h (Figura 16 A) o 12 h (Figura 16 C) después de la administración de LPS.

(vii) **AG:** hembras recibieron una inyección i.p. de aminoguanidina (AG), 24 h después una segunda dosis de AG y 3 h luego una tercer dosis; (viii) **AG + LPS:** hembras recibieron una

inyección i.p. de AG, 24 h después una segunda dosis de AG y 3 h luego junto con la tercer dosis de AG una inyección i.p. de LPS. Los animales fueron sacrificados 6 h después de la administración de LPS (Figura 16 B).

Nota: La administración de RU486 produce RE y expulsión de los fetos en los animales preñados a las 12 h de la administración. Por esto, hemos modificado el esquema de dosis reduciendo el tiempo de 14 h a 2 h antes de la administración del LPS.

*Dosis:*

- LPS: 1  $\mu\text{g/g}$  de peso o 0,5 $\mu\text{g/g}$  de peso (i.p., en solución fisiológica (SF))

- Progesterona:

Ratones no preñados: 4  $\mu\text{g/g}$  de peso (s.c., en aceite de maíz).

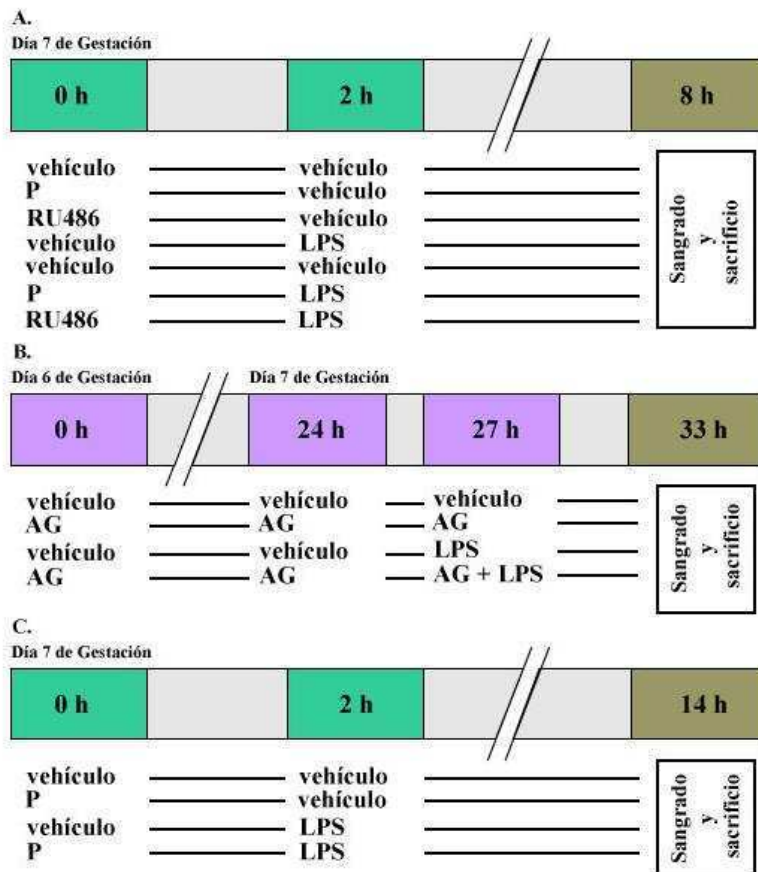
Ratones preñados: 2 mg/animal (s.c., en aceite de maíz).

- RU-486 (mifepristone): 10  $\mu\text{g/g}$  de peso (i.p., en 1:2 EtOH:SF)

- Lonaprizan (ZK230211, LONA): 1,2  $\mu\text{g/g}$  de peso (i.p., en 1:2 EtOH:SF)

- Dexametasona (Dexa): 1,5  $\mu\text{g/g}$  de peso (i.p., en SF)

- Aminoguanidina (AG): 6 mg/animal (i.p., en SF)



**Figura 16. Tratamientos ratones BALB/c preñados. A.- Esquema de dosis P y antagonista de P, sacrificio 6 h después de la dosis de LPS. B.- Esquema de dosis inhibidor de NOSi (AG), sacrificio 6 h después de la dosis de LPS. C.- Esquema de dosis P, sacrificio 12 h después de la dosis de LPS.**

Los procedimientos experimentales fueron realizados siguiendo la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NIH). Las extracciones de sangre fueron realizadas bajo anestesia (CO<sub>2</sub>), y se realizaron todos los esfuerzos posibles para disminuir al mínimo el sufrimiento de los animales.

#### 4.- Purificación PBMC.

La purificación de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se realizó a partir de sangre periférica. La sangre se recolectó por sangrado retro-orbital para lo cual los

animales fueron anestesiados en una atmósfera de CO<sub>2</sub>, e inmediatamente después fueron sacrificados por dislocación cervical. Para el sangrado se utilizaron tubos con buffer citrato de sodio 129mM pH=7,2 como anticoagulante.

La purificación se realizó por medio de gradientes de HISTOPAQUE-1083, los cuales se centrifugaron durante 30 minutos a 400 x g a temperatura ambiente. De la interface se tomaron las PBMCs, las cuales fueron lavadas por medio de centrifugación lenta (200 x g, 10 minutos) con PBS 1X para remover plaquetas y restos de HISTOPAQUE.

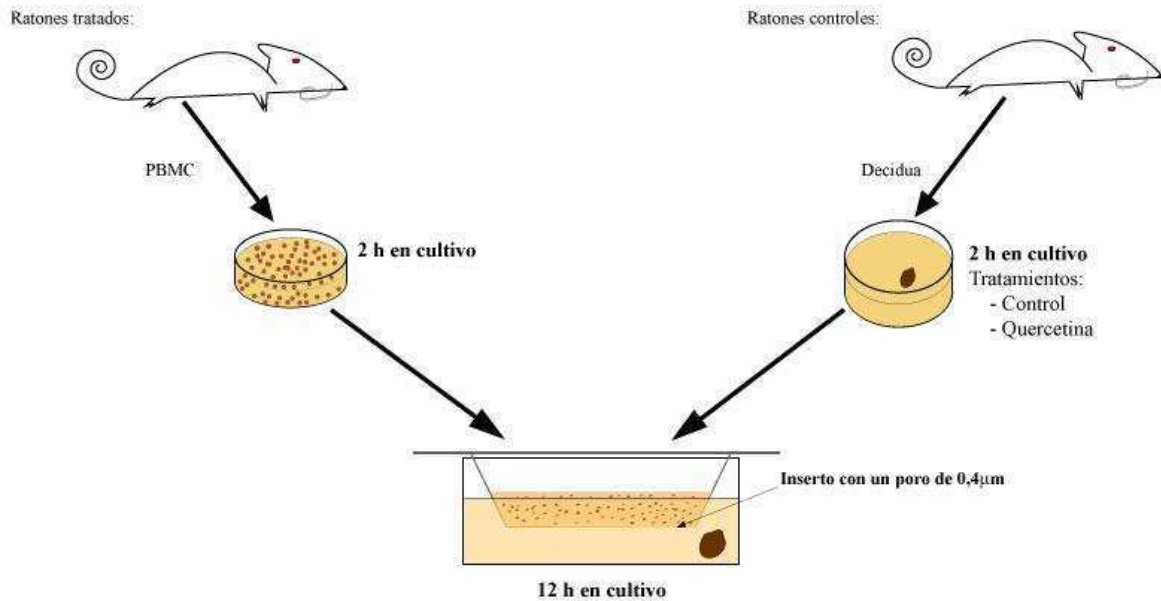
Dependiendo del ensayo fueron llevadas a cultivo o congeladas a -70°C para su posterior utilización.

#### **5.- Co-cultivos PBMC y deciduas.**

Para estos experimentos se utilizaron animales preñados de día 7 de preñez provenientes de los diferentes tratamientos.

Luego de su purificación, las PBMC fueron resuspendidas en 1 ml de medio de cultivo completo, colocadas en placas de 6 pozos, y mantenidas en estufa gaseada (5% CO<sub>2</sub>) a 37°C durante 2 h. Luego fueron descartados los monocitos que pudieron haberse pegado, utilizándose únicamente las células en suspensión.

Por otro lado, luego de sacrificar los animales, se extrajeron los cuernos uterinos, se individualizaron los sitios de implantación y se separaron las deciduas (decidua más tejido embrionario) del útero. Las deciduas fueron colocadas en placas de 24 pozos y fueron cubiertas con 400 µl de medio de cultivo completo. Luego en cada pozo se colocó un inserto (se utilizaron insertos con un poro de 0,4 micrones) generando dos cámaras. En la cámara inferior se encontraba la decidua y en la cámara superior se colocaron  $2,5 \times 10^5$  células PBMC en 200µl de medio de cultivo completo (Figura 17). Inmediatamente se colocaron en estufa gaseada (5% CO<sub>2</sub>) a 37°C durante los tiempos de incubación de cada caso en particular. Los tejidos fueron recuperados y conservados a -70°C hasta su utilización.



**Figura 17. Esquema del diseño experimental de los co-cultivos de decidua y PBMC.**

## 6.- Citometría de flujo:

Luego de la purificación, las PBMC fueron contadas. En cada tubo fueron colocadas 1.000.000 células, las cuales fueron centrifugadas a 200 x g durante 10 minutos, se descartaron los sobrenadantes y se resuspendieron las PBMC en PBS + 1% de BSA.

Nuevamente se centrifugaron a 200 x g por 10 minutos e incubadas durante 30 minutos a 4°C en oscuridad con el anticuerpo de marcación de superficie acoplado a un fluoróforo (CD49b [clon DX-5], CD3, F4/80 y sus correspondientes controles de isotipo, ver Tabla 1) en PBS + BSA 1%. Luego las células fueron lavadas por centrifugación (200 x g, 10 minutos) con la solución de PBS + 1% de BSA y fijadas con paraformaldehído (PFA) al 1%. Se mantuvieron a 4°C y en oscuridad hasta el día siguiente cuando se adquirieron los datos en un citómetro de flujo (FACSAria de la empresa BD Bioscience). Todos los resultados fueron analizados con el programa Cyflogic versión libre.

Antígeno	Fluoróforo	Dilución
CD3	PerCP-cy5.5	1:50
CD49b (clon DX5)	APC	1:50
F4/80	FITC	1:50

**Tabla 1. Concentración y tipos de anticuerpos utilizados en las citometrías de flujo.**

### 7.- Medición de $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ . Reacción de Griess.

Una de las formas de estudiar la formación del NO producido es a través de la medición de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), dos productos primarios estables 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. Para esto fueron cosechados los sobrenadantes de las PBMCs cultivadas en medio cultivo completo en estufa gaseada (5%  $\text{CO}_2$ ) a 37°C durante 24 horas.

El ensayo requiere de 2 pasos enzimáticos: el primero con Nitrato Reductasa dependiente de NADPH para reducir los nitratos y poder estimar la producción total real. El segundo con Lactato Deshidrogenasa para oxidar el NADPH que inhibe la reacción de Griess. Para el ensayo, 100  $\mu\text{l}$  de sobrenadante fueron incubados con 5  $\mu\text{l}$  de NADPH 2 mM y 5  $\mu\text{l}$  de nitrato reductasa (de *Aspergillus* 10 UI/m). Luego se agregaron 10  $\mu\text{l}$  de ácido pirúvico 100 mM y 10  $\mu\text{l}$  de lactato deshidrogenasa (1000 U/ml). Finalmente, se adicionaron 50  $\mu\text{l}$  de ácido sulfanílico (10 mg/ml) y se reveló agregando 50  $\mu\text{l}$  de Naftil-etilendiamina (NEDA) (1mg/ml) por 5 min en oscuridad y agitación constante. El producto coloreado fue leído a 540 nm. La concentración de  $\text{NO}_2^-$  fue deducida con una curva estándar de nitritos que se



realizó en paralelo a las muestras. Los resultados fueron expresado como:  $\mu\text{M NO}_2^- / 10^6$  células (Grisham y col, 1996).

### **8.- Inmunofluorescencia.**

Al finalizar la purificación de las PBMCs, se resuspendieron en PBS + 10% BSA, se colocó una gota de la solución con las células en un porta-objeto cargado positivamente y se dejó secar al aire. Luego se fijaron las PBMC con PFA 4% (en PBS) durante 15 minutos a temperatura ambiente, y se hizo un lavado de 5 minutos con PBS. Las células se permeabilizaron y bloquearon durante 20 minutos con PBS + 10% de suero normal de cabra + 0,3% de TRITON X-100. Luego se incubaron con el anticuerpo primario anti-PR (C-19) 1:50 en la solución de permeabilización durante 60 minutos. Se lavaron 10 minutos con PBS y luego se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado al fluoróforo Alexa-555 (1:200 en la solución de permeabilización) durante 30 minutos. Se lavaron 5 minutos con la solución de permeabilización y 5 minutos con PBS + 5% suero normal de cabra. Se incubó con un anticuerpo anti-CD3 acoplado a FITC 1:50 durante 60 minutos. Se lavó con PBS 10 minutos y se incubó con Hoechst 1  $\mu\text{g/ml}$  durante 10 minutos. Se lavaron 2 veces con PBS 10 minutos y se montó con PBS: Glicerol (1:9).

En la marcación intracelular los controles negativos se realizaron colocando el secundario acoplado al fluoróforo, sin haber colocado previamente el anticuerpo primario. En la marcación de antígenos de superficie, al ser directa, para los controles negativos se utilizó el control de isotipo del anticuerpo (misma IgG del anticuerpo en cuestión acoplada al mismo fluoróforo).

Los preparados se observaron en un microscopio de fluorescencia y las fotografías fueron sacadas con cámara digital acoplada al mismo (Nikon, Japón).

## 9.- Purificación de Linfocitos T.

Para el enriquecimiento en Linfocitos T por selección negativa de las PBMC se utilizó el kit comercial de purificación para linfocitos T (Pan T cell isolation) y se utilizó el protocolo recomendado por el fabricante.

Una vez obtenidas las PBMCs, por medio del gradiente de HISTOPAQUE-1083, fueron colocadas  $1,5 \times 10^6$  células por tubo y centrifugadas a  $300 \times g$  durante 10 minutos, el sobrenadante fue descartado. El pellet de las células fue resuspendido en  $40 \mu\text{l}$  de PBS + 0,5% de BSA + 2 mM EDTA (buffer), y fueron agregados  $10 \mu\text{l}$  de la mezcla de anticuerpos acoplados a biotina y se incubaron las células durante 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ .

La mezcla de anticuerpos contenía anticuerpos anti-CD11b, CD11c, CD19, CD45R (B220), CD49b (DX5), CD105, Anti-MHC class II y Ter-119, los cuales son afines a células no T, tales como linfocitos B, NKs, dendríticas, macrófagos, granulocitos, células endoteliales y eritrocitos.

Al término de la incubación con la mezcla de anticuerpos acoplados a biotina se agregaron  $30 \mu\text{l}$  de buffer y  $20 \mu\text{l}$  de un anticuerpo anti-biotina acoplado a esferas magnéticas durante 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Luego fueron lavados por centrifugación con 1 ml de buffer a  $300 \times g$  durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en  $500 \mu\text{l}$  de buffer.

El último paso, fue pasar las células por una columna, la cual previamente se acopló a un sistema magnético y se humedeció con el buffer. Se colectaron las células que no fueron marcadas, que representa la fracción enriquecida en linfocitos T.

Para obtener la eficiencia del procedimiento, una porción de las células colectadas fue utilizada para hacer una citometría de flujo con un anticuerpo anti-CD3, marcador de linfocitos T. El resto de las células fueron centrifugadas y resuspendidas en trizol, para luego extraer el ARNmensajero.

## 10.- Genotipificación de ratones.

Segmentos de 5-6mm de colas de ratones de 21 días de edad de la cepa CD1 wt y ko fueron utilizados como material para obtener el ADN genómico para la genotipificación. Los segmentos de las colas fueron digeridos con la enzima proteinasa K y el buffer de lisis para extracción de ADN durante toda la noche a temperatura ambiente. Luego fueron centrifugados los tubos a 14.000 rpm durante 10 minutos, los sobrenadantes fueron traspasados a un nuevo tubo donde se les agregó 400 µl de isopropanol y se invirtieron para que precipite el ADN. El ADN fue traspasado a un nuevo tubo, fue dejado secar al aire durante 5 minutos y luego fue resuspendido con buffer TE durante 8 horas a 37°C. A partir de este ADN fueron realizadas las PCRs para las secuencias del gen CB1 y/o el casete de neomisina (Neo-casete) (Tabla 2). Este último es la secuencia por la cual se reemplazó el gen en cuestión (CB1) en los animales ko.

Gen	Sentido	Secuencia
Neo-casete	Sentido	GATGCTCTTCGTCCAGATCATCC
	Anti-sentido	GCAGGATCTCCTGTCATCTCACC
CB1	Sentido	GAGGTGCCAGGAGGGAACC
	Anti-sentido	CATCATCACAGATTTCTATGTAC

**Tabla 2. Secuencia de los cebadores utilizados para la genotipificación.**

Las PCRs dieron dos productos el correspondiente al gen CB1 de 366 pb y el correspondiente al Neo-casete de 200 pb.

Para estas PCRs se utilizó el siguiente programa:

94°C 2 min (desnaturalización inicial), 30 ciclos de 94°C 30 seg, 56°C 1 min, 72°C 20 seg y por último 72°C 7 min (extensión final).

Al finalizar la PCR se realizó un gel de agarosa al 2% y se observó la presencia de bandas correspondientes a los fragmentos esperados.

## **11.- Western Blot.**

### *Procesamiento de las muestras.*

Las PBMCs y las deciduas fueron sonicadas por 30 seg en buffer de inhibidores para muestras de WB. Los sobrenadantes se guardaron a -70°C previa determinación de los niveles proteicos de cada muestra por el método de Bradford (1976).

### *Separación electroforética de las proteínas.*

La separación se realizó en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) según la técnica descrita por Laemmli (1970), las proteínas extraídas fueron desnaturalizadas a 100°C durante 5 min, luego colocadas para su separación electroforética en buffer muestra y sembradas en geles cuyo porcentaje de poliacrilamida dependió del peso molecular de la proteína a detectar (NOSi: 7.5 %; PR, FAAH, NAPE-PLD, CB1 y CB2: 10 %; NT: gradiente 5 a 15%). La electroforesis se llevó a cabo en buffer de corrida a corriente constante (15mA por gel) y a temperatura ambiente (TA) durante 90 min aproximadamente.

### *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 90 min (100 V).

A fin de determinar la correcta transferencia de la transferencia las membranas fueron teñidas con el colorante reversible Rojo Ponceau S. Luego las membranas fueron lavadas repetidamente con agua corriente y solución de lavado (PBS-T), y se incubaron en solución de bloqueo (PBS con 5% de leche descremada) durante 1 h a temperatura ambiente.

*Detección inmunológica.*

Posteriormente las membranas se lavaron para ser incubadas con los respectivos anticuerpos primarios (Tabla 3) durante 18 h a 4°C.

Proteína	Dilución del anticuerpo	Tipo de anticuerpo
FAAH	1:400	Policlonal
CB1	1:300	Policlonal
CB2	1:200	Policlonal
NAPE-PLD	1:400	Policlonal
NOSi	1:200	Policlonal
PR (hPRa7)	1:100	Monoclonal
NT	1:400	Policlonal
Actina	1:4000	Policlonal
2rioAnti-conejo acoplado a HRP	1:5000	Policlonal
2rioAnti-ratón acoplado a HRP	1:4000	Policlonal

**Tabla 3. Anticuerpos y diluciones utilizados.**

Luego de la incubación, las membranas se lavaron tres veces por 10 minutos en PBS-T y posteriormente se incubaron por 15 minutos con anticuerpo anti-actina y se volvieron a lavar. Luego las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 3) diluido en PBS durante 1 h a temperatura ambiente.

El revelado fue realizado por quimioluminiscencia, para lo cual las membranas fueron incubadas con la solución de revelado para ECL durante 1 min y posteriormente fueron

visualizadas y fotografiadas en el analizador de imágenes ImageQuant (GE Healthcare Life Sciences).

#### *Identificación de las bandas proteicas.*

Las bandas proteicas y sus correspondientes pesos moleculares fueron identificadas mediante la utilización de un marcador de peso molecular. El peso molecular de la banda fue verificado 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.

La intensidad de las bandas se cuantificó utilizando el programa Image J (libre acceso, NIH). Las bandas correspondientes a cada proteína se normalizaron contra la banda correspondiente a la actina. Los resultados se expresaron como la densidad óptica de la proteína analizada relativa a la de la actina.

#### **12.- Inmunoprecipitación de FAAH.**

Para determinar el grado de nitración de la FAAH, se decidió realizar una inmunoprecipitación de la misma y luego realizar un western blot con el anticuerpo anti-NT y anti-FAAH.

Para la inmunoprecipitación se utilizaron deciduas provenientes de los co-cultivos con las PBMC. Las mismas fueron homogenizadas por sonicación en buffer de homogeneización, 200 µg de proteínas fueron resuspendidas en 100 µl de buffer de homogeneización y fueron añadidos 5 µl de anti-FAAH. Fueron incubados durante 3-4 h a 4 °C en agitación. Luego fueron añadidos 30 µl de proteína G-sepharose y fueron incubados durante toda la noche en agitación a 4°C.

Los complejos fueron lavados según los siguientes pasos:

a) Se centrifugaron 5 min a 13.000 rpm y se descartaron los sobrenadantes.

- b) Se agregó al pellet 1 ml de buffer A y se mantuvieron en agitación 20 min a 4 °C.
- c) Se centrifugaron 1 min a 13.000 rpm. Se descartaron los sobrenadantes y se agregó al pellet 1 ml de buffer A, se mantuvieron en agitación otros 20 min.
- d) Se repitió el procedimiento con el buffer B y luego con el buffer C.
- e) Se centrifugaron 1 min a 13.000 rpm y se descartaron los sobrenadantes.
- f) Se resuspendieron los pellets en buffer muestra para electroforesis 6X, se hirvieron las muestras por 5 min y luego se mantuvieron en hielo.
- Se centrifugaron las muestras a 13.000 rpm por 3 min y los sobrenadantes fueron guardados a -70°C hasta su utilización.
- g) Se sembraron 15-30 µl de muestra por calle en geles de poliacrilamida de 10%.

### **13.- Determinación de la actividad de la hidrolasa de amidas de ácidos grasos (FAAH).**

La actividad de la FAAH fue determinada según la técnica descrita por Paria y col. (1996) con modificaciones menores.

Brevemente, las PBMCs y las deciduas fueron sonicadas durante 30 segundos 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).

Para las proteínas de las PBMC, 50 µg por tubo fueron incubadas durante 30 min, mientras que para las proteínas de las deciduas 100 µg por tubo fueron incubadas durante 15 minutos, en ambos casos en un baño termoestabilizado a 37°C. La proteínas se incubaron en 200 µl de buffer Tris/HCl 50 mM (pH=8,5) que contenía [<sup>3</sup>H]-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). Se centrifugó durante 5 min a 7.000 x g y se transfirió la fase orgánica a un nuevo tubo. Sobre la fase acuosa se realizaron dos extracciones de componentes orgánicos adicionando cloroformo puro y centrifugando 5 min a 7.000 x g. Las fases orgánicas de cada muestra se recolectaron en un mismo tubo y se dejó evaporar el

solvente. Una vez secas, las muestras se resuspendieron en cloroformo: metanol (1:1 v/v) y se sembraron en placas de cromatografía de capa delgada (TLC) Silica Gel 60 de aluminio con zona concentradora (Merk KgaA. Darmstadt, Germany). Luego los tubos se lavaron y sembraron dos veces más con cloroformo puro. 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 e identificados por la migración conjunta con estándares de AA y AEA. Las calles correspondientes a cada muestra, conteniendo los lípidos separados cromatográficamente, fueron cortadas en secciones dependiendo de la localización de los lípidos de interés y fueron colocadas en viales con líquido de centelleo. La cuantificación se llevó a cabo 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.

#### **14.- Radioinmunoensayo (RIA) para cuantificar la concentración de progesterona.**

Las muestras de suero se obtuvieron a partir de sangre periférica. La sangre se recolectó por sangrado retro-orbital para lo cual los animales fueron anestesiados en una atmósfera de CO<sub>2</sub>, e inmediatamente después fueron sacrificados por dislocación cervical. La sangre fue incubada durante 15-30 min a temperatura ambiente hasta que se formó el coágulo. Luego las muestras fueron centrifugadas durante 10 min a 3000 rpm y se separó el suero en nuevo tubo.

Las muestras de suero se llevaron a 50 µl con PBS. Después se extrajeron con ciclohexano (dos extracciones con 300 µl cada una). En cada extracción se separó la fase orgánica y se evaporó con calor. Finalmente se resuspendieron los esteroides con 100 µl PBS. El RIA se realizó según el protocolo descrito por Martínez Calejman y col. (2010). Brevemente, se agregaron a las muestras 100 µl de la progesterona marcada con tritio (aproximadamente



25.000 dpm/100 µl) y 100 µl de la dilución apropiada del anticuerpo anti progesterona. Se incubaron a 4°C durante toda la noche. Siempre en frío, se agregaron 200 µl de carbón/dextrano y se centrifugaron a 3.200 rpm durante 15 minutos. Una alícuota del sobrenadante fue contada en un contador de centelleo líquido.

### **15.- Medición de endocannabinoides por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) acoplada a espectrometría de masa (ME).**

La medición de endocannabinoides por HPLC acoplado a espectrometría de masa fue realizada en muestras de plasma de sangre periférica de ratones preñados. La sangre se recolectó por sangrado retro-orbital, para lo cual los animales fueron anestesiados en una atmósfera de CO<sub>2</sub>, e inmediatamente después fueron sacrificados por dislocación cervical. Los tubos donde se recolectó la sangre fueron previamente tratados con 20 µl de EDTA 0,5M para evitar la coagulación. Una vez recolectada la sangre fue centrifugada durante 10 min a 3.000 rpm y el plasma fue pasado a un nuevo tubo el cual fue mantenido a -70°C hasta su utilización.

La cuantificación se realizó a través de una colaboración con el laboratorio de la Dra. Heather B. Bradshaw en la Universidad de Indiana siguiéndose el siguiente protocolo.

Para el análisis de lípidos, se retiraron 0,6 ml de cada fracción y se les añadieron 2 ml de metanol de grado HPLC. Se añadió a cada muestra [<sup>2</sup>H<sub>8</sub>]-AEA (200 pmol) y se diluyó con agua grado HPLC para hacer una solución acuosa al 75%. Los lípidos fueron extraídos como se ha descrito previamente por Bradshaw y col. (2006). Brevemente, se acondicionaron columnas de extracción en fase sólida 500 mg C8 Bond Elut (Varian) con 5 ml de metanol grado HPLC, seguido de 3 ml de agua HPLC. Se cargaron en columnas individuales las soluciones acuosas conteniendo un 75% de las fracciones, luego fueron lavadas con 20 ml de agua. Se realizaron cinco eluciones secuenciales (1.5 ml de cada uno de 30, 50, 85 y 100% de metanol) las cuales se recogieron para el análisis de espectrometría de masas. El

análisis de la muestra de los lípidos se llevó a cabo de la siguiente manera: Una parte de cada uno de los eluidos se cargó utilizando una SCL10Avp Shimadzu (Wilmington, DE, EE.UU.) en un inyector automático de fase inversa Zorbax 2.1 columna LC ¥ 50 mm C8 que se mantuvo a 40 ° C. La formación del gradiente de HPLC a un caudal de 200 ml por min se logró mediante un sistema compuesto de un controlador Shimadzu y dos bombas Shimadzu LC10ADvp. Los niveles de lípidos en las muestras se analizaron en el modo de control de la reacción múltiple (MRM) en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo, usando ya sea el API 3000 o el API 4000 (Applied Biosystems / MDS Sciex, Foster City, CA, EE.UU.), con ionización por electrospray. Los cálculos en los experimentos de cuantificación se basaron en curvas de calibración con patrones sintéticos.

## **16.- RT-PCR.**

Se llevaron a cabo estudios de RT-PCR para analizar la expresión del ARNm de la enzima FAAH y de los receptores de progesterona (PR-A y PR-B).

### *Extracción del ARN:*

Luego de la purificación de las PBMCs, estas fueron homogeneizadas directamente en TRIZOL (Invitrogen, California, USA) manteniéndolas en frío. La extracción del ARN total fue realizada según las instrucciones del fabricante. La cuantificación del ARN total se realizó midiendo la absorbancia a 260nm y su pureza por medio de la relación entre la absorbancia a 260nm y a 280nm.

### *Preparado del ADNc:*

El ARN (2 µg) de cada muestra fue tratado con DNAasa. Para obtener la primer cadena de ADNc se realizó una transcripción inversa utilizando la enzima M-MLV (Moloney Murine

Leukemia virus reverse transcriptase, Invitrogen, California, USA) y cebadores aleatorios (Random primers), en presencia de un inhibidor recombinante de ribonucleasas.

*Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):*

Se utilizaron cebadores (primers) específicos diseñados con el programa Primer-Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)) sobre la base genética de *Mus musculus* (Tabla 4). Dado que la secuencia del ARNm de PR-A está incluida en la secuencia del ARNm de PR-B, los primers de PR se diseñaron para PR-B y para la suma de PR-A y de PR-B (PR-A/PR-B).

Cebadores utilizados:

Gen	Sentido	Secuencia	Producto (pb)
FAAH	Sentido	5'-GAG ATG TAT CGC CAG TCC GT-3'	287 pb
	Anti-sentido	5'-ACA GGC AGG CCT ATA CCC TT-3'	
PR-A/PR-B	Sentido	5'-GGTGGGCCTTCCTAACGAG-3'	121 pb
	Anti-sentido	5'-GACCACATCAGGCTCAATGCT-3'	
PR-B	Sentido	5'-GGTCCCCCTTGCTTGCA-3'	121 pb
	Anti-sentido	5'-CAGGACCGAGGAAAAGCAG-3'	
$\beta$ -actina	Sentido	5'-TGT TAC CAA CTG GGA CGA CA-3'	392 pb
	Anti-sentido	5'-TCT CAG CTG TGG TGG TGA AG-3'	

**Tabla 4. Secuencias de los cebadores utilizados.**

La reacción fue llevada a cabo utilizando como moldes los ADNc previamente obtenidos por transcripción reversa, junto con desoxiribioncleotidos trifosfatos, Taq DNA polimerasa (2,5 U), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM) y los cebadores correspondientes (0,5  $\mu$ M).

Las condiciones adecuadas de hibridación y extensión fueron puestas a punto para cada reacción. En cada experimento se realizaron controles negativos, donde se colocaron todos los reactivos menos el ADNc.

*Detección de la amplificación:*

Los productos resultados de la amplificación fueron sembrados en geles de agarosa al 2 % conteniendo bromuro de etidio (1 mg/ml) y separados mediante una corrida electroforética a 100 V. Una vez finalizada la corrida electroforética las bandas fueron visualizadas mediante el uso de un transiluminador, los geles fueron fotografiados con una 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 de la misma muestra. Los pesos moleculares de las bandas fueron determinados de acuerdo a los pesos moleculares de los marcadores de peso molecular utilizados.

**17.- Análisis de la reabsorción embrionaria (RE).**

Los animales control (PBS) y los tratados con LPS se sacrificaron en el día 9 de gestación y el porcentaje de reabsorción embrionaria fue calculado como:  $n^{\circ}$  de embriones reabsorbidos / ( $n^{\circ}$  de embriones viables +  $n^{\circ}$  de embriones reabsorbidos) X 100.

**18.- Análisis de infiltración leucocitaria.**

Los animales control (PBS) y los tratados con LPS se sacrificaron 6 h luego de la inyección con PBS o LPS, según corresponda. Se extrajeron los sitios de implantación, los cuales fueron fijados en formol al 10% en PBS durante 24h. Luego, el tejido se deshidrató mediante sucesivos pasajes en alcoholes (desde 70% hasta 100%). Finalmente, se incluyeron en parafina y se realizaron los cortes de 5  $\mu$ m de espesor. Previo a proceder con la técnica de

tinción con hematoxilina-eosina, se procedió a eliminar la parafina de los cortes histológicos.

Luego de la tinción, los cortes se montaron con Permount.

Se tomaron fotos de los sitios de implantación a dos aumentos: 40x y 100x.

Se contaron los tipos celulares de interés en un campo con aumento 100x. Los resultados fueron expresados como la sumatoria de células infiltrantes en 10 campos observados. Para cada tratamiento se contó con un n=4.

### **19.- Medición de la actividad de la sintasa de óxido nítrico.**

Fue utilizada la técnica de Bredt & Snyder (1989) modificada, que se basa en la conversión de  $^{14}\text{C}$ -L-arginina y  $\text{O}_2$  a  $^{14}\text{C}$ -L-citrulina y NO. Puesto que estos son producidos en cantidades equimolares, se puede utilizar la medición de citrulina, que permanece en la muestra, como medida de la cantidad de NO (el cual es rápidamente destruido) producida.

Las deciduas provenientes de los animales de los distintos tratamientos fueron pesadas y homogeneizadas en 500  $\mu\text{l}$  de buffer HEPES completo (HEPES 20,14 mM, pH=7,4, conteniendo  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  0.45mM, DTT 2.5mM, NADPH 0.5mM y valina 25mM (inhibidor de las arginasas)).

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

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

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

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

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

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

## **20.- Análisis estadístico de los datos.**

La evaluación estadística (InfoStat versión 2010 estudiantil) se realizó aplicando análisis de varianza (ANOVA) de uno o dos factores seguido por el test de comparaciones múltiples de Tukey o Duncan. Para el caso de dos tratamientos se utilizó la prueba “t” de Student (para muestras no pareadas). Los supuestos de normalidad y homosedasticidad se analizaron por medio del test de Shapiro-Wilks y de Levene respectivamente. En el caso que los datos no hayan cumplido con los supuestos se realizaron transformaciones de los mismos (escores normales, por ejemplo). Los datos fueron expresados como los valores medios  $\pm$  SEM (error estándar de la media). Las diferencias se consideraron significativas cuando p fue menor a 0,05.

## **Resultados**

---

## Resultados:

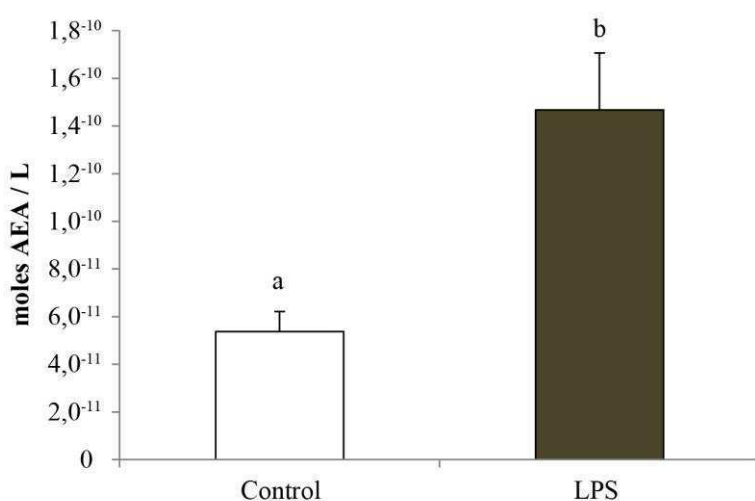
### 1.- Participación del SEC en la RE inducida por LPS.

Antecedentes de nuestro laboratorio demuestran, en estudios *in vitro*, la participación del sistema endocannabinoide en los mecanismos moleculares involucrados en la RE inducida por LPS (Vercelli y col., 2009a y 2009b). Por este motivo, realizamos un abordaje *in vivo* para confirmar la participación del SEC en la RE inducida por LPS.

#### 1.1.- Efecto del LPS sobre los niveles plasmáticos de AEA.

Dado que diferentes fallas reproductivas en mujeres (abortos recurrentes, embarazos ectópicos, etc.) están asociadas con altos niveles de AEA plasmática (Taylor y col., 2011; Gebeh y col., 2013), analizamos, en primer lugar, los niveles plasmáticos de este endocannabinoide en nuestro modelo de RE. Para ello se administró LPS (1 $\mu$ g/g de peso) a ratones de la cepa BALB/c en día 7 de gestación y se midieron los niveles séricos de AEA a las 12h del tratamiento con la endotoxina.

Como se puede observar en la figura 18, los niveles de AEA plasmática del grupo tratado con LPS son significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) que los del grupo control.



**Figura 18. Niveles plasmáticos de AEA. Letras diferentes indican una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ). n=7 animales por grupo.**



## 1.2.- Efecto de la AEA en la RE.

Habiéndose encontrado que la AEA plasmática se encuentra aumentada en los animales que padecen RE inducida por LPS, se decidió estudiar si, a su vez, la administración de este endocannabinoide podría modificar la tasa de reabsorción. Para ello se inyectaron intraperitonealmente (i.p.) con meta-anandamida (m-AEA, un análogo no hidrolizable de la AEA) ratones BALB/c en el día 7 de gestación. Se administraron dos o tres dosis de 0,03 µg/g de peso (Tabla 5).

Tratamiento	% RE
Control	9,13 ± 0,35
2 dosis m-AEA	11,50 ± 1,80
3 dosis m-AEA	15,90 ± 2,38 (*)

**Tabla 5. Tasa de RE en animales tratados con m-AEA. Tasa de RE: sitios reabsorbidos en el día 9 de gestación sobre sitios totales multiplicado por 100. \* p < 0,05 (vs. Control) . n=4 animales por grupo.**

En la tabla 5 se observa que los animales tratados con tres dosis de m-AEA muestran un aumento significativo de la tasa de RE respecto de los animales del grupo control. Este resultado sugiere que la AEA podría inducir RE *per se*.

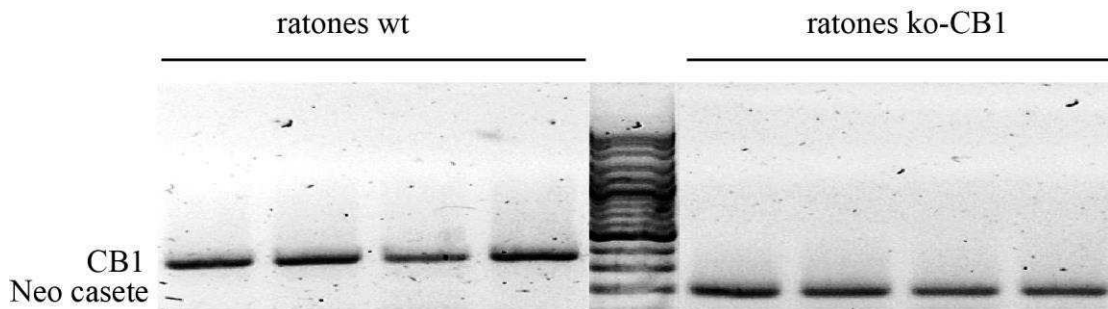
## 1.3.- Participación del receptor de cannabinoides tipo 1 (CB1) en la RE inducida por LPS.

Para analizar si los endocannabinoides participan en la RE inducida por LPS, se utilizaron ratones (CD1) transgénicos deficientes en el receptor de cannabinoides tipo 1 (ko-CB1).

### 1.3.1.- Control del genotipo de los ratones silvestres y de los ko-CB1.

A fin de determinar el genotipo de las colonias silvestre (wt) y *knock-out* (ko-CB1) se realizó una PCR de ADN genómico según se describe en la sección de materiales y métodos. Como se observa

en la figura 19, de los ratones wt se obtuvo un producto para el gen CB1 y ninguno para el casete de neomicina (Neo casete). En cambio, en la PCR de ADN genómico de los ratones ko-CB1 se puede observar el producto correspondiente al casete de neomicina y ausencia del producto correspondiente al gen CB1 (figura 19).



**Figura 19. Genotipificación de las colonias CD1. PCR de ADN genómico obtenido de fragmentos de colas de ratones wt y ko-CB1, para el gen CB1 (366pb) y para el Neo casete (200pb).**

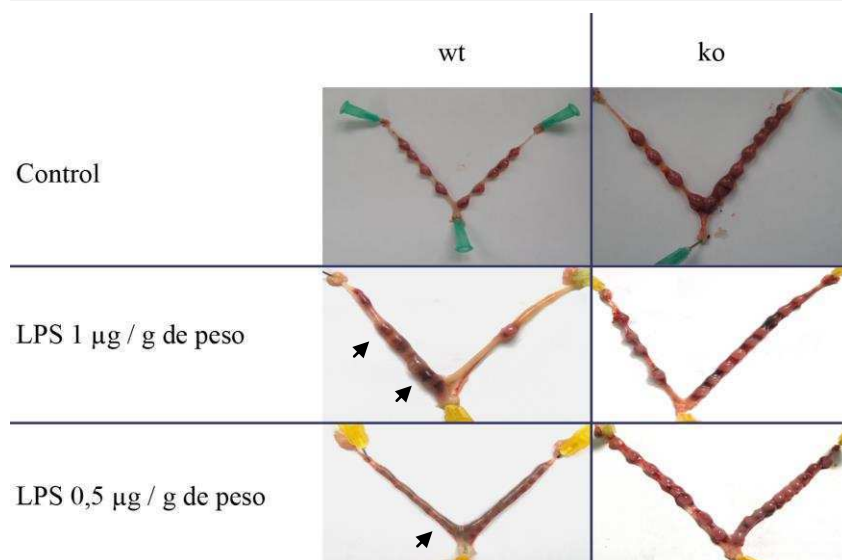
### 1.3.2.- Participación del CB1 en la RE inducida por LPS.

Dado que los ratones disponibles para el desarrollo de esta parte de la tesis son de una cepa distinta a la utilizada por Ogando y col. (2003) y a la utilizada por Vercelli y col. (2009a) en los trabajos *in vitro* sobre la participación del SEC en los mecanismos relacionados con la RE, en primer lugar se puso a punto el modelo de RE en los ratones CD1. Se inyectaron animales wt con dos dosis diferentes de LPS (0,5 y 1  $\mu\text{g/g}$  de peso) en el día 7 de gestación y se determinaron las tasas de RE en cada caso. Con ambas dosis de la toxina se observaron elevados porcentajes de RE en los ratones wt (Figura 20). La administración de las mismas dosis de LPS a ratones ko-CB1 produjeron menores tasas de RE respecto a lo observado en los wt (Figura 20, panel superior). Cabe destacar que los animales ko-CB1 se reproducen con igual eficiencia que los ratones wt, la duración de la preñez no varía, como tampoco el número de crías por parición.

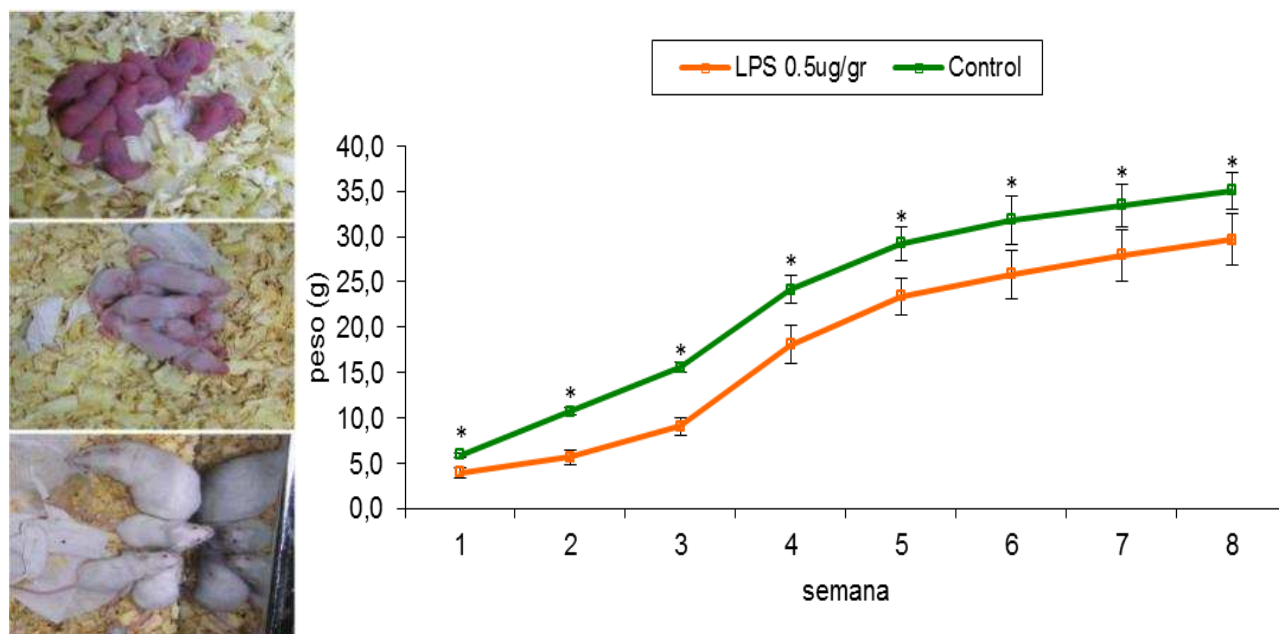
Con el propósito de analizar una posible morbi-mortalidad neonatal asociada al tratamiento con la endotoxina en los animales transgénicos, se permitió continuar con la preñez hasta su fin a un grupo

de estos ratones tratados con LPS 0,5  $\mu\text{g/g}$  de peso. Observamos que las crías nacieron a término (día 19) y con aspecto normal, al compararlos con un grupo de ratones nacidos de hembras no tratadas. Además, se registró el peso de las crías semanalmente hasta la semana ocho de edad. Las crías provenientes de hembras tratadas con LPS presentan menor peso desde el nacimiento hasta la adultez, respecto de las crías control. Sin embargo, las curvas de ganancia de peso en ambos grupos son similares (Figura 21). La descendencia de los animales ko-CB1 no mostró diferencias respecto de los controles en los siguientes parámetros de desarrollo físico: el momento de apertura de los ojos, el crecimiento del cabello y uñas, y la erupción de los dientes.

Tratamiento	Wt	Ko-CB1
Control	0,0 $\pm$ 0,0 %	0,0 $\pm$ 0,0 %
LPS (1 $\mu\text{g/g}$ de peso)	82,0 $\pm$ 11,9 % (*)	28,5 $\pm$ 3,0 %
LPS (0,5 $\mu\text{g/g}$ de peso)	69,4 $\pm$ 22,0 % (*)	3,4 $\pm$ 1,4 %



**Figura 20. Reabsorción embrionaria inducida por LPS en la cepa CDI.** Panel superior, tasas de RE en ratones wt y ko-CB1 (%RE: sitios reabsorbidos sobre sitios totales multiplicado por 100, en día 9 de gestación). \*  $p < 0,05$  (wt vs ko). Panel inferior, fotos ilustrativas de los cuernos uterinos, las flechas muestran ejemplos puntuales de sitios reabsorbidos. Los mismos se identifican por su menor tamaño y aspecto hemorrágico.  $n=5$  animales por grupo.

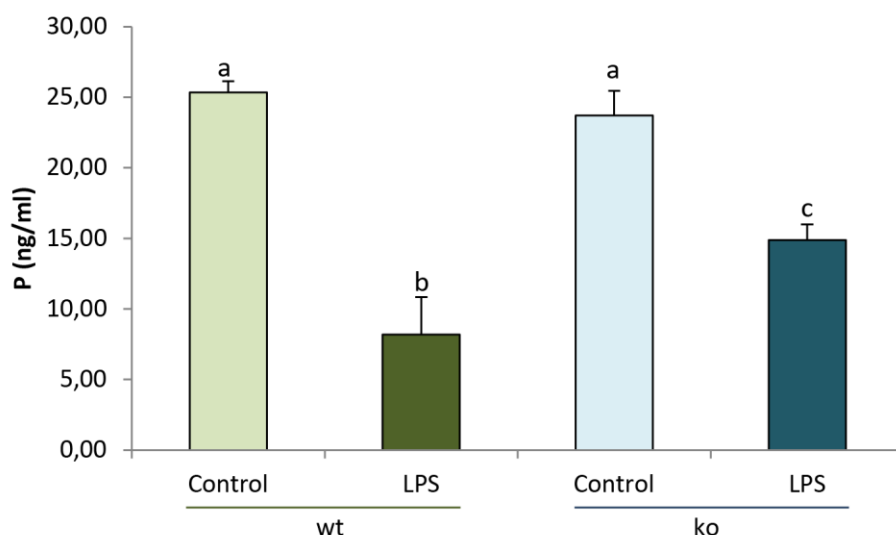


**Figura 21. Curvas de ganancia de peso en ratones ko-CB1.** El panel de la izquierda muestra fotografías de crías nacidas, en distintas etapas de crecimiento, de madres ko-CB1 tratadas con LPS 0,5  $\mu\text{g/g}$  de peso. En el panel de la derecha: curvas de aumento de peso de crías nacidas de madres ko-CB1 controles y tratadas con LPS 0,5  $\mu\text{g/g}$  de peso. \*  $p < 0,05$ .  $n=4$  animales por grupo.

### 1.3.3.- Efecto del LPS sobre la progesterona plasmática en ratones ko-CB1.

Dado que nuestro modelo de RE inducido por LPS presenta una disminución significativa de los niveles séricos de P y que la suplementación con esta hormona revierte las tasas de RE (Aisemberg y col., 2013), procedimos a determinar los niveles séricos de P en los ratones wt y ko-CB1 tratados con la endotoxina. Para ello, animales en día 7 de gestación fueron tratados con LPS (0,5  $\mu\text{g/g}$  de peso) y se obtuvo el suero para determinar los niveles de la hormona 12 h luego del tratamiento. El LPS provocó la disminución de los niveles séricos de P tanto en los ratones wt como los ko-CB1 en comparación con sus respectivos controles (Figura 22). Sin embargo, al comparar los wt con los ko-

CB1 tratados con la endotoxina, se puede destacar que la disminución de los niveles de P es de menor magnitud en los ko-CB1. En estos últimos, la disminución en los niveles de progesterona es de un 38% mientras que en los wt alcanza el 70%.



**Figura 22. Niveles séricos de progesterona en los ko-CB1. Letras diferentes indican una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ). n=8 animales por grupo.**

## **2.- El SEC de las PBMC murinas y su posible modulación por LPS. Papel de la P sobre los efectos de la endotoxina en estas células.**

Debido a que diferentes fallas reproductivas en mujeres (abortos recurrentes, embarazos ectópicos, entre otros) están asociados tanto con bajos niveles de actividad de FAAH (enzima que degrada la AEA) en linfocitos de sangre periférica, como con altos niveles de AEA plasmática (Maccarrone y col., 2010; Taylor y col., 2011; Gebeh y col., 2013), decidimos estudiar la expresión del SEC en PBMC murinas y luego analizamos su posible modulación por LPS.

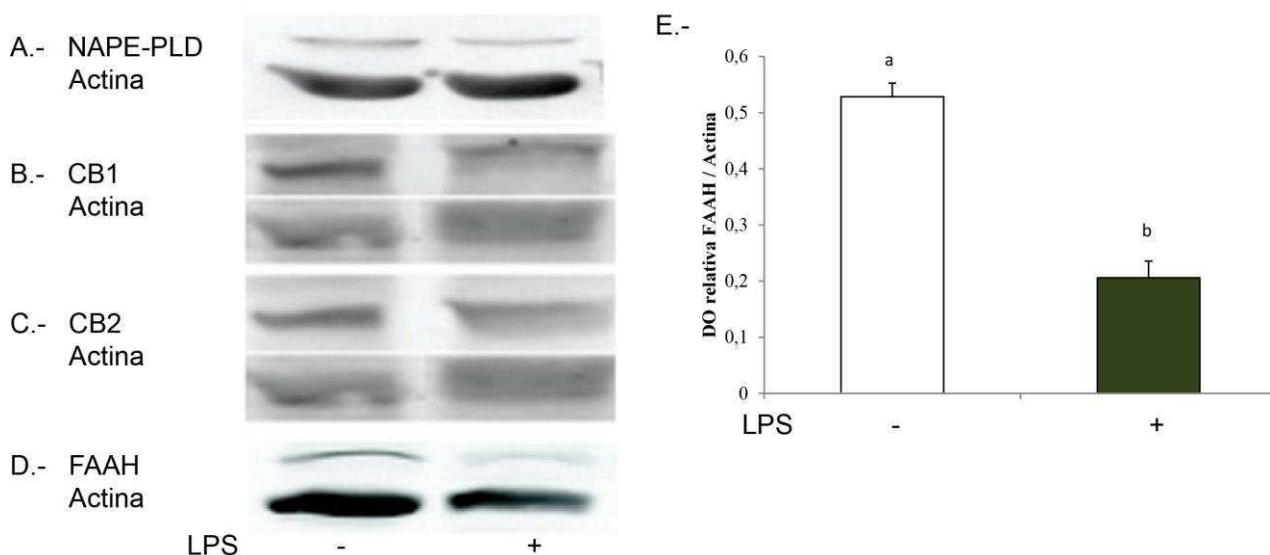
### **2.1.- Presencia del SEC en las PBMC murinas y su posible modulación por LPS.**

En primer lugar demostramos, por la técnica de western blot, la expresión proteica del SEC en las PBMC murinas de hembras de la cepa BALB/c no preñadas adultas. La figura 23 muestra la

presencia de la NAPE-PLD (enzima principal de síntesis de AEA), de los receptores CB1 y CB2 (receptores de cannabinoides) y de la FAAH (enzima que degrada la AEA).

Otro grupo de hembras se trataron con LPS 1  $\mu\text{g/g}$  de peso para analizar luego de 6 h si éste podría modular los niveles proteicos de los diferentes componentes del SEC.

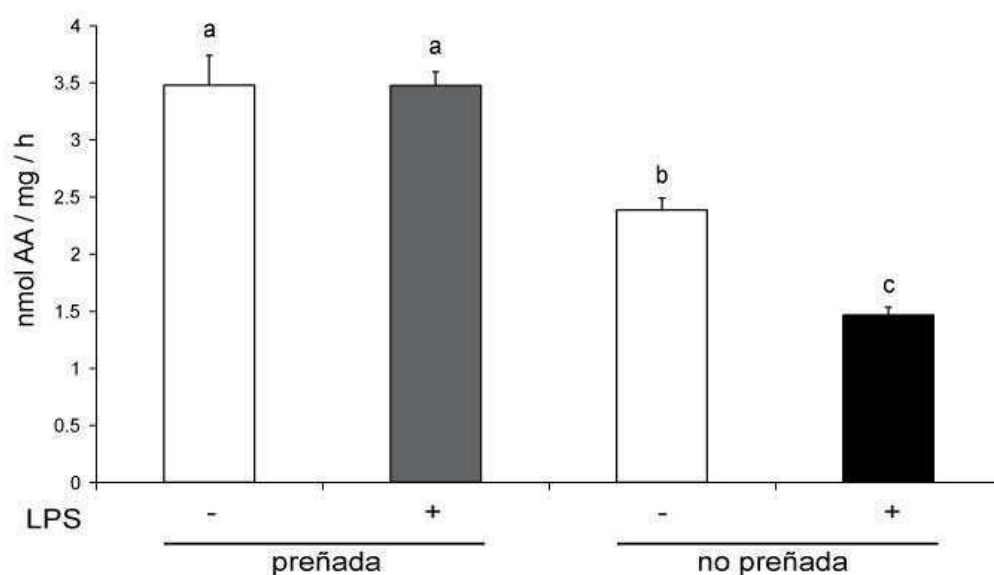
Aunque tanto la enzima NAPE-PLD como los receptores CB1 y CB2 se expresan en estas células, no se encontraron diferencias significativas entre los niveles proteicos de expresión de los animales tratados con LPS y de los animales control (Figura 23A, B y C). En cambio, el tratamiento con LPS disminuye significativamente los niveles proteicos de la enzima de degradación FAAH (Figura 23D y E).



**Figura 23. Presencia del SEC en PBMC y efecto del tratamiento con LPS. Geles representativos de: A.- NAPE-PLD. B.- CB1. C.- CB2. D.- FAAH. E.- Cuantificación del WB de FAAH en PBMC de animales controles y tratados con LPS por 6 h. Letras diferentes indican una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).  $n=4$  animales por grupo.**

Luego analizamos la actividad enzimática de la FAAH en PBMC de ratones no preñados y provenientes de ratones preñados en el día 7 de gestación, en ambos casos tratados y no tratados con LPS por 6 h. En primer lugar, los resultados muestran que la enzima FAAH de las PMBC provenientes de animales preñados presenta mayor actividad (aproximadamente un 32%) que la de

las células de los no preñados (Figura 24).



**Figura 24. Actividad de FAAH en PBMC de hembras preñadas y no preñadas, control y tratadas con LPS. Letras diferentes indican una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).  $n=5$  animales por grupo.**

Debido a que en las PBMC de ratones no preñados el tratamiento con LPS disminuye los niveles proteicos de FAAH a las 6 h, se decidió comparar la actividad de esta enzima entre PBMC provenientes de ratones preñados y no preñados desafiados durante 6h con LPS. En la figura 24 se observa que, en concordancia con lo observado con los niveles de la proteína, el LPS disminuye la actividad de FAAH de los PBMC de los animales no preñados. Es clave destacar que en las células de ratones preñados la endotoxina no tuvo efecto sobre la actividad de esta enzima.

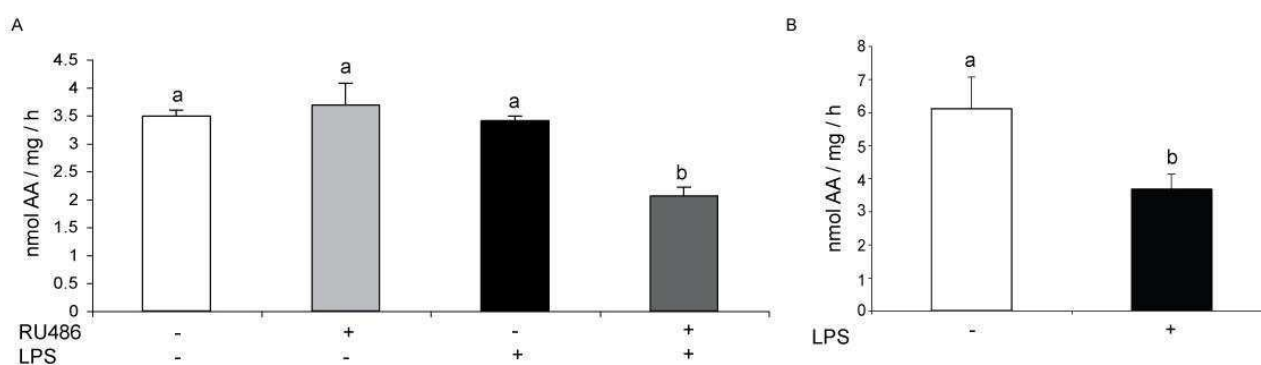
## 2.2.- Papel de la P sobre el efecto del LPS sobre la FAAH en las PBMC.

Dado que se ha informado que la P puede modular la actividad de la FAAH (Maccarrone y col., 2003), y que la misma se encuentra elevada durante la preñez, analizamos si esta hormona podría ser la responsable de las diferencias observadas en la respuesta al LPS entre animales preñados y no preñados. Para ello a ratones preñados en el día 7 de gestación se les administró RU486, un antagonista de los receptores de progesterona, y se evaluó la actividad de FAAH en PBMC a las 6 h del LPS. La figura 25A muestra que el pre-tratamiento de los animales preñados con RU486

disminuye significativamente los niveles de actividad de la FAAH en PBMC de animales tratados con LPS (un 42% aproximadamente).

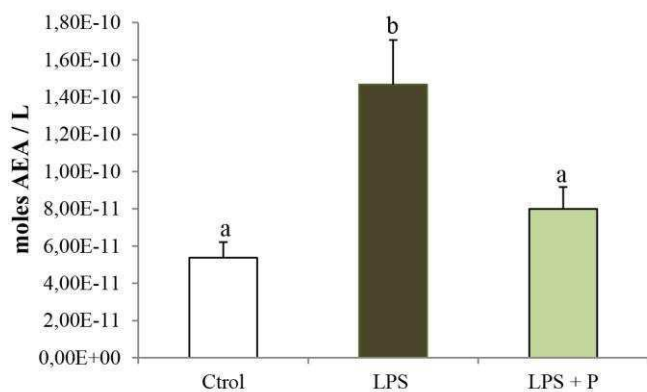
En nuestro modelo de RE, los niveles séricos de P disminuyen un 10% a las 6 h del tratamiento con LPS, mientras que luego de 12 h la disminución es del 60% (Aisemberg y col., 2013). Por ello, se decidió analizar qué ocurría con la actividad de FAAH a las 12 h de tratamiento con LPS, donde los niveles séricos de P están disminuidos. La figura 25B muestra que luego de 12 h hay un efecto de la endotoxina sobre la FAAH. Particularmente se observa una disminución de la actividad enzimática de aproximadamente un 36%.

En paralelo analizamos el efecto sobre los niveles plasmáticos de AEA en estos animales. Se observó que el tratamiento de ratones preñados con LPS durante 12 h aumenta los niveles de este endocannabinoide (Figura 26). Debido a que a las 12 h los niveles de progesterona disminuyen marcadamente, decidimos evaluar el efecto del suplemento con P sobre los niveles de AEA. Para ello, un grupo de animales fue inyectado con P y 2 h después con LPS. Se obtuvieron los PBMC de los mismos 12 h post-administración de la endotoxina. Se encontró que el suplemento con P previene el aumento de los niveles de AEA inducido por el tratamiento con LPS.



**Figura 25. Actividad de FAAH en PBMC de ratones preñados. A.- PBMC de ratones tratados 6 h con LPS y RU486. B.- PBMC de ratones tratados 12 h con LPS. Letras diferentes indican una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).  $n=5$  animales por grupo.**





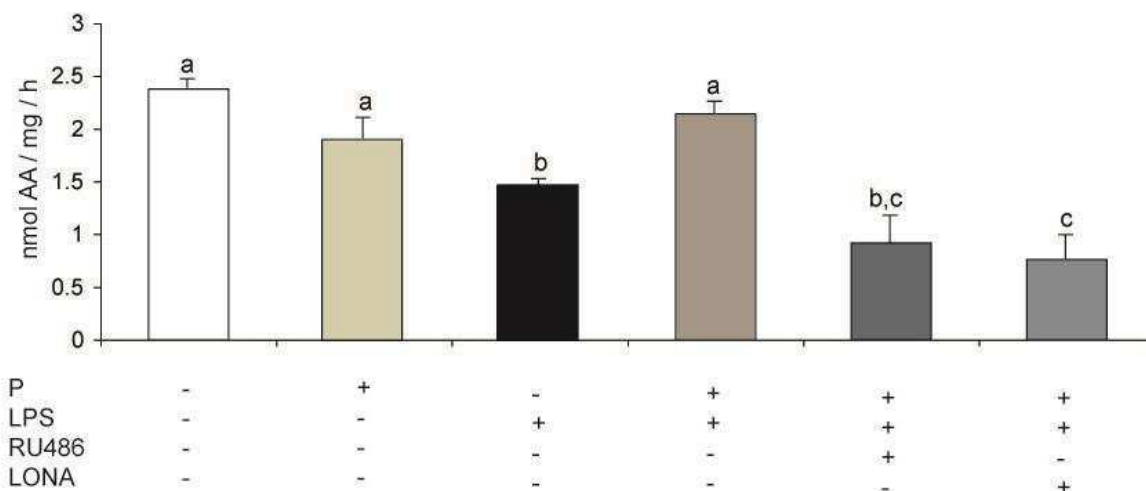
**Figura 26. Niveles plasmáticos AEA. Letras diferentes indican una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).  $n=7$  animales por grupo.**

Estos resultados sugieren que niveles elevados de P previenen el efecto del LPS sobre la actividad de la FAAH. Para corroborar esta hipótesis, se suplementaron ratones no preñados (los cuales tienen normalmente niveles bajos de P en sangre) con P y posteriormente se les administró LPS. En la figura 27 se muestran los resultados obtenidos. La actividad de la FAAH de PBMC de ratones no preñados disminuyó cuando fueron tratados con LPS por 6 h, y este efecto fue revertido al suplementar con P.

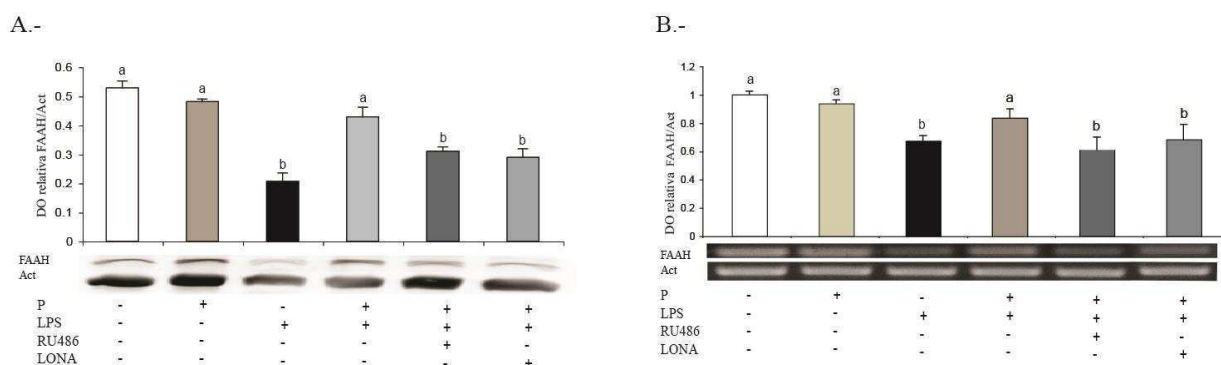
Quisimos profundizar este análisis evaluando si la progesterona actuaba a través de sus propios receptores clásicos (PR). Para ello se trató a los animales con P, RU486 y LPS. Se observó que al administrar RU486, el efecto protector de la P desaparece (Figura 27). Dado que este antagonista también actúa sobre los receptores de glucocorticoides (GR), se decidió utilizar lonaprizan (LONA), un antagonista con mayor especificidad y selectividad por los PR. El resultado obtenido fue el mismo y se muestra en la figura 27.

Al analizar los niveles proteicos y los niveles del ARNm de FAAH en PBMC de ratones no preñados (Figura 28 A y B, respectivamente) se observó que el tratamiento con LPS produjo una disminución significativa en sendos casos; y que al suplementar con P, se revertía el efecto del LPS. En concordancia con los resultados obtenidos sobre la actividad de FAAH, la administración de los antagonistas de los receptores de P, RU-486 y LONA bloqueó el efecto de la P sobre los cambios en

la expresión inducidos por la endotoxina.



**Figura 27. Actividad de FAAH en animales no preñados. Letras diferentes indican una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).  $n=4$  animales por grupo.**



**Figura 28. Niveles de FAAH en ratones no preñados. A.- Niveles proteicos. B.- Niveles de ARNm. Letras diferentes indican una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).  $n=5$  animales por grupo.**

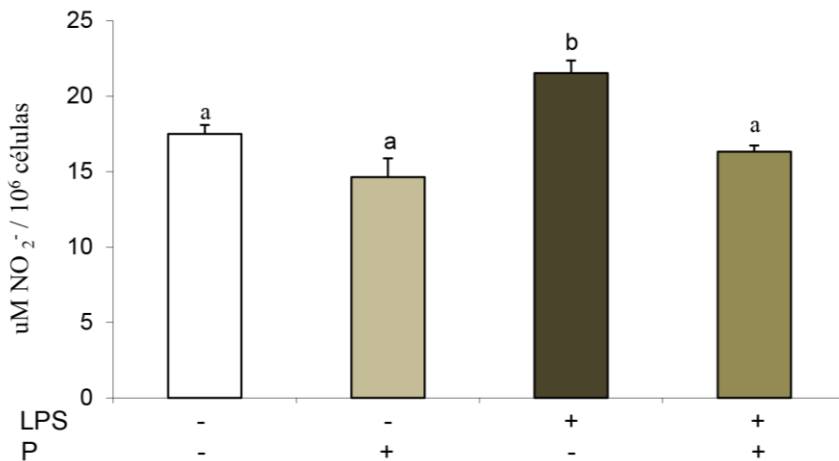
Estos resultados sugieren que la P revierte el efecto de la endotoxina actuando a través de sus receptores nucleares.

### **3.- Efecto del LPS sobre el sistema nitrérgico de las PBMC, y el posible papel protector de la P.**

En nuestro modelo de RE inducida por LPS se observó un incremento en los niveles de NO tanto en la decidua como en el útero, el cual alcanzó un máximo a las 6 h post-inyección (Ogando y col., 2003). Asimismo, la administración de aminoguanidina (AG), un inhibidor selectivo de la NOSi, previno la RE inducida por LPS. Salter y col. (1991) describieron que el LPS produce un aumento en la producción de óxido nítrico e infiltración leucocitaria en diversos tejidos. Por la técnica de inmunohistoquímica, Ogando y col. (2003) observaron infiltrados de macrófagos y granulocitos NOSi y CD14 positivos en la decidua. Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos propusimos estudiar si el tratamiento de ratones no preñados con LPS modulaba los niveles de NO en las PBMC. En la figura 29 se observa que la administración de LPS incrementó la liberación de NO producido por estas células (se determinaron los niveles de nitratos y nitritos acumulados en los sobrenadantes de cultivo de 24 h). Dado que en otros sistemas la P tiene un efecto protector sobre la inflamación (De Nicola y col., 2013) y que uno de los objetivos de este trabajo es evaluar el papel de la hormona en nuestro sistema, se analizó si la P podría modular el incremento en la producción de NO inducido por LPS en las PBMC. Se suplementaron animales no preñados con P y luego de 6 h del tratamiento con la endotoxina se obtuvieron las PBMC. En la figura 29 se puede observar que el tratamiento con P revierte el incremento de los niveles de NO inducido por LPS.

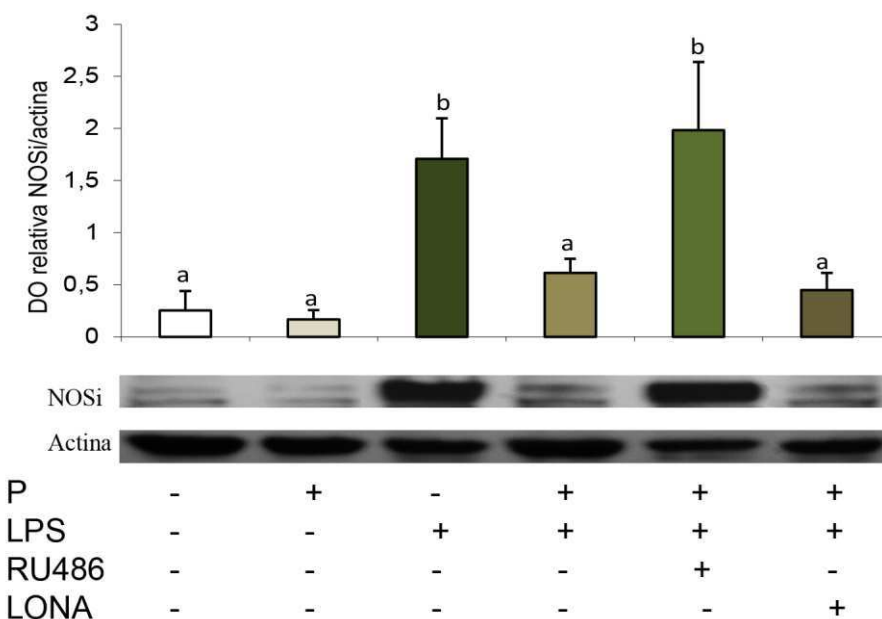
Resultados previos de nuestro laboratorio indican que el incremento del NO inducido por el tratamiento con la endotoxina en el útero y la decidua es acompañado por un aumento en la expresión proteica de la NOSi (Ogando y col., 2003). Por tal motivo se analizaron los niveles de esta enzima en las PBMC de animales no preñados. La figura 30 presenta los resultados obtenidos, se observó un aumento de los niveles proteicos de la NOSi cuando se trata a los animales con LPS. Asimismo, se determinaron los niveles de expresión de la enzima en las PBMC provenientes de animales suplementados con P y encontramos que el tratamiento con la hormona revirtió el

incremento en la expresión de la NOSi inducido por la endotoxina.



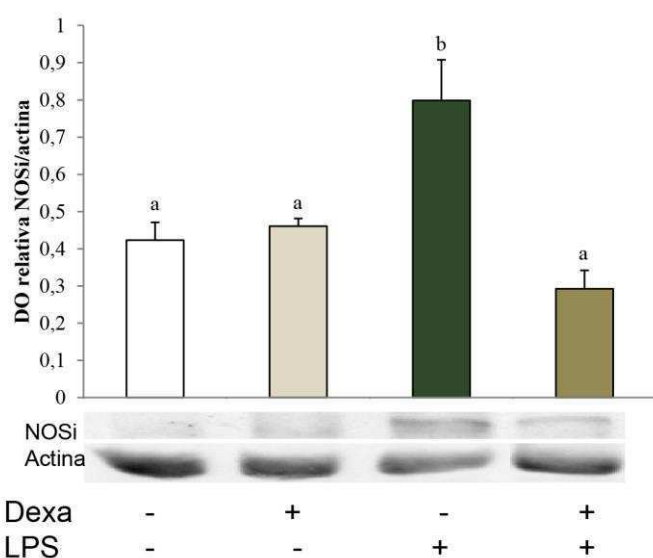
**Figura 29. Producción de nitratos y nitritos en PBMC de ratones no preñados. Letras diferentes indican una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).  $n=5$  animales por grupo.**

Posteriormente estudiamos si en el efecto de la P sobre la NOSi estaban involucrados sus receptores clásicos y para ello se utilizaron nuevamente los antagonistas de los receptores de progesterona. De la figura 30 concluimos que, cuando los animales fueron co-tratados con LPS, P y RU486, no se observó el efecto de la P. Sin embargo, cuando se utilizó LONA en lugar de RU486, se observó una disminución de la expresión de la NOSi en las PBMC.



**Figura 30. Niveles proteicos de NOSi en PBMC de animales no preñados tratados con antagonistas de los receptores de P. Letras diferentes indican una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ). n=4 animales por grupo.**

Dado que RU486 no es únicamente antagonista de los PR sino también de los GR, se analizó si un agonista específico de los GR, como dexametasona (Dexa), mimetizaba los efectos observados al suplementar con P. En la figura 31 se observa que la administración de Dexa revierte el efecto del LPS.



**Figura 31. Niveles proteicos de NOSi en PBMC de animales no preñados tratados con un agonista de los receptores de glucocorticoides. Letras diferentes indican una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ). n=4 animales por grupo.**

Estos resultados sugieren que el efecto protector de la P sobre el sistema nitrérgico es a través de los receptores de glucocorticoides.

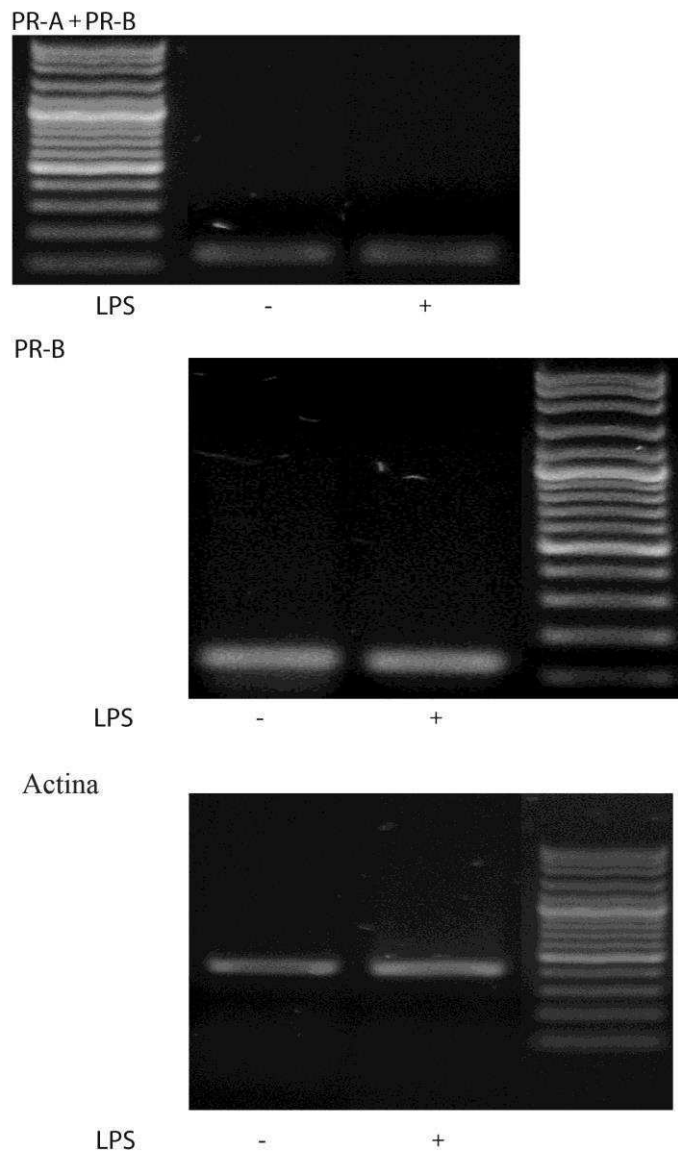
#### **4.- Analizar la presencia de los receptores nucleares de P en las PBMC.**

Dado que existen controversias acerca de la presencia de los receptores de progesterona clásicos en las PBMC de ratón, se decidió caracterizar la presencia de éstos en PBMC de animales no preñados.

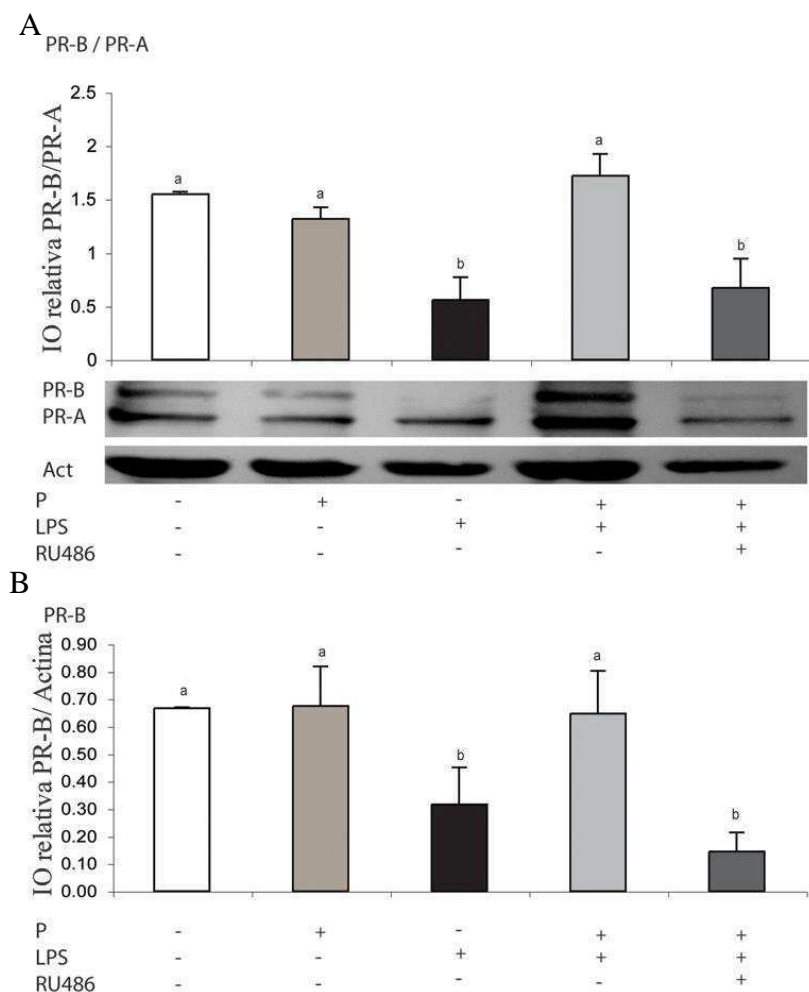
En primer lugar se realizó una PCR para estudiar la presencia de ARN mensajero (ARNm) de estos receptores. Debido a las características del gen de PR pudimos diseñar dos pares de cebadores, uno específico para PR-B y el otro par que no diferencia entre PR-A y PR-B. En la figura 32 se observa el producto de la PCR, coincidentemente con lo esperado para ambos cebadores, lo que sugiere la presencia de ambos receptores en las PBMC de ratón.

Para confirmar que ambas isoformas se expresan, se estudió la expresión proteica de las mismas por la técnica de WB. En la figura 33 se observan las bandas correspondientes a las dos isoformas, lo cual confirma los resultados obtenidos por PCR.

Nos resultó interesante analizar si el LPS puede modular la expresión de los receptores de P en las PBMC. Por ello analizamos los niveles proteicos de estas isoformas (PR-B y PR-A) cuando se trataban ratones no preñados con LPS. Los resultados muestran que con el tratamiento con la endotoxina disminuye la relación PR-B/PR-A (Figura 33A). También se analizó si la progesterona modula sus propios receptores. Al co-administrar LPS y P, la relación PR-B/PR-A volvió a los valores de los animales control, mientras que cuando se usó RU486, el efecto de la P no se evidenció (Figura 33A). Asimismo, se observó que cuando los ratones fueron tratados con LPS, los niveles de PR-B disminuyeron; que el tratamiento con P revirtió el efecto de la endotoxina; y que al utilizar RU486, la protección ejercida por la P desapareció (Figura 33B).



**Figura 32.** Expresión del ARNm de los receptores nucleares de *P.* RT-PCR para (A) PR-A+PR-B y para (B) PR-B. n=4 animales por grupo.

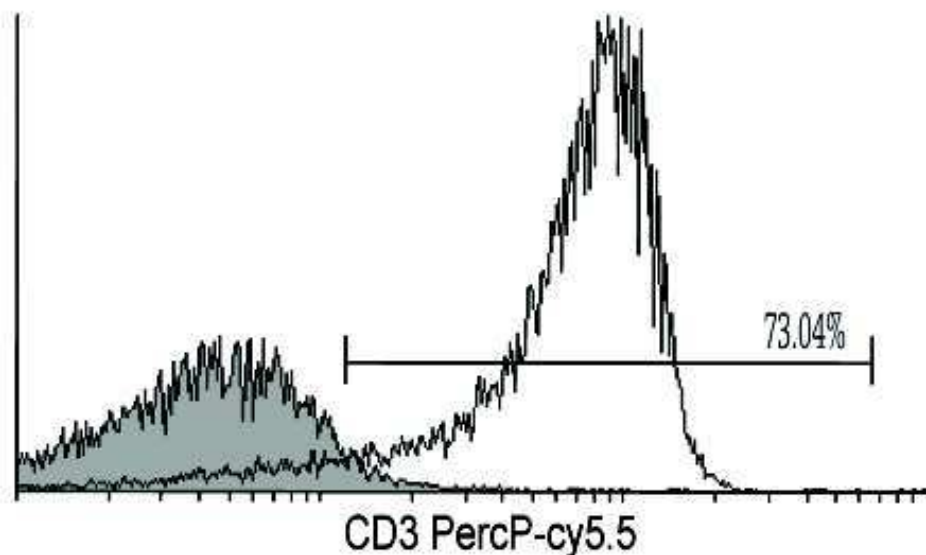


**Figura 33. Niveles proteicos de PR-A y PR-B. A.- Relación PR-B / PR-A. B.- PR-B. Letras diferentes indican una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).  $n=3$  animales por grupo.**

## 5.- Los linfocitos T entre las PBMC.

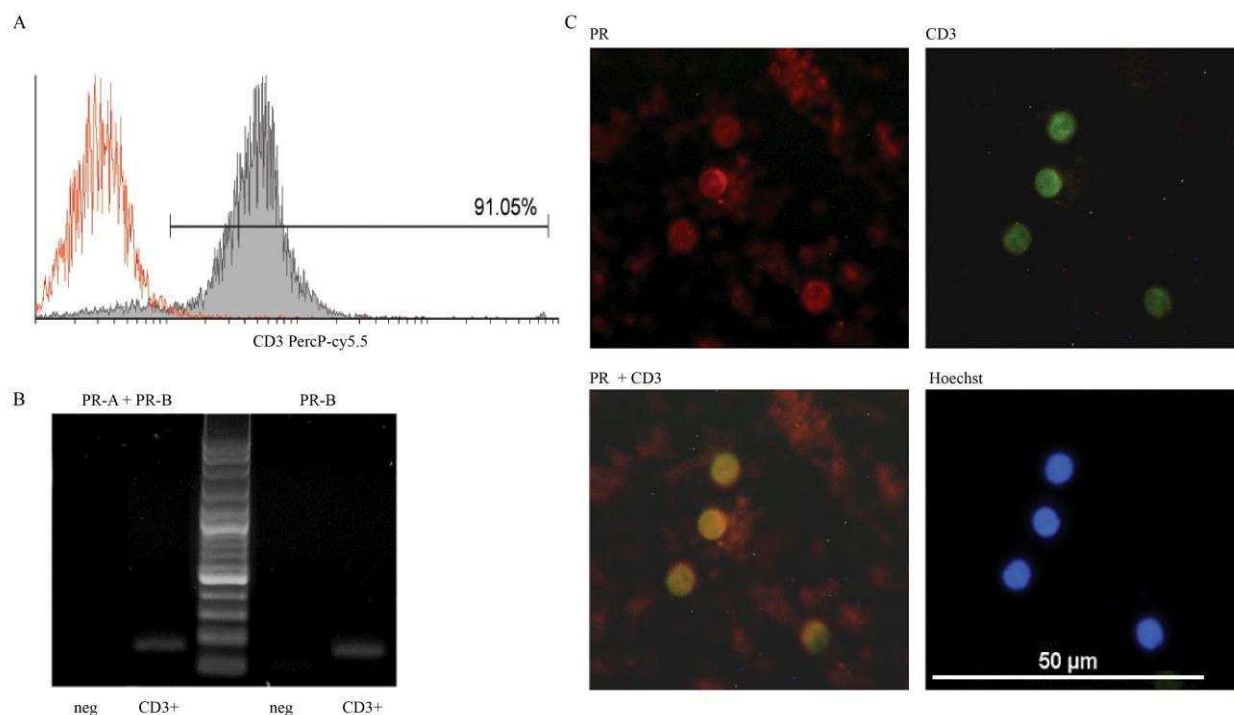
Las PBMC incluyen distintas poblaciones celulares, por ello se procedió a analizar la proporción de células CD3 positivas (marcador de linfocitos T) en la preparación de células aisladas con Histopaque. El análisis por medio de citometría de flujo indicó que al menos un 75% de las PBMC son células CD3+ (Figura 34).





**Figura 34. Citometría de flujo representativa de células CD3+. n=4 animales por grupo.**

A partir de las PBMC se purificaron las células T con un sistema de esferas magnéticas y se determinó que el 91% de las células recuperadas eran CD3+ (Figura 35A). En ellas se evaluó la presencia de los PR por medio de RT-PCR y de inmunocitoquímica. Los productos de la RT-PCR elaborada sobre estas células mostraron la presencia de ambos amplicones (PR-A+PR-B y PR-B, Figura 35B). Mediante inmunocitoquímica demostramos que las células que tienen marcación positiva para PR, lo son también para el marcador CD3 (Figura 35 C).

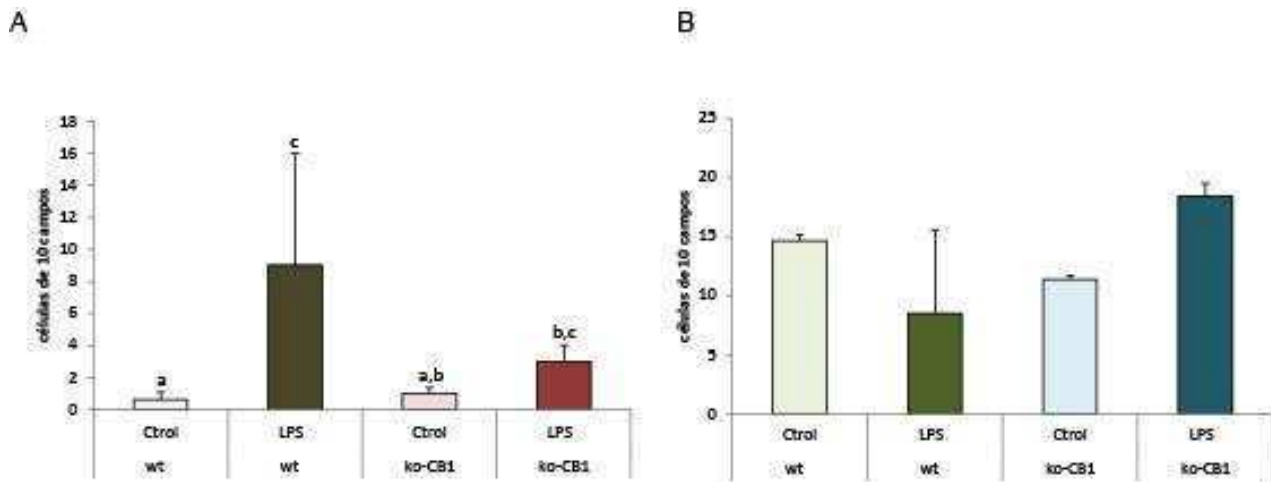


**Figura 35. Expresión de PR en células T (CD3+).** A.- Histograma del análisis por citometría de flujo que muestra la población de células CD3 positivas; B.- RT-PCR para PR-A+PR-B y para PR-B; C.- Inmunocitoquímica para CD3+ y PR+. Se incluye la marcación nuclear mediante tinción de Hoechst. n=4 animales por grupo.

## 6.- Analizar la tasa de infiltración leucocitaria inducida por LPS en ratones ko-CB1.

En nuestro modelo de RE en ratones BALB/c se observó un incremento de la infiltración leucocitaria en la decidua luego de 6 h del tratamiento con LPS (Ogando y col., 2003). Por otro lado, cuando comparamos la tasa de RE entre animales CD1 wt y ko-CB1, observamos que estos últimos tienen una tasa menor (figura 20). Con estos resultados previos nos propusimos analizar la infiltración de células inmunes en las deciduas de los sitios de implantación 6 h después que los ratones wt o ko-CB1 fueran tratados con LPS durante 6 h. En la figura 36A se puede observar que el tratamiento con la endotoxina produjo, en los ratones wt un incremento significativo de linfocitos

en el infiltrado, lo que no se observó en los animales ko-CB1. Cuando analizamos la infiltración de neutrófilos, no se observó incremento de este tipo celular en ninguno de los casos (Figura 36B).



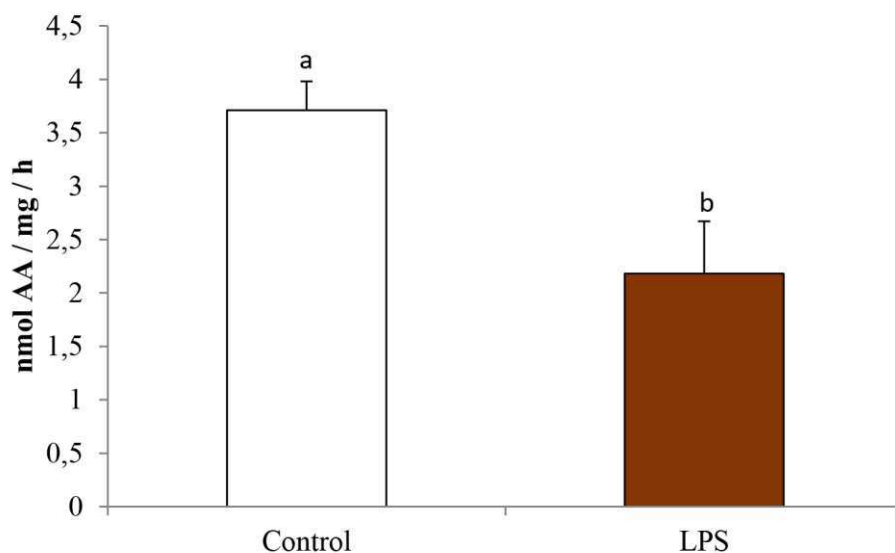
**Figura 36. Infiltración de células inmunes en las deciduas de los sitios de implantación.** Los resultados se expresan como sumatoria de células infiltradas en 10 campos con un aumento de 1000x. A.- Linfocitos infiltrados. B.- Neutrófilos infiltrados. Diferentes letras indican diferencia significativa ( $p < 0,05$ ). n=4 animales por grupo. Animales de la cepa CD1 fueron tratados con LPS por 6 h. Los sitios de implantación fueron procesados para realizar la tinción H&E y la posterior evaluación citológica de los sitios.

## 7.- Estudiar el efecto de las células inmunes infiltrantes sobre la decidua en la RE inducida por LPS.

Durante la reabsorción embrionaria inducida por LPS la decidua es un tejido que sufre grandes cambios y que finalmente es expulsado. La decidua es altamente reactiva al LPS y el tratamiento con la endotoxina, tanto *in vivo* como *in vitro*, produce daño tisular, aumento de la producción de NO y nitración de proteínas (Ogando y col., 2003; Vercelli y col., 2009a).

Vercelli y col. (2009a) observaron un aumento del 75% en la actividad de la FAAH en cultivos primarios de decidua cuando éstas eran tratadas *in vitro* con LPS por 12 h. Es por ello que

decidimos analizar en primer lugar el efecto *in vivo* de la endotoxina sobre la actividad de esta enzima. Ratones de la cepa BALB/c fueron tratados con LPS (1µg/g de peso) en el día 7 de gestación y a las 12 h se evaluó la actividad de FAAH en las deciduas provenientes de estos animales. En la figura 37 se observa que la actividad de FAAH disminuyó aproximadamente un 40% cuando los animales fueron tratados con LPS.



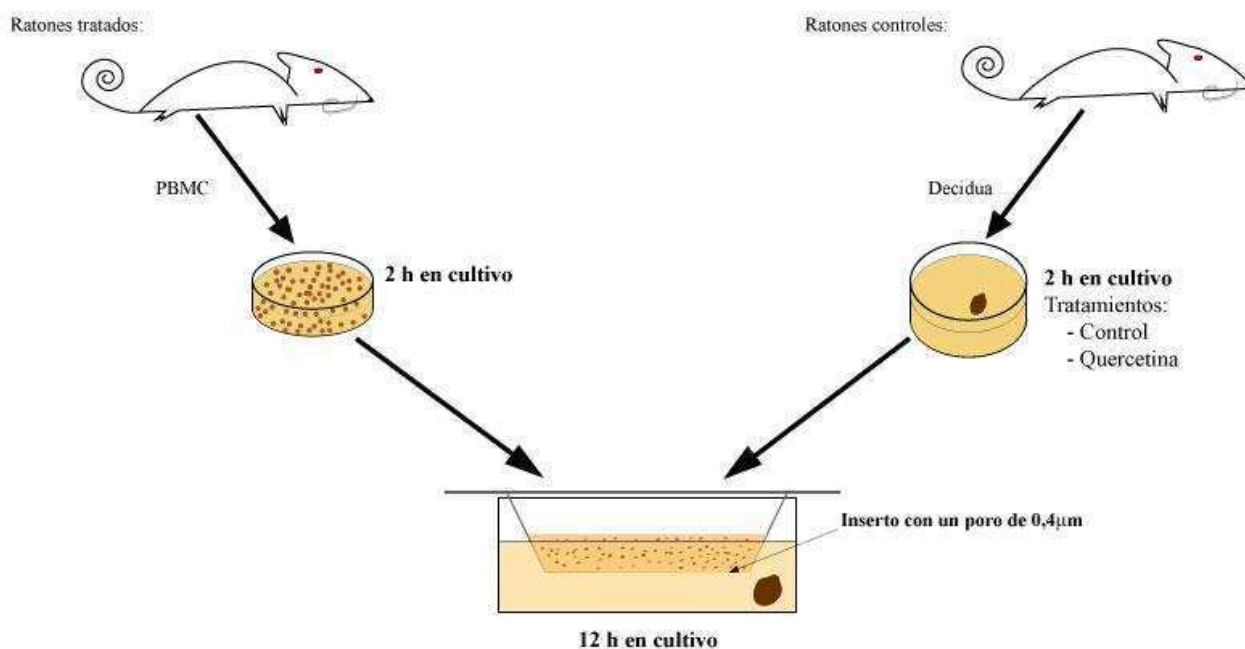
**Figura 37. Actividad de FAAH en deciduas de ratones preñados tratados con LPS durante 12h.**

**Letras diferentes indican una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).  $n=5$  animales por grupo.**

Encontramos una aparente contradicción entre los resultados *in vitro* del trabajo de Vercelli y los resultados *in vivo* presentados en esta tesis. Observamos que la incubación *in vitro* con LPS aumentó la actividad de la FAAH mientras que la administración *in vivo* de la endotoxina disminuyó dicha actividad. Nuestro modelo de RE se caracteriza por la presencia de un infiltrado en la decidua de células leucocitarias (Ogando y col., 2003), lo que sugiere que la diferencia entre estos dos modelos podría deberse a la presencia o ausencia de infiltración. Para poner a prueba esta hipótesis se puso a punto un modelo de co-cultivo con insertos. El mismo consiste en la creación de un sistema con dos cámaras separadas por una membrana con un poro de 0,4 µm, que sólo puede ser atravesada por factores solubles. En la cámara inferior se coloca una decidua proveniente de un

animal no tratado en día 7 de gestación y en la cámara superior se colocan PBMC de ratones preñados con diferentes tratamientos (Figura 38). El dispositivo se coloca durante 12 h en estufa a 37°C y con atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

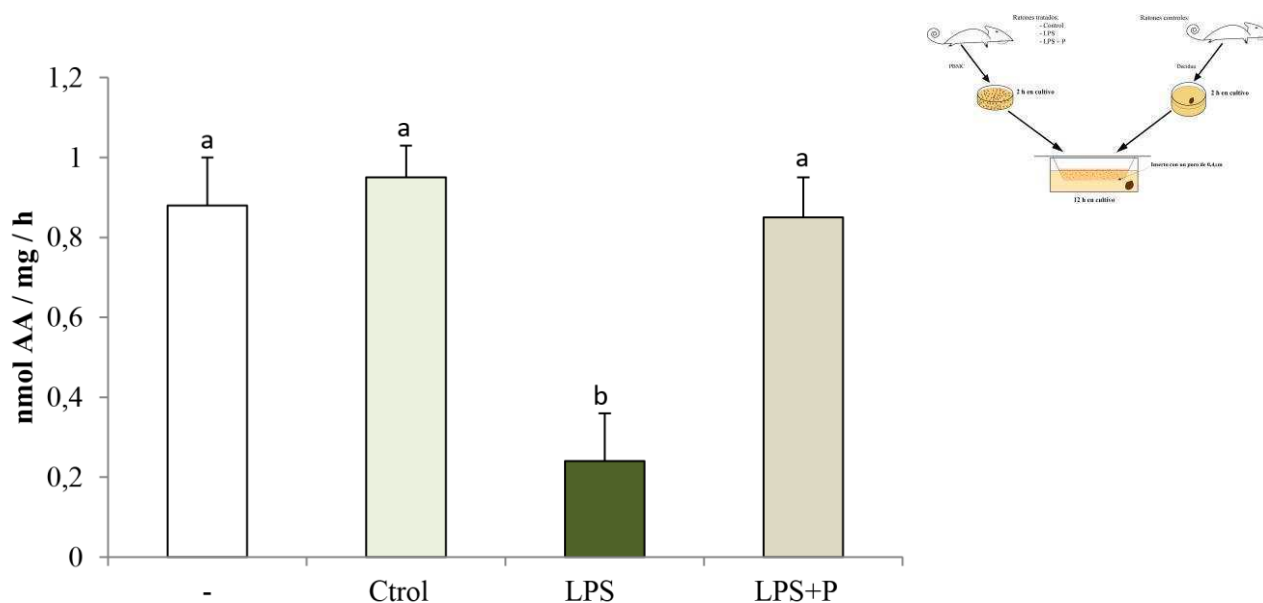
Se realizaron co-cultivos con PBMC provenientes de ratones preñados de día 7 de gestación tratados con vehículo y, como control interno, cultivos de deciduas sin la presencia de las PBMC. No se observaron diferencias al comparar la actividad de la FAAH en las deciduas no expuestas a células y la actividad de las cultivadas con células provenientes de animales control. Sin embargo, cuando las deciduas de animales controles se cultivaron en presencia de PBMC provenientes de animales tratados con LPS, la actividad de FAAH decidual disminuyó significativamente respecto a la actividad observada en los co-cultivos con células de animales no tratados con la endotoxina (Figura 39).



**Figura 38. Esquema sistema de insertos.**

Como mencionamos anteriormente, en nuestro modelo de RE inducida por LPS se observó una disminución significativa de los niveles séricos de P y una reversión de la reabsorción al suplementar los animales con la hormona (Aisemberg y col., 2013). Por ello nos planteamos

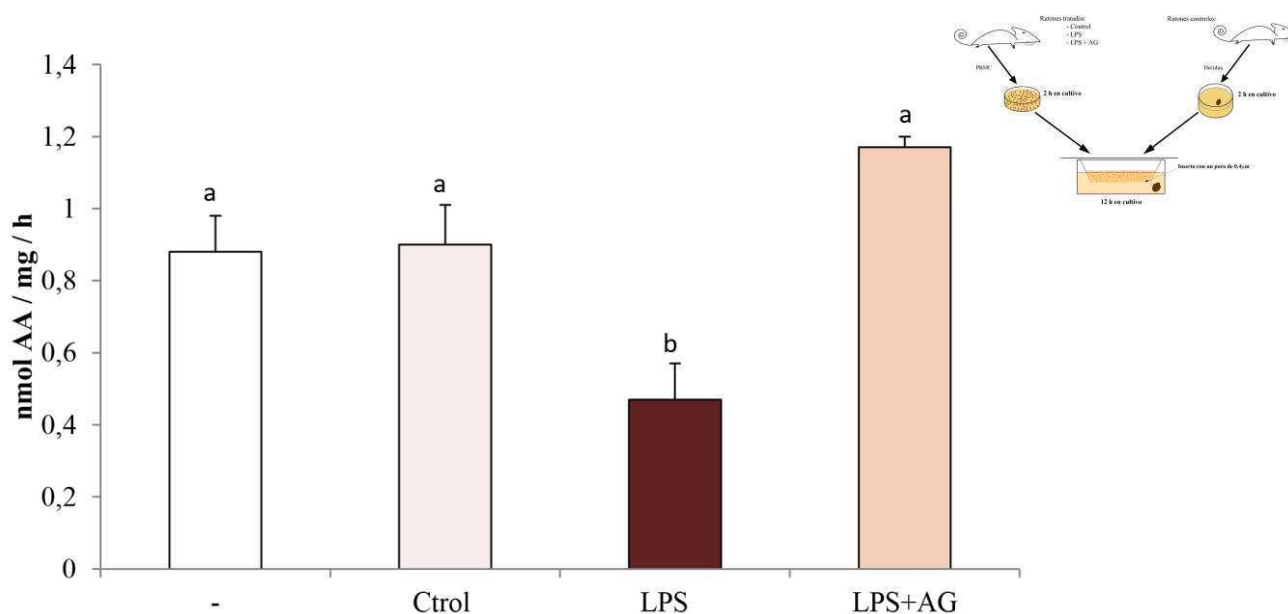
estudiar el efecto de las PBMC provenientes de animales a los cuales se les ha administrado LPS y P sobre la actividad de FAAH de las deciduas control. En la última columna de la figura 39, se puede observar cómo la P revirtió los efectos de la endotoxina sobre la actividad de FAAH la cual alcanzó niveles similares a la actividad observada en las deciduas expuestas a las PBMC de animales controles. Estos resultados sugieren que las células inmunes provenientes de animales preñados tratados con LPS secretan algún factor soluble que modula la actividad de la FAAH de la decidua.



**Figura 39. Actividad de FAAH de deciduas co-cultivadas con PBMC mediante el sistema de insertos. Letras diferentes indican una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).  $n=6$  animales por grupo.**

Dada la importancia del NO en nuestro modelo de reabsorción embrionaria (Ogando y col., 2003; Vercelli y col., 2009) y los resultados mostrados anteriormente donde el LPS indujo un aumento tanto de los niveles de NO como de la expresión de la NOSi en PBMC de ratones no preñados, se decidió analizar si el NO podría ser uno de los factores solubles involucrados. Para lo cual se mantuvo el sistema de insertos y en este caso las PBMC provinieron de animales tratados con aminoguanidina (AG, un inhibidor selectivo de la NOSi) y LPS. La figura 40 muestra que el tratamiento con AG revirtió la inhibición causada por el LPS de la actividad de FAAH de la

decidua.

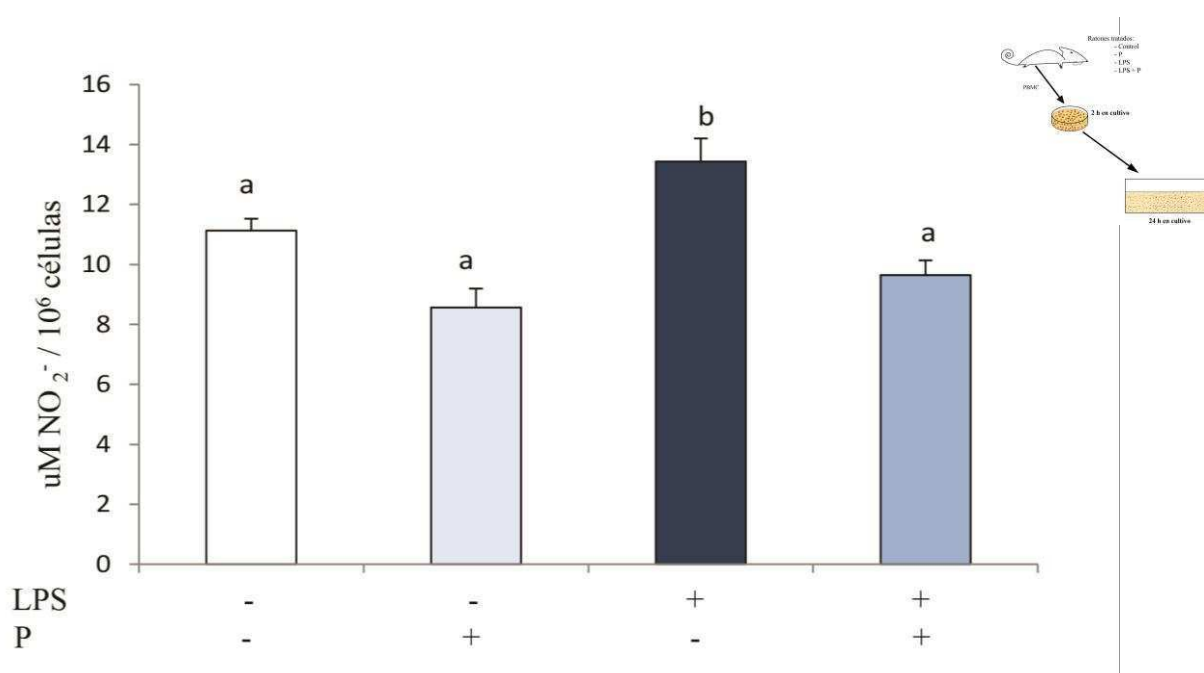


**Figura 40. Actividad de FAAH de deciduas co-cultivadas con PBMC. Letras diferentes indican una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).  $n=6$  animales por grupo.**

Para confirmar que las PBMC de ratones preñados tratados con LPS aumentan la liberación de NO y que la P revierte este efecto, se realizaron los mismos cultivos y se determinaron los niveles de nitratos y nitritos en los sobrenadantes. Observamos un aumento en los niveles de NO en el medio de cultivo cuando las PBMC provienen de animales tratados con LPS, mientras que con las PBMC de animales tratados con LPS y suplementados con P, los niveles de NO volvieron a los observados en los controles (Figura 41).

El NO puede reaccionar con el radical superóxido para generar peroxinitrito, un radical altamente oxidante y nitrante (Grisham y col., 1999). Resultados previos de nuestro laboratorio indican que en nuestro modelo de RE se produce peroxinitrito y que éste participa en la nitración de la COX-2, modificando su actividad (Aisemberg y col., 2007). A fin de estudiar si el radical peroxinitrito es otro de los factores solubles involucrado en la inhibición de la actividad de FAAH decidua, se realizaron co-cultivos con quercetina (Quer), un secuestrador de peroxinitritos. Se colocaron

deciduas de animales control en la cámara inferior del sistema de insertos en presencia de Quer en el medio de cultivo, mientras que en la cámara superior se colocaron las PBMC provenientes de animales preñados control o tratados con LPS. En ausencia de Quer, las PBMC provenientes de ratones tratados con LPS provocaron una disminución de la actividad de FAAH en la decidua (Figura 42). Por otra parte, las PBMC de animales tratados con LPS no modularon la actividad de FAAH en presencia del secuestrador de peroxinitritos (Figura 42).

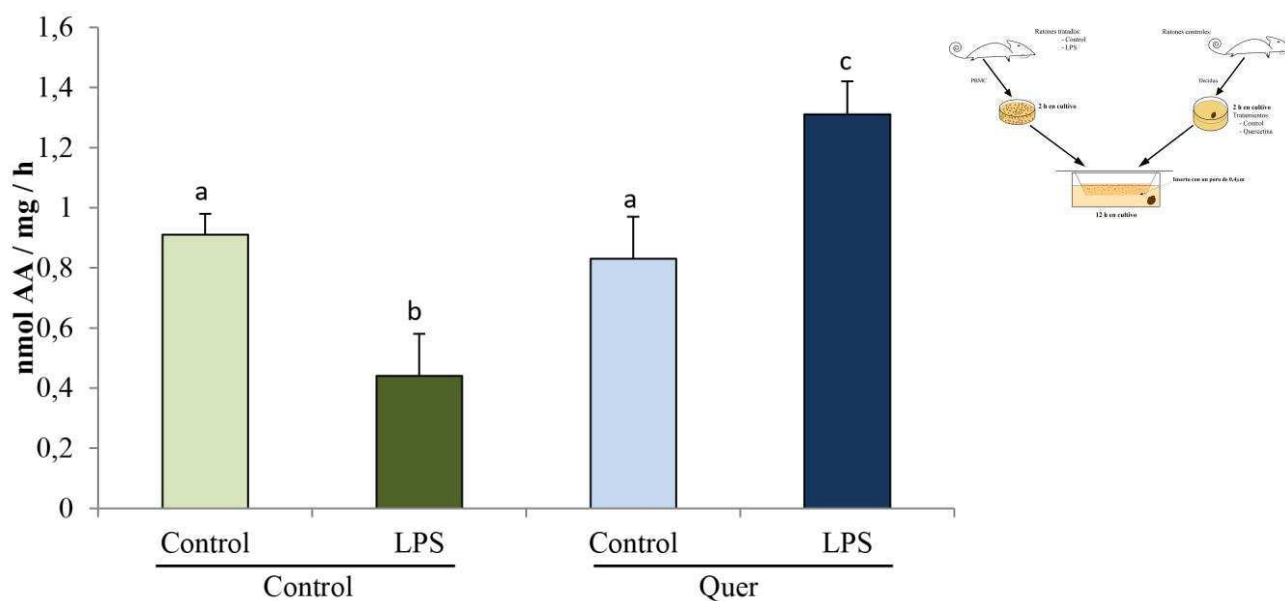


**Figura 41. Niveles de nitratos y nitritos liberados al medio de cultivo por las PBMC. Letras diferentes indican una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).**

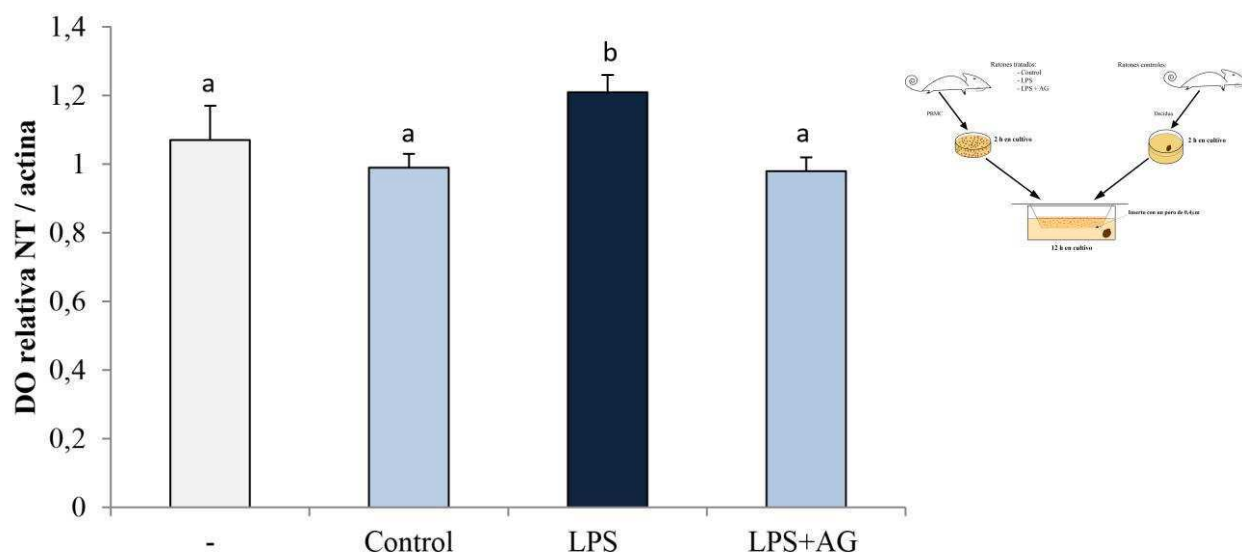
El peroxinitrito reacciona con los residuos de las proteínas produciendo la nitración de las mismas, lo que se traduce en general en cambios en la actividad enzimática (Eiserich y col., 1998). A partir de los resultados obtenidos con Quer, decidimos analizar el nivel de nitración de las proteínas de la decidua co-cultivadas con PBMC de distinto origen. En primer lugar, los resultados de la figura 43 muestran que las PBMC provenientes de animales controles no ejercieron efecto *per se* sobre la nitración proteica de las deciduas en cultivo. Sin embargo, en las deciduas cultivadas en presencia de PBMC provenientes de ratones tratados con LPS, se produjo un aumento en los niveles de



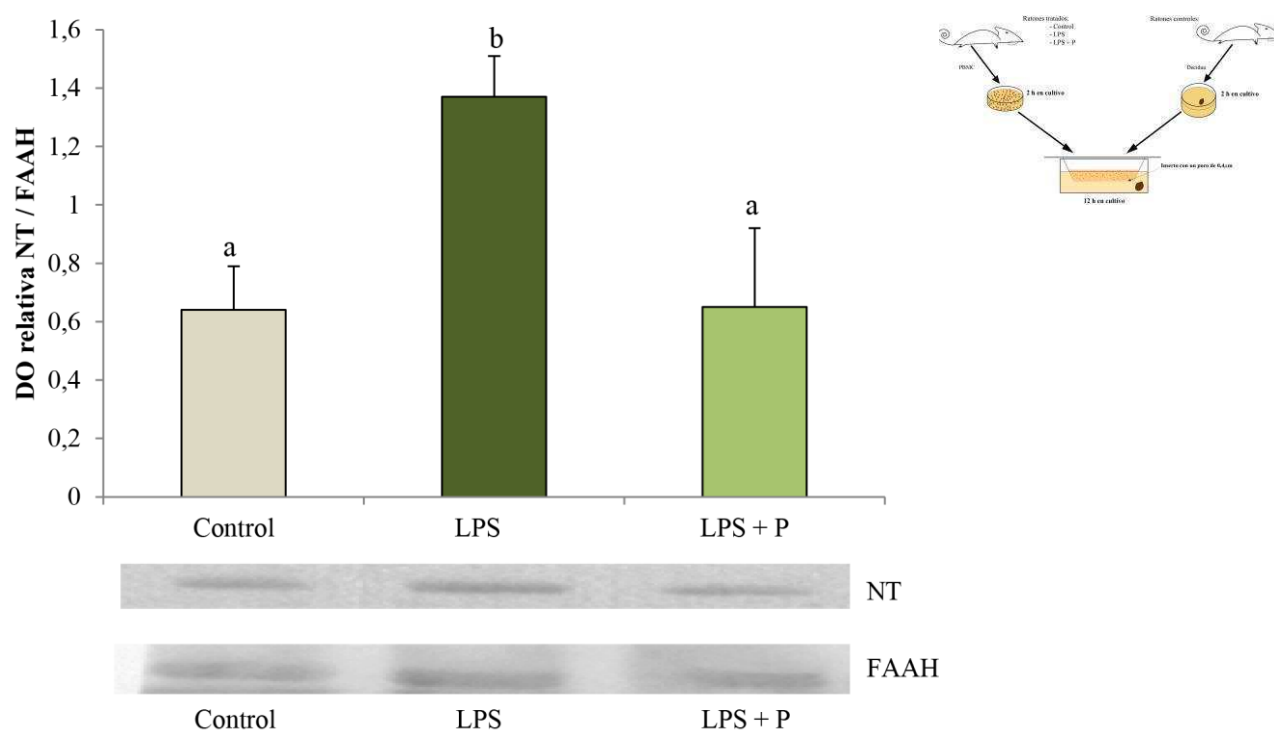
nitricación de las proteínas respecto de las deciduas cultivadas con las PBMC de animales controles (Figura 43). Para corroborar que el aumento en la nitración se debía al incremento en los niveles de NO, se decidió suplementar con AG a los ratones tratados con LPS y realizar los co-cultivos. Las PBMC provenientes de animales tratados con LPS y AG no produjeron incremento en el nivel de nitración de las proteínas de la decidua (figura 43).



**Figura 42. Actividad de FAAH de deciduas en presencia de quercetina (Quer) y co-cultivadas con PBMC obtenidas de animales control o tratados con LPS. Letras diferentes indican una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).  $n=5$  animales por grupo.**



**Figura 43.** Niveles de nitración de las proteínas de deciduas co-cultivadas con PBMC de animales tratados. Letras diferentes indican una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).  $n=5$  animales por grupo.



**Figura 44.** Niveles de nitración de la FAAH decidua inmunoprecipitada de co-cultivos con PBMC provenientes de animales tratados con LPS y P. Letras diferentes indican una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).  $n=4$  animales por grupo.

Como mencionamos previamente, una modificación postraduccional de una enzima, como lo es la nitración, puede producir tanto la ganancia como la pérdida de su actividad (Vadseth y col., 2004; Balafanova y col., 2002). Dado que en nuestro sistema se observó un aumento de la nitración proteica y una disminución de la actividad de FAAH, nos propusimos estudiar específicamente, utilizando la técnica de inmunoprecipitación, si la FAAH de las deciduas se nitra en presencia de PBMC provenientes de ratones tratados con LPS. Se observó un mayor nivel de nitración de la enzima de la decidua al incubarla con PBMC de animales tratados con LPS respecto a los controles (Figura 44). La figura 41 evidencia un efecto protector por parte de la P sobre la actividad de la FAAH decidual. Por ello se decidió analizar si la P podría modular la nitración de esta enzima. En la figura 44 se observa que, si bien las PBMC provenientes de animales tratados con LPS producen un incremento en los niveles de nitración de la FAAH de las deciduas, al co-cultivar las mismas con PBMC de ratones tratados con P y LPS, se revierte este efecto.

**Discusión**

---

---

## Discusión:

---

El 80% de los abortos en mujeres se produce dentro de las primeras 12 semanas de embarazo, por lo que es común que estas pérdidas pasen clínicamente inadvertidas. De esta manera, la tasa de gestaciones que finalizan en aborto, considerada un 20%, estaría siendo subestimada. Aun así la pérdida precoz del embarazo es la complicación más frecuente de la gestación, lo que determina que el establecimiento y mantenimiento del mismo es una situación mucho menos exitosa de lo que se podría imaginar. Asimismo, el hecho de que en un alto porcentaje de casos el origen de estas pérdidas sea idiopático, agrava la situación. Si bien las etiologías conocidas más frecuentes son los trastornos a nivel endocrino e inmune, existen muchos casos en los cuales la causa puede no estar caracterizada.

Aunque el aborto espontáneo o la pérdida temprana del embarazo generalmente no producen complicaciones para la salud física de la madre, sí tiene efectos psicológicos para la pareja. Los mismos se intensifican cuando los abortos se producen a repetición y cuando el especialista no puede asegurar la causa del mismo ni proponer un tratamiento para evitarlo. El crecimiento y desarrollo del campo de la reproducción asistida en los últimos años es un claro ejemplo de la necesidad de resolución de esta temática. Hoy en día, miles de parejas se acercan a centros especializados para encontrar una solución al problema del aborto y la infertilidad.

Por otra parte, la investigación básica aún no ha podido desentrañar las causas, y además los mecanismos fisiopatológicos de las pérdidas embrionarias tempranas aún no están dilucidados completamente.

La mayoría de los estudios sobre el tema se han realizado utilizando la craza murina CBA/J x DBA/2, que presenta una alta tasa de reabsorción espontánea. La misma se caracteriza por desarrollar una respuesta inmune inadecuada, generando elevados niveles de citoquinas pro-inflamatorias. Se ha informado que dosis fisiológicas de estas citoquinas no son capaces de inducir reabsorción embrionaria y que el desencadenamiento del aborto en este modelo involucra una señal mediada por TLR4, el receptor del LPS, que regula positivamente la expresión de los receptores de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Además, cuando se administra un anticuerpo anti-TLR4 específico hay una disminución significativa en la tasa de reabsorción en esta craza (Friebe y col., 2007). Por otro lado, Clark y col. (2002) describieron que el tratamiento con antibióticos es capaz de revertir este fenotipo abortador. La alta tasa de abortos producida en esta craza se podría explicar por la exposición al LPS durante el coito (Clark y col., 2004).

Coincidentemente, las endotoxinas bacterianas son reconocidas como agentes causantes de reabsorción embrionaria temprana. Se ha informado que este componente de las bacterias gram-negativas provoca muerte fetal y aborto en animales (Zahl y Bjerknes, 1943) y también se sabe que está implicado en el mecanismo de parto pretérmino en la mujer (Romero y col., 1988; Cox y col., 1988).

Durante el embarazo las infecciones del tracto genitourinario son un hecho frecuente, caracterizándose por la presencia de una cantidad significativa de bacterias del grupo de las enterobacterias, que colonizan una parte o la totalidad del tracto reproductivo. El LPS es el factor de mayor virulencia de las bacterias gram-negativas, las cuales son responsables de aproximadamente el 90% de las infecciones, siendo uno de los factores de riesgo más importantes para la salud fetal. En los últimos años se ha descrito al LPS como un agente abortogénico de gran importancia, siendo de suma relevancia dado el contacto continuo y directo que se tiene con el mismo.

En nuestro laboratorio hemos establecido un modelo de reabsorción embrionaria murino inducido por LPS (Ogando y col., 2003). En este modelo, la administración intraperitoneal de una única dosis de LPS de 1 µg/g de peso a hembras BALB/c en el día 7 de preñez produce un 100% de reabsorción embrionaria a las 24 h. A las 2 h post-inyección de LPS son apreciables algunos efectos sistémicos como diarrea, piloerección, reducción de la ingesta de alimento, inactividad y postura agachada. El tratamiento en ningún caso fue letal y además de no afectar la supervivencia materna, el cuadro inflamatorio finaliza aproximadamente luego de 48 h. Las hembras expulsan los restos embrionarios y son perfectamente viables para futuras gestaciones. Las características mencionadas del modelo utilizado en este trabajo le otorgan relevancia ya que, al igual que en este modelo murino, la pérdida temprana del embarazo en la mujer no se encuentra asociada a mortalidad materna ni a complicaciones sanitarias de gravedad.

El proceso inflamatorio implica el desarrollo de una respuesta frente a las agresiones del medio (de tipo biológico, químico, por alteraciones vasculares o inmunes) y cuya función primordial es la de eliminar al agente dañino. Si bien una respuesta inflamatoria es esencial para la recuperación del tejido u órgano afectado, un proceso inflamatorio excesivo o prolongado en el tiempo puede llevar a mayores lesiones que las iniciales y eventualmente comprometer al tejido sano adyacente.

Durante la respuesta inflamatoria se movilizan diferentes efectores y moduladores, así como potentes mediadores inflamatorios e inmunosupresores. Los mismos pueden actuar a nivel sistémico o ser producidos localmente, como por ejemplo la producción simultánea de NO y metabolitos derivados del ácido araquidónico (las prostaglandinas, los tromboxanos, los leucotrienos y las prostaciclinas).

Como hemos mencionado repetidamente, el LPS induce una marcada respuesta inflamatoria mediada primariamente por la activación de macrófagos, la producción y secreción de citoquinas inflamatorias como el TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, entre otras, así como la liberación de prostanoïdes, NO y otros mediadores solubles (Shachelford y col., 1995; Michalek y col., 1980; Michie y col., 1988; Spinass y col., 1991).

Los endocannabinoides, como la AEA, son ligandos endógenos de los receptores de cannabinoides que mimetizan muchos de los efectos asociados al uso del cannabis. El sistema endocannabinoides (SEC) ha sido de gran interés en las últimas décadas debido a sus múltiples efectos tanto en procesos fisiológicos como patológicos. En particular, se ha postulado que los endocannabinoides tienen una gran relevancia en los eventos reproductivos al actuar como una importante señal de diálogo en la interface materno-fetal. Como ya se ha mencionado anteriormente, se asocian niveles elevados de AEA en los sitios interimplantatorios con la inhibición de la proliferación del trofoblasto, mientras que niveles bajos en los sitios implantatorios están asociados con el efecto contrario. Este es un claro ejemplo del efecto dual de la AEA donde diferencias de concentración a nivel local tienen efectos opuestos (Paria y col., 2000).

Por otro lado, el papel de los endocannabinoides en la sepsis e inflamación ha sido descripto en diferentes trabajos (Maccarrone y col., 2002b). En particular, en linfocitos humanos el LPS aumenta los niveles de AEA disminuyendo la expresión proteica y la actividad de la FAAH (Maccarrone y col., 2001). Asimismo, Liu y col. (2003) han descripto 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.



Estos antecedentes nos permitieron hipotetizar que el sistema endocannabinoide de las células inmunes infiltrantes y del sitio de implantación participan en los mecanismos involucrados en el desencadenamiento de la reabsorción embrionaria inducida por LPS, cumpliendo la progesterona un papel inmunoprotector en estos procesos.

En nuestro modelo, la reabsorción embrionaria inducida por LPS cursa con un incremento en los niveles plasmáticos de AEA. Esta observación concuerda con hallazgos que muestran que mujeres que sufren abortos recurrentes presentan elevados niveles de AEA en plasma (Taylor y col., 2011) y una disminución en los niveles de actividad de FAAH (la enzima que degrada la AEA) en linfocitos de sangre periférica (Maccarrone y col., 2010). Por otra parte, el grupo de Maccarrone (2002a) encontró que tanto bajos niveles de actividad de FAAH como altas concentraciones de AEA plasmática están asociados a fallas en el embarazo en mujeres que fueron sido sometidas a fecundación *in-vitro*. Asimismo, Gebeh y col. (2013) observaron que mujeres con embarazos ectópicos presentan altos niveles de diferentes endocannabinoides plasmáticos. Por lo tanto, nuestro modelo murino de RE inducida por LPS reproduce los cambios en los niveles de AEA que han sido descriptos en humanos y que se asocian a fallas en el desarrollo normal del embarazo.

La relevancia de las alteraciones del sistema cannabinoide endógeno en procesos de aborto recurrente y pérdida del embarazo se ven reforzadas por el hecho de que el  $\Delta^9$ -THC, el principal compuesto psicoactivo de la marihuana, produce aborto y muerte fetal intrauterina en modelos animales (Asch y col., 1986; Abel y Dintcheff, 1986). Es decir, los compuestos cannabinomiméticos, tanto endógenos como exógenos, pueden afectar la regulación del embarazo y la sobrevivencia embrionaria y/o fetal.

En este sentido, evaluamos si la AEA produce RE en ratones en el día 7 de gestación. Observamos entonces, que además del aumento de los niveles plasmáticos de la AEA

inducido por la administración de LPS, el tratamiento con met-AEA, un análogo no hidrolizable de la AEA, produjo *per-se* un incremento en la tasa de RE.

Estos resultados demuestran la participación de la AEA en la pérdida temprana de la preñez, ya sea por su inducción por un análogo de este endocannabinoide como por el aumento de los niveles plasmáticos de AEA observado en en nuestro modelo de RE.

Asimismo, trabajos previos *in-vitro* de nuestro grupo, muestran la participación del receptor CB1 en los mecanismos involucrados en la RE inducida por LPS (Vercelli y col., 2009a; 2009b). Por ello, el paso siguiente fue determinar *in-vivo*, empleando animales genéticamente modificados, la participación del receptor CB1 en la RE. Observamos que la tasa de RE de los ratones ko-CB1 tratados con la endotoxina fue menor que la de los ratones silvestres (wt).

Los resultados obtenidos confirman las observaciones previas del laboratorio mencionadas en el párrafo anterior, donde en particular se demostró que la AEA *in-vitro* participaba de los mecanismos involucrados en la reabsorción embrionaria inducida por el LPS, como el aumento de la síntesis de NO y de las PGs tanto en el útero como en la decidua (Vercelli y col., 2009a; 2009b). En estos mismos trabajos, la incubación con AEA del tejido uterino y decidual del día 7 de gestación produce un alto grado de desorganización tisular que es revertida mediante la co-incubación con un antagonista del receptor CB1 (Vercelli y col., 2009a; 2009b).

Varios estudios informan que las mujeres abortadoras recurrentes, que muestran un retraso en el desarrollo endometrial, presentan, en la mayoría de los casos, menores niveles de P en suero (Daya, 1989; Babalioglu y col., 1996; Li y col., 2000). Por otro lado, diferentes trabajos informan menores niveles plasmáticos de esta hormona asociados al desarrollo de infecciones en mujeres abortadoras y en animales de experimentación tratados con LPS o con la bacteria

entera (Fidel y col., 1998; Hirsch y Muhle, 2002). Particularmente, en nuestro modelo demostramos previamente que el tratamiento con LPS disminuye significativamente los niveles de progesterona plasmática en los ratones preñados y que, si se suplementa a estos ratones con la hormona, se revierte el efecto de la endotoxina (Aisemberg y col., 2013).

Asimismo, la P puede también modular al sistema endocannabinoide (Gorzalka y Dang, 2012). En particular, el grupo de Maccarrone (2001; 2003) mostró que la P incrementa la expresión y actividad de la FAAH en células T y en una línea celular derivada de un linfoma (U937). Se ha informado también que en útero de ratón la P disminuye la actividad de la FAAH (Maccarrone y col., 2000a). Por otro lado, se ha demostrado que tanto el tratamiento con AEA como con agonistas selectivos de los receptores CB1 y CB2 disminuye los niveles plasmáticos de P y de la hormona leutinizante (LH), así como también los niveles de ARNm del receptor de LH en los cuerpos lúteos (Habayeb y col., 2002; Tsutahara y col., 2011). La liberación de P podría estar controlada entonces a nivel central por la liberación de LH, pero también controlada directamente por el SEC en los cuerpos lúteos.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos planteamos estudiar si las alteraciones en los niveles de P observados en nuestro modelo de RE también ocurren en los ratones que carecen del receptor CB1. En este sentido, la administración de LPS a ratones wt y ko-CB1 disminuyó la concentración plasmática de P en ambos grupos. Sin embargo, esta merma en los niveles plasmáticos fue menor en los ratones ko-CB1. Debido al papel fundamental de la P tanto para el establecimiento como el mantenimiento del embarazo (Halasz y Szekeres-Bartho, 2013), que el descenso de los niveles de P plasmática inducido por el LPS en ratones ko-CB1 sea menos pronunciado podría explicar la menor tasa de RE observada en estos ratones comparados con los wt. Se sabe que en roedores, antes del parto a término, se produce un descenso en los niveles de P plasmática que desencadena cambios en el útero y en el cérvix que son parte del inicio del parto (Condon y col., 2004; Mahendroo y col., 1999).

Por lo tanto, en nuestro modelo de RE inducida por LPS la ausencia del CB1, al reducir la magnitud del descenso de los niveles de P, podría contribuir tanto directa como indirectamente a una menor tasa de RE al tratar los animales con la endotoxina.

Se ha descrito que el tratamiento con LPS produce un aumento de la infiltración leucocitaria en diferentes tejidos (Salter y col., 1991). En nuestro modelo de RE inducida por LPS, Ogando y col. (2003) observaron una mayor infiltración leucocitaria en útero y decidua de ratones preñados expuestos a la endotoxina, que disminuye con el tratamiento con inhibidores de la NOSi.

Por otro lado, se ha demostrado la presencia del SEC en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas (Bioque y col., 2013; Matias y col., 2002; Galiègue y col., 1995) y que las PBMC constituyen una población heterogénea de distintos tipos celulares que tienen un papel clave en la infiltración leucocitaria de los tejidos ante una inflamación. Nos preguntamos entonces si el SEC de las PBMC participa de la RE inducida por el LPS. Para intentar contestar esta pregunta llevamos a cabo diversos diseños experimentales.

En primer lugar caracterizamos el SEC en PBMC de ratón, demostrando la presencia de las enzimas de síntesis (NAPE-PLD) y degradación (FAAH) de la AEA, y de los receptores CB1 y CB2, corroborando que estas células presentan el SEC tal como fue descrito por otros autores en células PBMC humanas (Bioque y col., 2013; Matias y col., 2002; Galiègue y col., 1995).

Dado que se ha informado que el LPS *in-vitro* disminuye la actividad de la FAAH y aumenta los niveles de AEA en linfocitos periféricos de mujeres (Maccarrone y col. 2001), desafiamos a ratones no preñados con la endotoxina durante 6 h para evaluar posibles cambios en el SEC de las PBMC. Cuando observamos la actividad enzimática y los niveles proteicos de la FAAH en las PBMC, encontramos una disminución en ambos parámetros en los animales

tratados con LPS. Por otra parte, cuando se determinaron los niveles basales de la actividad de FAAH en las PBMC provenientes de ratones preñados, se encontró que la actividad de esta enzima fue mayor en las PBMC de estos animales que en las PMBC proveniente de ratones no preñados. En contraste con lo observado en las PBMC de ratones no preñados, cuando desafiamos con LPS por el mismo tiempo a ratones preñados, no se observó una disminución en la actividad de FAAH. Esta respuesta diferenciada a la endotoxina entre las células provenientes de animales preñados y no preñados podría explicarse por los diferentes niveles de P que se observan entre ellos, ya que son 10 veces mayores en animales preñados (Virgo y Bellward, 1974).

Estudiamos entonces si la administración de un antagonista de los receptores de P (RU486) a animales preñados podría alterar la respuesta al LPS, observando que al bloquear los receptores de la hormona los niveles y la actividad de la FAAH de las PBMC disminuyeron por acción de la endotoxina.

Como ya se mencionó, en los ratones no preñados los niveles séricos de P son bajos en comparación con sus niveles durante la preñez (Wood y col., 2007). Por ello, estudiamos si en estos animales el efecto del LPS sobre la actividad de FAAH podía ser revertido por la administración de P. Los resultados muestran que esta hormona bloqueó el efecto del LPS sobre la actividad de la enzima que metaboliza AEA, reforzando nuestra hipótesis del papel protector de la P frente al LPS.

Diversos trabajos muestran que la enzima FAAH de células inmunes y neuronas humanas es modulada por la P a través de sus receptores, activando el factor de transcripción Ikaros (Gasperi y col., 2005; Maccarrone y col., 2004), al igual que en nuestros resultados donde al antagonizar los receptores de P se impidió que esta hormona revirtiera el efecto del LPS

sobre la actividad de FAAH. Tomando estos datos en conjunto, hipotetizamos que la P actuaría como agente protector frente a los efectos del LPS sobre la actividad de FAAH.

Como ya se mencionó, el LPS también modula los niveles plasmáticos de P. Aisemberg y col. (2013) mostraron que a las 6 h del tratamiento con LPS se produce una disminución del 10% en los niveles plasmáticos de P en ratones preñados y que, cuando se extiende el tratamiento con LPS a 12 h la disminución es del 60%. Una drástica disminución en los niveles de P podría ser la causa de la pérdida de los efectos protectores de esta hormona, permitiendo que el LPS induzca un marcado aumento de varios marcadores inflamatorios, como el NO y/o las prostaglandinas (Ogando y col., 2003; Aisemberg y col., 2007), que en nuestro modelo se observa tanto en útero como en decidua.

Cuando evaluamos la actividad de la FAAH en PBMC de animales preñados seis horas después de la administración de LPS, donde los niveles de P sólo han disminuido un 10%, no se encontró efecto de la endotoxina. Sin embargo a las 12 h del tratamiento con LPS observamos que la actividad de la FAAH disminuye en las PBMC de ratones preñados, concomitantemente con la pronunciada caída en los niveles de P, a este tiempo de tratamiento, descrita previamente (Aisemberg y col., 2013).

Paralelamente, y en concordancia con la disminución en la actividad de FAAH, encontramos un aumento de los niveles de AEA en el plasma de ratones preñados inducido por LPS, mientras que el suplemento con P inhibe este aumento. Como indicamos anteriormente, a fin de dilucidar el mecanismo por el cual actúa la P, se administró un antagonista de los receptores de esta hormona, el RU486, a ratones no preñados y observamos que la P perdió su efecto sobre la actividad de la FAAH de las PBMC de animales tratados con LPS. Dado que se ha descrito que RU486 es no sólo antagonista de los receptores de progesterona (PR) sino también de los receptores de glucocorticoides (GR) (Besedovsky y col., 2013) decidimos

utilizar el lonaprizan (LONA), un potente antagonista de los PR aproximadamente 10 veces más selectivo que el RU486 (Afhüppe y col., 2010). El efecto protector de la P sobre la disminución de la actividad de FAAH inducida por LPS fue inhibido también por el tratamiento con este antagonista, sugiriendo que en este caso la hormona actúa a través de sus propios receptores nucleares.

Por otro lado, en nuestro modelo de RE inducida por LPS se observa un aumento de los niveles de NO tanto en decidua como en útero alcanzando un máximo a las 6 h post-inyección (Ogando y col., 2003) y la administración de un inhibidor selectivo de la NOSi (Aminoguanidina, AG) revierte la RE inducida por LPS. Salter y col. (1991) describieron que el LPS produce un aumento en la producción de óxido nítrico e infiltración leucocitaria en diversos tejidos. Por la técnica de inmunohistoquímica, Ogando y col. (2003) observaron infiltrados deciduales de macrófagos y granulocitos que expresan NOSi y CD14 (parte del complejo proteico que funciona como receptor del LPS).

En concordancia con nuestros resultados previos hemos observado que el LPS también incrementa la liberación de NO, en particular en esta tesis, producido por las PBMC. Dado el papel inmunomodulador de la P, se analizó si esta hormona podría inhibir el incremento de la producción de NO inducido por la endotoxina. Se observó que el tratamiento con P previno el efecto de la endotoxina sobre la producción de NO. Resultados similares fueron informados en un modelo de injuria en la médula espinal, donde se observa un aumento de la producción de NO y un efecto protector de la P (Coronel y col., 2013). En este sentido, se ha informado que la P inhibe tanto la producción de NO como los niveles de la NOSi en macrófagos murinos (Miller y col., 1996). En la misma línea de los experimentos de Ogando y col. (2003), donde el incremento de NO es acompañado por un aumento en la expresión proteica de la NOSi, se analizaron los niveles de esta enzima en las PBMC de animales no preñados. Los resultados muestran un aumento de los niveles proteicos de la NOSi en los animales

tratados con LPS, mientras que cuando estos animales fueron suplementados con P se revirtió el aumento en la expresión de NOSi. Estos resultados indican que la P tiene también un efecto protector ya que modula negativamente la estimulación del sistema nitrérgico, el cual tiene una participación clave en el desarrollo de la RE que se desencadena frente al desafío con LPS.

Al estudiar si la P podría estar actuando en este caso también a través de sus receptores clásicos, se observó que el tratamiento con RU486 revirtió el efecto protector de la P sobre los niveles proteicos de la NOSi. Sin embargo, cuando se utilizó el antagonista más potente y selectivo, LONA, la P mantuvo su efecto protector aboliendo el efecto de la endotoxina. Dado que RU486 es también antagonista de los GR se administró dexametasona (Dexa), un potente agonista de estos receptores, el cual mimetizó los efectos de la P. En concordancia con estos resultados, Jones y colaboradores (2008) demostraron en macrófagos que la P, frente a un estímulo como lo es el LPS, puede actuar tanto a través de sus propios receptores como a través de los GR.

Podemos entonces concluir que en nuestro modelo, la P protegería de la disminución de la actividad de la FAAH (y por ende del incremento en los niveles de AEA) inducida por LPS a través de los PR, mientras que inhibiría el aumento de los niveles de NO causado por la endotoxina a través de los GR.

Dado que la mayor parte de las acciones de la P ocurre a través de los receptores nucleares PR-A y PR-B (Conneely y col., 2002) y que la presencia de estos receptores en las PBMC es controversial, se decidió estudiar si los mismos se expresan en las PBMC murinas. Algunos trabajos sostienen que estos receptores no se expresan en las PBMC (Dosiou y col., 2008; Szekeres-Bartho y col., 2001; Mansour y col., 1994) proponiendo la existencia de mecanismos de señalización alternativos a los PR nucleares, como la acción a través de los



receptores de glucocorticoides (Kontula y col., 1983), de canales dependientes de voltaje y activados por  $\text{Ca}^{2+}$  (Lai y col., 2012; Ehring y col., 1998) o de receptores de membrana (Ndiaye y col., 2012; Dosiou y col., 2008). Sin embargo, en nuestro modelo experimental hemos demostrado que las PBMC murinas expresan los receptores nucleares de P por RT-PCR y por WB. Dado que PR-A y PR-B son productos de un mismo gen y siendo la isoforma PR-A un producto truncado de PR-B (carece de los 164 aminoácidos N-terminales) (Connely col., 1989; Kastnet y col., 1990) no pudieron diferenciarse los productos de ambas isoformas por la técnica de RT-PCR. Para sortear esta dificultad, se realizó un WB donde el anticuerpo contra estos receptores permitió detectar ambas isoformas individualmente debido a las diferencias existentes en el peso molecular de cada una de ellas. Apoyando nuestros resultados, diversos trabajos de investigación demuestran la presencia de estos receptores en diferentes células inmunes, como por ejemplo células NK (Arruvito y col., 2008) y esplenocitos (León Nava y col., 2009).

Asimismo, hemos demostrado que el LPS actúa disminuyendo los niveles proteicos de PR-B y que la P puede modular el efecto de la endotoxina sobre sus propios receptores. Es conocido que la P regula los niveles de sus receptores clásicos (Katzenelle, 1980) y que los niveles, y por ende la relación entre PR-A y PR-B, varían durante la preñez en tejidos reproductivos (Shymala y col., 1990). En nuestro modelo de RE inducida por LPS se observó una disminución de la isoforma PR-B en las PBMC cuando los animales no preñados son tratados con LPS. Esto es consistente con trabajos previos que muestran que la isoforma predominante en membranas fetales de mujeres a las que se les realiza cesárea es PR-B, mientras que en las que tienen parto vaginal la isoforma predominante es PR-A (Oh y col., 2005). Por otra parte, la relación PR-A/PR-B es mayor en membranas fetales provenientes de mujeres con trabajo de parto que de mujeres sin trabajo de parto (Oh y col., 2005). Tan y col. (2012) sugieren que durante la mayor parte del embarazo humano, cuando las células

miométriales expresan mayoritariamente los receptores PR-B, la progesterona promueve la quiescencia del miometrio a través de acciones antiinflamatorias mediadas por esta isoforma. En el momento del parto, el aumento de la expresión de PR-A promueve el trabajo de parto mediante la inhibición de las acciones antiinflamatorias mediadas por PR-B y estimula la expresión de genes proinflamatorios en respuesta a la progesterona.

En nuestro sistema, el aumento de la relación PR-A/PR-B inducido por la endotoxina y la caída en los niveles de P podría estar relacionado con la disminución en los niveles de FAAH, disminuyendo la actividad de la misma y aumentando en consecuencia los niveles plasmáticos de AEA, la cual participaría de los mecanismos proinflamatorios que contribuyen a la RE. Asimismo, el efecto protector de la progesterona podría estar mediado por los PR-B cuyo aumento promueve la propia hormona.

En este trabajo de tesis determinamos que los linfocitos T son la población mayoritaria (70%) de las PBMC en nuestro modelo. En humanos, los abortos tempranos se asocian con bajos niveles de actividad y de expresión de FAAH en estas células maternas y con un incremento de los niveles de AEA en sangre (Maccarrone y col., 2002a; Butts y col., 2007) hecho que también ocurre en nuestro modelo. Además, en linfocitos humanos, la P incrementa los niveles de FAAH, pero no de NAPE-PLD, ni del transportador de AEA (ATM) ni de los receptores CBs, reduciendo los niveles de AEA contenidos en esas células (Maccarrone y col., 2000a; 2001).

Asimismo, dado que en las PBMC murinas no había sido demostrada claramente la presencia de los PR nucleares, se aislaron células T de la población total de PBMC y se analizó la presencia de los PR, observándose que los linfocitos T (CD3+) expresan estos receptores. Estos resultados sugieren que los linfocitos T tienen la maquinaria necesaria para responder a la P a través de sus receptores nucleares.

Corroborando los hallazgos de Ogando y col.(2003) en ratones de la cepa BALB/c, la administración de LPS a ratones de la cepa CD1 también produjo un incremento en la infiltración de linfocitos en los sitios de implantación. Sin embargo, este incremento en la infiltración linfocitaria inducida por el tratamiento con LPS no se observó en los ratones genéticamente modificados que carecen del receptor CB1 (ko-CB1). Estos resultados concuerdan con los de Marquart y col. (2010), quienes muestran que la inactivación de los receptores CB1 disminuye la infiltración de linfocitos T en la piel lesionada, y que por el contrario, la utilización de un agonista para estos receptores promueve la infiltración de linfocitos T. La ausencia de infiltración leucocitaria en los animales ko-CB1 podría también contribuir a la baja RE observada en estos animales.

También hemos observado en la cepa CD1 que el LPS *in-vivo* aumenta la producción de NO por la decidua como ya habíamos descrito en la cepa Balb/c (Ogando, 2003). Cuando estudiamos la síntesis de NO en deciduas provenientes de animales ko-CB1 encontramos que la endotoxina no la modifica confirmando estudios previos *in-vitro* de Vercelli y col (2009a) que mostraba el bloqueo del aumento inducido por LPS de la producción de NO por un antagonista del receptor CB1. Asimismo Maccarrone y col. (2000b) han informado de que la activación de los receptores CB1 por AEA provoca una estimulación de la actividad y expresión de la NOS inducible de las células endoteliales de la vena umbilical humanas (HUVEC).

Si bien muchos de los mecanismos estudiados en la decidua durante el tratamiento con LPS son similares tanto *in-vitro* (Vercelli y col., 2009a) como *in-vivo* (Ogando y col., 2003) (como por ejemplo el aumento de la producción de NO, prostaglandinas, incremento del daño tisular, entre otros) no ocurre lo mismo con la actividad de FAAH. Así, Vercelli y col. (2009a) mostraron que el tratamiento *in-vitro* de deciduas con LPS aumenta la actividad de FAAH mientras que los resultados *in-vivo* obtenidos en esta tesis, al tratar a los ratones con

la endotoxina, mostraron una disminución de la actividad de dicha enzima. En nuestro modelo, los resultados obtenidos con la administración de LPS son coherentes con el aumento encontrado de los niveles plasmáticos de AEA, ya que una menor metabolización del endocannabinoide tendría como resultado una concentración mayor del mismo si su síntesis no está afectada (como se observó al evaluar los niveles proteicos de NAPE-PLD, enzima de síntesis).

La diferencia entre los resultados *in-vitro* e *in-vivo* podría adjudicarse a la contribución del infiltrado leucocitario inducido por el LPS en la decidua de ratones tratados con la endotoxina, situación que no ocurre en el modelo *in-vitro*, donde la decidua aislada es expuesta al LPS. Para corroborar esta hipótesis nos propusimos realizar co-cultivos mediante un sistema de insertos en el cual deciduas de animales controles se incuban con PBMC provenientes de animales sometidos a diferentes tratamientos, separados por una membrana que sólo deja pasar factores solubles. Cuando las deciduas se co-cultivaron con PBMC provenientes de ratones preñados tratados con LPS durante 6 h, estas células indujeron una disminución de la actividad de FAAH decidual. Como se describió anteriormente, la P cumple diferentes papeles inmunomoduladores (Butts y col., 2007; 2008) y, de acuerdo a nuestras propias observaciones, es capaz de modular tanto la actividad de la enzima FAAH como al sistema nitrérgico. Por ello, decidimos estudiar si suplementando a los ratones con P se contrarrestaban los efectos de la endotoxina en este modelo de co-cultivos. Efectivamente, las PBMC provenientes de ratones desafiados con LPS y co-tratados con P no produjeron el mismo efecto sobre la FAAH decidual que las PBMC provenientes de ratones tratados con LPS, poniéndose en evidencia nuevamente el papel inmunomodulador y antiinflamatorio de esta hormona.

Teniendo en cuenta que en el sistema de insertos elegido solamente pueden pasar de una cámara a la otra factores solubles, sumado al papel central que tiene el NO en nuestro modelo

de RE (Ogando y col., 2003; Vercelli y col., 2009a; 2009b), a los numerosos trabajos que relacionan al sistema endocannabinoide con el sistema nitrérgico (Cella y col., 2008; Vercelli y col., 2009b) y a los resultados previamente descritos en los que el LPS induce un aumento tanto de los niveles de NO como de la expresión de NOSi en PBMC de ratones no preñados, se analizó si el NO podría ser uno de los factores solubles que, al ser liberados por las PBMC, modulaban la actividad de la FAAH decidual. Al analizar la producción de NO, no solo se observó un incremento en la liberación de NO por parte de las PBMC al tratar los animales preñados con LPS, sino que el tratamiento con P abolió el efecto de la endotoxina. Dado que en nuestro modelo de RE el incremento de los niveles de NO tanto en útero como en decidua (Aisemberg y col., 2007) es producto de la NOSi (Ogando y col., 2003), se trataron los animales con aminoguanidina (AG), un inhibidor de la NOSi en presencia o ausencia de LPS. La administración de AG a los animales que recibieron LPS bloqueó la capacidad de las PBMC de inducir una disminución de la actividad de la FAAH decidual. Conjuntamente, estos resultados nos sugieren que el LPS, mediante un aumento de la expresión de la NOSi en las PBMC, produce un incremento en los niveles de NO liberado, y este mediador sería el factor soluble que modularía la actividad de la FAAH decidual.

Como los mecanismos involucrados en la modulación de la actividad de la FAAH, en particular por el NO, no han sido dilucidados, nos propusimos estudiar si el radical peroxinitrito podría estar involucrado en los mismos. El peroxinitrito, un radical altamente oxidante y nitrante (Grisham y col., 1999), es generado al reaccionar el NO con el radical superóxido. Por otro lado, se ha descrito que esta molécula tiene una potente actividad citotóxica y pro-inflamatoria (Virag y col., 2002; Beckman y col., 1990; Salvemini y col., 1998; Misko y col., 1998).

Para analizar si el NO liberado por las PBMC ejercía sus efectos a través de la generación de radicales peroxinitritos, se incubaron las deciduas con quercetina (Quer), un secuestrador de

peroxinitritos. Cuando se trataron las deciduas con Quer, la presencia de las PBMC provenientes de animales tratados con LPS no produjo ningún efecto sobre la actividad de la FAAH decidual. Ello sugiere que el radical peroxinitrito estaría involucrado en la disminución de la actividad de la FAAH decidual inducida por las PBMC de ratones preñados tratados con LPS y por ende en el mecanismo regulador ejercido por el NO.

Por otro lado, el anión superóxido es un agente secuestrador de NO. Como resultado de la interacción entre ambos se produce el anión peroxinitrito, el cual tiene funciones regulatorias cuyos mecanismos involucran la nitración proteica en residuos tirosina.

La nitración de las proteínas ha sido reconocida en los últimos años como una modificación post-traducciona eficaz que permite modular la funcionalidad de determinadas enzimas. Lo cierto es que se ha descubierto que la nitración mediada por peroxinitrito cumple un rol clave durante la inflamación. La misma, parece estar focalizada en determinados residuos tirosina de las proteínas, lo que potencialmente resulta en ganancia o pérdida de actividad enzimática.

Podríamos mencionar a la manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) mitocondrial (Radi y col., 2002), a la prostaciclina sintasa, al receptor de glucocorticoides y al transportador de glutamato entre las proteínas que pierden actividad por nitración en tirosina. Esto conlleva al aumento en la producción de ROS, a la disminución de PGI<sub>2</sub> o a la disminución en la respuesta a glucocorticoides entre otros efectos (Salvemini y col., 2006). Asimismo, la nitración aumenta la actividad de la COX-2 en la mayoría de los casos observados, con el consecuente aumento en la producción de PGs (Salvemini y col., 2006; Beharka y col., 2001; Schildknecht y col., 2008; Ndengele y col., 2008; Goodwin y col., 1999). Particularmente, resultados previos de nuestro laboratorio muestran la importancia de la nitración de esta enzima en los sitios de implantación en nuestro modelo (Aisemberg y col., 2007)

Trabajos previos *in-vivo* de nuestro laboratorio muestran el efecto del LPS en el aumento de la nitración en residuos tirosina de proteínas del útero y la decidua (Ogando y col., 2003). En particular, en este trabajo de tesis se demostró *in-vitro* que las PBMC provenientes de animales tratados con LPS incrementaron la nitración en residuos tirosina de las proteínas de deciduas en los co-cultivos. Puntualmente mostramos que una de las proteínas que se nitra en nuestro sistema de insertos es la FAAH. Se observó la presencia de esta enzima nitrada en las deciduas co-cultivadas con PBMC provenientes de animales tratados con LPS y también en el tejido control, aunque en esta última situación en menor medida. Teniendo en cuenta el rol anti-inflamatorio, inmunomodulador y protector ejercido por la P, se estudió si el suplemento con esta hormona a los ratones proveedores de las PBMC podría revertir el aumento observado en la nitración de la FAAH decidual inducida por las PBMC de animales tratados únicamente con LPS. Se encontró que, efectivamente, las PBMC de animales tratados con P y LPS poseen niveles de nitración de la FAAH similares a los observados en los controles.

Analizando estos resultados en conjunto, se puede observar que un menor nivel de actividad de FAAH se correlaciona con una mayor nitración en residuos tirosina de las proteínas de la decidua, particularmente de FAAH. Diferentes trabajos describen que la nitración de una enzima puede causar tanto una ganancia como una pérdida en su actividad (Cassina y col., 2000; Vadseth y col., 2004; Balafanova y col., 2002). Un ejemplo de pérdida de actividad por nitración es la MnSOD mitocondrial, la enzima que normalmente mantiene controlados los niveles de superóxido (Radi y col., 2002). También en pacientes con sepsis se ha observado que la NOSi se encuentra nitrada (Lanone y col., 2002), induciendo un cambio conformacional que impacta a nivel de la dimerización y produce disminución de su actividad catalítica. En contraste con las observaciones de Aisemberg y col. (2007), donde la nitración de COX-2 indujo un incremento en su actividad, nuestros datos indican que la nitración de la FAAH decidual causada por las PBMC de animales tratados con LPS produce

una disminución en la actividad de esta enzima, que se traduciría en un incremento de los endocannabinoides en la decidua. El sentido biológico de este aumento podría entenderse en el contexto de los resultados presentados en este trabajo, donde se demuestra que AEA es *per-se* una molécula abortogénica.

En conjunto, los resultados presentados en esta tesis contribuyen a una mejor comprensión de los mecanismos fisiopatológicos por los cuales el sistema endocannabinoide, tanto de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) como de la decidua, participa en el desencadenamiento de la reabsorción embrionaria y del fundamental papel protector de la progesterona en la reversión de este proceso.



**Conclusiones**

---

## Conclusiones:

---

### En este trabajo observamos que:

- El LPS incrementa los niveles plasmáticos de la AEA.
- La AEA *per-se* induce un aumento en la reabsorción embrionaria.
- Los receptores CB1 participan en la RE inducida por LPS.
- Los receptores CB1 están involucrados en la disminución de los niveles séricos de P, en el aumento de la infiltración linfocitaria al sitio de implantación y en el incremento de la producción de NO en la decidua inducidos por el LPS.
- Las PBMC de ratón expresan las enzimas de síntesis (NAPE-PLD) e hidrólisis (FAAH) de AEA y los receptores CB1 y CB2.
- Las PBMC de ratones no preñados tienen menor actividad de FAAH basal que las provenientes de ratones preñados.
- En ratones no preñados, donde los niveles de P son bajos, el LPS disminuye la actividad de FAAH de las PBMC.
- El tratamiento con LPS disminuye la actividad de la FAAH en las PBMC de ratones preñados sólo cuando los niveles séricos de P han disminuido o los PR han sido bloqueados.
- El LPS incrementa la producción de NO y los niveles de la NOSi de las PBMC. La P revierte este efecto, a través de los receptores de glucocorticoides.
- Las PBMC expresan los receptores nucleares de P (PR-A y PR-B).
- El LPS modula negativamente la relación PR-B/PR-A, la P revierte este efecto de la endotoxina.
- Los linfocitos T expresan los receptores nucleares de P.

- Las PBMC de animales tratados con LPS, co-cultivadas con deciduas provenientes de animales preñados controles, inducen una disminución en la actividad de la FAAH de este tejido. La administración de P protege de los efectos de la endotoxina.
- Un incremento en la producción del NO por las PBMC, puede ser responsable de la disminución de la actividad de la FAAH decidual.
- La liberación de NO por las PBMC de ratones tratados con LPS incrementa los niveles de nitración de las proteínas de la decidua.
- En particular, produce la nitración de la FAAH decidual, lo cual parece modular negativamente la actividad de la enzima y contribuir de esta forma al desarrollo de la RE. La P protege de este efecto.
- El peroxinitrito participa en la nitración de las proteínas deciduales.

Estos resultados nos permiten concluir que:

**El SEC participa de la RE inducida por LPS.**

## **Referencias**

---

---

**Referencias:**

---

1. Abán C, Leguizamón GF, Cella M, Damiano A, Franchi AM, Farina MG. Differential expression of endocannabinoid system in normal and preeclamptic placentas: effects on nitric oxide synthesis. *Placenta*. 2013; 34(1):67-74.
2. Afhüppe W, Beekman JM, Otto C, Korr D, Hoffmann J, Fuhrmann U, Möller C. In vitro characterization of ZK 230211--A type III progesterone receptor antagonist with enhanced antiproliferative properties. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010; 119(1-2):45-55.
3. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol*. 2012; 10:49.
4. Aisemberg J, Vercelli C, Billi S, Ribeiro ML, Ogando D, Meiss R, McCann SM, Rettori V, Franchi AM. Nitric oxide mediates prostaglandins' deleterious effect on lipopolysaccharide-triggered murine fetal resorption. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(18):7534-9.
5. Aisemberg J, Vercelli CA, Bariani MV, Billi SC, Wolfson ML, Franchi AM. Progesterone is essential for protecting against LPS-induced pregnancy loss. LIF as a potential mediator of the anti-inflammatory effect of progesterone. *PLoS One*. 2013; 8(2):e56161.
6. Alderton WK, Cooper CE y Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. 2001; 357 (Pt 3):593-615.
7. Ali M, Buhimschi I, Chwalisz K y Garfield RE. Changes in expression of the nitric oxide synthase isoforms in rat uterus and cervix during pregnancy and parturition. *Mol Hum Reprod*. 1997; 3(11): 995-1003.
8. Anderson KV. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol*. 2000; 12(1):13-9.
9. Asch RH y Smith CG. Effects of delta 9-THC, the principal psychoactive component of marijuana, during pregnancy in the rhesus monkey. *J Reprod Med*. 1986; 31(12):1071-81.
10. Astle S, Slater DM, Thornton S. The involvement of progesterone in the onset of human labour. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2003;108(2):177-81.

11. Babalioglu R, Varol FG, Ilhan R, Yalçın O, Cizmecioglu F. Progesterone profiles in luteal-phase defects associated with recurrent spontaneous abortions. *J Assist Reprod Genet.* 1996; 13(4):306-9.
12. Baker D, Pryce G, Davies WL y Hiley CR. In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci* 2006; 27:1-4.
13. Balafanova Z, Bolli R, Zhang J, Zheng Y, Pass JM, Bhatnagar A, Tang XL, Wang O, Cardwell E, Ping P. Nitric oxide (NO) induces nitration of protein kinase Cepsilon (PKCepsilon ), facilitating PKCepsilon translocation via enhanced PKCepsilon -RACK2 interactions: a novel mechanism of no-triggered activation of PKCepsilon. *J Biol Chem.* 2002; 277(17):15021-7.
14. Bátkai S, Rajesh M, Mukhopadhyay P, Haskó G, Liaudet L, Cravatt BF, Csiszár A, Ungvári Z, Pacher P. Decreased age-related cardiac dysfunction, myocardial nitrate stress, inflammatory gene expression, and apoptosis in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 293(2):H909-18.
15. Battista N, Di Tommaso M, Bari M, Maccarrone M. The endocannabinoid system: an overview. *Front Behav Neurosci.* 2012; 6:9.
16. Beckman JS y Crow JP. Pathological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite formation. *Biochem Soc Trans.* 1993; 21(2):330-4.
17. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87(4):1620-4.
18. Beckman JS. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem Res Toxicol.* 1996a; 9(5):836-44
19. Beckman JS. The physiological and pathological chemistry of nitric oxide. *En Nitric Oxide: Principles and Actions.* 1996b; Pp: 1–82. Ed: Lancaster JR, Orlando, Florida, USA.
20. Beharka AA, Wu D, Serafini M, Meydani SN. Mechanism of vitamin E inhibition of cyclooxygenase activity in macrophages from old mice: role of peroxynitrite. *Free Radic Biol Med.* 2002; 32(6):503-11.
21. Besedovsky L, Born J, Lange T. Endogenous glucocorticoid receptor signaling drives rhythmic changes in human T-cell subset numbers and the expression of the chemokine receptor CXCR4. *FASEB J.* 2013. [Epub ahead of print]

22. Beutler B. Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr Opin Immunol.* 2000; 12(1):20-6.
23. Bioque M, García-Bueno B, Macdowell KS, Meseguer A, Saiz PA, Parellada M, Gonzalez-Pinto A, Rodriguez-Jimenez R, Lobo A, Leza JC, Bernardo M. Peripheral Endocannabinoid System Dysregulation in First-Episode Psychosis. *Neuropsychopharmacology.* 2013. doi: 10.1038/npp.2013.165. [Epub ahead of print]
24. Bornheim LM, Kim KY, Chen B, Correia MA. Microsomal cytochrome P450-mediated liver and brain anandamide metabolism. *Biochem Pharmacol.* 1995; 50(5):677-86.
25. Boulos C, Jiang H, Balazy M. Diffusion of peroxynitrite into the human platelet inhibits cyclooxygenase via nitration of tyrosine residues. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 293(1):222-9.
26. Bradford, M.. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248–254.
27. Bradshaw HB, Rimmerman N, Krey JF, Walker JM. Sex and hormonal cycle differences in rat brain levels of pain-related cannabimimetic lipid mediators. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 291: R349–R358.
28. Buckley NE, Hansson S, Harta G, Mezey E. Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat. *Neuroscience.* 1998; 82(4):1131-49.
29. Buhimschi I, Ali M, Jain V, Chwalisz K y Garfield RE. Differential regulation of nitric oxide in the rat uterus and cervix during pregnancy and labour. *Hum Reprod.* 1996; 11(8):1755-1766.
30. Butler AR, Megson IL y Wright PG. Diffusion of nitric oxide and scavenging by blood in the vasculature. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1425: 168–176.
31. Cadas H, di Tomaso E, Piomelli D. Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain. *J Neurosci.* 1997; 17(4):1226-42.
32. Carney ST, Lloyd ML, MacKinnon SE, Newton DC, Jones JD, Howlett AC y Norford DC. Cannabinoid regulation of nitric oxide synthase I (nNOS) in neuronal cells. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2009; 4:338–349.

33. Cassina AM, Hodara R, Souza JM, Thomson L, Castro L, Ischiropoulos H, Freeman BA, Radi R. Cytochrome c nitration by peroxynitrite. *J Biol Chem.* 2000; 275(28):21409-15.
34. Cavanaugh PF Jr, Ho YK, Bardos TJ. The activation of murine macrophages and natural killer cells by the partially thiolated double stranded RNA poly(I)-mercapto poly(C). *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 1996; 91(2):131-47.
35. Cella M, Leguizamón GF, Sordelli M, Cervini M, Guadagnoli T, Ribeiro ML, Franchi AM y Farina MG. Dual effect of anandamide on rat placenta nitric oxide synthesis. *Placenta.* 2008; 29(8):699–707.
36. Cervera R, Balasch J. Bidirectional effects on autoimmunity and reproduction. *Hum Reprod Update.* 2008; 14(4):359-66.
37. Childers SR, Sexton T, Roy MB. Effects of anandamide on cannabinoid receptors in rat brain membranes. *Biochem Pharmacol.* 1994; 47(4):711-5.
38. Clark DA, McDermott MR, Szewczuk MR. Impairment of host-versus-graft reaction in pregnant mice. II. Selective suppression of cytotoxic T-cell generation correlates with soluble suppressor activity and with successful allogeneic pregnancy. *Cell Immunol.* 1980; 52(1):106-18.
39. Clark DA, Chaouat G, Gorczynski RM. Thinking outside the box: mechanisms of environmental selective pressures on the outcome of the materno-fetal relationship. *Am J Reprod Immunol.* 2002; 47(5):275-82.
40. Clark DA, Manuel J, Lee L, Chaouat G, Gorczynski RM, Levy GA. Ecology of danger-dependent cytokine-boosted spontaneous abortion in the CBA x DBA/2 mouse model. I. Synergistic effect of LPS and (TNF-alpha + IFN-gamma) on pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol.* 2004; 52(6):370-8.
41. Cobellis G, Cacciola G, Scarpa D, Meccariello R, Chianese R, Franzoni MF, Mackie K, Pierantoni R, Fasano S. Endocannabinoid system in frog and rodent testis: type-1 cannabinoid receptor and fatty acid amide hydrolase activity in male germ cells. *Biol Reprod.* 2006; 75(1):82-9.
42. Condon JC, Jeyasuria P, Faust JM, Mendelson CR. Surfactant protein secreted by the maturing mouse fetal lung acts as a hormone that signals the initiation of parturition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(14):4978-83.
43. Condon JC, Hardy DB, Kovaric K, Mendelson CR. Up-regulation of the progesterone receptor (PR)-C isoform in laboring myometrium by activation of nuclear factor-kappaB may contribute to the onset of labor through inhibition of



- PR function. *Mol Endocrinol.* 2006; 20(4):764-75.
44. Conneely OM, Lydon JP, De Mayo F, O'Malley BW. Reproductive functions of the progesterone receptor. *J Soc Gynecol Investig.* 2000; 7(1 Suppl):S25-32.
  45. Cooke JP, Tsao PS. 1993. Cytoprotective effects of nitric oxide. *Circulation.* 1993; 88:2451-2454.
  46. Coronel MF, Labombarda F, De Nicola AF, González SL. Progesterone reduces the expression of spinal cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase and prevents allodynia in a rat model of central neuropathic pain. *Eur J Pain.* 2013. doi: 10.1002/j.1532-2149.2013.00376.x. [Epub ahead of print]
  47. Cox SM, MacDonald PC, Casey ML. Assay of bacterial endotoxin (lipopolysaccharide) in human amniotic fluid: potential usefulness in diagnosis and management of preterm labor. *Am J Obstet Gynecol.* 1988; 159(1):99-106.
  48. Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature.* 1996; 384(6604):83-7.
  49. Cravatt, B.F., Demarest, K., Patricelli, M.P., Bracey, M.H., Giang, D.K., Martin, B.R., Lichtman, A.H. Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:9371-9376.
  50. Cravatt BF, Saghatelian A, Hawkins EG, Clement AB, Bracey MH, Lichtman AH. Functional disassociation of the central and peripheral fatty acid amide signaling systems. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(29):10821-6.
  51. Davidge ST. Prostaglandin H synthase and vascular function. *Circ Res.* 2001; 89(8):650-60.
  52. Daya S. Optimal time in the menstrual cycle for serum progesterone measurement to diagnose luteal phase defects. *Am J Obstet Gynecol.* 1989; 161(4):1009-11.
  53. De Fougères AR y Baines MG. Modulation of the natural killer cell activity in pregnant mice alters the spontaneous abortion rate. *J Reprod Immunol.* 1987; 11(2):147-53.
  54. Deeb RS, Resnick MJ, Mittar D, McCaffrey T, Hajjar DP, Upmacis RK. Tyrosine nitration in prostaglandin H(2) synthase. *J Lipid Res.* 2002; 43(10):1718-26.
  55. Deutsch DG, Goligorsky MS, Schmid PC, Krebsbach RJ, Schmid HHO, Das SK, Dey SK, Arreaza G, Thorup C, Stefano G y Moore LC. Production and

- physiological actions of anandamide in the vasculature of the rat kidney. *J Clin Invest.* 1997; 100:1538-1546.
56. Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS y Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol.* 1988; 34(5):605-613.
57. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A y Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science.* 1992; 258(5090):1946-1949.
58. Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC y Piomelli D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature.* 1994; 372(6507):686-691.
59. Di Pasquale E, Chahinian H, Sanchez P, Fantini J. The insertion and transport of anandamide in synthetic lipid membranes are both cholesterol-dependent. *PLoS One.* 2009; 4(3):e4989.
60. Dogné JM, Hanson J, Pratico D. Thromboxane, prostacyclin and isoprostanes: therapeutic targets in atherogenesis. *Trends Pharmacol Sci.* 2005; 26(12):639-44.
61. Dong YL y Yallampalli C. Interaction between nitric oxide and prostaglandin E2 pathways in pregnant rat uteri. *Am J Physiol.* 270 1996a; (3 Pt 1): E471-E476.
62. Dong YL, Gangula PR y Yallampalli C. Nitric oxide synthase isoforms in the rat uterus: differential regulation during pregnancy and labour. *Journal of Reproduction and Fertility.* 1996b; 107:249-254.
63. Dorman JS, Burke JP, McCarthy BJ, Norris JM, Steenkiste AR, Aarons JH, Schmeltz R, Cruickshanks KJ. Temporal trends in spontaneous abortion associated with Type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 1999; 43(1):41-7.
64. Dosiou C, Hamilton AE, Pang Y, Overgaard MT, Tulac S, Dong J, Thomas P, Giudice LC. Expression of membrane progesterone receptors on human T lymphocytes and Jurkat cells and activation of G-proteins by progesterone. *J Endocrinol.* 2008; 196(1):67-77.
65. Du X, Poltorak A, Silva M, Beutler B. Analysis of Tlr4-mediated LPS signal transduction in macrophages by mutational modification of the receptor. *Blood Cells Mol Dis.* 1999; 25(5-6):328-38.
66. Duclos AJ, Haddad EK, Baines MG. Presence of activated macrophages in a murine model of early embryo loss. *Am J Reprod Immunol.* 1995; 33(5):354-66.

67. Duclos AJ, Pomerantz DK, Baines MG. Relationship between decidual leukocyte infiltration and spontaneous abortion in a murine model of early fetal resorption. *Cell Immunol.* 1994; 159(2):184-93.
68. Dunn CL, Kelly RW, Critchley HO. Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation. *Reprod Biomed Online.* 2003; 7(2):151-61.
69. Eccles JC y Magladery JW. Rhythmic responses of smooth muscle. *J Physiol.* 1937; 90 (1): 68-99.
70. Ehring GR, Kerschbaum HH, Eder C, Neben AL, Fanger CM, Khoury RM, Negulescu PA, Cahalan MD. A nongenomic mechanism for progesterone-mediated immunosuppression: inhibition of K<sup>+</sup> channels, Ca<sup>2+</sup> signaling, and gene expression in T lymphocytes. *J Exp Med.* 1998; 188(9):1593-602.
71. Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B y van der Vliet A. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 1998; 391:393-397.
72. Elovitz MA, Mrinalini C. Animal models of preterm birth. *Trends Endocrinol Metab.* 2004; 15(10):479-87.
73. Elovitz MA, Mrinalini C. The use of progestational agents for preterm birth: lessons from a mouse model. *Am J Obstet Gynecol.* 2006; 195(4): 1004-10.
74. El-Talatini MR, Taylor AH, Elson JC, Brown L, Davidson AC, Konje JC. Localisation and function of the endocannabinoid system in the human ovary. *PLoS One.* 2009; 4(2):e4579.
75. Farina M, Ribeiro ML y Franchi A. Nitric oxide synthases in pregnant uterus. *Reproduction.* 2001; 121:403-407.
76. Fergusson DM, Horwood LJ, Northstone K. Maternal use of cannabis and pregnancy outcome. ALSPAC Study Team. Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood. *BJOG.* 2002; 109(1):21-7.
77. Fidel PI Jr, Romero R, Maymon E, Hertelendy F. Bacteria-induced or bacterial product-induced preterm parturition in mice and rabbits is preceded by a significant fall in serum progesterone concentrations. *J Matern Fetal Med.* 1998; 7(5):222-6.
78. Fimiani C, Mattocks D, Cavani F, Salzet M, Deutsch DG, Pryor S, Bilfinger TV y Stefano GB. Morphine and anandamide stimulate intracellular calcium

- transients in human arterial endothelial cells: coupling to nitric oxide release. *Cell Signal*. 1999; 11:189-193.
79. Förstermann U, Schmidt SHH, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD y Nakame M. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification of different cell types. *Biochem Pharmacol*. 1991; 42: 1849-1857.
80. Franchi AM, Chaud M, Rettori V, Suburo A, Mc Cann SM y Gimeno, M. Role of nitric oxide in eicosanoid synthesis and uterine motility in estrogen-treated rat uteri. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91: 539- 543.
81. Fried PA, Watkinson B y Willan A. Marijuana use during pregnancy and decreased length of gestation. *Am J Obstet Gynecol*. 1984; 150: 23-27.
82. Fried PA, Smith AM. A literature review of the consequences of prenatal marijuana exposure. An emerging theme of a deficiency in aspects of executive function. *Neurotoxicol Teratol*. 2001; 23(1):1-11.
83. Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carrière D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem*. 1995; 232(1):54-61.
84. Gaoni Y y Mechoulam R. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc*. 1964; 86:1646.
85. Gellersen, M.S. Fernandes, and J.J. Brosens. Non-genomic progesterone actions in female reproduction . *Human Reproduction Update*. 2009; Vol.15, No.1 pp. 119– 138.
86. Gerard CM, Mollereau C, Vassart G y Parmentier M. Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J*. 1991; 279 (Pt 1):129-134.
87. Gervasi MG, Rapanelli M, Ribeiro ML, Farina M, Billi S, Franchi AM, Perez Martinez S. The endocannabinoid system in bull sperm and bovine oviductal epithelium: role of anandamide in sperm-oviduct interaction. *Reproduction*. 2009; 137(3):403-14.
88. Gervasi MG, Osycka-Salut C, Caballero J, Vazquez-Levin M, Pereyra E, Billi S, Franchi A, Perez-Martinez S. Anandamide capacitates bull spermatozoa through CB1 and TRPV1 activation. *PLoS One*. 2011; 6(2):e16993.
89. Gewaltig MT, Kojda G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc Res*. 2002; 55(2):250-60.

90. Gorzalka BB, Dang SS. Minireview: Endocannabinoids and gonadal hormones: bidirectional interactions in physiology and behavior. *Endocrinology*. 2012; 153(3):1016-24.
91. Graham JD, Clarke CL. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev*. 1997; 18(4):502-19. Review.
92. Grisham MB, Johnson GG y Lancaster JR Jr. Quantification of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Methods Enzymol*. 1996; 268:237-246.
93. Grisham MB, Jourdeuil D y Wink DA. Nitric oxide I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol*. 1999; 276: 315–321.
94. Habayeb, O.M., Taylor, A.H., Finney, M., Evans, M.D., Konje, J.C. Plasma anandamide concentration and pregnancy outcome in women with threatened miscarriage. *JAMA* 2008; 299:1135-1136.
95. Halasz M y Szekeres-Bartho J. The role of progesterone in implantation and trophoblast invasion. *J Reprod Immunol*. 2013; 97(1):43-50.
96. Ham AW. *Tratado de Histología*. Nueva Editorial Interamericana S. A. México. 1970; pp 1025.
97. Henneke P, Golenbock DT. Innate immune recognition of lipopolysaccharide by endothelial cells. *Crit Care Med*. 2002; 30(5 Suppl):S207-13.
98. Hillard CJ, Jarrahan A. Cellular accumulation of anandamide: consensus and controversy. *Br J Pharmacol*. 2003; 140(5):802-8.
99. Hirsch E, Muhle R. Intrauterine bacterial inoculation induces labor in the mouse by mechanisms other than progesterone withdrawal. *Biol Reprod*. 2002; 67(4):1337-41.
100. Huang PL, Dawson TM, Bredt DS, Snyder SH y Fishman MC. Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell*. 1993; 75 (7): 1273-1286.
101. Izumi H y Garfield RE. Relaxant effects of nitric oxide and cyclic GMP on pregnant rat uterine longitudinal smooth muscle. *Eur J Obst Gynecol Reprod Biol*. 1995; 60:171-180.
102. Joachim R, Zenclussen AC, Polgar B, Douglas AJ, Fest S, Knackstedt M, Klapp BF, Arck PC. The progesterone derivative dydrogesterone abrogates murine stress-triggered abortion by inducing a Th2 biased local immune response. *Steroids*. 2003; 68(10-13):931-40.

- 103.** Kajii T, Ferrier A, Niikawa N, Takahara H, Ohama K y Avirachan S. Anatomic and chromosomal anomalies in 639 spontaneous abortuses. *Hum Genet.* 1980; 55(1):87-98.
- 104.** Kalinka J, Szekeres-Bartho J. The impact of dydrogesterone supplementation on hormonal profile and progesterone-induced blocking factor concentrations in women with threatened abortion. *Am J Reprod Immunol.* 2005; 53(4):166-71.
- 105.** Karima R, Matsumoto S, Higashi H, Matsushima K. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Mol Med Today.* 1999; 5(3):123-32.
- 106.** Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., Chambon, P. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* 1990; 9:1603-1614.
- 107.** Kathuria, S., Gaetani, S., Fegley, D., Valiño, F., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Tarzia, G., La Rana, G., Calignano, A., Giustino, A., Tattoli, M., Palmery, M., Cuomo, V., Piomelli, D. Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med* 2003; 9:76-81.
- 108.** Kleinfeld RG y O'Shea JD. Spatial and temporal patterns of deoxyribonucleic acid synthesis and mitosis in the endometrial stroma during decidualization in the pseudopregnant rat. *Biol Reprod.* 1983; 28(3):691-702.
- 109.** Kontula K, Paavonen T, Luukkainen T, Andersson LC. Binding of progestins to the glucocorticoid receptor. Correlation to their glucocorticoid-like effects on in vitro functions of human mononuclear leukocytes. *Biochem Pharmacol.* 1983; 32(9):1511-8.
- 110.** Kraus WL, Montano MM, Katzenellenbogen BS. Cloning of the rat progesterone receptor gene 5'-region and identification of two functionally distinct promoters. *Mol Endocrinol.* 1993; 7(12):1603-16.
- 111.** Krinke GJ. En: *The laboratory mouse.* Ed: Hans Hedrich, Elsevier Academic Press. 2004; pp 162-163.
- 112.** Lai JN, Wang OY, Lin VH, Liao CF, Tarng DC, Chien EJ. The non-genomic rapid acidification in peripheral T cells by progesterone depends on intracellular calcium increase and not on Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchange inhibition. *Steroids.* 2012; 77(10):1017-24.

113. Li TC, Spuijbroek MD, Tuckerman E, Anstie B, Loxley M, Laird S. Endocrinological and endometrial factors in recurrent miscarriage. *BJOG*. 2000; 107(12):1471-9.
114. Li TC, Makris M, Tomsu M, Tuckerman E, Laird S. Recurrent miscarriage: aetiology, management and prognosis. *Hum Reprod Update*. 2002; 8(5):463-81.
115. Lichtman AH, Leung D, Shelton CC, Saghatelian A, Hardouin C, Boger DL, Cravatt BF. Reversible inhibitors of fatty acid amide hydrolase that promote analgesia: evidence for an unprecedented combination of potency and selectivity. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004; 311(2):441-8.
116. 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. A biosynthetic pathway for anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(36):13345-13350.
117. Liu J, Wang L, Harvey-White J, Huang BX, Kim HY, Luquet S, Palmiter RD, Krystal G, Rai R, Mahadevan A, Razdan RK, Kunos G. Multiple pathways involved in the biosynthesis of anandamide. *Neuropharmacology* 2008; 54, 1–7.
118. Losel RM, Falkenstein E, Feuring M, Schultz A, Tillmann HC, Rossol-Haseroth K, Wehling M. Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiol Rev*. 2003; 83(3):965-1016.
119. Maccarrone M, Valensise H, Bari M, Lazzarin N, Romanini C y Finazzi-Agro A.. Relation between decreased anandamide hydrolase concentrations in human lymphocytes and miscarriage. *Lancet*. 2000a; 355(9212): 1326-1329.
120. Maccarrone M, Bari M, Lorenzon T, Bisogno T, Di Marzo V, Finazzi-Agrò A. Anandamide uptake by human endothelial cells and its regulation by nitric oxide *J Biol Chem*. 2000b; 275 (18): 13484–13492
121. Maccarrone, M., Valensise, H., Bari, M., Lazzarin, N., Romanini, C., Finazzi-Agrò, A. Progesterone upregulates anandamide hydrolase in human lymphocytes: role of cytokines and implications for fertility. *J Immunol*. 2001; 166:7183-7189.
122. Maccarrone, M., Bisogno, T., Valensise, H., Lazzarin, N., Fezza, F., Manna, C., Di Marzo, V., Finazzi-Agrò, A. Low fatty acid amide hydrolase and high anandamide levels are associated with failure to achieve an ongoing pregnancy after IVF and embryo transfer. *Mol Hum Reprod*. 2002a; 8:188-195.

- 123.**Maccarrone M, Bari M, Battista N, Finazzi-Agrò A. Endocannabinoid degradation, endotoxic shock and inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2002b; 1(1):53-63.
- 124.**Maccarrone M, Bari M, Di Rienzo M, Finazzi-Agrò A, Rossi A. Progesterone activates fatty acid amide hydrolase (FAAH) promoter in human T lymphocytes through the transcription factor Ikaros. Evidence for a synergistic effect of leptin. *J Biol Chem*. 2003; 278(35):32726-32.
- 125.**Maccarrone M, Barboni B, Paradisi A, Bernabò N, Gasperi V, Pistilli MG, Fezza F, Lucidi P, Mattioli M. Characterization of the endocannabinoid system in boar spermatozoa and implications for sperm capacitation and acrosome reaction. *J Cell Sci*. 2005; 118(Pt 19):4393-404.
- 126.**Maccarrone M, Dainese E, Oddi S. Intracellular trafficking of anandamide: new concepts for signaling. *Trends Biochem Sci*. 2010; 35(11):601-8.
- 127.**Maeshima N, Fernandez RC. Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013; 3:3.
- 128.**Mahendroo MS, Porter A, Russell DW, Word RA. The parturition defect in steroid 5alpha-reductase type 1 knockout mice is due to impaired cervical ripening. *Mol Endocrinol*. 1999; 13(6):981-92.
- 129.**Marquart S, Zerr P, Akhmetshina A, Palumbo K, Reich N, Tomcik M, Horn A, Dees C, Engel M, Zwerina J, Distler O, Schett G, Distler JH. Inactivation of the cannabinoid receptor CB1 prevents leukocyte infiltration and experimental fibrosis. *Arthritis Rheum*. 2010; 62(11):3467-76.
- 130.**Martinez Calejman C, Astort F, Di Gruccio JM, Repetto EM, Mercau M, Giordanino E, Sanchez R, Pignataro O, Arias P, Cymeryng CB. Lipopolysaccharide stimulates adrenal steroidogenesis in rodent cells by a NFκB-dependent mechanism involving COX-2 activation. *Mol Cell Endocrinol*. 2011; 337(1-2):1-6.
- 131.**Matias I, Pochard P, Orlando P, Salzet M, Pestel J, Di Marzo V. Presence and regulation of the endocannabinoid system in human dendritic cells. *Eur J Biochem*. 2002; 269(15):3771-8.
- 132.**Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC y Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 1990; 346(6284): 561-564.



133. McKay LI y Cidlowski JA. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev.* 1999; 20(4):435-59.
134. Mesiano S, Chan EC, Fitter JT, Kwek K, Yeo G, Smith R. Progesterone withdrawal and estrogen activation in human parturition are coordinated by progesterone receptor A expression in the myometrium. *J Clin Endocrinol Metab.* 200; 87(6):2924-30.
135. Michalek SM, Kiyono H, Babb JL y McGhee JR. Inheritance of LPS nonresponsiveness and elevated splenic IgA immune responses in mice orally immunized with heterologous erythrocytes. *J Immunol.* 1980; 125(5):2220-2224.
136. Michie HR, Manogue KR, Spriggs DR, Revhaug A, O'Dwyer S, Dinarello CA, Cerami A, Wolff SM y Wilmore DW. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N Engl J Med.* 1988; 318(23):1481-1486.
137. Miko E, Halasz M, Jericevic-Mulac B, Wicherek L, Arck P, Arató G, Skret Magierlo J, Rukavina D, Szekeres-Bartho J. Progesterone-induced blocking factor (PIBF) and trophoblast invasiveness. *J Reprod Immunol.* 2011; 90(1):50-7.
138. Miller L, Alley EW, Murphy WJ, Russell SW, Hunt JS. Progesterone inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide production in murine macrophages. *J Leukoc Biol.* 1996; 59(3):442-50.
139. Misko TP, Highkin MK, Veenhuizen AW, Manning PT, Stern MK, Currie MG, Salvemini D. Characterization of the cytoprotective action of peroxynitrite decomposition catalysts. *J Biol Chem.* 1998; 273(25):15646-53.
140. Montecucco F, Di Marzo V, da Silva RF, Vuilleumier N, Capettini L, Lenglet S, Pagano S, Piscitelli F, Quintao S, Bertolotto M, Pelli G, Galan K, Pilet L, Kuzmanovic K, Burger F, Pane B, Spinella G, Braunersreuther V, Gayet-Ageron A, Pende A, Viviani GL, Palombo D, Dallegri F, Roux-Lombard P, Santos RA, Stergiopoulos N, Steffens S, Mach F. The activation of the cannabinoid receptor type 2 reduces neutrophilic protease-mediated vulnerability in atherosclerotic plaques. *Eur Heart J.* 2012; 33(7):846-56.
141. Moriconi A, Cerbara I, Maccarrone M, Topai A. GPR55: Current knowledge and future perspectives of a purported "Type-3" cannabinoid receptor. *Curr Med Chem.* 2010; 17(14):1411-29.

142. Muccioli GG. Endocannabinoid biosynthesis and inactivation, from simple to complex. *Drug Discov Today*. 2010; 15(11-12):474-83.
143. Munro S, Thomas KL y Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 1993; 365(6441):61-65.
144. Murad F. Regulation of cytosolic Guanylyl Cyclase by nitric oxide: the NO-cyclic GMP signal transduction system. *Adv Pharmacol*. 1994; 26: 19-33.
145. Muzio M, Natoli G, Saccani S, Levrero M y Mantovani A. 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*. 1998; 187(12):2097-2101.
146. Narita S. ABC transporters involved in the biogenesis of the outer membrane in gram-negative bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2011; 75(6):1044-54.
147. Ndiaye K, Poole DH, Walusimbi S, Cannon MJ, Toyokawa K, Maalouf SW, Dong J, Thomas P, Pate JL. Progesterone effects on lymphocytes may be mediated by membrane progesterone receptors. *J Reprod Immunol*. 2012; 95(1-2):15-26.
148. Neal HV y Rand HW. En: *Comparative anatomy*. Ed: Blakinston's son & Co, Inc. USA. 1943.
149. Ogando, D.G., Paz, D., Cella, M., Franchi, A.M. The fundamental role of increased production of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced embryonic resorption in mice. *Reproduction* 2003; 125:95-110.
150. Oh, S.Y., Kim, C.J., Park, I., Romero, R., Sohn, Y.K., Moon, K.C., Yoon, B.H. Progesterone receptor isoform (A/B) ratio of human fetal membranes increases during term parturition. *Am J Obstet Gynecol*. 2005; 193:1156-1160.
151. Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N. Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J Biol Chem*. 2004; 279(7):5298-305.
152. O'Neil RG, Brown RC. The vanilloid receptor family of calcium-permeable channels: molecular integrators of microenvironmental stimuli. *News Physiol Sci*. 2003; 18:226-31.
153. Pacher P, Bátkai S, Kunos G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*. 2006; 58(3):389-462.
154. Pacher P, Beckman JS y Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*. 2007; 87:315-424.

155. Padykula HA. 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. 1981; Pp, 197-216.
156. Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev.* 2006; 27(1):73-100. Epub 2005 Nov 23.
157. Pandey MK, Rani R, Agrawal S. An update in recurrent spontaneous abortion. *Arch Gynecol Obstet.* 2005; 272(2):95-108.
158. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE y Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *New Engl J Med.* 1990; 323 (1): 22-29.
159. Peralta L, Agirregoitia E, Mendoza R, Expósito A, Casis L, Matorras R, Agirregoitia N. Expression and localization of cannabinoid receptors in human immature oocytes and unfertilized metaphase-II oocytes. *Reprod Biomed Online.* 2011; 23(3):372-9.
160. Petersen G, Hansen HS. N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolysing phospholipase D lacks the ability to transphosphatidylate. *FEBS Lett.* 1999; 455(1-2):41-4.
161. Pinto JC, Potié F, Rice KC, Boring D, Johnson MR, Evans DM, Wilken GH, Cantrell CH, Howlett AC. Cannabinoid receptor binding and agonist activity of amides and esters of arachidonic acid. *Mol Pharmacol.* 1994; 46(3):516-22.
162. Piomelli D, Giuffrida A, Calignano A y Rodriguez de Fonseca F. The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol Sci.* 2000; 21(6):218-224.
163. Pollock JS, Forstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M y Murad F. 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.* 1991; 88(23): 10480-10484.
164. Radi R, Cassina A, Hodara R, Quijano C, Castro L. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33(11):1451-64.
165. Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(12):4003-4008.

- 166.**Ragusa A, de Carolis C, dal Lago A, Miriello D, Ruggiero G, Brucato A, Pisoni MP, Muscarà M, Merati R, Maccario L, Nobili M. Progesterone supplement in pregnancy: an immunologic therapy? *Lupus*. 2004; 13(9):639-42.
- 167.**Rees DD, Palmer RM y Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86 (9): 3375-3378.
- 168.**Romero R, Roslansky P, Oyarzun E, Wan M, Emamian M, Novitsky TJ, Gould MJ, Hobbins JC. Labor and infection. II. Bacterial endotoxin in amniotic fluid and its relationship to the onset of preterm labor. *Am J Obstet Gynecol*. 1988; 158(5):1044-9.
- 169.**Roth SH, Williams PJ. The non-specific membrane binding properties of delta9-tetrahydrocannabinol and the effects of various solubilizers. *J Pharm Pharmacol*. 1979; 31(4):224-30.
- 170.**Rubinstein L y Forbes TR. Maintenance of pregnancy with subcutaneous pellets of progesterone in ovariectomized mice. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1963; 113:1043-6.
- 171.**Salomon LJ, Rozenberg P, Szekeres-Bartho J, Malagrida L, Giudicelli Y, Ville Y. Changes in progesterone-induced-blocking-factor expression rates following mifepristone administration in termination of pregnancy at 5 to 8 weeks. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2005; 17(5):353-6.
- 172.**Salter M, Knowles RG y Moncada S. Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-independent nitric oxide synthases. *Federation of European Biochemical Societies*. 1991; 291(1):145-149.
- 173.**Salvemini D, Wang ZQ, Stern MK, Currie MG, Misko TP. Peroxynitrite decomposition catalysts: therapeutics for peroxynitrite-mediated pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(5):2659-63.
- 174.**Sawzdargo M, Nguyen T, Lee DK, Lynch KR, Cheng R, Heng HH, George SR y O'Dowd BF. 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*. 1999; 64:193-198.
- 175.**Sengupta S, Ghosh D. Effect of early luteal phase administration of a single dose mifepristone on immunohistochemical distribution of interleukin 1 alpha (IL-1

- alpha) and transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) in mid-luteal phase ovary of the rhesus monkey. *Indian J Physiol Pharmacol.* 2003; 47(2):221-4.
- 176.**Shackelford R, Adams DO y Johnson SP. IFN-gamma and lipopolysaccharide induce DNA binding of transcription factor PU.1 in murine tissue macrophages. *J Immunol.* 1995; 154(3):1374-1382.
- 177.**Sherwood RA, Keating J, Kavvadia V, Greenough A y Peters TJ. Substance misuse in early pregnancy and relationship to fetal outcome. *Eur J Pediatr.* 1999; 158:488-492.
- 178.**Shimada S, Iwabuchi K, Watano K, Shimizu H, Yamada H, Minakami H, Onoé K. Expression of allograft inflammatory factor-1 in mouse uterus and poly(I:C)-induced fetal resorption. *Am J Reprod Immunol.* 2003; 50(1):104-12.
- 179.**Simon GM, Cravatt BF. Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-N-acyl ethanolamine and a role for alpha/beta-hydrolase 4 in this pathway. *J Biol Chem.* 2006; 281(36):26465-72.
- 180.**Simpson JL. Genes, chromosomes, and reproductive failure. *Fertil Steril.* 1980; 33(2):107-116.
- 181.**Sladek SM y Roberts JM. Nitric oxide synthase activity in the gravid rat uterus decreased a day before the onset of parturition. *Am J Obstet Gynecol.* 1996; 175: 1661-1667.
- 182.**Smith CG, Asch RH. Acute, short-term, and chronic effects of marijuana on the female primate reproductive function. *NIDA Res Monogr.* 1984; 44:82-96.
- 183.**Spinas GA, Bloesch D, Keller U, Zimmerli W, y Cammisuli S. Pretreatment with ibuprofen augments circulating tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, and elastase during acute endotoxemia. *J Infect Dis.* 1991; 163(1):89-95.
- 184.**Springall DR, Riveros-Moreno V, Buttery L, Suburo A, Bishop AE, Merrett M, Moncada S y Polak JM. Immunological detection of nitric oxide synthase(s) in human tissues using heterologous antibodies suggesting different isoforms. *Histochemistry.* 1992; 98(4): 259-266.
- 185.**Stefano GB, Kream RM. Reciprocal regulation of cellular nitric oxide formation by nitric oxide synthase and nitrite reductases. *Med Sci Monit.* 2011; 17(10):RA221-6.
- 186.**Sun X, Dey SK. Endocannabinoid signaling in female reproduction. *ACS Chem Neurosci.* 2012; 3(5):349-55.

- 187.** Sun YX, Tsuboi K, Okamoto Y, Tonai T, Murakami M, Kudo I, Ueda N. Biosynthesis of anandamide and N-palmitoylethanolamine by sequential actions of phospholipase A2 and lysophospholipase D. *Biochem J.* 2004; 380(Pt 3):749-56.
- 188.** Szekeres-Bartho J, Polgar B, Kozma N, Miko E, Par G, Szereday L, Barakonyi A, Palkovics T, Papp O, Varga P. Progesterone-dependent immunomodulation. *Chem Immunol Allergy.* 2005; 89:118-25.
- 189.** Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K y Akira S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity.* 1999; 11(4):443-451.
- 190.** Tanaka M, Yanagihara I, Takahashi H, Hamaguchi M, Nakahira K, Sakata I. The mRNA expression of fatty acid amide hydrolase in human whole blood correlates with sepsis. *J Endotoxin Res.* 2007; 13(1):35-8.
- 191.** Tang B, Guller S, Gurdip E. Mechanism of human endometrial stromal cells decidualization. *Ann N Y Acad Sci.* 1994; 734:19-25.
- 192.** Taylor AH, Ang C, Bell SC, Konje JC. The role of the endocannabinoid system in gametogenesis, implantation and early pregnancy. *Hum Reprod Update.* 2007; 13(5):501-13.
- 193.** Thellin O, Coumans B, Zorzi W, Igout A, Heinen E. Tolerance to the foeto-placental 'graft': ten ways to support a child for nine months. *Curr Opin Immunol.* 2000; 12(6):731-7.
- 194.** Thors L, Fowler CJ. Effect of nitric oxide donors on membrane tritium accumulation of endocannabinoids and related endogenous lipids. *Eur J Pharmacol.* 2009; 621(1-3):10-8.
- 195.** Trostchansky A, O'Donnell VB, Goodwin DC, Landino LM, Marnett LJ, Radi R, Rubbo H. Interactions between nitric oxide and peroxynitrite during prostaglandin endoperoxide H synthase-1 catalysis: a free radical mechanism of inactivation. *Free Radic Biol Med.* 2007; 42(7):1029-38.
- 196.** Tsutahara NM, Weems YS, Arreguin-Arevalo JA, Nett TM, LaPorte ME, Uchida J, Pang J, McBride T, Randel RD, Weems CW. Effects of endocannabinoid 1 and 2 (CB1; CB2) receptor agonists on luteal weight, circulating progesterone, luteal mRNA for luteinizing hormone (LH) receptors, and luteal unoccupied and

- occupied receptors for LH in vivo in ewes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2011; 94(1-2):17-24.
- 197.** Ueda N, Yamamoto K, Kurahashi Y, Yamamoto S, Ogawa M, Matsuki N, Kudo I, Shinkai H, Shirakawa E y Tokunaga T. Oxygenation of arachidonylethanolamide (anandamide) by lipoxygenases. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.* 1995; 23:163-165.
- 198.** Upmacis RK, Deeb RS, Hajjar DP. Regulation of prostaglandin H2 synthase activity by nitrogen oxides. *Biochemistry.* 1999; 38(38):12505
- 199.** Vadseth C, Souza JM, Thomson L, Seagraves A, Nagaswami C, Scheiner T, Torbet J, Vilaire G, Bennett JS, Murciano JC, Muzykantov V, Penn MS, Hazen SL, Weisel JW, Ischiropoulos H. Pro-thrombotic state induced by post-translational modification of fibrinogen by reactive nitrogen species. *J Biol Chem.* 2004; 279(10):8820-6.
- 200.** Vercelli CA, Aisemberg J, Billi S, Wolfson ML, Franchi AM. Endocannabinoid system and nitric oxide are involved in the deleterious effects of lipopolysaccharide on murine decidua. *Placenta.* 2009a; 30(7):579-84.
- 201.** Vercelli, C.A., Aisemberg, J., Billi, S., Cervini, M., Ribeiro, M.L., Farina, M., Franchi, A.M. Anandamide regulates lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthesis and tissue damage in the murine uterus. *Reprod BioMed Online* 2009b; 18:824-831.
- 202.** Virág L, Szabó E, Bakondi E, Bai P, Gergely P, Hunyadi J, Szabó C. Nitric oxide-peroxynitrite-poly(ADP-ribose) polymerase pathway in the skin. *Exp Dermatol.* 2002; 11(3):189-202.
- 203.** Vreugdenhil AC, Rousseau CH, Hartung T, Greve JW, van 't Veer C y Buurman WA. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein mediates LPS detoxification by chylomicrons. *J Immunol.* 2003; 170(3):1399-1405.
- 204.** Wang H, Guo Y, Wang D, Kingsley PJ, Marnett LJ, Das SK, DuBois RN, Dey SK. Aberrant cannabinoid signaling impairs oviductal transport of embryos. *Nat Med.* 2004; 10(10):1074-80.
- 205.** Wang H, Hirsch E. Bacterially-induced preterm labor and regulation of prostaglandin-metabolizing enzyme expression in mice: the role of toll-like receptor 4. *Biol Reprod.* 2003; 69(6):1957-63.

206. Wang, H., Xie, H., Sun, X., Kingsley, P.J., Marnett, L.J., Cravatt, B.F., Dey, S.K. Differential regulation of endocannabinoid synthesis and degradation in the uterus during embryo implantation. *Prost Other Lipid Med.* 2007; 83:62-74.
207. Wei BQ, Mikkelsen TS, McKinney MK, Lander ES, Cravatt BF. A second fatty acid amide hydrolase with variable distribution among placental mammals. *J. Biol. Chem.* 2006; 281,36569–36578.
208. Wei LL, Hawkins P, Baker C, Norris B, Sheridan PL, Quinn PG. An amino-terminal truncated progesterone receptor isoform, PRc, enhances progestin-induced transcriptional activity. *Mol Endocrinol.* 1996; 10(11):1379-87.
209. Wissink S, van Heerde EC, van der Burg B, van der Saag PT. A dual mechanism mediates repression of NF-kappaB activity by glucocorticoids. *Mol Endocrinol.* 1998; 12(3):355-63.
210. Wurfel MM, Kunitake ST, Lichenstein H, Kane JP y Wright SD. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS. *J Exp Med.* 1994; 180(3):1025-1035.
211. Xu DX, Wang H, Zhao L, Ning H, Chen YH, Zhang C. Effects of low-dose lipopolysaccharide (LPS) pretreatment on LPS-induced intra-uterine fetal death and preterm labor. *Toxicology.* 2007; 234(3):167-75.
212. Yallampalli C, Garfield RE y Byam-Smith M. Nitric oxide inhibits uterine contractility during pregnancy but not during delivery. *Endocrinology.* 1993; 133(4): 1899-1902.
213. Yates, M.L. and Barker, E.L. Organized trafficking of anandamide and related lipids. *Vitam. Horm.* 2009; 81, 25–53
214. Yu M, Ives D y Ramesha CS. Synthesis of prostaglandin E2 ethanolamide from anandamide by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem.* 1997; 272(34):21181-21186.
215. Zahl, P. A. and Bjerknes, C. Induction of decidua-placental hemorrhage in mice by the endotoxins of certain gram-negative bacteria. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1941; 54: 329–332.
216. Zuckerman B, Frank DA, Hingson R, Amaro H, Levenson SM, Kayne H, Parker S, Vinci R, Aboagye K, Fried LE, et al. Effects of maternal marijuana and cocaine use on fetal growth. *N Engl J Med.* 1989; 320(12):762-8.
217. Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sørgård M, Di Marzo V, Julius D, Högestätt ED. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature.* 1999; 400(6743):452-7.