

Capítulo 7

Participación del sistema endocannabinoide en la pérdida temprana del embarazo

Manuel L. Wolfson • Julieta A. Schander • Carolina Marvaldi • Fernanda L. de la Cruz Borbhiry • Maximiliano Cella • Julieta Aisemberg • Ana M. Franchi

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO) (CONICET-UBA) Buenos Aires, Argentina. anafranchi2000@gmail.com

Resumen: 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 lipopolisacárido (LPS) estudiamos la participación del SEC tanto del sitio de implantación como de las células inmunes infiltrantes y su posible regulación por progesterona (P). 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). 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. 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 clave: sistema endocannabinoide, aborto

Abstract: It has been demonstrated a close association between abortion and changes in the endocannabinoid system (ECS) in women peripheral lymphocytes. In a murine model of lipopolysaccharide-induced embryonic reabsorption (ER) we studied the involvement of the ECS of both the implantation site and the infiltrating immune cells and their possible regulation by progesterone (P). We observed elevated plasma levels of the main endocannabinoid, anandamide (AEA). On the other hand, we found that LPS-induced ER was much lower in transgenic mice deficient in the type 1 cannabinoid receptor, as well as the decrease in serum levels of P. We demonstrated the presence of ECS in peripheral blood mononuclear cells (mouse PBMC) and that the activity of the metabolizing enzyme of the AEA (fatty acid amide hydrolase, FAAH) of the PBMC of pregnant mice is greater than that of the non-pregnant mice. We also observed a protective effect of P on FAAH activity and that it was mediated by the classical receptors of this hormone (PR). On the other hand, LPS increased both nitric oxide (NO) levels, and the enzyme that synthesizes it (iNOS). P abolished the increase induced by LPS, acting through glucocorticoid receptors. During ER, the decidua is infiltrated by cells of the immune system, suffers significant damage and is finally expelled. We investigated the effect of leukocyte infiltration on FAAH activity in the decidua through a coculture system. When the decidua from control animals were grown in the presence of PBMC from pregnant animals treated with LPS, the activity of the decidua FAAH decreased, an effect that was reversed by the co-administration of P or a selective iNOS inhibitor (aminoguanidine). This work demonstrates that the ECS participates in ER induced by LPS and that the changes of this system in the decidua are influenced by both infiltrating immune cells and alterations in the endocrine system.

Keywords: Endocannabinoid system, pregnancy loss.

Abreviaturas: AEA = anandamida, AG= aminoguanidina, CB1= receptor de cannabinoides tipo 1, CB2= receptor de cannabinoides tipo 2, EC= endocannabinoides, FAAH= amidohidrolasa de ácidos grasos, Ko= knock-out, LONA= lonaprizan, LPS= lipopolisacárido, m- AEA= meta-anandamida, NAPE= N-Acil-fosfatidil-etanolamina, NAPE-PLD= N-Acil-fosfatidil-etanolamina fosfolipasa, D NO= óxido nítrico, NOSi= sintasa inducible de óxido nítrico, P= progesterona, PBMC= células mononucleares de sangre periférica, PR= receptores de progesterona, RE= reabsorción embrionaria, SEC= sistema endocannabinoide, THC= tetrahidrocannabinol, Wt= wild type.

Introducción, resultados y 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.

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.

La investigación básica aún no ha podido desentrañar las causas ni los mecanismos fisiopatológicos de las pérdidas embrionarias.

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.

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 Bjercknes, 1943) y también se sabe que está implicado en el mecanismo de parto pretérmino en la mujer (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 lipopolisacárido (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.

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- α y la liberación de prostanoïdes (Michalek y col., 1980; Michie y col., 1988). 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 μ 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 reabsorción embrionaria (RE) post-implantatoria. 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).

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, piloerección 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 proinflamatorias. 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).

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 óxido nítrico (NO) y metabolitos derivados del ácido araquidónico (las prostaglandinas, los tromboxanos, los leucotrienos y las prostaciclinas).

Por otro lado, la administración de aminoguanidina (AG), un inhibidor selectivo de la actividad de la sintasa inducible de óxido nítrico (NOS), 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.

El sistema endocannabinoide

En el año 1964 se aisló el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC), principal compuesto psicoactivo de la planta *Cannabis sativa* (Gaoni y Mechoulam, 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. 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). La anandamida o araquidonil-etanolamida (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).

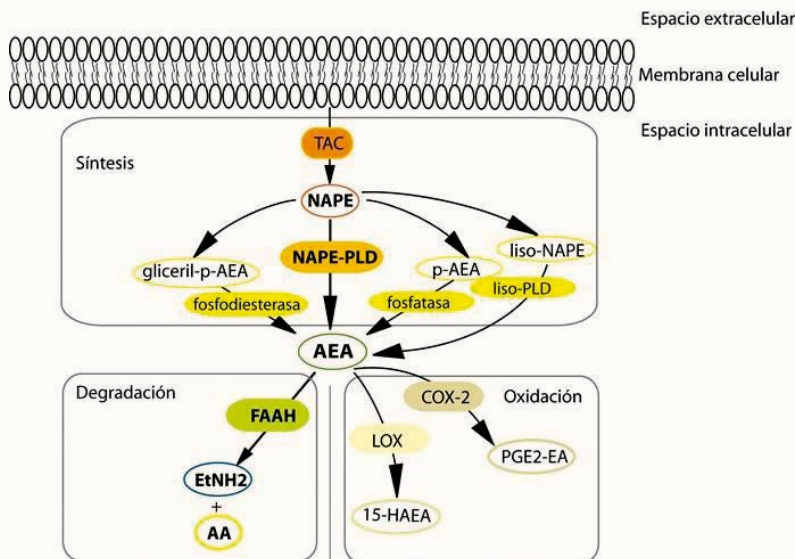


Figura 1. Metabolismo de AEA. Figura modificada de Maccarrone y col. (2010)

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 (Zuckerman y col., 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 Smith, 1986), y produce aumento de muerte intrauterina y pérdida de peso fetal en ratones (Abel y Dintcheff, 1986).

El 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 interfase 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 Dey, 2000).

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

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., 2007) y una disminución en los niveles de actividad de FAAH (la enzima que degrada la AEA) en linfocitos de sangre periférica (Maccarrone y col., 2000). Por otra parte, el grupo de Maccarrone (2002) encontró que tanto

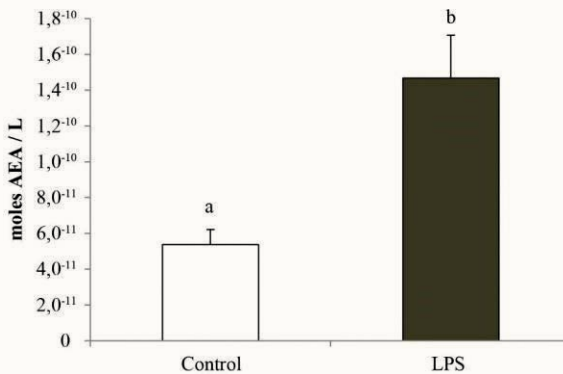


Figura 2. Niveles plasmáticos de AEA. Letras diferentes indican una diferencia significativa ($p < 0,05$). $n=7$ animales por grupo.

bajos niveles de actividad de FAAH como altas concentraciones de AEA plasmática están asociados a fallas en el embarazo en mujeres que fueron sometidas a fecundación in-vitro. 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 Smith, 1986). Es decir, los compuestos cannabinomiméticos, tanto endógenos como exógenos, pueden afectar la regulación del embarazo y la sobrevivencia embrionaria y/o fetal.

Tabla 1. Tasa de RE en animales tratados con m-AEA.

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

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 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 meta-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 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).

	Wt	Ko-CB1
Control	0,0 ± 0,0 %	0,0 ± 0,0 %
LPS (1 µg/g de peso)	82,0 ± 11,9 % (*)	28,5 ± 3,0 %
LPS (0,5 µg/g de peso)	69,4 ± 22,0 % (*)	3,4 ± 1,4 %

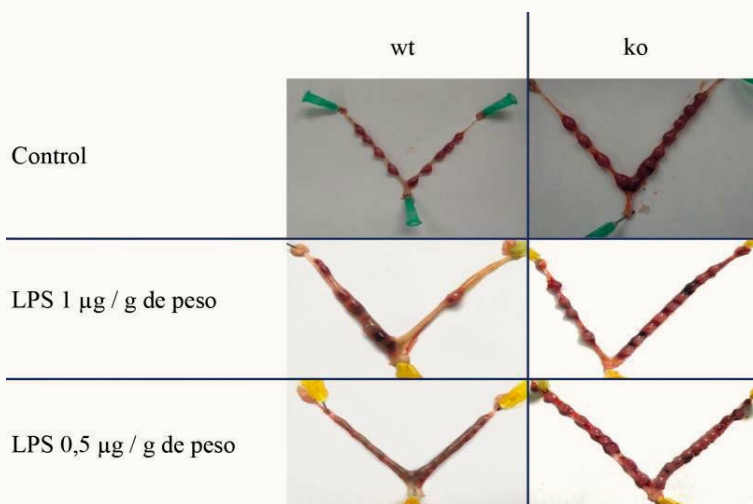


Figura 3. Reabsorción embrionaria inducida por LPS en la cepa CD1. Panel superior, tasas de RE en ratones wt y ko-CB1 (%RE: sitios reabsorbidos sobre sitios totales multiplicado por 100 en día 9 de gestación). * $p < 0,05$ (wt vs ko). Panel inferior, fotos ilustrativas de los cuernos uterinos, las flechas muestran ejemplos puntuales de sitios reabsorbidos. Los mismos se identifican por su menor tamaño y aspecto hemorrágico. $n=5$ animales por grupo.

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 progesterona (P) en suero (Babalioglu y col., 1996; Li y col., 2002). Por otro lado, diferentes trabajos informan que menores niveles plasmáticos de esta hormona están 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 Mühle, 2002). Particularmente, en nuestro modelo demostramos previamente que el tratamiento con LPS disminuye significativamente los niveles de P 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 (2003; 2004) 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., 2000). 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.

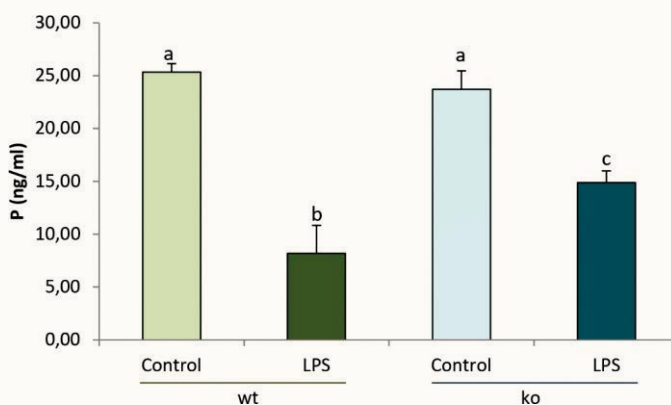


Figura 4. Niveles séricos de progesterona en ratones ko-CB1. Letras diferentes indican una diferencia significativa ($p < 0,05$). $n=8$ animales por grupo.

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., 2006; 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.

Se ha descrito que el tratamiento con LPS produce un aumento de la infiltración leucocitaria en diferentes tejidos. 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) 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).

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.

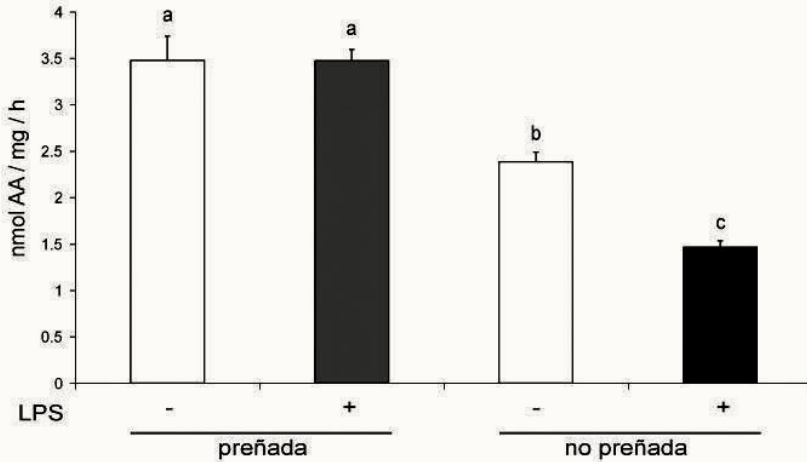


Figura 5. Actividad de FAAH en PBMC de hembras preñadas y no preñadas, control y tratadas con LPS (6 h). Letras diferentes indican una diferencia significativa ($p < 0,05$). $n=5$ animales por grupo.

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 ésta era mayor comparada con 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.

Estudiamos entonces si la administración de un antagonista de los receptores de P, el 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.

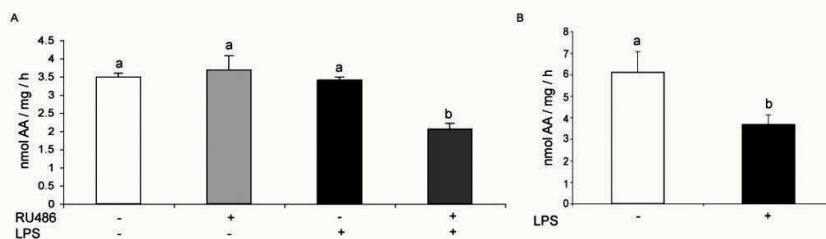


Figura 6. Actividad de FAAH en PBMC de ratones preñados. A.- PBMC de ratones tratados 6 h con LPS y RU486. B.- PBMC de ratones tratados 12 h con LPS. Letras diferentes indican una diferencia significativa ($p < 0,05$). $n=5$ animales por grupo.

Como ya se mencionó, en los ratones no preñados los niveles séricos de P son bajos en comparación con sus niveles durante la preñez. 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.

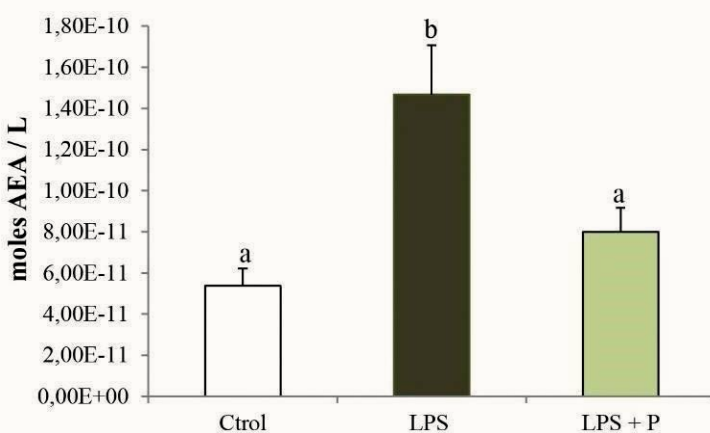


Figura 7. Niveles plasmáticos AEA. Letras diferentes indican una diferencia significativa ($p < 0,05$). $n=7$ animales por grupo.

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 (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.

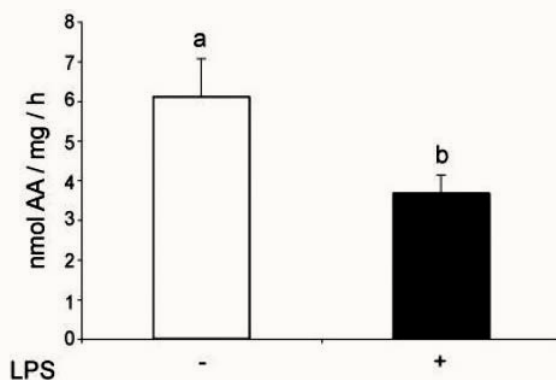


Figura 8. Actividad de FAAH en PBMC de ratones preñados tratados 12 h con LPS. Letras diferentes indican una diferencia significativa ($p < 0,05$). $n=5$ animales por grupo.

Como señalamos, 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, descrita previamente (Aisemberg y col., 2013).

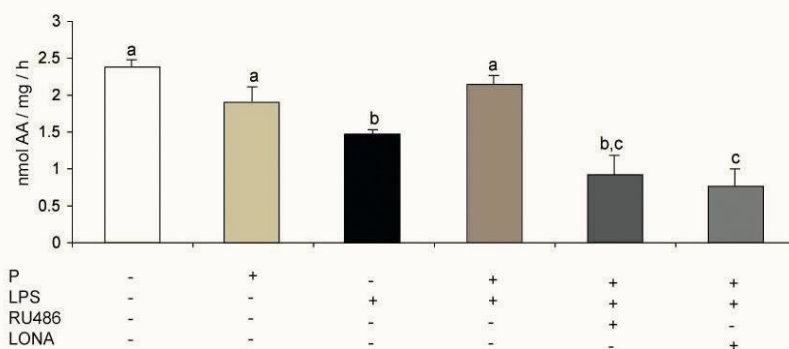


Figura 9. Actividad de FAAH en animales no preñados. Letras diferentes indican una diferencia significativa ($p < 0,05$). $n=4$ animales por grupo.

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., 2014) 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. 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).

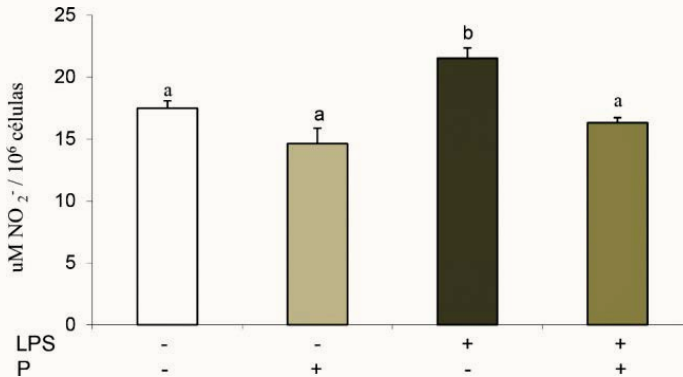


Figura 10. Producción de nitratos y nitritos en PBMC de ratones no preñados. Letras diferentes indican una diferencia significativa ($p < 0,05$). $n=5$ animales por grupo.

En concordancia con nuestros resultados previos hemos observado que el LPS también incrementa la liberación de NO producido por las PBMC. Dado el papel inmunomodulador de la P, se analizó si esta hormona pudiese 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.

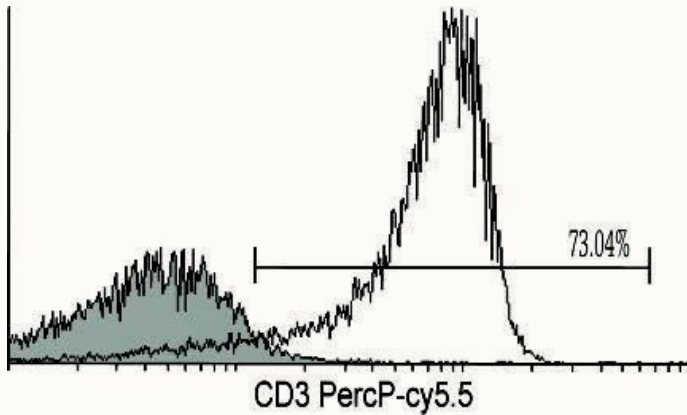


Figura 11. Citometría de flujo representativa de células CD3+. n=4 animales por grupo.

Determinamos que los linfocitos T son la población mayoritaria (73%) 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., 2002) 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., 2000; 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 se había 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 mostraban el bloqueo del aumento inducido por LPS de la producción de NO por un antagonista del receptor CB1. De igual forma, Maccarrone y col. (2000) han informado que la activación de los receptores CB1 por AEA provoca una estimulación de la actividad y expresión de la NOSi 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, 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

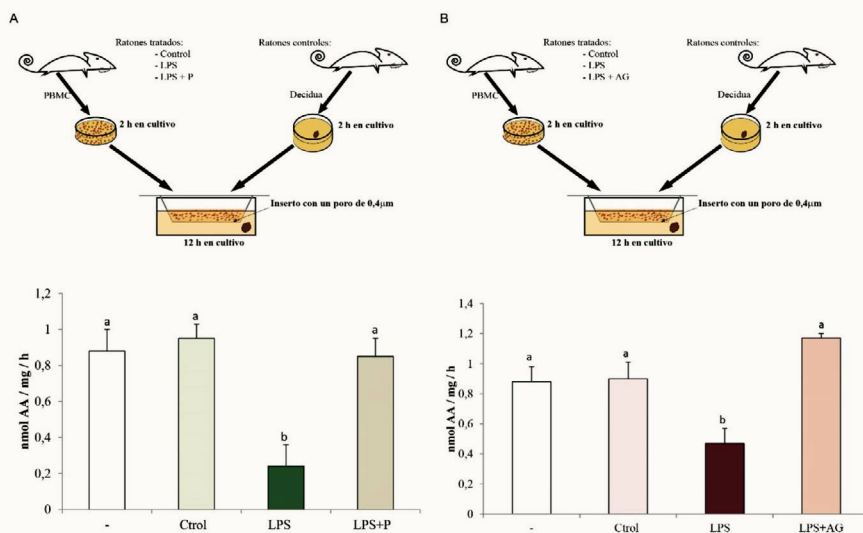


Figura 12. Actividad de FAAH de deciduas co-cultivadas con PBMC. A.- PBMC de ratones tratados 6 h con LPS y P. B.- PBMC de ratones tratados 6 h con LPS y AG. Letras diferentes indican una diferencia significativa ($p < 0,05$). $n=6$ animales por grupo.

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 12 h, estas células indujeron una disminución de la actividad de FAAH decidual. Como se describió anteriormente, la P cumple diferentes papeles inmunomoduladores 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 descriptos 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.

Todos los procedimientos realizados en este trabajo fueron aprobados por Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina (Universidad de Buenos Aires) (CD N° 900/2016), y se realizaron de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NIH).

Conclusiones

En conjunto, los resultados presentados 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.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y por el Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT). Agradecemos a Daniel González y Marcela Márquez por el cuidado de los animales de experimentación.

Referencias

- Abel EL, Dintcheff BA. Increased marihuana-induced fetotoxicity by a low dose of concomitant alcohol administration. *J. Stud. Alcohol.* 1986; 47(5):440-3.
- 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.
- 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.
- 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.

- Asch RH, 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.
- Babalioğlu R, Varol FG, İlhan 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.
- 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.* 2014; 28(1):67-75.
- 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; FLAMM-PEPs study—Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental. Peripheral endocannabinoid system dysregulation in first-episode psychosis. *Neuropsychopharmacology.* 2013; 38(13):2568-77.
- Cella M, Leguizamón GF, Sordelli M, Cervini M, Guadagnoli T, Ribeiro ML, Franchi AM yFarina MG. Dual effect of anandamide on rat placenta nitric oxide synthesis. *Placenta.* 2008; 29(8):699-707.
- Childers SR, Sexton T, Roy MB. Effects of anandamide on cannabinoid receptors in rat brain membranes. *Biochem Pharmacol.* 1994; 47(4):711-5.
- Condon JC, Hardy DB, Kovacic K, Mendelson CR. Up-regulation of the progesterone receptor (PR)-C isoform in laboring myometrium by activation of nuclear factor- κ B may contribute to the onset of labor through inhibition of PR function. *Mol. Endocrinol.* 2006; 20(4):764-75.
- 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.
- 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.
- Fergusson DM, Horwood LJ, Northstone K; ALSPAC Study Team. Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood. Maternal use of cannabis and pregnancy outcome. *BJOG.* 2002; 109(1):21-7.
- 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.
- Fried PA, Watkinson B, Willan A. Marijuana use during pregnancy and decreased length of gestation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1984; 150(1):23-7.
- Gaoni R and Mechoulam R. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc.* 1964; 86: 1646-47.
- Gorzalka BB, Dang SS. Minireview: Endocannabinoids and gonadal hormones: bidirectional interactions in physiology and behavior. *Endocrinology.* 2012;153(3):1016-24.
- Halasz M y Szekeres-Bartho J. The role of progesterone in implantation and trophoblast invasion. *J. Reprod. Immunol.* 2013; 97(1):43-50.
- 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.
- 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.
- Li TC, Makris M, Tomsu M, Tuckerman E, Laird S. Recurrent miscarriage: aetiology, management and prognosis. *Hum. Reprod. Update.* 2002; 8(5):463-81.
- Maccarrone M, Bari M, Battista N, Finazzi-Agrò A. Endocannabinoid degradation, endotoxic shock and inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2002; 1(1):53-63.
- 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.
- 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.* 2000; 275(18):13484-92.
- 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.* 2002; 8(2):188-95.
- Maccarrone M, De Felici M, Bari M, Klinger F, Siracusa G, Finazzi-Agrò A. Down-regulation of anandamide hydrolase in mouse uterus by sex hormones. *Eur. J. Biochem.* 2000; 267(10):2991-7.

- Maccarrone M, De Petrocellis L, Bari M, Fezza F, Salvati S, Di Marzo V, Finazzi-Agrò A. Lipopolysaccharide downregulates fatty acid amide hydrolase expression and increases anandamide levels in human peripheral lymphocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 2001; 393(2):321-8.
- Maccarrone M, Gasperi V, Fezza F, Finazzi-Agrò A, Rossi A. Differential regulation of fatty acid amide hydrolase promoter in human immune cells and neuronal cells by leptin and progesterone. *Eur. J. Biochem.* 2004; 271(23-24):4666-76.
- Maccarrone M, Valensise H, Bari M, Lazzarin N, Romanini C, Finazzi-Agrò A. Relation between decreased anandamide hydrolase concentrations in human lymphocytes and miscarriage. *Lancet.* 2000; 355(9212):1326-9.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Ogando DG, Paz D, Cell M., Franchi AM. The fundamental role of increased production of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced embryonic resorption in mice. *Reproduction* 2003; 125:95-110.
- 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.
- Paria BC y Dey SK. Ligand-receptor signalling with endocannabinoids in preimplantation embryo development and implantation. 2000. *Chem Phys Lipids.* 108(1-20)211-20.
- Park B, McPartland JM, Glass M. Cannabis, cannabinoids and reproduction. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 2004; 70(2):189-97.

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Zahl, P. A. and Bjercknes, 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.
- 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.