



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

El ambiente enriquecido como estrategia para prevenir el parto prematuro y las consecuencias en la descendencia en un modelo murino.

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

Julieta Aylen Schander

Directora de tesis: Ana María Franchi.

Director asistente de tesis: Federico Jensen.

Consejera de estudios: Cecilia Varone.

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

Buenos Aires, 2020.

El ambiente enriquecido como estrategia para prevenir el parto prematuro y las consecuencias en la descendencia en un modelo murino.

El estilo de vida antes y durante el embarazo afecta la salud materna y fetal. Numerosos estudios han demostrado que las intervenciones orientadas a reducir el estrés y la ansiedad materna tienen efectos positivos en algunas complicaciones de la gestación, como la preeclampsia, la pérdida temprana del embarazo, la diabetes gestacional y el parto prematuro. En este trabajo, demostramos que el enriquecimiento ambiental, definido como un estímulo biológicamente significativo y no invasivo de la vía sensorial en combinación con actividad física voluntaria, disminuyó la tasa de parto prematuro (PP) en un 40%. Para ello, utilizamos un modelo murino de inflamación durante la preñez, inducido por la administración sistémica de lipopolisacárido bacteriano (LPS). Además, mostramos que el ambiente enriquecido (AE) modula el metabolismo materno produciendo un ambiente antiinflamatorio que contribuye al mantenimiento de la preñez. En el útero de ratonas preñadas, el AE disminuye la expresión de TLR4 y CD14 (el receptor de LPS y su proteína coactivadora), evitando el aumento de la producción de prostaglandina (PG) E₂ y PGF_{2α} y de la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS), inducido por LPS. En el cérvix, la exposición a un AE inhibe algunos de los eventos involucrados en la maduración cervical prematura, como la liberación de PGE₂, el aumento de la actividad de la metaloproteinasa de matriz (MMP)-9 y el reclutamiento de neutrófilos, conservando así la función cervical. Además, observamos un efecto protector del enriquecimiento ambiental materno sobre la descendencia, reduciendo la muerte perinatal y algunos de los efectos nocivos del ambiente inflamatorio intrauterino, inducido por la administración de LPS. Nuestros resultados también sugieren que este efecto está mediado, en parte, por un entorno antiinflamatorio inducido por AE en el líquido amniótico, caracterizado por un aumento de la citoquina antiinflamatoria IL-10. Proponemos que el enriquecimiento ambiental podría ser una terapia no invasiva y preventiva para las complicaciones del embarazo que eventualmente puede trasladarse a las mujeres gestantes, disminuyendo el riesgo de sufrir un parto prematuro y en consecuencia las secuelas que están presentes en los niños y niñas que nacen demasiado pronto.

Palabras clave

Parto prematuro, ambiente enriquecido, estilo de vida materno, lipopolisacárido bacteriano, maduración cervical, contractilidad uterina, inflamación prenatal, líquido amniótico, salud de la descendencia.

The enrichment of maternal environment as a strategy to prevent preterm birth and the sequelae on the offspring in a murine model.

Maternal lifestyle affects both mother health and pregnancy outcome in humans. Several studies have demonstrated that interventions oriented towards reducing stress and anxiety have positive effects on pregnancy complications such as preeclampsia, excessive gestational weight, gestational diabetes and preterm birth. In this work, we showed that the environmental enrichment (EE), defined as a noninvasive and biological significant stimulus of the sensory pathway combined with voluntary physical activity, prevented preterm birth (PTB) rate in a 40% in an inflammatory mouse model induced by the systemic administration of bacterial lipopolysaccharide (LPS). Furthermore, we found that EE modulates maternal metabolism and produces an anti-inflammatory environment that contributes to pregnancy maintenance. In pregnant mice uterus, EE reduces the expression of TLR4 and CD14 (the LPS receptor and its coactivator protein), preventing the LPS-induced increase in prostaglandin (PG)E₂ and PGF_{2α} release and nitric oxide synthase (NOS) activity. In cervical tissue, EE inhibits cervical ripening events, such as PGE₂ release, matrix metalloproteinase (MMP)-9 increased activity and neutrophil recruitment, therefore conserving cervical function. Interestingly, we also observed a protective effect of the maternal enrichment of the environment on the offspring, reducing the perinatal death and some of the deleterious effects of the inflammatory environment induced by the LPS administration. This effect thought to be mediated by an anti-inflammatory environment induced by the EE in the amniotic fluid, characterized by an increase in IL-10 in the EE exposed group. It seems that EE could be a noninvasive and preventive therapy for pregnancy complications that eventually may translate to the human condition, averting pre-term birth occurrence and dreaded sequelae that are present in the offspring born to soon.

Key words

Pre-term birth, Enriched environment, maternal lifestyle, bacterial lipopolysaccharide, cervical ripening, uterine contractility, prenatal inflammation, amniotic fluid, offspring health.

Los resultados presentados en esta tesis han sido parcialmente publicados en:

“The enrichment of maternal environment prevents pre-term birth in a mice model.”

Schander JA, Aisemberg J, Correa F, Wolfson ML, Juriol L, Cymeryng C, Jensen F, Franchi AM.

Reproduction. 2020 Apr;159(4):479-492. doi: 10.1530/REP-19-0572.

Agradecimientos

GRACIAS...

A Ana, por ser no solo mi directora durante todos estos años, sino también mi mentora, mi amiga, un ejemplo a seguir, la abuela científica de Fran. Gracias por dirigir tan profesionalmente esta tesis, por interesarte, por apasionarte, por dejarme tomar decisiones, por darme libertad. Gracias por llevarme a conocer París. Gracias por formar el mejor equipo de trabajo que conozco. Mis años en el laboratorio Franchi fueron hermosos. Parte de mi corazón se queda en el 111 del CEFyBO, y otra parte en la presidencia del CONICET. Gracias por tu incansable lucha y compromiso.

A mi “Franchi´s Team”, a todos en general quiero agradecerles por el día a día, porque no recuerdo un día de trabajo que haya sido malo. Porque si uno está mal, los otros buscamos alegrarlo y la calidad humana de este grupo es lo que más valoro. Por los mates, los chocolates, la música y mucho más. Trabajar así da gusto.

A Juli, primero por ser mi amiga, por quererme, por escucharme. Segundo por todo lo que tu experiencia aportó a esta tesis. Me encanta trabajar con vos, discutir resultados y experimentos, Gracias por leer la tesis y mejorarla. Sos una hermosa persona.

A Manu, por ser mi confidente, por compartir nuestras angustias y dudas y darnos ánimo. Por todo tu conocimiento que siempre suma y por el aporte que diste a esta tesis. Por las figuras de Illustrator y otras ediciones. Por Feli que es lo más.

A Maki, por tu buena onda de todos los días, siempre decirme que sí a compartir una piza, o un sanguchito. Por todas las NOS y RIAs. Por pipetear tan bien!! Gracias por ocuparte de todas las compras, pedir presupuestos, realizar pagos. El tiempo que nos ahorras en el día a día es invaluable y nos hace la vida más fácil.

A Fer (nando), por ser tan bueno conmigo, por tus abrazos. Por saber de tooodo, por tu ayuda con los mails en inglés y la escritura de los papers. Por tus ideas y sugerencias. Por intentar enseñarme de geografía, aunque no aprendí nada te agradezco la intención. Te quiero.

A Vicky, por ser de las personas más buenas que conozco. Por ser mi amiga todos estos años. Por compartir las horas de laboratorio y ayudarme siempre que lo necesité.

A Caro, por compartir conmigo mis últimos años de becaria. Por compartir la mesada y tener todo siempre ordenadito. Por los congresos compartidos, que siempre son más divertidos con vos.

A Anabel, porque tu compromiso con este grupo se nota desde el día que llegaste. Por fomentar el orden y la limpieza (cuando Maki no nos ve). Porque siempre que te pedí ayuda estabas dispuesta a darme una mano.

A Fer (nanda), por dejarme co-dirigir su tesis. Por haberme dado una tan linda primer experiencia en esto de enseñar cosas. Por ser tan compañera. Fue hermoso compartir este último tiempo con vos.

A Anita, por tu alegría y por sumar tus ocurrencias. Me divertí mucho compartiendo mesadas y congresos con vos.

A Pauli por enseñarme muchas de las técnicas cuando empecé y por tu invaluable ayuda con la estadística. Por tu buena onda y tu amistad. Por ser siempre tan buena conmigo.

A Felisa, por saber siempre de todo de todo el mundo, por compartir tu experiencia en el cervix conmigo. Por las meriendas. Ya te voy a ir a visitar a Suiza.

A Rami, que ya no está pero que sigue estando. Por todos los primeros años cuando “no era persona”.

También quiero agradecer al resto del CEFyBO, porque siempre tiramos para el mismo lado. Por generar tan buen clima de trabajo:

A Patri, Cris y Ale, por ocuparse de todo lo administrativo y siempre resolver cualquier problema que les llevamos. Por los cafecitos y las charlas de pasillo.

A Pachi, Vane, Ro, Pame, porque su trabajo es invaluable para nosotros. Por siempre tener buena onda. Por los mates y las charlas.

A Dani, por arreglar todo! Tu llegada fue una salvación.

A Marce, Dani, Enzo y Eduardo. Por su excelente trabajo cuidando a los animales. En particular a Marce por siempre tener buena predisposición frente a los problemas. A Alicia porque ocuparse del bioterio no es tarea fácil.

A los AFE, Andre, Eva, Ange, Juli y Ganna, por ser los vecinos más copados. En especial a Andre y Eva, por siempre ayudarme con las cuestiones de protocolos y análisis de datos.

Al 113 y al 116, Mari, Pau Tomi, Euge, Mica, Lauchi, Jime, Sil, Agus, Raque, Cami, Nico, por compartir los cumpleaños, los festejos y los almuerzos. En particular a Raque, porque sos medio Franchi y no estamos completos si no estás. Por cebarnos mate, por tus ocurrencias que siempre me hacen divertir mucho. También a Lauchi y Jime, porque formamos un hermoso equipo junto con Fer para dirigir su tesina.

A Fede, por asistir esta tesis. Por tus ideas de inmunología y tu colaboración en la citometría. Por corregir el manuscrito. También a todos los miembros de su laboratorio por la ayuda. En particular a Nata y Lore, por enseñarme de citometría. Por trabajar conmigo cuando arrancamos de cero. Gracias por darme una mano siempre.

A Ruth, y todos los chicos de su labo, Flor, Marcos, Damián, Hernán, Salva, por sus consejos y ayuda. En particular a Flor, por todo lo que me ayudaste con las inmunos y el Photoshop.

Al resto del CEFyBO, los Jawer, los Motta, los Faletti, los Gabis, etc. Porque siempre que pedí ayuda estuvieron dispuestos a darme una mano. A Romi por enseñarme a hacer zimogramas y a Gise por las clases de q-PCR.

A la AGENCIA y al CONICET por las becas y subsidios otorgados que permitieron llevar adelante este trabajo.

A la FCEyN y ala UBA por todos los años de formación de excelencia.

Por otro lado, quiero agradecer a mi familia y amigxs, por ser el apoyo moral que se necesita para llevar a cabo un doctorado.

A los SOCLA, que q pesar de haber llegado a la vida adulta y las responsabilidades que conlleva, siempre estamos ahí para bancarnos y acompañarnos. Ya no somos 15, somos muchos más y aumentando...

A Coli, por hacerme la segunda mil veces en el labo hasta tarde. Por corregirme los posters. Por cuidar a Fran mientras yo terminaba con algo. Sos genial, te adoro. Además, junto con Felpa, siempre están ahí para nosotros. Incluso en las varias mudanzas. ¡Gracias!

A mis amigos y amigas de la vida, patín, pile, a mi ahijado, a lxs niñxs de mis amigas. Su presencia me alegra la vida.

A mis papás, porque siempre estuvieron, están y estarán incondicionalmente para mí. En particular a mi mamá, por cuidar a Franco. Sin tu ayuda nada de esto hubiera sido posible.

A Ali, porque también me ayudaste mil veces con Franco. ¡Gracias!

A Mario, por ser mi compañero desde hace 5 años y sumando. Por proyectar conmigo. Gracias por apoyarme siempre y sostenerme. Te amo y amo nuestra familia.

A Franco. Porque sos mi vida. Gracias por llegar y completarme. Aunque todo es más complejo, también es mil veces más lindo. Te amo.

“Ojalá podamos ser desobedientes, cada vez que recibimos órdenes que humillan nuestra conciencia o violan nuestro sentido común.”

Eduardo Galeano.

A FRANCO.

Abreviaturas

μ L: microlitros	kDa: kilo Daltons
15-PGDH: 15-hidroxiprostaglandina dehidrogenasa	LA: Líquido amniótico
AA: Ácido araquidónico	LBP: Proteína de unión al LPS
AC: Ambiente control	LPS: Lipopolisacárido
ADNc: ADNcopia	MEC: Matriz extracelular
AE: Ambiente enriquecido	mg: miligramo/s
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero	min.: minutos
COX 1: Ciclooxygenasa-1	mL: mililitros
COX 2: Ciclooxygenasa-2	MMP: Metaloproteinasas de matriz
d: día	NF-kB: Factor nuclear kappa Beta
DAG: Diacilglicerol	NO: Óxido nítrico
DEIS: Dirección de Estadística e Información de Salud.	NOS: Óxido nítrico sintasa
dNTPs: desoxiribonucleótidos trifosfatados	P4: Progesterona
E2: Estrógenos	PGE2: Prostaglandina E2
EDTA: Ácido etilendiaminotetracético	PGF2 α : Prostaglandina F2 α
EE: Error estándar	PGH2: prostaglandina H2
FNF: Fibronectina Fetal	PGs: Prostaglandinas
g: gramos	PL: Fosfolipasa
h: hora/s	PP: Parto prematuro
i.p.: intraperitoneal	PT: Parto a término
IIA: infección intraamniótica	RIA: Radioinmunoensayo
IL: Interleuquina	SF: Solución fisiológica
IQR: rango intercuartil	TLR: Receptor de tipo toll
	TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa.

Índice

Introducción.....	3
1. El parto.....	3
1.1. El parto prematuro.....	3
1.2. Modelos de PP.....	12
1.3. Características generales de los animales de estudio.....	13
1.4. Nuestro modelo de PP.	14
2. El lipopolisacárido bacteriano o LPS.....	14
3. PGs y reproducción.	17
3.1. Síntesis y metabolismo.....	17
4. NO y reproducción.	19
5. LPS, activación de la vía común del parto y PP.	20
5.1. Contractilidad uterina y PP.....	21
5.2. Borramiento cervical y PP.	25
6. El líquido amniótico.....	28
7. Programación fetal.....	29
8. Importancia del estilo de vida durante la gestación.....	29
9. El ambiente enriquecido.	30
Hipótesis y objetivos.	32
Materiales y métodos.	34
10. Animales.....	34
10.1. Condiciones de bioterio.	34
10.2. Protocolo de enriquecimiento ambiental.	34
10.3. Modelo de PP.	36
10.4. Desarrollo de las crías	38
11. Técnicas.....	38
11.1. Medición de glucosa y test oral de tolerancia a la glucosa.....	38
11.2. Medición de triglicéridos y colesterol.	39
11.3. Purificación de células mononucleares de sangre periférica (o PBMC).....	39
11.4. Western blot.....	40
11.5. RT-PCR.	41
11.6. Medición de la actividad gelatinasa de MMP-2 y MMP-9 por zimografía.....	42
11.7. Radioinmunoensayo de PGs.....	43
11.8. Radioinmunoensayo de corticosterona.	44
11.9. Actividad de las NOS medida por radio conversión.	44

11.10.	Inmunofluorescencia.....	44
11.11.	Citometría de flujo de líquido amniótico.	45
11.12.	ELISA de citoquinas.	46
12.	Análisis estadístico de los datos.....	46
13.	Reactivos, drogas y soluciones.....	47
Resultados.....		50
14.	Efecto del AE sobre la fisiología de las hembras.....	50
14.1.	Efecto de la exposición a un AE sobre la ganancia en peso de las hembras.....	50
14.2.	Efectos del AE sobre las características de la preñez y los parámetros metabólicos en hembras preñadas.....	51
15.	Efecto del enriquecimiento ambiental materno sobre la gestación.....	56
15.1.	El enriquecimiento ambiental materno reduce la tasa de PP en un modelo inflamatorio inducido por la administración de lipopolisacáridos bacterianos.....	56
15.2.	El AE materno modula los niveles proteicos de los receptores de tipo Toll (TLR)-4 y su proteína co-activadora CD14 en el útero de hembras preñadas en d15.....	57
15.3.	El enriquecimiento ambiental materno previene el aumento de corticosterona sérica inducido por la administración de LPS.....	59
15.4.	El enriquecimiento ambiental materno induce cambios moleculares en el útero y el cérvix en respuesta al desafío inflamatorio inducido por el LPS.....	60
15.5.	Resumen del objetivo 2:.....	68
16.	Efecto del enriquecimiento ambiental materno y del desafío inflamatorio durante la gestación sobre la descendencia.....	69
16.1.	Efecto del enriquecimiento ambiental materno y el LPS sobre la unidad feto-placentaria en día 15 de gestación.....	69
16.2.	Efecto del enriquecimiento ambiental materno y del LPS sobre la descendencia durante la lactancia.....	74
16.3.	Análisis de la descendencia al llegar a la adultez.....	78
16.4.	Resumen del objetivo 3:.....	81
17.	Efecto del enriquecimiento ambiental materno solamente durante la gestación.....	82
Discusión.....		84
Conclusiones.....		98
Referencias.....		99

Introducción.

1. El parto.

La gestación en humanos dura aproximadamente 40 semanas y es posible gracias a una fina regulación temporal del ambiente uterino que involucra cambios en su perfil inmunológico siendo proinflamatorio en el momento de la implantación y antiinflamatorio y tolerogénico durante el crecimiento del feto (Figura 1). El embarazo finaliza en el momento del parto, definido como el proceso por el cual se expulsa al feto y a la placenta ya sea de manera natural o quirúrgica. Es un proceso que se desencadena luego de que la interfaz materno-fetal cambie su perfil tolerogénico hacia uno proinflamatorio. Los mecanismos involucrados en este cambio de perfil no se conocen en su totalidad, pero si se sabe que los eventos que se desencadenan en consecuencia son el aumento en la contractilidad uterina, la iniciación del remodelado y posterior borramiento cervical y la ruptura de las membranas fetales.

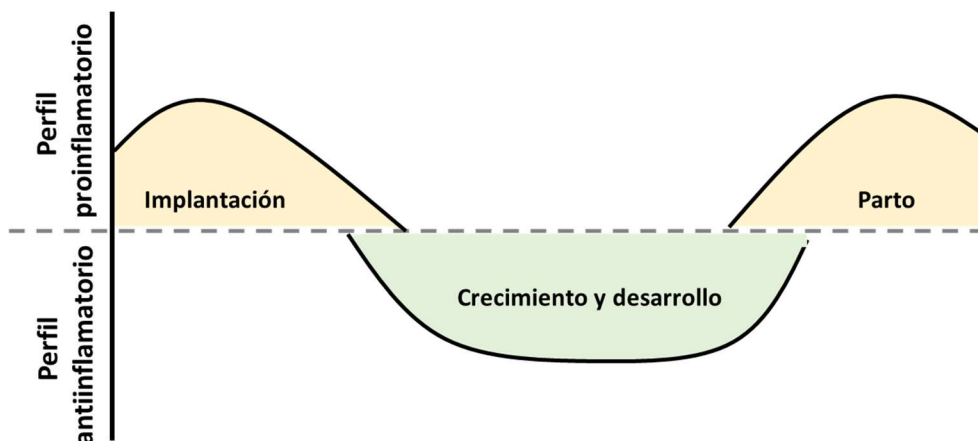


Figura 1: Perfiles inmunológicos de la interfaz materno-fetal durante la gestación.

1.1. El parto prematuro.

1.1.1. Definición.

El parto es considerado prematuro cuando ocurre entre las 22 y las 36,6 semanas de gestación (Di Marco y Asprea, 2015). Si el embarazo termina antes de las 22 semanas de gestación hablamos de aborto, ya sea este espontáneo o inducido.

A nivel mundial, la prematuridad es la primera causa de mortalidad en los niños y niñas menores de cinco años. Además, en casi todos los países que disponen de datos fiables al respecto, las tasas de nacimientos prematuros están en aumento (OMS, 2018). Esto parece estar asociado principalmente al aumento de la edad materna y a la prevalencia de algunas enfermedades como la diabetes y la hipertensión, muy relacionadas con el estilo de vida de la madre antes y durante la gestación. También, el aumento de embarazos múltiples debido al incremento de los tratamientos de fertilización asistida contribuye al aumento de la tasa de partos pretérmino. Por último, el empoderamiento económico de las mujeres ha ido modificando su rutina, incluso durante la gestación, lo que viene asociado, también, con un aumento en los niveles de estrés que conlleva el mundo del trabajo. Muchos trabajos muestran que el estrés materno es un factor que contribuye al desencadenamiento del parto pretérmino (Wadhwa *et al.*, 2011).

El término *prematuro/a* comprende un grupo de niños y niñas muy heterogéneo, con edad gestacional, peso de nacimiento, estado nutricional, y riesgos de morbi-mortalidad diferentes, por lo que ha sido necesario clasificarlos en subgrupos. Existen diferentes clasificaciones según el criterio que se utilice. Si nos enfocamos en la edad gestacional, el Ministerio de Salud de la Nación Argentina (Di Marco y Asprea, 2015) definió 4 grupos: Prematuros extremos, muy prematuros, prematuros moderados y prematuros tardíos (Figura 2).

Según edad gestacional al nacer	Categoría	Edad gestacional (semanas)
Pretérminos < 32 semanas	Prematuros extremos	22 - 27,6
	Muy prematuros	28 - 31,6
Pretérminos ≥ 32 semanas	Prematuros moderados	32 - 33,6
	Prematuros tardíos	34 - 36,6

Figura 2: Clasificación del grado de prematurez según la edad gestacional.

Fuente: Di marco y col, 2015.

1.1.2. Epidemiología y relevancia del tema en estudio.

Cada año nacen en el mundo unos 15 millones de bebés antes de llegar a término, es decir, más de uno en 10 nacimientos. Aproximadamente un millón de niños prematuros mueren cada año debido a complicaciones en el parto. Además, los bebés prematuros que sobreviven tienen mayores posibilidades de sufrir algún tipo de discapacidad de por vida, en particular, discapacidades relacionadas con el aprendizaje y problemas visuales y auditivos (OMS, 2018).

Las tasas de supervivencia presentan notables disparidades entre los distintos países del mundo. En contextos de ingresos bajos, la mitad de los bebés nacidos a las 32 semanas mueren por no haber recibido cuidados sencillos, como aportar al recién nacido calor suficiente, o no haber proporcionado apoyo a la lactancia materna, así como por no haberseles administrado atención básica para combatir infecciones y problemas respiratorios. En los países de ingresos altos, prácticamente la totalidad de estos bebés sobrevive. Sin embargo, se ha visto que estos niños tienen un riesgo más elevado de sufrir complicaciones a lo largo de su vida.

En nuestro país durante el año 2017, según la Dirección de Estadística e Información de Salud (DEIS), la tasa de parto prematuro (PP) fue de un 8,76% presentando variación interprovincial (Figura 3). Además, el 52% de la mortalidad en menores de un año se atribuyó al nacimiento prematuro. Según datos de un trabajo publicado en 2017 en *Archivos Argentinos de Pediatría*, en los 10 años precedentes, el número de partos pretérmino aumentó un 19,1% y las defunciones neonatales de nacidos pretérmino crecieron un 16,5% (Finkelstein *et al.*, 2017).

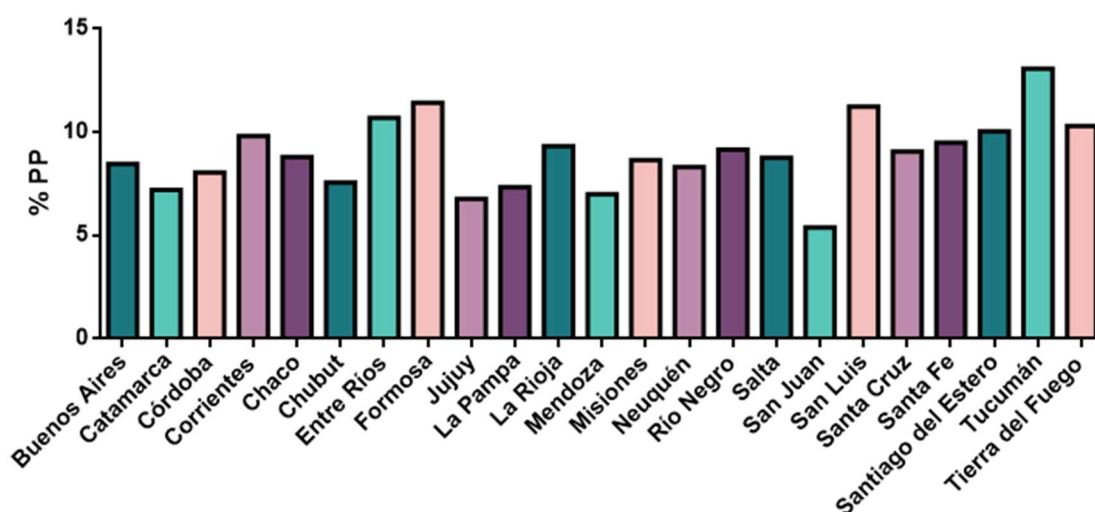


Figura 3: Incidencia del PP en la República Argentina discriminada por provincias.

La cuestión trasciende lo sanitario y tiene un gran impacto social y económico: *Económico*, ya que gran parte de estos recién nacidos requieren cuidados especiales de por vida, que representan un alto costo para los sistemas de salud; *social*, porque los niños y niñas nacidas prematuramente tienen tasas más altas de parálisis cerebral, de déficit sensorial, de desórdenes de aprendizaje y de enfermedades de las vías respiratorias, respecto de los nacidos a término, lo que dificulta su desarrollo como ciudadanos y conlleva dificultades a sus familias (Di Marco y Asprea, 2015). También se ha demostrado que para los niños y niñas prematuras existe un mayor riesgo de sufrir enfermedades crónicas en la edad adulta, como la obesidad, la diabetes y la hipertensión (Rubens *y col.*, 2014). Curiosamente, el efecto de la prematuridad no es independiente del sexo biológico del feto, pareciendo ser los efectos adversos más graves en los bebés de sexo masculino (Peacock *y col.*, 2012).

1.1.3. Etiología.

Desde el punto de vista etiológico, el PP espontáneo es considerado un síndrome. Ya que, a pesar de que las causas que lo provocan pueden ser diferentes, los eventos que se desencadenan previo al parto son similares a los que ocurren en el parto a término: aumento en la contractilidad uterina, iniciación del remodelado y posterior borramiento cervical y ruptura de las membranas fetales. Esto es lo que se conoce como la vía común del parto (figura 4) (Gotsch *y col.*, 2009).

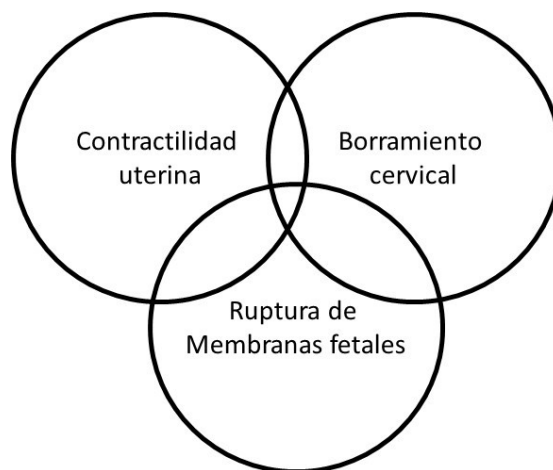


Figura 4: La vía común del parto. Adaptado de Gotsch *y col.*, 2009.

Aproximadamente el 40%-50% de los nacimientos pretérmino son idiopáticos o espontáneos. Cerca del 30% se relacionan con rotura prematura precoz de membranas y un 25%-30% son

atribuibles a indicaciones médicas por causa materna o fetal (Di Marco y Asprea, 2015). La indicación materna más común es la preeclampsia, y la indicación fetal más recurrente es que el feto sea muy pequeño para la edad gestacional con evidencia de compromiso fetal. Otras causas de inducción del parto antes de tiempo incluyen anomalías congénitas o enfermedades maternas (por ejemplo, hígado graso agudo del embarazo u otros trastornos, que mejorarían después del parto (Gotsch *y col.*, 2009).

El parto pretérmino espontáneo es un síndrome de origen multifactorial, ya que está asociado a diferentes procesos patológicos como: infecciones intrauterinas, isquemia o sobre distensión uterina, reconocimiento alogénico anormal, enfermedades cervicales y desórdenes endócrinos, entre otros (Romero *y col.*, 2006) (Figura 5).



Figura 5: Causas asociadas al parto pretérmino. Fuente: Di Marco *y col.*, 2015.

1.1.4. Prevención.

Dado que el parto pretérmino representa un problema de salud pública para nuestro país, desde el Ministerio de Salud se elaboró una guía para la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de este síndrome basándose en evidencia científica y estudios multicéntricos

sobre intervenciones durante el embarazo (Di Marco y Asprea, 2015). A continuación, se detallan algunas de las medidas de prevención propuestas en este documento:

Prevención primaria

Son aquellas intervenciones realizadas para reducir la morbilidad y mortalidad asociadas al parto pretérmino y están dirigidas a todas las mujeres antes y durante el embarazo, para prevenir y reducir riesgo de la prematurez. Estas deben iniciarse en el periodo preconcepcional y son muy importantes debido a que varios factores de riesgo son difíciles de modificar una vez que se ha logrado el embarazo.

Prevención primaria preconcepcional

- **Educación pública:** Es conveniente ofrecer información a la población de mujeres y sus familias acerca de la prematurez como una de las principales causas de mortalidad infantil. El objetivo es despejar la falsa creencia, instalada en buena parte de la población, en el sentido de que las mejoras y avances en el cuidado neonatal han resuelto los problemas de los niños nacidos prematuramente.
- **Asesoramiento individual sobre fertilización asistida:** Toda mujer o pareja que opte por tratamientos de fertilidad asistida debe recibir asesoramiento en cuanto a que estas técnicas constituyen un factor de riesgo para los nacimientos pretérmino, especialmente en gestaciones múltiples, aunque también en gestas únicas.
- **Estilo de vida y hábitos:** Se ha de fomentar el abandono de adicciones tales como tabaco, alcohol y las drogas ilícitas, así como de la automedicación.
- **Suplementos nutricionales:** Las mujeres en edad reproductiva, especialmente aquellas que planean un embarazo, deben consumir una dieta equilibrada desde el punto de vista calórico y proteico.
- **Cuidado odontológico:** Debe ser recomendado desde el período preconcepcional, pues el riesgo de PP se asocia con la gravedad de la enfermedad periodontal.

Prevención primaria en mujeres embarazadas

- **Suplementos nutricionales:** Para toda mujer embarazada se recomienda una alimentación completa y balanceada en proteínas, vitaminas y minerales, incluyendo ácidos grasos Omega-3.
- **Cuidado odontológico:** Se recomienda a toda mujer embarazada una consulta odontológica, a fin de evaluar del estado de su dentadura y, de ser necesario, realizar

de inmediato el tratamiento correspondiente. El riesgo de PP se asocia con la gravedad de la enfermedad periodontal y aumenta cuando la misma progresa durante el embarazo. El aumento del riesgo de PP puede resultar de la transmisión hematológica de patógenos microbianos orales al tracto genital o, más probablemente, de las variaciones comunes en la respuesta inflamatoria a los microorganismos de la cavidad oral y del tracto genital.

- **Estilo de vida y hábitos:** Al igual que durante el período preconcepcional se recomienda el abandono de adicciones tales como tabaco, alcohol y drogas ilícitas, así como de la automedicación. Hay evidencia de la asociación del tabaquismo en el embarazo y el nacimiento pretérmino, así como también con el bajo peso al nacer, el desprendimiento prematuro de placenta y la mortalidad infantil. Es oportuno lograr una mejora en las condiciones laborales y de vida en poblaciones postergadas. Ejemplos de políticas para proteger a las mujeres embarazadas son la Licencia por Maternidad, la Asignación Universal por Embarazo y el tiempo disponible para el cuidado prenatal, entre otros.
- **Pesquisa de infecciones urinarias y bacteriuria asintomática:** Durante el primer control de toda embarazada se debe solicitar un urocultivo. Idealmente, debería ser realizado alrededor de las 12 semanas de gestación, para detectar y tratar precozmente estas infecciones, ya sean sintomáticas o asintomáticas, pues se ha establecido una fuerte asociación entre infecciones urinarias y el parto pretérmino.
- **Pesquisa de vaginosis bacteriana:** La vaginosis bacteriana es una condición polimicrobiana, caracterizada por una disminución en la calidad o cantidad de lactobacilos de la flora vaginal normal y un aumento de mil veces en el número de otros organismos. Las pacientes con vaginosis bacteriana pueden presentar un mayor riesgo de parto pretérmino por lo que se recomienda el tratamiento antibiótico oral para erradicar la infección vaginal en el embarazo.
- **Medición del cuello uterino:** Desde hace varios años se ha identificado a la medición de la longitud cervical como un método diagnóstico de suma utilidad para la predicción del PP. Sin embargo, hasta el momento, el resultado del análisis de numerosos trabajos que evaluaron la medición de longitud cervical mediante ecografía transvaginal, aplicado a población general de embarazadas indican resultados poco satisfactorios en poblaciones de bajo riesgo, con un valor predictivo positivo bajo. Debido a los pobres valores predictivos positivos, la baja sensibilidad y la falta de intervenciones de eficacia comprobada, no se recomienda el uso de la

ecografía transvaginal rutinaria para la medición de la longitud cervical en mujeres con bajo riesgo de prematuridad.

Prevención secundaria en mujeres embarazadas

Son las intervenciones realizadas con el objetivo de eliminar o reducir el riesgo preexistente de tener un parto pretérmino, o sea que son destinadas únicamente a aquellas mujeres que presenten uno o más factores de riesgo.

- **Estilo de vida y reposo:** Se recomienda a aquellas embarazadas con factores de riesgo de parto pretérmino evitar las jornadas laborales prolongadas y aumentar las horas de descanso nocturno.
- **Tratamiento con progesterona:** La progesterona (P4) en el embarazo normal es considerada la hormona clave para el sostén del embarazo, por su acción sobre el miometrio: suprime genes contráctiles, promueve la relajación de la fibra miométrial y suprime la producción de citoquinas, prostaglandinas (PGs) y la respuesta a la oxitocina, lo que contribuye a mantener la quiescencia uterina. Se ha postulado que un descenso de los niveles de progesterona o una modificación de su acción desempeña un papel preponderante en el desencadenamiento del parto a término.
- **Cerclaje cervical:** La utilización del cerclaje cervical, desde hace cerca de 80 años, como alternativa para prevenir el parto pretérmino resulta controversial. Aún no se cuenta con estudios sólidos que muestren evidencia de su efectividad, excepto en algunos casos seleccionados. Se lo ha utilizado en mujeres con pérdidas de embarazo previas durante el segundo trimestre, o luego de haberse detectado otros factores de riesgo, tales como cuello uterino corto.

Prevención terciaria en mujeres embarazadas

Son aquellas que se utilizan luego de la detección temprana de signos y síntomas que identifiquen a las mujeres en riesgo de parto pretérmino, y que intentan ofrecer la oportunidad de mejorar los resultados perinatales.

- **Test de Fibronectina:** La Fibronectina Fetal (FNF) se encuentra en las secreciones cérvicovaginales. Permanece elevada durante las primeras 22 semanas de gestación, pero disminuye entre las 22 y 34 semanas en los embarazos normales. Los niveles superiores o iguales a 50 ng/ml a partir de las 22 semanas se han asociado con mayor riesgo de PP. El test para fibronectina presenta alta especificidad y valor predictivo

negativo para el punto de corte de 50 ng/ml. Su mayor importancia radica en su alto valor predictivo negativo, por lo que un resultado negativo sería un elemento tranquilizador, especialmente dentro de los 15 días posteriores a la toma de la muestra, lo que evitaría tratamientos innecesarios. Se recomienda el uso de FNF sólo en mujeres sintomáticas con alto riesgo entre las 24 y las 36 semanas de gestación. Este test aún no está disponible para su uso en instituciones públicas de nuestro país.

- **La terapia tocolítica:** Los tocolíticos (entre los que se encuentran los antagonistas de la oxitocina, los inhibidores de los canales de calcio, los dadores de óxido nítrico y los inhibidores de la síntesis de PGs) son drogas que se usan para prolongar el embarazo, en especial en el corto plazo, entre las 48 horas y los 7 días. La principal indicación del tratamiento tocolítico para las mujeres que están en amenaza de parto pretérmino, es posponer el nacimiento por lo menos por 48 horas, para permitir el efecto óptimo de los glucocorticoides antenatales que disminuyen la morbilidad y mortalidad de los recién nacidos prematuros. El objetivo secundario es prolongar la gestación para aumentar en lo posible la probabilidad de una mejora en las tasas de supervivencia y una reducción de la morbilidad neonatal y las secuelas a largo plazo. Además, da tiempo, de ser necesario, al traslado de la embarazada a un hospital que cuente con Unidad de Cuidados Neonatales con el nivel de complejidad adecuado.

Una vez que el trabajo de parto se ha iniciado prematuramente, los tratamientos previamente descritos no son suficientes para permitir que el embarazo llegue a término y que el feto culmine su crecimiento y maduración dentro del útero. Sin embargo, estas estrategias pueden retrasar el parto durante un tiempo crucial para que se puedan realizar intervenciones que ayuden a disminuir las consecuencias en el neonato. Entre éstas, la administración antenatal de corticoides reduce el riesgo de padecer dificultades respiratorias, hemorragia intraventricular, enterocolitis necrotizante y ductus arterioso persistente. Los glucocorticoides actúan en el desarrollo fetal promoviendo la maduración sobre el crecimiento. En los pulmones los corticoides promueven la síntesis de surfactantes, incrementan la distensibilidad pulmonar, reducen la permeabilidad vascular y generan una mejor respuesta al tratamiento postnatal con surfactantes (Roberts *y col.*, 2017)

Las intervenciones previamente mencionadas han logrado que la tasa de PP se mantenga y la mortalidad perinatal disminuya. El uso prenatal de corticoides y antibióticos y el postnatal de surfactantes, los avances en las técnicas de resucitación en los recién nacidos, el mejor entendimiento del uso de respiradores y el manejo de fluidos, así como el progreso en

técnicas quirúrgicas y anestésicas, y el uso apropiado de antibióticos tienen un rol muy importante en el aumento de la tasa de supervivencia de los nacidos prematuros. Sin embargo, las intervenciones que intentan reducir la incidencia de PP son limitadas, y no son totalmente eficientes por lo que el estudio de los mecanismos asociados y la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos es crucial para disminuir las secuelas en los recién nacidos y las consecuencias económicas para los sistemas de salud.

1.2. Modelos de PP.

Los modelos animales son especies que se utilizan en la investigación biológica y médica, para tratar de dilucidar interrogantes relacionados con la fisiología de los seres humanos y otros animales. Permiten obtener información sobre patologías que los aquejan, proponer tratamientos para prevenirlas, y también formas de diagnosticarlas. Al usar animales de investigación se pueden realizar experimentos que serían impracticables o no éticos si se hicieran en humanos. Alrededor del 90% de los animales utilizados en investigación son roedores, principalmente ratones y ratas.

A la hora de seleccionar un modelo para estudiar los mecanismos involucrados en el desencadenamiento del PP, es necesario establecer antes, las similitudes y diferencias que existen entre el desencadenamiento del parto de esa especie y los seres humanos. En especies de mamíferos inferiores (ratón, rata, conejo), el parto a término ocurre después de la regresión del cuerpo lúteo y una posterior disminución de la progesterona sérica. En ovejas, el cortisol fetal aumenta la síntesis de enzimas placentarias, que disminuyen la síntesis de progesterona y aumentan la biosíntesis de estradiol, conduciendo al parto. En todos estos animales, la disminución de la progesterona precede al parto. Por el contrario, una caída sistémica de los niveles de progesterona no parece ser esencial para el desencadenamiento del parto en humanos primates y humanos (Elovitz y Mrinalini, 2004). Sin embargo, en humanos hay una pérdida de la función de la progesterona por un cambio en sus receptores. Ambos procesos, si bien se producen por mecanismos distintos, llevan a un mismo resultado (Mahendroo, 2012).

Los primates no humanos, parecen ser los modelos más adecuados para estudiar el PP ya que tienen sistemas genitales y mecanismos de parto similares; sin embargo, el costo económico, los protocolos éticos y, por lo tanto, la cantidad restringida de estas especies, limita el uso de este modelo animal.

Tomando en cuenta las consideraciones anteriores, para este trabajo se utilizó un modelo murino de PP.

1.3. Características generales de los animales de estudio.

Los ratones del género *Mus* son uno de los modelos biológicos y biomédicos más utilizados ya que presentan una serie de cualidades que los posicionan como buenos modelos animales. En primer lugar, se encuentra su talla apropiada para la crianza y manipulación: los animales adultos miden entre 9-12 cm y pesan entre 25-35 gramos, según el sexo. Por su tamaño pequeño poseen requerimientos mínimos de espacio y alimentación, como también de temperatura y humedad para su mantenimiento y reproducción. Por otro lado, son lo suficientemente longevos, (llegando a vivir en promedio alrededor de 24 meses), se reproducen todo el año, los períodos de gestación y destete son breves, y las camadas numerosas.

Al igual que los seres humanos, son mamíferos euterios, con quien conservan el 99% de identidad del genoma y su sistema inmune es muy similar al del humano.

El ciclo reproductivo del ratón es estral. Las hembras son poliéstricas continuas, es decir, presentan ciclos consecutivos durante todo el año que sólo son interrumpidos por los períodos gestacionales. Tanto las hembras como los machos son sexualmente maduros a los 50-60 días de edad. La cópula, que se produce durante el estro, se comprueba al día siguiente por la presencia de tapón vaginal, que 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 puede durar entre 19 y 21 días a partir de la cópula. En la cepa BALB/c la gestación se prolonga durante 19 días, al final de la cual la hembra pare entre 6 y 10 crías. Una vez que las crías han nacido, la hembra devora la placenta y las membranas fetales ayudando la salida de la cría del saco amniótico y estimulando la eliminación de líquido de sus vías respiratorias. La hembra anida y cuida de sus crías, las alimenta, las limpia y las defiende, asegurándose de permanezcan en el nido otorgándoles calor ya que todavía no tienen bien desarrollada la termorregulación. Durante el período de lactancia se pueden identificar distintos cambios que va sufriendo la cría como el desarrollo del pelaje, la erupción de los dientes, la apertura del conducto auditivo externo y de los ojos, que pueden ser evaluados como parámetros de crecimiento (Feria *y col.*, 2003). Entre los días 13 y 14 las crías comienzan a ingerir alimento sólido y agua del bebedero

además de continuar con la lactancia materna. A los 21 días de edad las crías son separadas de la madre, forzando el destete.

1.4. Nuestro modelo de PP.

Como se mencionó previamente, las infecciones durante la gestación, y los procesos inflamatorios asociados, son una de las principales causas de desencadenamiento del parto pretérmino y los mecanismos implicados han sido extensamente estudiados.

En nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo murino de PP inducido por la administración sistémica de lipopolisacárido bacteriano (LPS) (Cella *y col.*, 2010; Bariani *y col.*, 2017; Domínguez Rubio *y col.*, 2017). Esta molécula es un importante factor de virulencia de las bacterias Gram negativas que es reconocido por el receptor TLR-4 y es utilizado en modelos de diversas patologías reproductivas por su capacidad de ser un potente inflamógeno. El modelo consiste en la administración intraperitoneal de dos dosis de LPS (de *E. Coli*, serotipo 05B55) en el día 15 de gestación separadas por 3 horas. Las hembras tratadas muestran signos normales asociados al proceso inflamatorio inducido por el LPS, como piloerección, disminución de la ingesta de alimento, inactividad y postura agachada. El parto se desencadena entre las 8 y 10 horas luego de la administración del LPS. Las crías nacen muertas o mueren a causa de su prematurez y las madres no presentan signos adversos luego del parto observándose un comportamiento normal al día siguiente.

2. El lipopolisacárido bacteriano o LPS.

El lipopolisacárido o LPS, como se mencionó anteriormente, es un componente de la pared de las bacterias Gram negativas. Éstas, además de tener la capa de péptidoglicano, a diferencia de las Gram positivas, presentan una segunda bicapa lipídica que contiene además otros polisacáridos y proteínas. El LPS es el principal componente de la membrana externa y un importante factor de virulencia, es por ello que es común que se denomine a toda la membrana externa capa de lipopolisacáridos o simplemente LPS.

Los lipopolisacáridos básicamente están formados por tres dominios estructurales: el lípido A anclado a la membrana externa; una región de oligosacáridos ubicada en la parte media o núcleo, que posee azúcares poco usuales; y el antígeno O que se proyecta hacia el exterior de la bacteria. En el antígeno O los azúcares están unidos entre sí formando secuencias de cuatro o cinco unidades que se repiten y que a menudo se hallan ramificadas (figura 6). El lípido A es

el motivo estructural activo por excelencia del LPS. Estudios han demostrado que la toxina purificada o el lípido A sintetizado son capaces de reproducir los efectos de la bacteria entera.

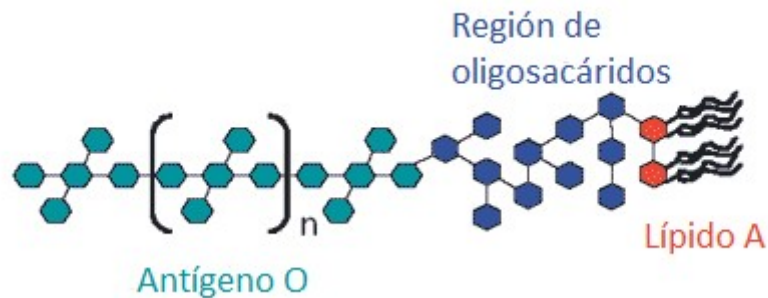


Figura 6: Estructura del LPS.

Cuando las bacterias Gram-negativas se multiplican o mueren, el LPS se libera tanto libre como unido a otras proteínas bacterianas. Una vez en el torrente sanguíneo, se dispone en agregados debido a su naturaleza anfipática y sólo se presenta como monómero gracias a la acción de la proteína plasmática LBP, por sus siglas en inglés “*LPS Binding Protein*”. El LBP es una molécula que, transfiere lípidos y cataliza el pasaje del LPS desde los agregados a la molécula CD14, soluble o de membrana. También transfiere la endotoxina a fosfolípidos, especialmente el HDL (Wurfel *y col.*, 1994; Vreugdenhil *y col.*, 2020). El complejo LPS/LBP se une al receptor CD14 en la membrana de células monocíticas o al CD14 soluble presente en sangre y fluidos. Los blancos del complejo CD14 soluble/LPS son células que no poseen el receptor, como las endoteliales o epiteliales. Este mecanismo permite que células que no expresan CD14 puedan responder a la endotoxina. De esta forma se inicia la respuesta celular esencial para la defensa contra la infección. Esta respuesta es seguida, en los vertebrados, por una respuesta inmune adaptativa que conduce a su inactivación a través de un mecanismo de detoxificación del LPS que incluye la incorporación del mismo a lipoproteínas como HDL o VLDL y LDL que son capaces de neutralizar su toxicidad (Park y Lee, 2013). La desregulación de las respuestas del huésped a LPS puede conducir a una afección inflamatoria sistémica llamada sepsis que puede resultar letal cuando es excesiva (Płociennikowska A. *y col.*, 2015).

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 glicofosfatidil-inositol, que lo ancla a la membrana, impide la traducción de señales.

Los receptores tipo Toll (TLR por sus siglas en inglés *Toll Like Receptors*) reconocen una variedad de componentes estructurales microbianos llamados patrones moleculares asociados a patógenos o PAMPs (por sus siglas en inglés *pathogen-associated molecular patterns*). Tras el reconocimiento de los PAMPs, los TLR desencadenan la producción de mediadores proinflamatorios que ayudan a erradicar la infección. El TLR-4 se expresa en células de linaje mieloide y algunas células no inmunes como las células epiteliales intestinales y las células endoteliales, y es el receptor encargado de reconocer al LPS y desencadenar la vía de señalización que culmina en la síntesis de citoquinas proinflamatorias (Ekman-Ordeberg y Dubicke, 2012). En un escenario típico, la activación de TLR-4 está precedida por la unión de LPS a la proteína CD14 anclada en microdominios ricos en colesterol y esfingolípidos de la membrana plasmática llamados balsas lipídicas (Płociennikowska A. y col., 2015). El CD14 luego transfiere el LPS al complejo TLR-4 / MD-2 que dimeriza y desencadena la producción dependiente del Factor 88 de diferenciación mieloide (MyD88 por sus siglas en inglés *myeloid differentiation factor 88*) y TRIF (por sus siglas en inglés *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β*) de citoquinas proinflamatorias e interferones de tipo I (figura 7).

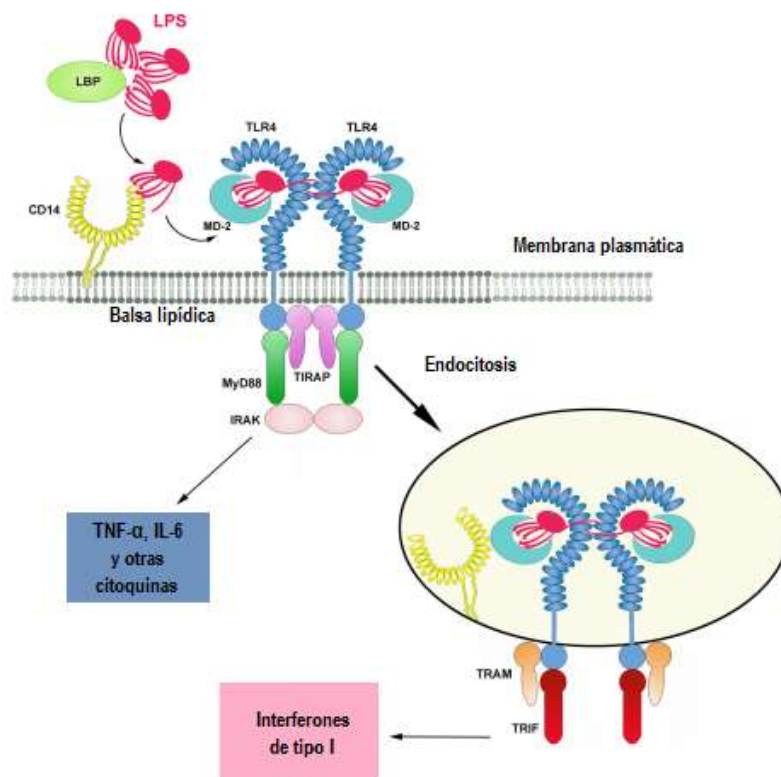


Figura 7: Transducción de señales de la vía LPS-TLR4.

Adaptado de Płociennikowska A. y col., 2015.

La síntesis de las citoquinas proinflamatorias está regulada por la activación del factor de transcripción NFκβ (por sus siglas en inglés *Nuclear Factor kappa β*). Este a su vez es un factor de transcripción que controla la expresión de muchos genes asociados al parto, incluido el de la sintasa de PGs tipo 2 o ciclooxigenasa 2 (COX-2), el receptor de prostaglandina F2α, el receptor de oxitocina y otros genes proinflamatorios relacionados con el desencadenamiento del parto como las interleuquinas (IL)-6, IL-8 (cxcl8) y el factor de necrosis tumoral α (TNFα por sus siglas en inglés *Tumor Necrosis Factor α*) (Sykes y col., 2012).

3. Prostaglandinas y reproducción.

Después de las hormonas sexuales, las prostaglandinas (PGs) siguen en nivel de importancia en cuanto a la regulación que ejercen sobre la función reproductiva femenina (ovulación, receptividad uterina, implantación y parto) y sus patologías asociadas (Lindstrom y Bennett, 2004).

Las PGs, como también los tromboxanos y los leucotrienos son ácidos grasos de 20 carbonos que se denominan genéricamente eicosanoides y son producidas por todos los tejidos corporales (Fortier M.A. y col., 2008). Se sabe que están involucradas en procesos fisiológicos como el correcto funcionamiento del sistema reproductivo femenino, así como también en procesos patológicos, entre ellos la hipertensión, el cáncer y la inflamación (Fortier M.A. y col., 2008; Stouffer y Hennebold, 2015). En procesos sépticos, las PGs son liberadas en grandes cantidades y tienen efectos abortivos debido a que, entre otras cosas, estimulan la contractilidad de miometrio (Aisemberg y col., 2007).

3.1. Síntesis y metabolismo.

Las PGs se sintetizan a partir del ácido araquidónico (AA), presente en todas las membranas celulares, que se encuentra unido a fosfolípidos de membrana, por lo que debe ser liberado por fosfolipasas movilizadoras (fosfolipasa A2 (PLA2), PLC y PLD) que lo hacen accesible a las enzimas metabolizantes. Una vez libre, las ciclooxigenasas, por dos pasos de conversión, metabolizan el AA a la prostaglandina H2 (PGH2). Como la PGH2 es un intermediario inestable, es convertida rápidamente por las sintasas de PGs en metabolitos que son relativamente más estables, entre ellos la prostaglandina E2 (PGE2) y la prostaglandina F2α (PGF2α) (figura 8). En ciertos tejidos, la PGE2 puede ser convertida en prostaglandina PGF2α por acción de la 9-ceto-reductasa, en una reacción reversible (Gimeno y col., 1985).

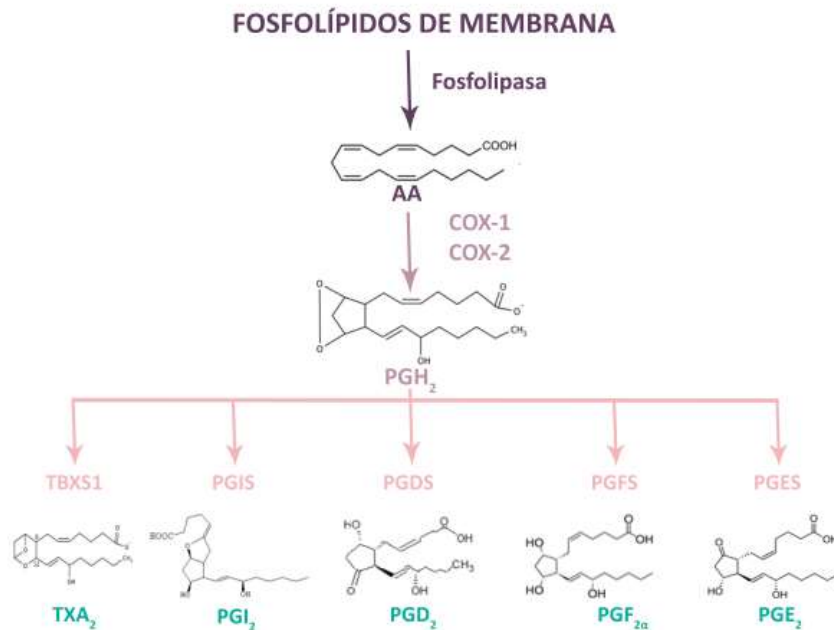


Figura 8: Síntesis de PGs. Las fosfolipasas liberan el ácido araquidónico de la membrana fosfolipídica y las enzimas COX-1 y COX-2 lo convierten primero en PGG₂ y finalmente en PGH₂, precursor de todas las PGs. PGH₂ es convertido en una PGs activa por alguna de las sintasas específicas.

Las PGs producen su acción al unirse a receptores celulares específicos de membrana o intracelulares. Las enzimas limitantes en la vía de síntesis de las PGs son las ciclooxigenasas (COX). Hasta el momento se han identificado dos isoformas de la COX. La COX-1, se expresa de manera constitutiva en la mayoría de las células, y es la fuente dominante de PGs que mantienen la homeostasis. La expresión de la COX-2, es inducible por estímulos inflamatorios, hormonas y factores de crecimiento, y es la fuente más importante de formación de PGs en procesos inflamatorios. Sin embargo, ambas enzimas contribuyen a la generación de prostanoïdes autorreguladores y homeostáticos, y ambas pueden contribuir a la liberación de prostanoïdes durante la inflamación (Ricciotti E. y FitzGerald G., 2012).

La degradación de las PGs está dada en un primer paso, por su inactivación por acción de la 15-hidroxiprostaglandina dehidrogenasa (15-PGDH). Esta enzima cataliza la oxidación del grupo 15-hidroxilo de las PGs y las convierte en metabolitos inactivos. En general las concentraciones máximas de esta enzima se encuentran en bazo, pulmón y corteza renal y se ha localizado su expresión y actividad en útero (Franchi, A. y col, 1985). Luego de la oxidación

inicial por acción de la 15-PGDH, son reducidas por acción de la enzima Δ 13-15-cetoprostaglandina reductasa (13-PGR) y los metabolitos obtenidos son eliminados por la orina.

4. Óxido nítrico y reproducción.

El óxido nítrico (NO) es un radical libre muy reactivo de vida corta, esencial en el funcionamiento normal de las células. Es una señal multifuncional y un importante modulador de las respuestas celulares en muchos tejidos, entre ellas la contractibilidad cardíaca y la regulación de la vasodilatación (Dusting, G.J., y col., 2005; Lee, J. y col., 2016).

Su síntesis resulta de la conversión del aminoácido L-arginina a L-citrulina a través de una familia de isoformas conocidas como óxido nítrico sintasas (NOS) (figura 9). Esta familia se compone de tres isoformas, la neuronal (NOSn), la endotelial (NOSe) y la inducible (NOSi) (Cannon, 1998; Viaro, F. y col., 2000). Las isoformas neuronal y endotelial son dependientes de calcio/calmodulina, se localizan en el citosol y se activan en respuesta a un aumento en la concentración de calcio intracelular. En cambio, la isoforma inducible es regulada por endotoxinas y citoquinas proinflamatorias, entre otros estímulos, y cataliza la síntesis de altas concentraciones de NO. En un comienzo, fueron divididas en constitutivas (NOSe y NOSn) e inducible (NOSi). 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 S.A. y col., 1999; Alderton W.K. y col., 2001).

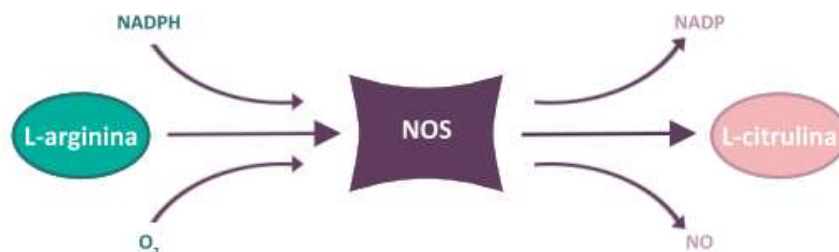


Figura 9: Síntesis de NO.

Durante un proceso inflamatorio, el NO produce vasodilatación, conduce a un aumento en la permeabilidad vascular con la consiguiente formación de edema, inhibe la agregación plaquetaria, y regula el tono del músculo liso (Schmidt, H.H. & Walter, U., 1994; Rosselli *y col.*, 1998). A su vez, el NO, producido principalmente por la NOSi en respuesta a un estímulo inflamatorio, promueve el aumento en la producción de citoquinas, la expresión de moléculas de adhesión de leucocitos y el infiltrado de neutrófilos en los tejidos durante la inflamación aguda o crónica (Hierholzer *y col.*, 1998; McInnes *y col.*, 1998; Cuzzocrea, S. *y col.*, 2000).

En los tejidos reproductivos y durante la gestación, el NO cumple importantes funciones entre las que se encuentran la regulación de la motilidad espermática, de la foliculogénesis, de la correcta implantación, de la contractilidad uterina y el borramiento cervical (Rosselli *y col.*, 1998).

5. LPS, activación de la vía común del parto y PP.

Como se mencionó previamente, las infecciones, y su consecuente proceso inflamatorio asociado, son la única causa que ha sido estrechamente relacionada al desencadenamiento del PP espontáneo y de las que se conocen los mecanismos implicados (Romero *y col.*, 2006). El trabajo de parto es un proceso proinflamatorio, por lo que un desbalance inmunológico en la interfase materno fetal provocado por un proceso infeccioso puede provocar el desencadenamiento del parto antes de tiempo.

Si bien las causas que pueden desencadenar el PP son muy variadas, las vías de señalización y los eventos que preceden al inicio del trabajo de parto son comunes, incluso en el PP inducido por un proceso inflamatorio (Figura 10) (Ekman-Ordeberg y Dubicke, 2012).

Causas y vías de señalización del parto prematuro

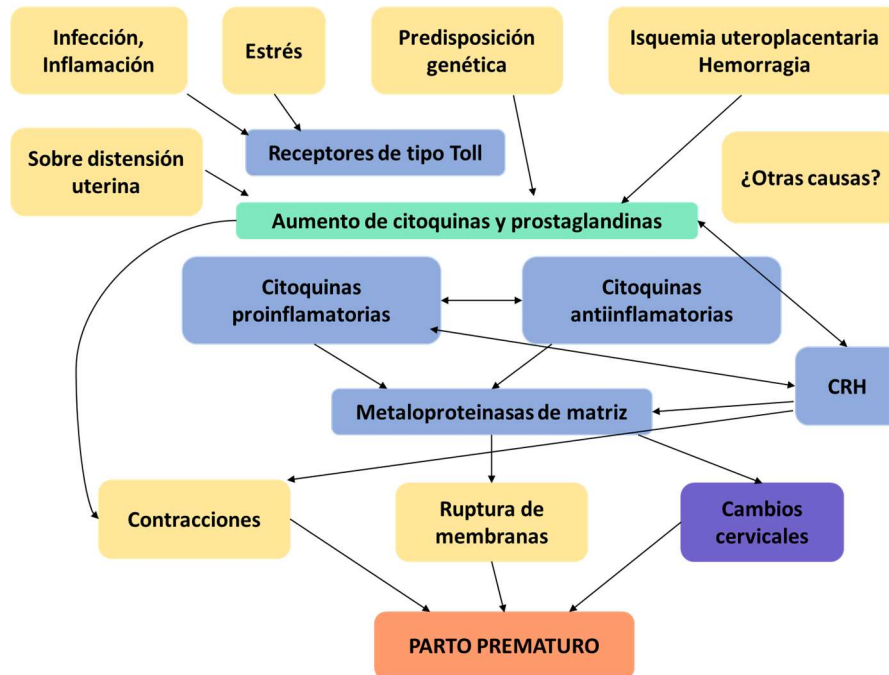


Figura 10: Causas y vías moleculares asociadas al parto pretérmino.

Adaptado de Ekman-Ordeberg y Dubicke, 2012.

Tanto en humanos, como en ratones, la producción de citoquinas proinflamatorias por parte de los tejidos reproductivos, entre las que se encuentran las interleuquinas IL-1 α , 1 β , IL-6, IL-8 y TNF α entre otras, ha sido estrechamente asociada al desencadenamiento del PP. Estas citoquinas, que son producidas por una variedad de células en el cérvix, el útero y el amnios en respuesta a la presencia de componentes bacterianos como el LPS, estimulan en el amnios, el corion, la decidua y el miometrio la liberación de PGs y la producción de metaloproteinasas de matriz (MMP) en el amnios y el corion. La liberación de PG uterina inicia la contractilidad uterina y las MMP estimulan la maduración cervical y contribuyen a la ruptura de las membranas fetales (Ekman-Ordeberg y Dubicke, 2012).

La evidencia acumulada sugiere que el parto ya sea prematuro espontáneo o a término parece compartir una vía inflamatoria común (aunque ocurre en una edad gestacional diferente) que finalmente conduce a una mayor contractilidad uterina, activación de la membrana decidual y remodelado o maduración cervical.

5.1. Contractilidad uterina y PP.

5.1.1. El útero.

Anatómicamente, el útero murino es un órgano bicorne que comienza en el oviducto y recorre la cavidad abdominal dorsal. Consiste en dos largos cuernos, que se unen sólo externamente hacia el final y, 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 (Bertram y col., 2019) (Figura 11).

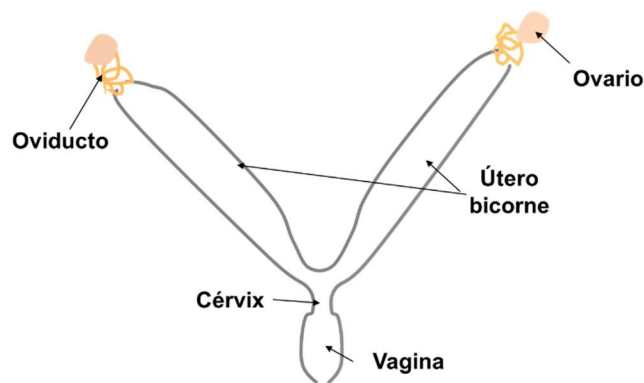


Figura 11: Esquema del sistema genital femenino de ratón.

Histológicamente, el útero está constituido por tres capas de tejido: la serosa o perimetrio en la parte externa, el miometrio en la región media muscular y el endometrio en el interior (figura 12). La serosa es la cubierta peritoneal del útero. Está constituida por una monocapa epitelial simple secretora, sostenida por tejido conectivo que se continúa con el peritoneo y da anclaje a otros órganos y estructuras corporales. El miometrio está compuesto por músculo liso dispuesto en una capa interna circular y una externa longitudinal al eje mayor del útero. Su 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. El endometrio está formado por una capa de epitelio cilíndrico simple y un estroma que consiste en una lámina propia de gran espesor. En el estroma se encuentran las glándulas endometriales formadas por epitelio cuboidal simple.



Figura 12: Corte transversal de útero de ratón.

5.1.2. La contractilidad uterina.

Durante la preñez normal, el útero debe permanecer relativamente quiescente para permitir el crecimiento y el desarrollo de la unidad feto-placentaria. Al momento del parto, sufre cambios que lo transforman en un órgano contráctil que permite que, tanto el feto como la placenta, puedan ser expulsados (Kota *y col.*, 2013). Entre estos mecanismos involucrados en la contractilidad uterina se encuentran el aumento de los receptores de oxitocina el aumento de la producción de PGs (PGE2 y PGF2 α) y la disminución de la producción de NO.

El inicio del parto tanto a término como prematuro resulta de la activación y luego estimulación del miometrio (Gibb y Challis, 2002). El estiramiento mecánico del útero, y el aumento de la actividad del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal fetal favorecen la producción de quemoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-8) en el líquido amniótico que actúan como quimioattractantes favoreciendo el infiltrado de leucocitos en el útero y cérvix. Como resultado, se induce la activación de factores de transcripción proinflamatorios que regulan el aumento de la transcripción de genes que promueven la contractilidad del miometrio (Ravanas *y col.*, 2015).

En embarazos a término se ha observado un aumento de la producción de PG por parte de las células miometriales, de la unidad feto placentaria, principalmente en el amnios (Olson DM, *y col.*, 1983), y de la decidua materna (principalmente PGF2 α) (K. Ravanas *y col.*, 2015). Las PGs

actúan de manera autócrina y parácrina sobre el útero favoreciendo el inicio de la contractilidad uterina, entre otras funciones (Gibb y Challis, 2002).

En nuestro laboratorio también evaluamos la participación del sistema COX/PGs en el último tercio de la preñez normal en ratones BALB/c y hallamos que la producción uterina de PGE2 y PGF2 α aumenta y alcanza los máximos niveles en los momentos previos al parto (Cella *y col.*, 2010). Sólo se vio aumentada gradualmente la expresión de la COX-2 uterina en concordancia con el aumento de PG, mientras que no se hallaron variaciones en la expresión de COX-1 en el mismo tejido (Cella, 2007). Además, en un modelo de PP inducido por LPS, observamos un aumento de los niveles de la COX-2, y de la producción de PGs uterinas previo al desencadenamiento del parto, reafirmando su importancia en el inicio de la contractilidad uterina tanto a término como pretérmino (Cella *y col.*, 2010; Domínguez Rubio *y col.*, 2014).

Otro mediador importante en el útero es el NO, que contribuye al mantenimiento de la quiescencia uterina necesaria para que la gestación llegue a término disminuyendo hacia el momento del parto (Izumi y Garfield, 1995; Ali *y col.*, 1997; Rosselli *y col.*, 1998; Farina *y col.*, 2000). En concordancia con esto, en nuestro laboratorio se evaluó la producción uterina de NO en el último tercio de la gestación entre los días 13 y 19 encontrando que la producción uterina de NO permanece constante entre los días 13-16 y disminuye significativamente en los días 18 y 19 (Cella *y col.*, 2010). Esto está asociado a una disminución en los niveles de la NOSi (Cella, 2007). Resultados similares fueron obtenidos por el grupo de Takahashi (2012).

Cómo se mencionó previamente, en procesos inflamatorios aumenta la expresión de la NOSi lo que conlleva a un aumento en la producción de NO. Durante la gestación, Anbe *y col.* (2007) encontraron que al tratar con LPS a ratones hembra preñadas se inducía un aumento de la expresión de la NOSi y de la producción de NO uterina previo al desencadenamiento del PP. En concordancia con esto, en nuestro modelo de PP inducido por LPS, a diferencia de lo que ocurre en el parto a término, observamos un aumento en la actividad de la NOS, antes del inicio del parto, que es acompañado por un aumento en la expresión proteica de la enzima NOSi uterina. Al igual que en el parto a término, en el modelo de PP inducido por LPS no se hallaron variaciones en la expresión de las NOSn y NOSe uterinas (Cella *y col.*, 2010). Estos resultados sugieren que la isoforma NOSi es la principal responsable de las variaciones en la producción de NO observadas tanto en el parto a término como en el PP. Pero mientras que en el parto a término la caída de la producción de NO y de los niveles proteico de la NOSi favorecen las contracciones uterinas, en el modelo de PP se observa el efecto contrario.

5.2. Borramiento cervical y PP.

5.2.1. El cérvix.

El cérvix murino es una estructura de tejido cilíndrico de pared gruesa, ubicada en la zona inferior y caudal del útero abriéndose hacia la vagina. Está formado en un 10-15% por músculo liso y el resto por tejido conectivo. El tejido conectivo que conforma el estroma cervical, es predominantemente colágeno de tipo I y III, y en menor medida de tipo IV. Además, la matriz extracelular (MEC) está constituida por agua, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, proteínas matricelulares y elastina (Leppert, 1995). Las dimensiones del cuello uterino varían con la gestación, llegando a alcanzar el doble de su volumen hacia el momento del parto debido principalmente a un aumento de la hidratación del tejido (Yoshida *y col.*, 2019).

Durante la gestación, el cérvix se somete a un complejo proceso de remodelado, caracterizado por cambios dramáticos tanto en la estructura de la MEC como en sus propiedades mecánicas. Su función principal durante la gestación es mantener el canal de parto cerrado, lo que hace que el feto permanezca dentro del útero, pero debe remodelarse al momento del parto para permitir la expulsión del feto y la placenta. Luego del parto, el cérvix retoma su forma y consistencia anterior (Yoshida *y col.*, 2019).

5.2.2. El remodelado del cérvix.

El remodelado del cérvix puede considerarse como un proceso continuo dividido en cuatro fases superpuestas: ablandamiento, maduración, dilatación y trabajo de parto, y reparación posparto (Word *y col.*, 2007) . La integridad cervical y el momento correcto de remodelado cervical son esenciales para mantener la gestación tanto en humanos como en roedores. En la figura 13 se puede observar una comparación de las etapas de remodelado cervical entre humanos y ratones.

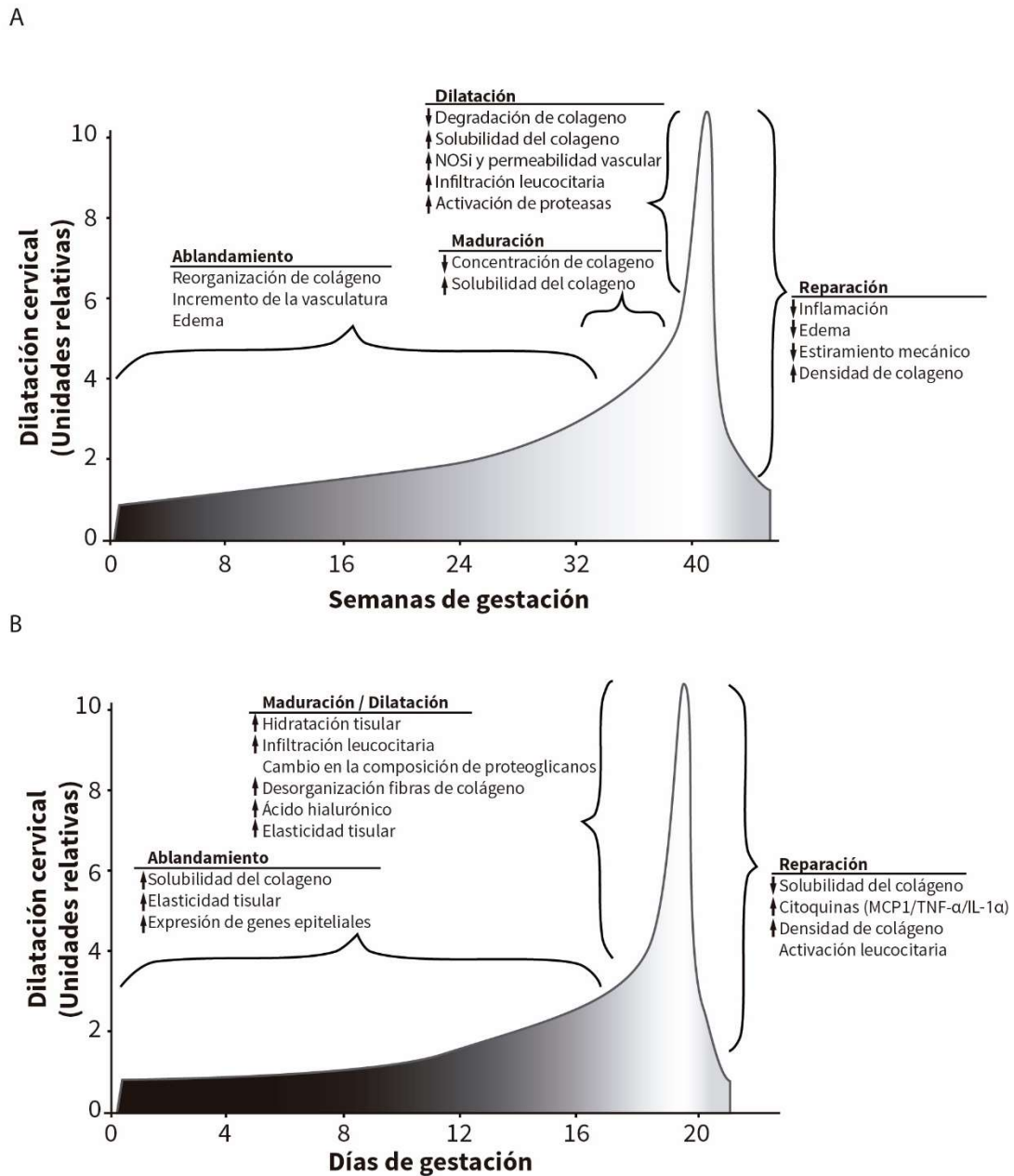


Figura 13: Etapas del remodelado cervical en (A) humanos y (B) ratones.

Adaptado de Word *et al.*, 2007 y de Read *et al.*, 2007.

Durante la fase de ablandamiento se puede observar el primer decaimiento en la fuerza de tensión del tejido al compararlo con el cérvix de una hembra no preñada y un aumento en la elasticidad tisular. En humanos esto ocurre en el primer trimestre de embarazo, mientras en ratones en la última semana de gestación entre los días 12-19. Es un proceso lento que ocurre cuando los niveles de P4 están elevados. A lo largo de la preñez se mantienen altos niveles de P4 y bajos niveles de estrógenos (E2), invirtiéndose esta

proporción en el ratón uno o dos días previos al parto. La disminución de la relación P4/E2 es clave para dar comienzo a una cascada de cambios estructurales en el cérvix, que permitirá el pasaje del feto a través del canal de parto (Read *y col.*, 2007; Timmons *y col.*, 2010; Mahendroo, 2012).

Luego del ablandamiento, continúa la fase de maduración cervical. Ésta es una etapa rápida y se caracteriza por la pérdida de la integridad del tejido, ocurriendo días previos al nacimiento en mujeres, u horas en el caso de ratones. Durante la fase de maduración se observa un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias, mayor permeabilidad vascular, un aumento el infiltrado de células inmunes y un aumento en la degradación de la matriz extracelular mediada por MMPs (Ali *y col.*, 1997; Stygar *y col.*, 2002; Word *y col.*, 2007; Timmons *y col.*, 2010; Sykes *y col.*, 2012). La maduración es el evento inmediato que precede al parto y es el más estudiado en el parto pretérmino, sin embargo, las investigaciones en las mujeres a menudo son difíciles de interpretar porque los tejidos cervicales comúnmente se derivan de biopsias de mujeres embarazadas a término antes del parto en comparación con las biopsias de mujeres inmediatamente después del parto. El estudio en roedores ha sido muy útil a la hora de dilucidar los mecanismos involucrados en este proceso dado que es muy similar a lo que ocurre en mujeres.

Una vez que comienzan las contracciones uterinas, el cérvix ya maduro tiene la capacidad de dilatarse lo suficiente (fase de dilatación) para permitir el pasaje del feto a través de él. Finalmente, la remodelación cervical culmina con la recuperación de la integridad y tensión cervical postparto (Read *y col.*, 2007; Timmons *y col.*, 2010).

Aunque la función del remodelado del cérvix en el parto a término sea similar a la del parto pretérmino, numerosos trabajos han demostrado que los mecanismos moleculares subyacentes que culminan en la maduración y dilatación cervical difieren en ambos casos (Holt *y col.*, 2011; Nallasamy y Mahendroo, 2017; Yellon, 2017).

Por ejemplo, se han identificado diferencias distintivas en las poblaciones de células inmunes infiltrantes, la expresión génica, la proporción de progesterona y estrógeno y los niveles y el metabolismo de la prostaglandina cervical utilizando modelos murinos de PP (Timmons y Mahendroo, 2006; Timmons y col., 2014). En estos estudios, se demostró que los niveles de PGs no estaban elevados en el cérvix de hembras que parieron a término, pero si en las hembras que tuvieron PP inducido por un proceso inflamatorio. Estos hallazgos, sumado a que la inhibición de la COX 2 en ratones tratados con LPS redujo significativamente las tasas

de PP sin tener efecto en el parto a término (Timmons *y col.*, 2014), demuestran un rol fundamental de la síntesis de PGs cervical en el PP desencadenado por un proceso inflamatorio.

Por otro lado, si bien el remodelado cervical es un evento proinflamatorio tanto a término como pretérmino, se ha demostrado que el infiltrado de células mieloides, y en consecuencia la producción de citoquinas proinflamatorias, en el cérvix previo al parto difiere según este sea a término o pretérmino en un modelo animal: durante un proceso inflamatorio hay un infiltrado masivo de neutrófilos en el tejido cervical (Holt *y col.*, 2011); sin embargo, no se observa infiltrado de neutrófilos en el cérvix antes del parto a término y se ha demostrado que son prescindibles en el parto a término (Timmons y Mahendroo, 2006).

6. El líquido amniótico.

El líquido amniótico (LA) es el líquido protector que rodea al feto durante la gestación y es esencial para su desarrollo y maduración. Entre sus funciones principales se encuentran suministrar nutrientes y otros factores necesarios para el crecimiento fetal, proporcionar amortiguación mecánica al feto y ejercer funciones inmunológicas que contribuyen a la formación de una barrera inmunológica contra los patógenos invasores (Gomez-Lopez *y col.*, 2018; Bommer *y col.*, 2019).

El LA contiene componentes solubles y celulares. Los componentes solubles incluyen carbohidratos, proteínas, péptidos, lípidos, lactato, piruvato, electrolitos, enzimas y hormonas, entre otros, muchos de los cuales actúan como la primera línea de defensa contra los patógenos que invaden la cavidad amniótica. Los componentes celulares del líquido amniótico incluyen diferentes tipos de células derivadas de las superficies exfoliantes del feto en desarrollo, incluida la piel, el sistema respiratorio, el tracto urinario y el tracto gastrointestinal, así como las células madre. En mujeres, se ha demostrado que en ausencia de infección, el líquido amniótico también presenta células inmunes, incluidos los macrófagos, neutrófilos, linfocitos T y B, células *natural killer* (NK) y células linfoides innatas o ILC (Gomez-Lopez *y col.*, 2018). En ratones, se ha demostrado que los linfocitos B están presentes en el líquido amniótico en diferentes grados de maduración y que son capaces de producir citoquinas pro y antiinflamatorias (Bommer *y col.*, 2019).

7. Programación fetal.

La calidad de vida intrauterina "programa" nuestra susceptibilidad para enfermedades de las arterias coronarias, la diabetes, la obesidad y una multitud de otras condiciones que aparecen más tarde en la vida. La hipótesis de los orígenes evolutivos de las enfermedades del adulto, a menudo llamada la "Hipótesis de Barker" o "programación fetal" (Barker, 1998), establece que las influencias negativas en el desarrollo temprano y, en particular durante la vida intrauterina, promueven respuestas compensatorias en la fisiología y el metabolismo del individuo, que devienen en permanentes y ejercen un efecto de reprogramación, teniendo consecuencias en el resto de la vida del individuo (De Boo y Harding, 2006).

El estrés, y sus factores asociados durante períodos críticos del desarrollo fetal modulan los mecanismos epigenéticos que controlan genes específicos, que puede afectar la estructura y la función de los sistemas fisiológicos. Las infecciones maternas durante la gestación, o la simulación del proceso inflamatorio a través del tratamiento con LPS, produce una suerte de "estrés inmune" que ha sido considerado un poderoso factor de programación del desarrollo fetal (Izvolaskaia y col., 2018).

8. Importancia del estilo de vida durante la gestación.

La prevención de las complicaciones y las muertes debidas al PP comienza con un embarazo saludable. La atención de calidad antes, durante y entre embarazos garantiza que la gestación sea una experiencia positiva para todas las personas gestantes. Las directrices de la OMS sobre la atención prenatal incluyen intervenciones esenciales que ayudan a prevenir el PP, como el asesoramiento sobre la dieta saludable y la nutrición óptima, o el abandono del consumo de tabaco y otras sustancias; las mediciones ecográficas del feto, que ayudan a determinar la edad gestacional y a detectar los embarazos múltiples, y un mínimo de 8 contactos con profesionales sanitarios a lo largo del embarazo, con el fin de identificar y tratar otros factores de riesgo, como las infecciones. Facilitar el acceso a los anticonceptivos y promover su acceso también puede contribuir a que disminuya el número de nacimientos prematuros (OMS, 2018).

El estilo de vida de la madre antes y durante la gestación, puede tener efectos sobre el resultado del embarazo y puede, aún más, tener efectos sobre la salud de la descendencia en la edad adulta. De hecho, diferentes estudios han demostrado que el estrés y la depresión materna crónica aumentan el riesgo de PP y la restricción del crecimiento intrauterino (Latendresse, 2009; Grote y col., 2010). Por otro lado, algunos estudios han demostrado que

la práctica de actividad física voluntaria (Hegaard *y col.*, 2007, 2008) y los tratamientos antiestrés (como el acompañamiento psicológico, el acompañamiento por parte de parteras durante el embarazo o las terapias de relajación y la práctica de yoga (Narendran *y col.*, 2005; Khianman *y col.*, 2012; Deshpande *y col.*, 2013; Sandall *y col.*, 2016; Cunningham *y col.*, 2018) mejoran la salud materna, y reducen las enfermedades gestacionales en humanos.

9. El ambiente enriquecido.

El ambiente enriquecido (AE) es una estrategia de laboratorio que consiste en proveer una serie de estímulos a los animales a través del entorno físico y social. Se caracteriza por presentar mayor espacio para los animales que la condición estándar. Además, alberga mayor cantidad de individuos para promover la interacción social y se emplean objetos con diferentes texturas formas y colores que estimulan la actividad física, cognitiva y la exploración (Mering y Jolkkonen, 2015). Se cree, además, que el AE implica cambios ambientales que producen un nivel de estrés que puede ser manipulado por el animal, permitiendo que lo evite en situaciones futuras y resultando beneficioso a largo plazo (Sparling *y col.*, 2018).

En los modelos animales, el efecto de la estimulación y el enriquecimiento ambiental generalmente se asocia con un mayor bienestar, una mejor función cognitiva y resistencia al estrés, que son impulsados por cambios moleculares, celulares y fisiológicos (Bakos *y col.*, 2009; Langdon y Corbett, 2012).

Se ha utilizado la estrategia de enriquecimiento ambiental en modelos animales de la enfermedad de Parkinson resultando una intervención beneficiosa (Jungling *y col.*, 2017; Wi *y col.*, 2018), y se ha visto que ejerce efectos neuroprotectores ante estímulos nocivos (Horvath *y col.*, 2013) y daño retiniano (Dorfman *y col.*, 2014; González Fleitas *y col.*, 2018). Además, también puede prevenir el deterioro cognitivo relacionado con la edad y las consecuencias adversas del estrés prenatal (Patten *y col.*, 2015).

Si bien no existen a la fecha trabajos que evalúen el efecto del enriquecimiento ambiental sobre los tejidos reproductivos, sí se ha visto que el enriquecimiento ambiental modula la respuesta inmune inflamatoria en dos modelos de inflamación en ratones (Brod *y col.*, 2017) y se ha estudiado el efecto del enriquecimiento ambiental materno sobre el desarrollo de la descendencia (Sale *y col.*, 2007; Caporali *y col.*, 2014; Connors *y col.*, 2014). Incluso se ha

postulado que la exposición de hembras a AE antes del periodo reproductivo podría tener efectos transgeneracionales (Cutuli *et al.*, 2015).

Hipótesis y objetivos.

El PP es la primera causa de morbi mortalidad en niños y niñas menores de 5 años y representa un gran problema para los sistemas de salud, dado que los costos económicos de los cuidados neonatales son muy elevados. Además, los niños y niñas nacidas antes de tiempo tienen mayores probabilidades de sufrir algún tipo de discapacidad de por vida, en particular, las relacionadas con el aprendizaje y complicaciones relacionadas con la visión y la audición. Si bien las causas que pueden desencadenar el parto antes de tiempo son muy variadas, las infecciones durante la gestación y el consecuente proceso inflamatorio representa una de las principales causas.

En nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo inflamatorio de PP, inducido por la administración sistémica de LPS, para tratar de dilucidar los mecanismos asociados al desencadenamiento del parto pretérmino y buscar terapéuticas para prevenirlo.

El estilo de vida antes y durante la gestación puede tener efectos, no solo sobre la salud de la madre y del feto, sino también sobre el desarrollo del embarazo en humanos.

En modelos animales, el enriquecimiento ambiental se presenta como una estrategia beneficiosa para tratar diversos tipos de patologías y se asocia con un mayor bienestar, una mejor función cognitiva y resistencia al estrés, que son impulsados por cambios moleculares, celulares y fisiológicos.

Sobre la base de estas consideraciones nos planteamos la siguiente *hipótesis de trabajo*:

“El enriquecimiento del ambiente materno produce cambios moleculares, celulares y fisiológicos, que modulan la respuesta inmune materna frente a un desafío inflamatorio, que podrían prevenir o retrasar el inicio del parto pretérmino y tener efectos beneficiosos sobre la salud de la descendencia”.

El *objetivo general* de este proyecto es:

Diseñar un protocolo de enriquecimiento ambiental materno y analizar su viabilidad como un tratamiento para prevenir el PP y para disminuir las secuelas en la descendencia sometida a un proceso inflamatorio durante su vida intrauterina.

Para llevarlo a cabo se plantearon los siguientes ***objetivos particulares***:

- 1- Diseñar un protocolo de enriquecimiento ambiental, que consiste en una combinación de estimulación inanimada, interacción social y ejercicio físico voluntario antes y durante la gestación. Analizar si produce cambios sobre la fisiología materna.
- 2- Analizar la exposición de las madres a un AE, como una posible terapéutica para la prevención del PP, utilizando un modelo murino. Estudiar los mecanismos moleculares y celulares asociados a este evento.
- 3- Estudiar las consecuencias de la administración de LPS y del enriquecimiento ambiental materno sobre el crecimiento y el metabolismo de las crías.
- 4- Analizar la viabilidad de utilizar el protocolo de enriquecimiento ambiental acotado solo al periodo gestacional como tratamiento preventivo del PP.

Materiales y métodos.

10. Animales.

10.1. Condiciones de bioterio.

Para la realización de este trabajo se utilizaron ratones de la cepa BALB/c obtenidos del bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA. Se usaron hembras de seis semanas de edad, crecidas hasta la adultez en nuestro bioterio. Fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura (23-25°C) y luminosidad bajo un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad, con agua y alimento *ad libitum*. Luego de 6 semanas de estadía en nuestro bioterio fueron puestas en apareo con machos adultos de la misma cepa. La cópula se verificó por la presencia del tapón mucoso vaginal a la mañana siguiente, tomando ese día como el día cero (d0) de preñez. La gestación, bajo las condiciones de nuestro bioterio, tiene una duración de 19 días.

10.2. Protocolo de enriquecimiento ambiental.

Para evaluar si el enriquecimiento ambiental materno podía tener efectos beneficiosos, diseñamos un AE que consiste en el alojamiento de las hembras en jaulas más grandes (640 x 420 x 200 mm) que las estándar de laboratorio, que permiten albergar a diez animales. Estas jaulas, además de alojar más animales, proveen más espacio por animal. La jaula contiene ruedas y objetos de diferentes formas, texturas y colores (juguetes, túneles, refugios y escaleras) que son cambiados completamente una vez por semana. A mitad de la semana, uno de los objetos se elimina, se mueve o se agrega un nuevo objeto a la jaula, para estimular la actividad exploratoria. Este protocolo combina el incremento en la actividad social, exploratoria, física y cognitiva de las hembras que participan de él. Las condiciones control (ambiente control, AC) consisten en jaulas estándar de laboratorio que alojan a cuatro animales (Figura 14).

Escaneando el siguiente código QR se puede ver un video de los animales en las jaulas AE o en las jaulas estándar:



Para analizar si el enriquecimiento ambiental materno previo al apareo y mantenido durante la gestación resultaba beneficioso, los animales se ingresaron a las jaulas de AE (o AC) a las seis semanas de edad y permanecieron en ellas durante 6 semanas cuando fueron puestas en apareo con machos BALB/c adultos en jaulas estándar (2 hembras con un macho por jaula). Una vez detectado el tapón mucoso las hembras regresaron a las jaulas de AE (o AC respectivamente) hasta el día 15 de gestación, cuando se les administró el LPS i.p. (o la solución salina en el caso de los controles).

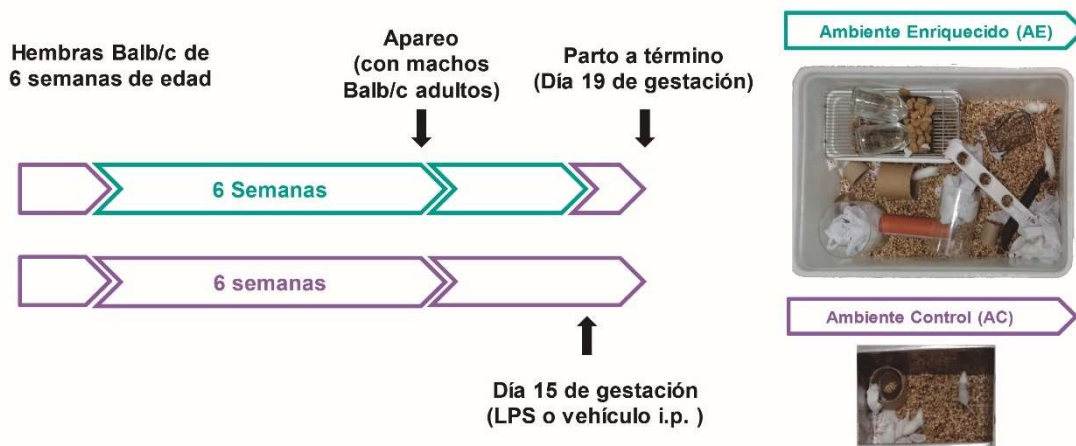


Figura 14: Esquema del protocolo de enriquecimiento ambiental materno. Esquema del protocolo y fotos de las jaulas de AE y AC. Las hembras ingresaron al protocolo cuando tenían 6 semanas de edad y permanecieron en sus respectivas jaulas (AC o AE) por 6 semanas más. Luego fueron puestas en apareo con machos adultos de la misma cepa y el día que se observó el tapón mucoso las hembras volvieron a su jaula de origen hasta el día 15 de gestación, cuando se les administró el LPS (o el vehículo).

Para evaluar el efecto del enriquecimiento ambiental materno aplicado solo durante la gestación, hembras provenientes de un AC fueron puestas en apareo y luego de la aparición del tapón mucoso (d0) fueron colocadas en jaulas de AE hasta el día 15 de gestación cuando fueron tratadas con el LPS (figura 15).

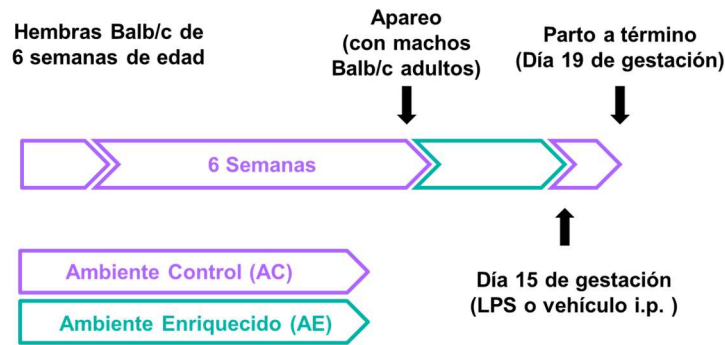


Figura 15: Esquema del protocolo de enriquecimiento ambiental materno solo durante la gestación.

Hembras de 6 semanas de edad permanecieron en jaulas estándar de laboratorio (AC) por 6 semanas más. Luego fueron puestas en apareo con machos adultos de la misma cepa y el día que se detectó el tapón mucoso las hembras entraron al protocolo de enriquecimiento ambiental hasta el día 15 de gestación, cuando se les administró el LPS.

10.3. Modelo de PP.

En el día 15 de gestación, las hembras provenientes de AE o AC fueron desafiadas con 2 dosis de LPS administrado por vía intraperitoneal. La primera (0,13 mg/kg de LPS, 5 μ g en 100 μ l de solución salina estéril) a las 9h y la segunda (0,39 mg/kg, 15 μ g en 100 μ l de vehículo) a las 12h. Las hembras control recibieron en el mismo momento y por la misma vía de administración, idéntico volumen del vehículo utilizado para resuspender el LPS (100 μ l de solución salina estéril).

Un grupo de animales fue sacrificado en el mismo día y se recolectaron los tejidos de interés a distintos tiempos según la técnica a utilizar. A otro grupo de hembras se las dejó continuar con la preñez (en jaulas individuales) para monitorear el momento del parto, definido como el momento de expulsión de la primera cría (Figura 16). Consideramos que el parto fue prematuro si ocurrió antes de completado el día 17 de gestación. Con este grupo de animales, calculamos el porcentaje de PP, el tamaño de la camada, la mortalidad perinatal y luego monitoreamos el desarrollo de las crías durante la lactancia y al llegar a la adultez (Figura 16).

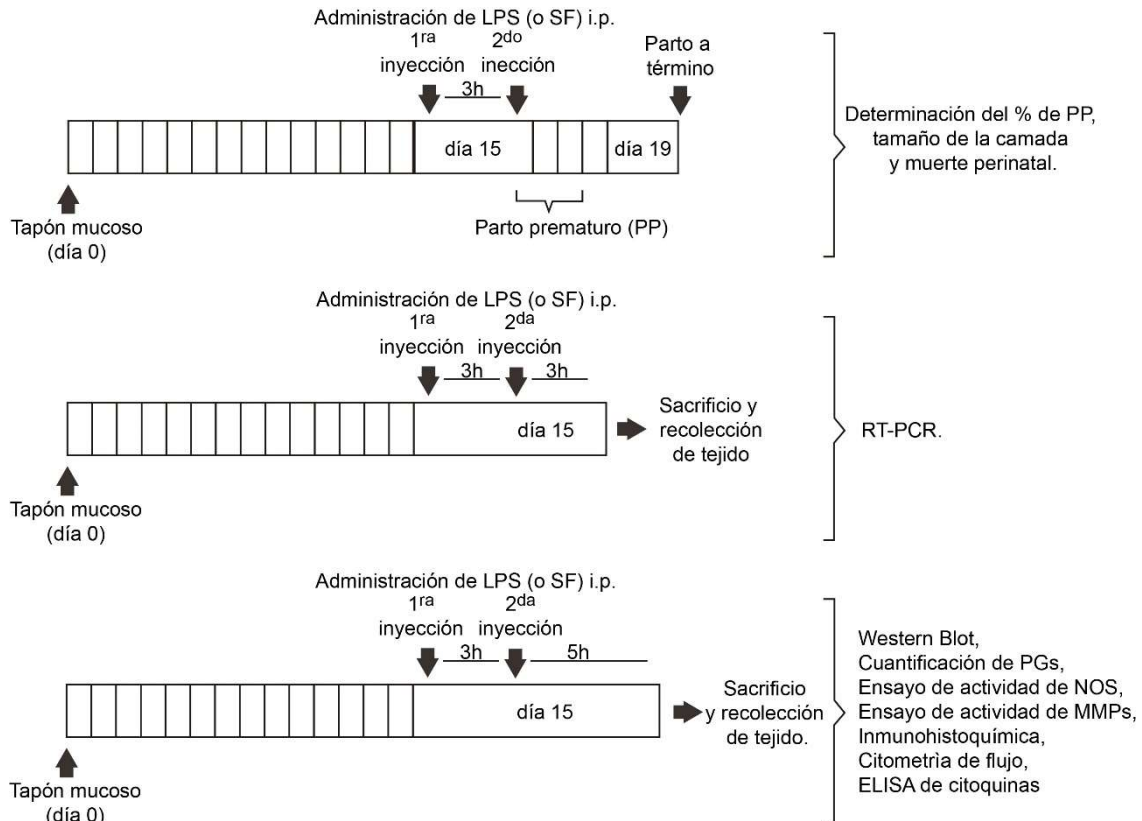


Figura 16: Esquema del protocolo de administración de LPS y recolección de tejidos. El d0 de gestación corresponde al día en que se observó el tapón mucoso. En el día 15 de gestación se administraron 2 dosis de LPS separadas por 3 horas. Dependiendo del tipo de determinación a realizar, se separó a los animales en 2 grupos: a un grupo se le permitió continuar la gestación para monitorear el inicio del parto y el desarrollo de las crías. Estas hembras fueron colocadas de a una en jaulas estándar hasta el momento del parto y se calculó el porcentaje de PP. Otro grupo fue sacrificado en día 15 de gestación, 3 o 5 horas luego de la segunda dosis de LPS, y se aislaron los tejidos de interés.

Combinando el protocolo de enriquecimiento ambiental y el de PP inducido por LPS quedaron determinados 4 grupos experimentales a los que las hembras son asignadas al azar:

- AC+C: ambiente control + solución salina
- AC+LPS: ambiente control + LPS
- AE+C: ambiente enriquecido + solución salina
- AE+LPS: ambiente enriquecido + LPS

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).

10.4. Desarrollo de las crías

La evaluación del desarrollo físico en las crías provenientes de hembras tratadas durante la gestación se realizó durante la lactancia y una vez alcanzada la adultez (2 meses de edad).

Durante la lactancia se estudió el peso de las crías semanalmente y se evaluaron tres parámetros de desarrollo físico: la separación del pabellón auricular, la erupción de los dientes y la apertura ocular. Estos parámetros aparecen normalmente en un margen de edad acotada y por lo tanto la presencia o ausencia de los mismos debe ser evaluada en determinados días, considerando al día 0 el día de su nacimiento (Feria *et al.*, 2003).

Las crías fueron pesadas los días 1, 7, 14 y 21 postnatal. La separación del pabellón auricular fue evaluada entre los días 2 y 4, la erupción de los dientes entre los días 7 y 10 y la apertura ocular entre los días 12 y 16. Un retraso en alguno de estos parámetros fue considerado anormal. Se evaluaron 2 crías de la camada elegidas al azar.

Es importante mencionar que en las hembras que tuvieron PP inducido por LPS, provenientes tanto de AC como de AE, las crías nacen muertas o mueren de inmediato a causa de su prematuridad por lo que no son utilizadas para estos análisis.

Al alcanzar la adultez, las crías fueron pesadas y luego sacrificadas para recolectar el suero y para pesar los depósitos adiposos. A los machos se les pesó la grasa abdominal-gonadal (en conjunto) y la grasa retroperitoneal. A las hembras se les pesó la grasa abdominal, la grasa gonadal y la grasa retroperitoneal. En suero se midieron los niveles de colesterol y triglicéridos.

11. Técnicas.

11.1. Medición de glucosa y test oral de tolerancia a la glucosa.

La determinación de la glucemia (concentración de glucosa en sangre) se realizó mediante el aparato Accu-Chek® Performa y sus correspondientes tiras reactivas (Roche S.A.Q. e I., Buenos Aires, Argentina). El test de tolerancia a la glucosa se realizó a hembras en el día 15 de preñez provenientes de AC y de AE sin la administración de LPS (ni de vehículo). Luego de 6 horas de ayuno, se administraron por vía oral mediante sonda esofágica 100 µl de una solución de 2 g de dextrosa/kg de peso corporal. Previamente se midieron los niveles basales

de glucosa sanguínea (tiempo 0). Luego de la administración de la dextrosa, se midieron las concentraciones de glucosa sanguínea a los 30, 60 y 120 minutos. Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena de la cola de los animales. Los valores se expresaron en mg/dl.

11.2. Medición de triglicéridos y colesterol.

Para la determinación de los niveles de triglicéridos y de colesterol en suero de madres y crías adultas se utilizaron los *kits TG color GPO/PAP AA línea líquida* y *Colestat enzimático AA línea líquida*, respectivamente. Brevemente, se colocaron 10 µl de suero o del reactivo estándar (de concentración de triglicéridos o de colesterol conocida) en 1 mL de reactivo y se incubaron las muestras durante 5 min (triglicéridos) o 15 min (colesterol) en un baño de agua a 37°C. El método de medición es colorimétrico de punto final, por lo cual, se determinó la absorbancia a 505 nm en un espectrofotómetro.

Las muestras de sangre fueron obtenidas luego de 8 horas de ayuno, en el día 15 de gestación en el caso de las madres y a los 2 meses de edad en el caso de las crías. Los animales se sangraron por decapitación luego de ser anestesiados con CO₂. Se dejó la muestra a temperatura ambiente para permitir la coagulación y luego se centrifugó la sangre coagulada a 800 x g durante 10 min lo que permitió la separación del suero. Los niveles séricos de triglicéridos se expresaron como mg de triglicéridos/dl de suero y los de colesterol se expresaron como mg de colesterol/dl de suero.

11.3. Purificación de células mononucleares de sangre periférica (o PBMC).

La purificación de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se realizó a partir de sangre periférica obtenida por sangrado retro-orbital, para lo cual los animales fueron anestesiados en una atmósfera de CO₂ y luego 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 PBMC, las cuales fueron lavadas por medio de centrifugación lenta (200 x g, 10 minutos) con PBS 1X para remover plaquetas y restos de HISTOPAQUE. Las células obtenidas fueron congeladas a -80°C para su posterior utilización.

11.4. Western blot.

Para analizar los niveles proteicos de TLR4, CD14, NOSi, COX-1 y COX-2 se aislaron las PBMC, el útero y el cérvix de hembras preñadas en día 15, 5h luego de la segunda dosis de LPS (o del vehículo). Los tejidos se lavaron con PBS y se guardaron a -80°C hasta el momento del ensayo. Se homogeneizaron en buffer de homogenización (50µL para las PBMC, 200µL para el cérvix, 500 µL para el útero), se sonicaron y se centrifugaron a 14000 xg por 10 minutos a 4°C. Se aisló el sobrenadante que contenía las proteínas totales y se separó una alícuota para cuantificarlas por el método de Bradford (Bradford, 1976). Para poder llevar a cabo la separación electroforética, se colocaron 50-100 µg de proteínas en buffer muestra con 5% de β-mercaptoetanol en un volumen final de 20 µl para luego ser desnaturalizadas a 100°C durante 5 minutos.

La separación electroforética se realizó en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) según la técnica descrita por LaemmLi (LaemmLi, 1970). Las muestras y el marcador de peso molecular fueron sembrados en geles de poliacrilamida, con un gel concentrador del 4,5% y un gel separador del 10%. La electroforesis se llevó a cabo a temperatura ambiente con buffer de corrida, primero a un voltaje constante de 60 V para que se concentre la muestra y luego a 100 V para que se separen las proteínas.

Una vez 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 (Bio-Rad) a voltaje constante (100 V) en hielo durante 90 minutos. A fin de verificar que la transferencia se haya realizado correctamente, se tiñeron las membranas con Rojo Ponceau, un colorante reversible. Luego fueron lavadas con solución de lavado (T-PBS) e incubadas en solución de bloqueo (PBS con 5% de leche en polvo descremada) durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con T-PBS.

Para la detección inmunológica se incubaron las membranas con diluciones previamente optimizadas de los anticuerpos primarios durante 24 horas a 4°C. Luego se lavaron las membranas con T-PBS y se incubaron por una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 1) diluido en PBS.

El revelado fue realizado por quimioluminiscencia, para lo cual las membranas fueron incubadas con la solución de revelado para ECL durante 1 minuto y posteriormente fueron visualizadas y fotografiadas en el analizador de imágenes Syngene, Gene Gnome XRQ NM (UNITEK, Argentina). Las diluciones de los anticuerpos y sus correspondientes tiempos de incubación se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 1: Anticuerpos utilizados para los western blot. Se muestra la dilución utilizada y el anticuerpo secundario correspondiente.

Anticuerpo	Dilución	Anticuerpo secundario
COX-1	1/200	<i>Anti-rabbit (1/3000)</i>
COX-2	1/300	<i>Anti-rabbit (1/3000)</i>
NOSi	1/200	<i>Anti-rabbit (1/3000)</i>
TLR4	1/200	<i>Anti-goat (1/10000), 3% leche.</i>
CD14	1/200	<i>Anti-rabbit (1/3000)</i>
Actina	1/5000	<i>Anti-rabbit (1/3000)</i>

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

11.5. RT-PCR.

Se colectaron las muestras de cervix 3 horas luego de la segunda administración de LPS y se guardaron en Quick-Zol (Kalium, Buenos Aires, Argentina) a -80°C hasta el momento de su utilización. El día del ensayo se homogeneizaron y se realizó la extracción del ARN total según instrucciones del fabricante. La concentración de ARN se determinó a través de un espectrofotómetro de micro volúmenes.

El ADNcopia (ADNc) se generó a partir de 2ug de ARN, previamente tratado con DNAasa. Se realizó la retrotranscripción incubando las muestras con la enzima M-MLV, cebadores aleatorios y desoxiribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) en presencia de un inhibidor recombinante de ribonucleasas durante 10' a 25°C, 50' a 37°C y 15' a 70°C.

La amplificación del ADNc se hizo utilizando cebadores (primers) específicos diseñados con el programa Primer-Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) para cada mensajero retrotranscrito de interés (tabla 2). Para cada ADNc se pusieron a punto las condiciones ideales de reacción. En cada experimento se realizaron controles negativos, donde se colocaron todos los reactivos menos el ADNc. Para cada muestra se realizó en paralelo la RT-PCR de la b-actina como control de carga.

Tabla 2. Cebadores utilizados para las RT-PCR

cDNA	Cebador sentido	Cebador antisentido	Tamaño del producto (Pb)
<i>Cxcl-15</i>	GGTGAAGGCTACTGTTGGC	TATTCTCTTGTTCAGGTCTCC	151
<i>Ccl5</i>	CCTCACCATCATCCTCACTG	CACTTGGCGGTTCCCTTCG	196
<i>Ccl3</i>	CCGACTGCCTGCTGCTTCTCCTAC	CGTTCCTCGCTGCCTCCAAGACTC	213
<i>Ccl2</i>	CTCACCTGCTGCTACTCATTAC	ATGTCTGGACCCATTCTTCTTG	163
<i>Cxcl-10</i>	ATCCCTGCGAGCCTATCC	AATTCTTGATGGTCTTAGATTCCG	103
<i>Mmp8</i>	TGGTGATTTCTTGCTAACCCC	TACTACTCCAGACGTGAAAAGC	139
β -actina	TGTTACCAACTGGGACGACA	TCTCAGCTGTGGTGGTGAAG	392

Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa (2%) se corrieron a 100 V en buffer TAE 1X y se posteriormente se incubaron con una solución de bromuro de etidio. Los geles se fotografiaron con cámara digital bajo luz UV y la intensidad de las bandas se cuantificó utilizando el programa Image J. Las bandas correspondientes a cada ARNm se normalizaron contra la banda correspondiente a la actina.

11.6. Medición de la actividad gelatinasa de MMP-2 y MMP-9 por zimografía.

Se evaluó la actividad gelatinasa de las MMP-2 y MMP-9 en el tejido cervical según lo descrito por Pustovrh y col. (2005). Brevemente, el cérvix se homogeneizó en buffer de homogenización para zimografía y se prepararon 40 μ g de proteína con buffer muestra para sembrar las muestras en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7,5% en los que se incorporó 1 mg/mL de gelatina. Después de la electroforesis, los geles se lavaron en Tritón X-100 al 2,5% durante 60 minutos para eliminar SDS. A continuación, los geles se incubaron durante 24 h en buffer de incubación a 37 °C. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie y luego se destiñeron con ácido acético al 10% y metanol al 30% en agua. Las áreas de actividad proteolítica se observaron como bandas sin tinción sobre el fondo oscuro. Las MMPs se identificaron según sus pesos moleculares. Se evaluó también la actividad de la pro MMP-2 ya que la exposición a SDS induce cambios en su conformación que producen su activación.

La actividad enzimática se cuantificó utilizando el paquete de software Image J y se expresó como unidades densitométricas arbitrarias, que se normalizaron a la actividad MMP del grupo

control (AC+C). Los datos se muestran como relativos a un valor de 1 asignado a los valores medios de la actividad de MMP-9, MMP-2 y pro-MMP-2 respectivamente, en el cérvix de hembras del grupo control.

11.7. Radioinmunoensayo de PGs.

Mediante la técnica de radioinmunoensayo, RIA según su abreviatura del inglés *radio-immuno-assay*, se determinaron los niveles de PGE2 y PGF2 α en útero, cérvix y líquido amniótico. Hembras preñadas en día 15 fueron sacrificadas 5 horas después de la segunda inyección de vehículo o LPS de los cuatro grupos experimentales. Por cada hembra se recolectó un fragmento uterino de aproximadamente 100 mg, el cérvix entero y el líquido amniótico de todos los fetos. El útero y el cérvix que se congelaron a -80°C y el líquido amniótico se centrifugó por 10' a 800 x g a 4°C y se guardó el sobrenadante a -80°C.

El día del ensayo, se pesaron los fragmentos (de útero y cérvix) y se incubaron en 1 mL de buffer KRB durante 1 h en un baño a 37°C en atmósfera de carbógeno. Este paso no fue necesario para el líquido amniótico. A continuación, se separó el tejido para cuantificar las proteínas totales y el buffer KRB se acidificó hasta pH=3 con HCl 1N, para luego agregar la fase orgánica, 2 mL de acetato de etilo, para extraer las PGs liberadas. Se recogió la fase orgánica y se repitió el proceso de extracción 2 veces más. El acetato de etilo, que contenía las PGs, se evaporó en estufa de vacío.

Las muestras y todos los reactivos fueron reconstituidos en buffer RIA de PGs. Se preparó una solución madre del estándar respectivo (8000 pg/mL) a partir de la cual se hicieron diluciones seriadas al medio hasta llegar a 7,5 pg/mL para la curva de calibración. En tubos de propileno se colocaron 0,1 mL de los estándares o de la muestra con el antisuero correspondiente (anti-PGE2 o anti-PGF2 α) y se incubaron por 30 minutos a 4°C, posteriormente se agregó la prostaglandina marcada durante 1 hora y finalmente una suspensión de carbón activado (1%)-dextran (0,1%), que separa la PG unida de la libre. Las muestras se centrifugaron a 2000 x g durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante se volcó en viales conteniendo 1 mL de líquido de centelleo para muestras acuosas. La radioactividad se midió en contador de centelleo beta. Luego de una transformación logarítmica los datos se expresaron como pg de PGE2 o PGF2 α / μ g de proteínas totales. El método tiene una reactividad cruzada menor al 0,1% y una sensibilidad de 5 pg/tubo con una $K_a = 1.5 \times 10^{10}$ l/mol.

11.8. Radioinmunoensayo de corticosterona.

Se obtuvieron las muestras de sangre periférica por decapitación luego de anestesiar a los animales con CO₂. Se dejó la muestra a temperatura ambiente para permitir la coagulación y luego se centrifugó a 800 x g durante 10 min lo que permitió la separación del suero, que se guardó a -80°C hasta el momento de su utilización. Los niveles de corticosterona se determinaron en muestras de suero por RIA después de una extracción con diclorometano, como Cymeryng y col. describieron anteriormente (Cymeryng y col., 1998).

11.9. Actividad de las NOS medida por radio conversión.

La actividad de las NOS en el cérvix y en el útero de hembras preñadas en d15 Se midió 5 horas luego de la segunda inyección de vehículo o LPS de los cuatro grupos experimentales.

La técnica se basa en la radioconversión de [¹⁴C]-L-arginina y O₂ a [¹⁴C]-L-citrulina y NO. Dado que la citrulina es producida en cantidades equimolares con el NO, se puede utilizar la medición de citrulina, que permanece en la muestra, como medida de la cantidad producida de NO (el cual se pierde rápidamente por ser gaseoso) (Bredt and Snyder, 1989). Se recolectó un fragmento uterino de aproximadamente 100 mg y el cérvix entero que se guardaron a -80°C hasta su posterior utilización. El día del ensayo, los tejidos fueron pesados y homogeneizados en 500 µl de buffer HEPES completo. Posteriormente, los tejidos fueron incubados con [¹⁴C]-L-arginina 10 µM (0.3 µCi) durante 15 minutos, en un baño a 37°C con agitación constante y atmósfera de carbógeno. Finalizada la incubación, cada muestra fue centrifugada a 17000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante fue sometido a cromatografía de intercambio iónico, para separar la [¹⁴C]-L-citrulina formada de la [¹⁴C]-L-arginina, utilizando columnas DOWEX AG50W-X8 (forma aniónica Na⁺). La [¹⁴C]-L-arginina queda adsorbida, mientras que la [¹⁴C]-L-citrulina es eluída. Se colectó el eluído y se le agregó líquido de centelleo para muestras acuosas. La radioactividad se midió en contador de centelleo beta. Se adicionó un tubo de radioactividad inespecífica conteniendo solamente 500µl de buffer HEPES completo y [¹⁴C]-L-arginina. La actividad de la enzima se expresó como femtomoles de citrulina radioactiva producidos por mg de peso de tejido en 15 minutos (fmol [¹⁴C]-citrulina/mg tejido/15 min.).

11.10. Inmunofluorescencia.

El cérvix de hembras preñadas se recolectó 5h después de la administración de LPS (o vehículo) y se fijó en formaldehído al 10% en PBS. Los tejidos fueron deshidratados en gradiente creciente de alcohol y embebidos en parafina. Se realizaron secciones de 4 µm con

un microtomo y se montaron en portaobjetos recubiertos con silano. La recuperación antigénica se realizó calentando los cortes a 90°C durante 30 minutos en buffer citrato (pH 6,3). Las secciones se sumergieron en Triton X-100 al 0,1% en PBS durante 20 min para lograr la permeabilización. Los cortes se bloquearon en una solución de suero equino al 5% durante 1 hora y luego se incubaron durante la noche a 4 ° C con el anticuerpo primario (1: 200 anti-Ly6G). Después de varios lavados, los cortes se incubaron con el anticuerpo secundario (IgG anti-rata de cabra conjugado con Alexa 488, 1:200) durante 2 h a temperatura ambiente. Algunas secciones fueron tratadas sin los anticuerpos primarios para confirmar la especificidad. Los núcleos se tiñeron con Hoechst (1 µg/mL) y luego los vidrios se montaron con medio de montaje fluorescente y se observaron bajo un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse 200, NY, EE. UU.). Las imágenes digitales comparativas de diferentes muestras se tomaron utilizando configuraciones idénticas de exposición temporal, brillo y contraste. Los neutrófilos se identificaron analizando la marca Ly6G+ y la forma característica de los núcleos. Se analizaron 10 campos por cada corte y los resultados se expresaron como el número total de neutrófilos en 10 campos. Los neutrófilos se clasificaron según el área del tejido en el que se ubicaron las células: en el epitelio, en el tejido intersticial o en la luz de los vasos sanguíneos.

11.11. Citometría de flujo de líquido amniótico.

Se colectó el líquido amniótico (LA) de cada feto de las madres en d15 de gestación, 5h luego de la segunda dosis de LPS (o SF). Se centrifugó a 800 x g a 4°C y se separó el sobrenadante para realizar las mediciones de citoquinas. Se resuspendieron las células en 1mL de buffer FACS y se aisló una alícuota para cuantificar el número de células en cámara de Neubauer. Luego del recuento, se separaron 200.000 células en 3 tubos que luego se centrifugaron 10 min a 4°C a 800 x g y fueron resuspendidos en 60 µL de las distintas soluciones de tinción. El control negativo se resuspendió en FACS, el tubo FMO (por sus siglas en inglés *Fluorescence Minus One*) se resuspendió en una dilución 1/300 del anticuerpo anti CD45 en FACS y el tubo con marca que poseía las diluciones de todos los anticuerpos utilizados para el ensayo en FACS: CD45 (1/300), CD19 (1/50) y CD5 (1/200). Se incubaron durante 30 min a 4°C, y se agregaron 500 µL de FACS buffer en frío. Posteriormente, se centrifugaron durante 10 min a 4°C a 2500 800 x g. Se descartó el sobrenadante y se fijaron las células con paraformaldehído (PFA) 1% por 24 hs a 4°C. Se agregaron 500 µL de FACS y se centrifugaron los tubos por 10 minutos a 4°C a 800 x g. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 200 µL de FACS buffer. Se guardaron a 4°C cubiertos en papel aluminio hasta su análisis.

11.12. ELISA de citoquinas.

La medición de la IL-10, de TNF α y de la IL-6 en el líquido amniótico llevó a cabo utilizando kits de ELISA BD OptEIA™ de la empresa BD Bioscience (números de catálogo 555252, 555268 y 555240 respectivamente) siguiendo el protocolo del fabricante.

La interleuquina IL-22 en el líquido amniótico se midió utilizando el kit de ELISA de la empresa Biolegend® (número de catálogo 436304) siguiendo el protocolo del fabricante.

12. Análisis estadístico de los datos.

El tamaño aproximado de la muestra se calculó a priori para todas las determinaciones utilizando el software estadístico Infostat, según lo requerido por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Medicina (Universidad de Buenos Aires). Este programa permite calcular el tamaño mínimo de la muestra para detectar diferencias estadísticamente significativas entre las medias grupales especificadas por el usuario teniendo en cuenta el número de tratamientos, la varianza (obtenida de la bibliografía y los experimentos anteriores del laboratorio), el nivel de significancia (0,05) y la mínima diferencia a detectar, asociada a valores de potencia, teniendo en cuenta que estos últimos siempre son superiores al 80%.

En todos los experimentos la unidad experimental fue la madre, que fue asignada en un diseño completamente aleatorizado a alguno de los 4 grupos experimentales:

- AC+C: ambiente control + solución salina
- AC+LPS: ambiente control + LPS
- AE+C: ambiente enriquecido + solución salina
- AE: ambiente enriquecido + LPS

De esta manera, todas las muestras son independientes entre sí.

Al analizar las crías la unidad experimental también fue la madre. Durante la lactancia se pesaron todas las crías de la camada y los pesos se promediaron y luego se usó la media para el análisis estadístico. Los parámetros de desarrollo se evaluaron en 2 crías al azar y también se promediaron. Al llegar a la adultez se utilizaron dos crías por madre (una de cada sexo) para medir el colesterol, los triglicéridos séricos y el peso de los depósitos adiposos.

Los resultados fueron analizados por ANOVA de uno o dos factores según correspondiera. Cuando se evaluaron solamente los efectos del ambiente se utilizó ANOVA de un factor, y cuando se quiso evaluar también el efecto del LPS y una posible interacción entre factores se utilizó ANOVA de 2 factores. Cuando se utilizó ANOVA de dos factores, primero se probó la

significancia de la interacción entre los dos factores (ambiente y tratamiento). Si la interacción no fue estadísticamente significativa ($p > 0,05$), se evaluaron los efectos principales.

Además, se utilizó el diseño de medidas repetidas en el tiempo cuando una misma unidad experimental fue sometida a mediciones sucesivas a lo largo del tiempo (peso de las crías durante la lactancia, glucosa en sangre) lo que permite un mejor control del error ya que se estudian patrones individuales de cambio y su variación entre los diferentes tratamientos.

Las comparaciones se realizaron mediante la prueba de Tukey o DGC (Rienzo et al., 2002). La normalidad y la homogeneidad de la varianza se probaron mediante las pruebas de Shapiro-Wilk (modificada) y Levene, respectivamente. En el caso de los datos que no cumplieron con los supuestos, se aplicó la transformación más adecuada según el comportamiento de los datos y continuó de la misma manera que con los datos reales. El análisis estadístico se realizó utilizando un diseño de bloques al azar cuando fue necesario.

Los datos se expresaron como media \pm ES (error estándar de la media) y las diferencias se consideraron significativas cuando p-valor fue inferior a 0,05.

La incidencia de PP se analizó efectuando un arreglo de los datos en tablas de contingencia. Mediante el test de chi-cuadrado se analizó la hipótesis de independencia entre el ambiente al que son expuestas las hembras y la ocurrencia de PP. Cuando se rechazó la hipótesis de independencia con un p-valor $< 0,05$ se concluyó que existían diferencias significativas en los porcentajes de PP entre los grupos.

La eficiencia de la preñez se analizó mediante el test estadístico no paramétrico Kruskal-Wallis utilizando la mediana y el rango intercuartil debido a que los datos no se distribuían de manera normal.

El número de neutrófilos infiltrantes en el cérvix se analizó mediante un modelo lineal modelando la heterogeneidad de varianza debido a que los datos no cumplían el supuesto de homogeneidad de varianza requisito necesario para la utilización del ANOVA.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico Infostat (FCA, Universidad de Córdoba, Argentina).

13. Reactivos, drogas y soluciones.

El Lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* 055:B5, HISTOPAQUE-1083, los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rabanito, la gelatina, el Höchst, el anticuerpo

primario anti- β actina, el Rojo Ponceau S., el HEPES, el CaCl_2 , el DTT, la citrulina y el NADPH fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA).

Los anticuerpos anti-COX 1, anti-NOSi y anti-COX 2 fueron adquiridos de Cayman Chemical Company. Los anticuerpos anti-TLR4 y anti-CD14 provinieron de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas).

Los anticuerpos para citometría de flujo y para la inmunofluorescencia fueron obtenidos de BioLegend (San Diego, California).

EL kit Colestat enzimático AA línea líquida y el kit TG color GPO/PAP AA línea líquida utilizados para medir colesterol y triglicéridos en suero, respectivamente, fueron adquiridos de Wiener Lab. (Rosario, Argentina).

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

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

El marcador de peso molecular para western blot fue obtenido de GE Healthcare, y el marcador de peso molecular para PCR fue proporcionado por Biodynamics S.R.L.

Los reactivos utilizados para la retro-transcripción (RT) del ARNm (H_2O ultrapura, DNAsa, Buffer DNAsa, cebadores random, Buffer Tris 5X, DTT) y los cebadores específicos, fueron adquiridos de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), mientras que el Inhibidor de RNAsas y los dNTPs que fueron suministrados por Genbiotech (CABA, Argentina). La transcriptasa reversa M-MLV, el Green GoTaq Reaction Buffer 5X y la DNA polimerasa GoTaq utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son de Promega (Madison, USA).

El material radioactivo utilizado fue obtenido de Perkin Elmer:

- [5,6,8,9,11,12,14,15(n)- ^3H]-prostaglandina F2 α (160 Ci/mmol, 200 $\mu\text{Ci/mL}$)
- [5,6,8,9,11,12,14,15(n)- ^3H]-prostaglandina E2 (130 Ci/mmol, 100 $\mu\text{Ci/mL}$)

Soluciones y Buffers:

- Buffer fosfato (PBS): NaCl 136,9 mM + KCl 2,68 mM + KH_2PO_4 1,47 mM + $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8 mM.
- PBS-T: PBS + Tween-20 (0,1%)

- Cocktail de inhibidores: 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: Azul de bromofenol 0,3% (p/v) + Buffer Tris 0,5 M (pH=6,8) + SDS 1% (p/v) + β-mercaptoetanol 5% (v/v) + glicerol 10% (v/v).
- Buffer de homogenización para WB: Azida sódica 0,02% (p/v) + SDS 0,1% (p/v) + Deoxicolato 0,5% (p/v) + Nonidet P40 1% (v/v) + cóctel de inhibidores 1X en PBS.
- Buffer de homogenización para zimografía: Tris 50 mM, CaCl₂ 5 mM, ZnCl₂ 1 µM, Triton X-100 al 1% de sodio 0,25% (v/v).
- Buffer de incubación: Tris Buffer 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM y CaCl₂ 10 mM.
- Buffer de corrida: Tris base 123,8 mM (pH=8,3) + glicina 0,96 M + SDS 17,3 mM.
- Buffer de transferencia: 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).
- Bradford: 120 mg de Coomassie Brilliant Blue G + 60 mL de etanol + 120 mL de H₃PO₄ + 620 mL H₂O.
- Solución de revelado para ECL:
 - Solución de revelado A: Luminol 250 mM + ácido cumárico 90 mM + Tris-HCl pH 8,5 1M + H₂O.
 - Solución de revelado B: 100 ml de Tris-HCl 1 M pH 8,5 + 900 ml de H₂O + 2 ml de H₂O₂ 100 vol.
- Buffer Krebs–Ringer–Bicarbonato (KRB): NaCl 118mM + KCl 4,7 mM + KH₂PO₄ 1,18 mM + MgSO₄•7H₂O 1,22mM + 25.3 NaHCO₃ 25 mM + glucosa 11,1mM.
- Buffer RIA de PGs: K₂HPO₄•3H₂O 7.3 mM + KH₂PO₄ 2.7 mM + ClNa 154 mM + albúmina bovina 7.1 mM + azida sódica 15.4 mM. pH=7.4.
- Buffer HEPES completo: HEPES 20,14 mM, pH=7,4, conteniendo CaCl₂ 0.45mM, DTT 2.5mM, NADPH 0.5mM y valina 25mM (inhibidor de las arginasas).
- Buffer FACS: PBS + 1% de seroalbúmina bovina (BSA), 0,1% de azida sódica, pH=7.4.
- Buffer TAE 50X: Tris base 24,2 g; ácido acético glacial 5,7 ml; EDTA 1,861 g. Llevar a 100 ml con agua destilada.

Resultados.

14. Efecto del AE sobre la fisiología de las hembras.

14.1. Efecto de la exposición a un AE sobre la ganancia en peso de las hembras.

Como primer objetivo, nos propusimos diseñar un protocolo de enriquecimiento ambiental y evaluar el efecto del mismo sobre la fisiología materna. Si bien no existían protocolos de enriquecimiento ambiental para evaluar cuestiones reproductivas, a partir de bibliografía sobre enriquecimiento ambiental como estrategia para tratar patologías del sistema nervioso y/o para mejorar las secuelas en la descendencia en modelos de estrés materno (Kentner *et al.*, 2008; Sparling *et al.*, 2010; Caporali *et al.*, 2014; Sale *et al.*, 2014; Tamura *et al.*, 2015; Ashokan *et al.*, 2016; Jungling *et al.*, 2017, entre otros), establecimos el protocolo de enriquecimiento ambiental previamente descrito.

En ratones, desde el destete a los 21 días de edad, hasta que alcanzan la madurez reproductiva a los 2 meses de edad las crías se consideran pre púberes. Las hembras ingresaron al protocolo de AE o a las jaulas estándar (ambiente control, AC) a las seis semanas de edad, por lo que hay un periodo de crecimiento que ocurrió dentro de las jaulas de AE o AC respectivamente. Es por eso que decidimos evaluar, como parámetro de crecimiento, la ganancia de peso de las hembras luego del protocolo de AE. En la figura 17 podemos observar que las hembras que fueron alojadas en jaulas de AE ganan menos peso hasta el día 45 (cuando entran en apareo) en comparación con las hembras que fueron alojadas en jaulas estándares de laboratorio.

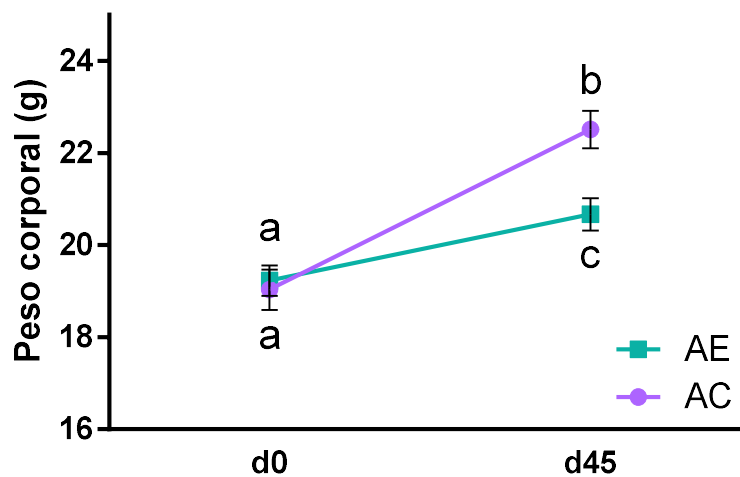


Figura 17: Peso de las hembras antes y después de su estadía en las jaulas de ambiente enriquecido (AE) o ambiente control (AC). Los valores representan el promedio \pm EE. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), ANOVA de 1 factor con medidas repetidas, test de Tukey. d0= día de entrada y d45= día 45 de estancia en el protocolo de AE (o AC). N= 10 (AC) y 20 (AE) animales.

14.2. Efectos del AE sobre las características de la preñez y los parámetros metabólicos en hembras preñadas.

Luego de cumplidas las seis semanas de protocolo de AE (o AC), las hembras fueron puestas en apareo con machos de la misma cepa en jaulas estándar y cuando presentaron tapón mucoso regresaron a las jaulas de AE o AC respectivamente. Para todos los resultados de aquí en adelante, siempre que nos referimos a hembras preñadas, las estaremos evaluando en el día 15 de gestación, que es el día seleccionado para realizar el protocolo de PP.

Lo primero que evaluamos fue el porcentaje de preñez (calculado como el % de hembras preñadas respecto a las que presentaron tapón) en las hembras provenientes de AE y AC (tabla 3). Observamos que el % de preñez fue significativamente mayor en las hembras que habían estado expuestas a AE, siendo casi del 100%, en comparación con las AC cuyo % de preñez normal en las condiciones de nuestro bioterio es del 40%.

Tabla 3: Porcentaje de preñez en d15, de las hembras que estuvieron en apareo y presentaron tapón mucoso. Se presentan los datos como la media \pm error estándar (EE) y como la mediana más el rango intercuartil (IQR). Para el análisis estadístico se utilizaron las medianas. Análisis no paramétrico Kruskal-Wallis. *indica diferencias estadísticamente significativas, $p < 0,05$.

	Media \pm EE (%)	Mediana \pm IQR (%)	N
AC	38,79 \pm 2,87	40,0 \pm (33,3-50,0)	29
AE	88,33 \pm 5,38	100 \pm (75,0-100) *	15

Basándonos en la hipótesis de que el AE puede modular el metabolismo de las madres decidimos analizar el peso materno y algunos parámetros metabólicos durante la gestación.

Lo primero que analizamos fue el peso corporal de las hembras preñadas en d15 y observamos que no había diferencias entre los grupos (Figura 18). Esto indicaría que, una vez que quedan preñadas, las hembras AE ganan más peso que las AC, dado que parten de un peso menor que se iguala al día 15 de gestación. En principio, esto podía deberse a que las hembras AE engordaran más, o a que los fetos o las camadas de estas madres fueran más grandes. Para dilucidar esto, analizamos en principio el número y peso de los fetos en d15. Los resultados pueden observarse en la tabla 4.

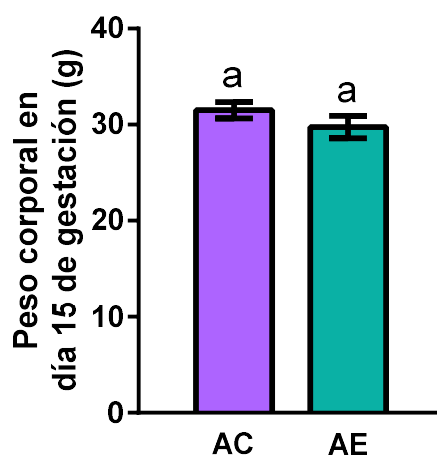


Figura 18: Peso de las hembras preñadas en día 15 de gestación. Los valores representan la media \pm EE. Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). ANOVA de 1 factor. N=8 animales por grupo.

Tabla 4: Número de fetos en d15 de gestación y peso promedio de los fetos. Se realizó un promedio de peso de los fetos de cada madre y sobre este promedio se realizó el test estadístico. ANOVA de 1 factor. No se encontraron diferencias significativas. Los datos se presentan como la media \pm EE.

	Número de fetos	Peso de los fetos (g)	N
AC	8 \pm 1	0,36 \pm 0,01	11
AE	8 \pm 1	0,38 \pm 0,02	15

Al no encontrar diferencias ni en el tamaño de la camada, ni en el peso de los fetos, decidimos pesar los depósitos de tejido adiposo abdominal, gonadal y retroperitoneal en estas hembras (Figura 19). Observamos que, para todos los depósitos analizados, las hembras AE tenían más grasa que las hembras AC. Esto indicaría que, luego de quedar preñadas, las hembras AE ganan más peso, y que se debe, al menos en parte, a que desarrollan más tejido adiposo en comparación con las AC.

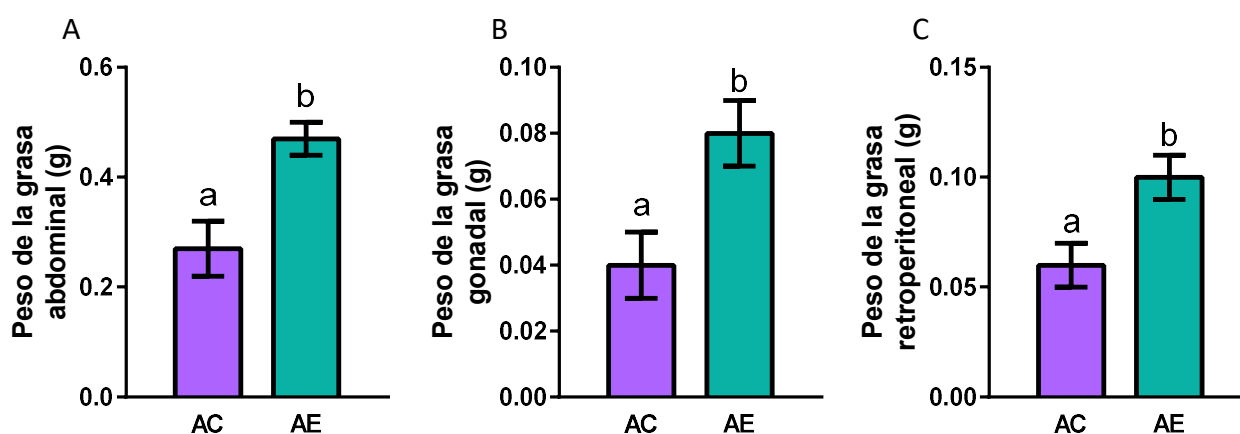


Figura 19: Peso de los depósitos de tejido adiposo de las hembras preñadas en día 15 de gestación. A) Grasa abdominal; B) Grasa gonadal y C) grasa retroperitoneal. Los valores representan la media \pm EE. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). ANOVA de 1 factor, test de Tukey. N=8 animales por grupo.

Analizamos los niveles séricos de colesterol y triglicéridos en las hembras preñadas y observamos que ambos parámetros estaban disminuidos en las hembras provenientes de AE en comparación con las AC (Figura 20). Además, le realizamos a las hembras el test oral de tolerancia a la glucosa y no encontramos diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 21).

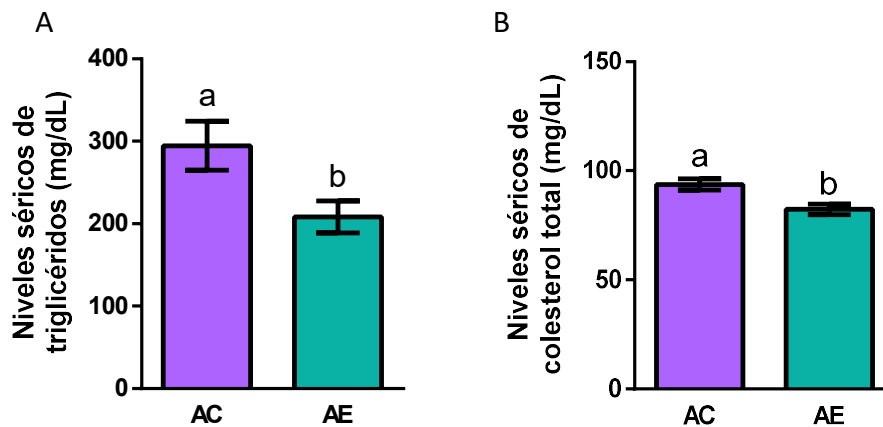


Figura 20: Niveles séricos de (A) triglicéridos y (B) colesterol en hembras preñadas en día 15 de gestación. Los valores representan la media \pm EE. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, ANOVA de 1 factor, Test de Tukey. N= 14 (AC) y 17 (AE) animales.

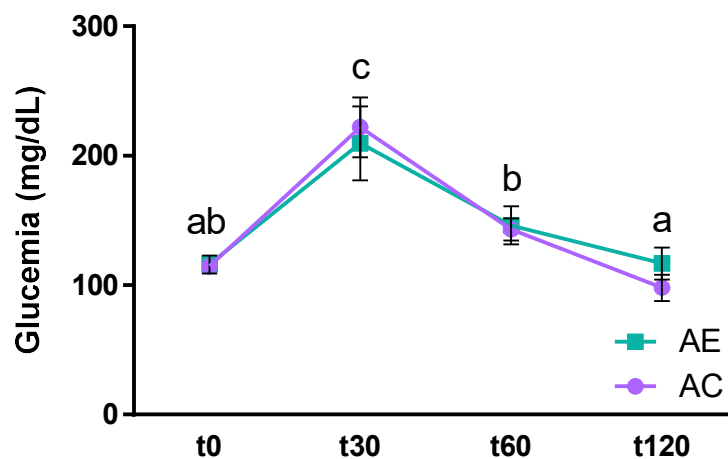


Figura 21: Curva de glucemia durante el test oral de tolerancia a la glucosa. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos de medición ($p < 0,05$), test de medidas repetidas. Los valores representan la media \pm EE. n=7 animales por grupo.

El AE, al exponer a los animales a estímulos novedosos semanalmente, puede resultar en un tratamiento que expone a los animales a una situación de bajo estrés, pero prolongado en el tiempo. Por ello decidimos medir los niveles de corticosterona sérica en las hembras preñadas, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre grupos (Figura 22). Sin embargo, observamos una respuesta bimodal en cuanto a los niveles séricos de la

hormona en las hembras AE. Un grupo de animales presentó niveles más altos de corticosterona circulante en comparación con las AC.

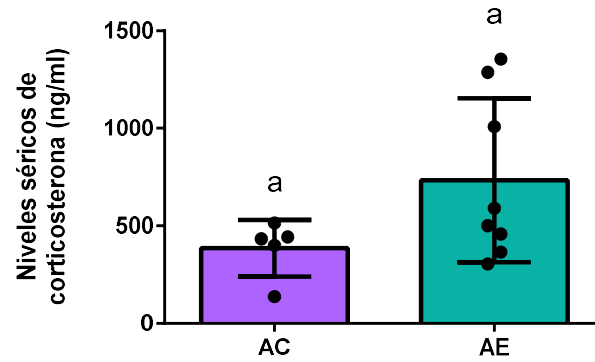


Figura 22: Niveles séricos de corticosterona en hembras preñadas en día 15 de gestación. Los valores representan la media \pm EE. Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). ANOVA de 1 factor. N=5 (AC) y N=8 (AE) animales.

15. Efecto del enriquecimiento ambiental materno sobre la gestación.

15.1. El enriquecimiento ambiental materno reduce la tasa de PP en un modelo inflamatorio inducido por la administración de lipopolisacáridos bacterianos.

Para evaluar si el enriquecimiento ambiental de la madre podía tener un efecto protector durante la gestación, utilizamos un modelo de PP inducido por la administración intraperitoneal de LPS. El LPS, en las dosis elegidas, produce en las hembras provenientes de AC un 82,4% de PP. Cuando realizamos el mismo protocolo a hembras que habían estado expuestas a AE, observamos que el porcentaje de PP fue significativamente menor (Figura 23). En este grupo de animales, solo el 50% de las hembras tratadas con LPS parieron prematuramente. En ambos grupos, las hembras que no tuvieron PP parieron a término, sin presentar retrasos en el desencadenamiento del parto. Los grupos controles, tanto AC como AE, fueron tratados con solución salina y en ningún caso observamos parto pretérmino.

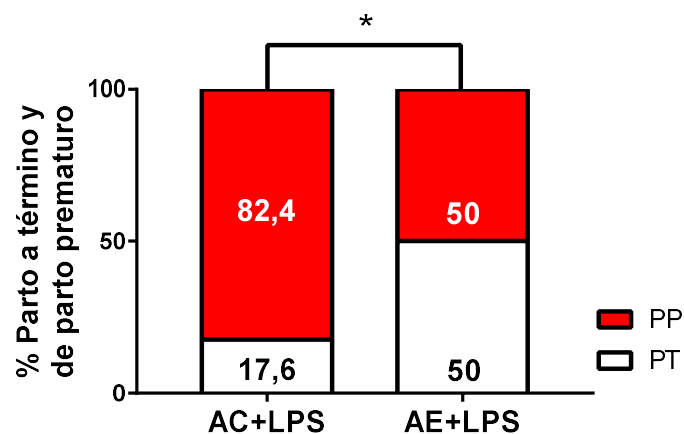


Figura 23: Porcentaje de hembras que tuvieron parto prematuro (PP) y parto a término (PT) luego de la administración de LPS en el día 15 de gestación. * indica diferencias estadísticamente significativas entre los % de PP ($p < 0,05$). Test de Chi-cuadrado. N=16 animales por grupo.

15.2. El AE materno modula los niveles proteicos de los receptores de tipo Toll (TLR)-4 y su proteína co-activadora CD14 en el útero de hembras preñadas en d15.

Bajo la hipótesis de que las hembras que habían sido alojadas en AE eran menos sensibles al LPS, ya que presentan una tasa significativamente menor de PP, decidimos medir los niveles proteicos del receptor TLR-4 y su proteína co-activadora CD14 en el útero y en el cérvix de hembras preñadas en d15. Estos receptores, son las principales moléculas involucradas en el reconocimiento del LPS y el inicio de la cascada de señalización de la respuesta inflamatoria. Como se puede observar en la figura 24 ambas proteínas estaban disminuidas en el útero de las hembras provenientes de AE. En el cérvix, si bien se observa una tendencia, esta disminución no fue estadísticamente significativa, probablemente debido a la gran variabilidad entre las hembras.

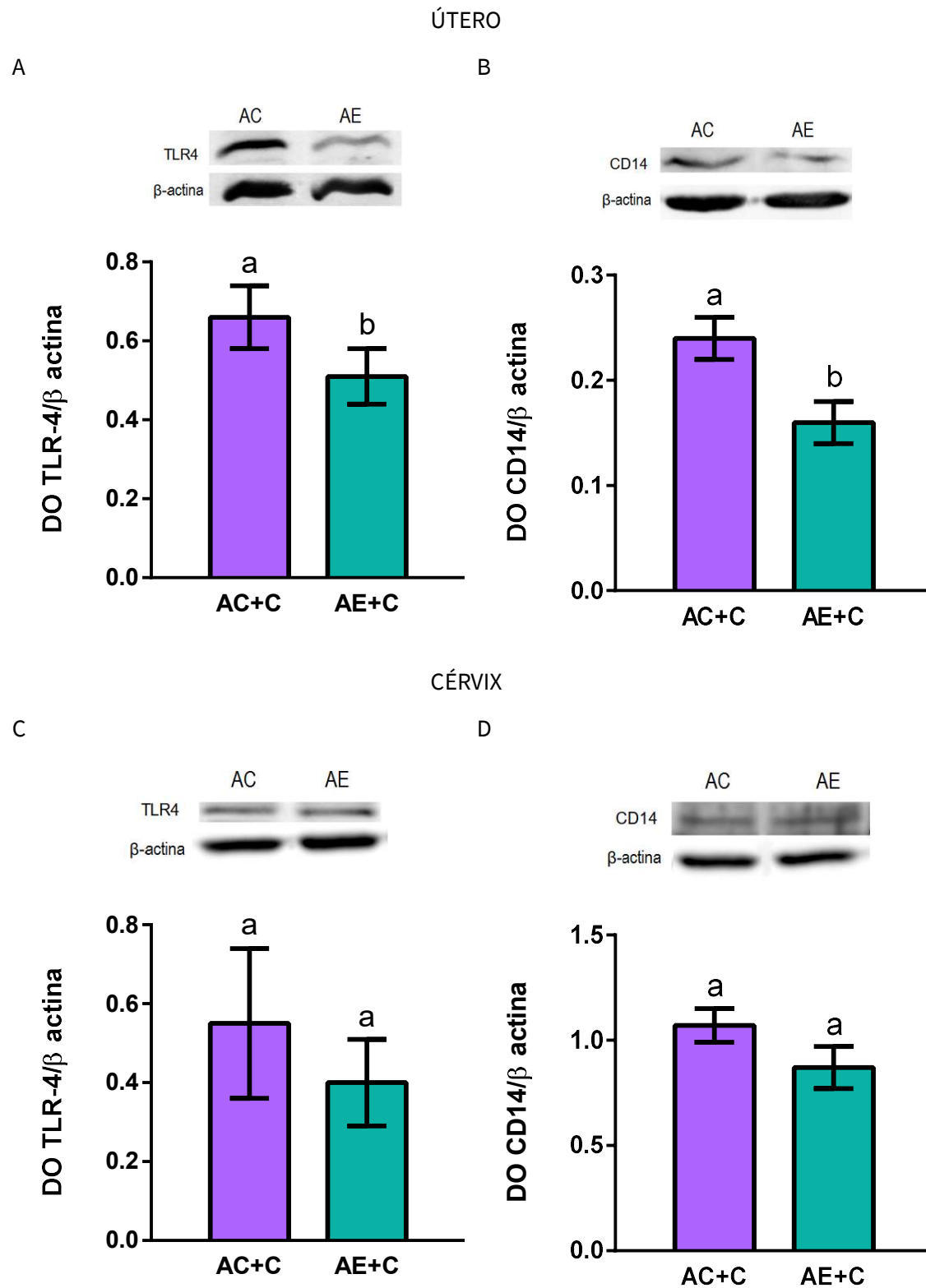


Figura 24: Niveles proteicos de (A, C) TLR-4 y (B, D) CD14 en útero y cérvix de hembras preñadas en día 15 de gestación. Paneles A y B muestran los niveles uterinos de estas proteínas, mientras que los paneles C y D muestran los niveles proteicos en cérvix. Los valores representan la media \pm EE. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, ANOVA de 1 factor, Test de Tukey. N= 8 animales por grupo.

Para dilucidar si el AE podría estar modulando al sistema inmune a nivel sistémico, analizamos también los niveles proteicos de TLR4 y CD14 en las PBMC que incluyen linfocitos, monocitos y células NK. No encontramos diferencias significativas entre los grupos para ninguna de las dos proteínas (figura 25).

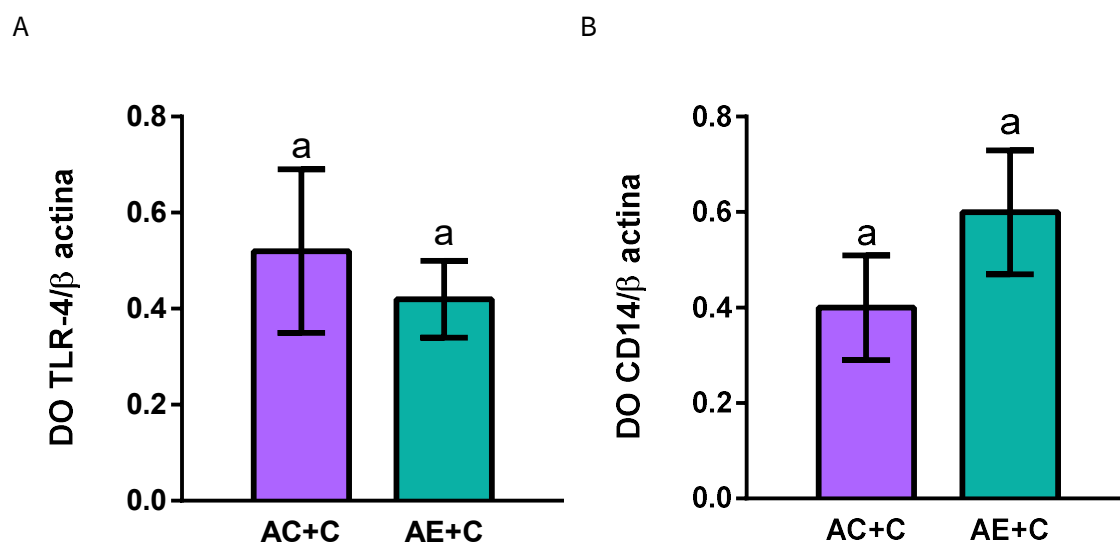


Figura 25: Niveles proteicos de TLR-4 y CD14 en PBMC de hembras preñadas en día 15 de gestación. Se obtuvieron las PBMC de hembras preñadas provenientes de AC o AE en d15 de gestación, se aislaron las proteínas y se analizó la cantidad de (A) TLR4 y (B) CD14. Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Los valores representan la media \pm EE. ANOVA de 1 factor. N= 7 animales por grupo.

15.3. El enriquecimiento ambiental materno previene el aumento de corticosterona sérica inducido por la administración de LPS.

Debido a que la respuesta inflamatoria está asociada con la liberación de mediadores de estrés decidimos evaluar los niveles séricos de corticosterona en los animales tratados con LPS, 8h luego de la primera dosis. Como se observa en la figura 26, el LPS indujo un aumento de corticosterona a las 8h de la primera dosis en las hembras provenientes de AC. Sin embargo, este pico no se observó en las hembras tratadas con LPS, provenientes de AE.

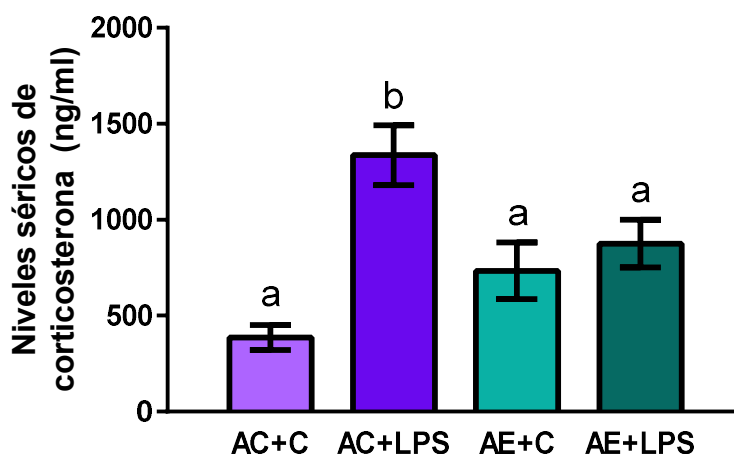


Figura 26: Niveles séricos de corticosterona en hembras preñadas en día 15 de gestación luego de la administración del LPS. Las muestras de suero fueron obtenidas 8h luego de la primera dosis de LPS (o SF). Los valores representan la media \pm EE. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). ANOVA de 1 factor, test DGC. N=5 (AC) y N=8 (AE) animales en cada grupo.

15.4. El enriquecimiento ambiental materno induce cambios moleculares en el útero y el cérvix en respuesta al desafío inflamatorio inducido por el LPS.

15.4.1. Útero.

Para tratar de dilucidar los mecanismos moleculares subyacentes a la protección de la preñez frente al desafío inflamatorio, en las hembras expuestas a un enriquecimiento ambiental, decidimos evaluar mediadores inflamatorios relacionados con el inicio de las contracciones uterinas que desencadenan el parto. Analizamos las enzimas COX-1 y COX-2, ambas encargadas del incremento en la producción de PGs que promueven la contractilidad uterina. Encontramos que no había diferencias en los niveles proteicos de la isoforma 1 (constitutiva) entre los grupos, pero sí estaban elevados los niveles proteicos de la isoforma 2 (la isoforma inducible) en los grupos tratados con LPS, tanto AC como AE (figura 27 A y B).

A continuación, medimos la producción de PGs uterinas, y observamos que el LPS indujo un aumento de la producción de PGF2 α y PGE2 en las hembras provenientes de AC. Sin embargo, en las hembras provenientes de AE no se observó este aumento en los niveles de PGs inducido

por el LPS. Los niveles basales de PGs en las hembras control que habían estado en AE fueron más altos que los de las hembras que estuvieron en AC, sin existir diferencias entre los grupos AE+C y AC+LPS (figura 27 C y D).

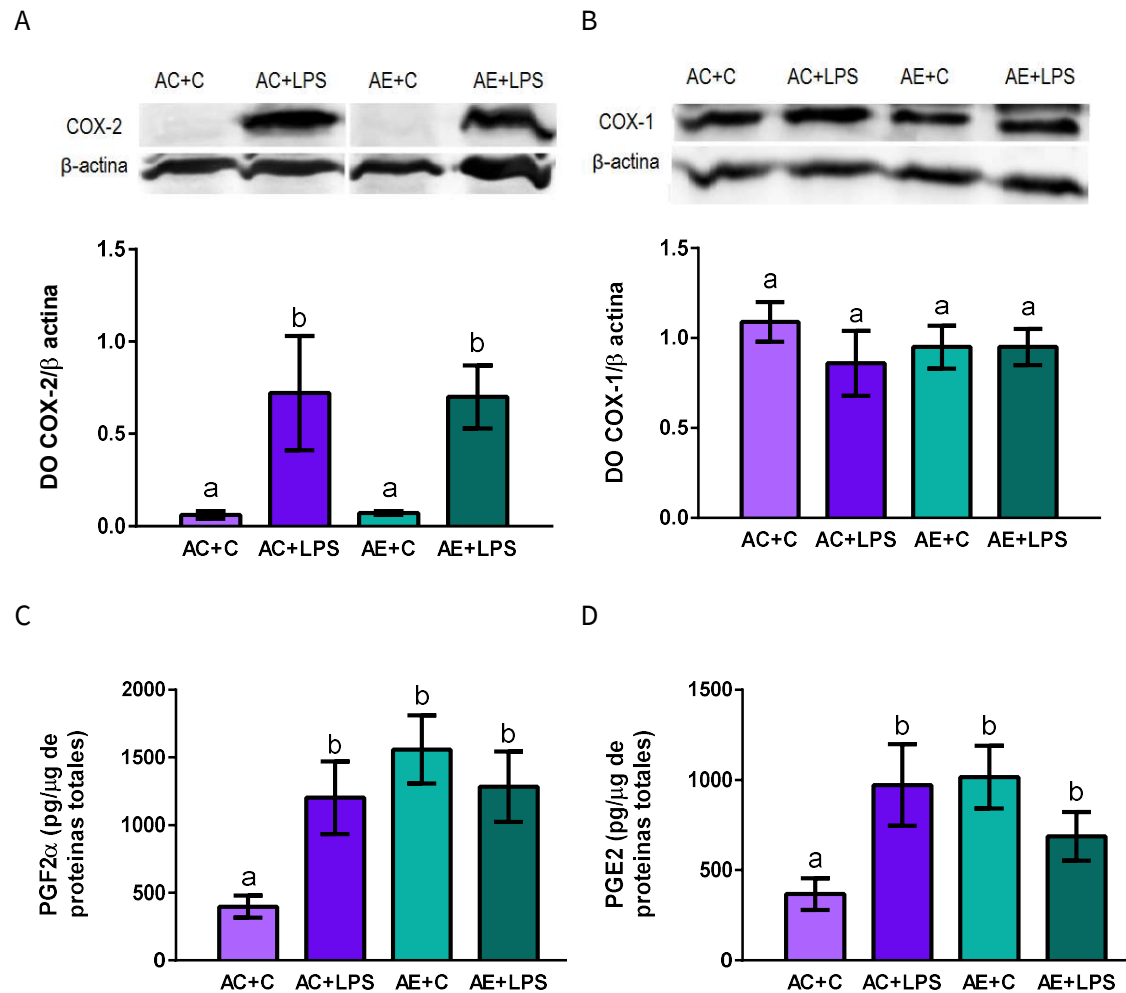


Figura 27: Niveles proteicos de (A) COX-2 y (B) COX-1, y niveles de (C) PGF $_{2\alpha}$ y (D) PGE2 en úteros de hembras preñadas en día 15 de gestación luego de la administración de LPS (o SF). Las muestras de útero fueron obtenidas 8h luego de la primera dosis de LPS (o SF). Los valores representan la media \pm EE. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). ANOVA de 2 factores, test de Tukey. N=5 (paneles A y B) N=7 (paneles C y D) animales en cada grupo.

Debido a que el NO es un mediador inflamatorio involucrado en el desencadenamiento del parto, medimos también los niveles proteicos de la NOSi, principal enzima productora de NO frente a un estímulo inflamatorio. También evaluamos la actividad de la NOS por radioconversión de arginina marcada, que es una medida indirecta de medir la producción de NO por parte de la enzima en el tejido de interés.

Al igual que lo observado en la enzima COX-2, el LPS indujo un aumento de los niveles proteicos de la NOSi en las hembras provenientes tanto de AC como de AE (figura 28 A). Sin embargo, al analizar la actividad enzimática, el incremento inducido por el LPS en el útero de hembras de AC no se observó en las muestras de las hembras que habían estado en AE (Figura 28 B).

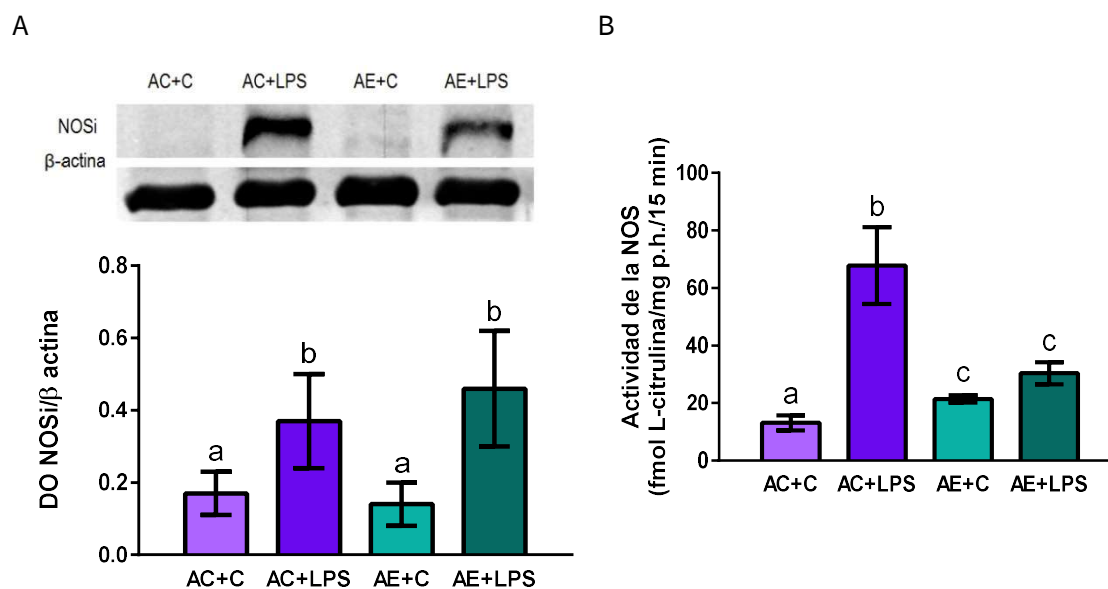


Figura 28: (A) Niveles proteicos de NOSi y (B) actividad de la NOS en úteros de hembras preñadas en día 15 de gestación luego de la administración del LPS (o SF). Las muestras de útero fueron obtenidas 8h luego de la primera dosis de LPS (o SF). Los valores representan la media \pm EE. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). ANOVA de 2 factores, test de Tukey. N=7 (panel A) N=9 (panel B) animales en cada grupo.

15.4.2. Cérvix.

Otro evento que precede al parto, ya sea a término como pretérmino es el borramiento del cérvix. Es por eso que decidimos analizar algunos mediadores moleculares y celulares que dan inicio a este evento.

En primer lugar, y dado que el aumento de la producción de PGE2 es un marcador del inicio del borramiento cervical, analizamos la producción de esta prostaglandina y la expresión proteica de la enzima COX-2 (figura 29 A). Al igual que en el útero, el LPS indujo un aumento en la expresión proteica de la COX-2 en ambos grupos (AC y AE). Sin embargo, cuando evaluamos los niveles de PGE2, el aumento en la producción de esta prostaglandina inducido por el LPS en el cérvix, no se vio en las hembras que fueron alojadas en AE (figura 29 B).

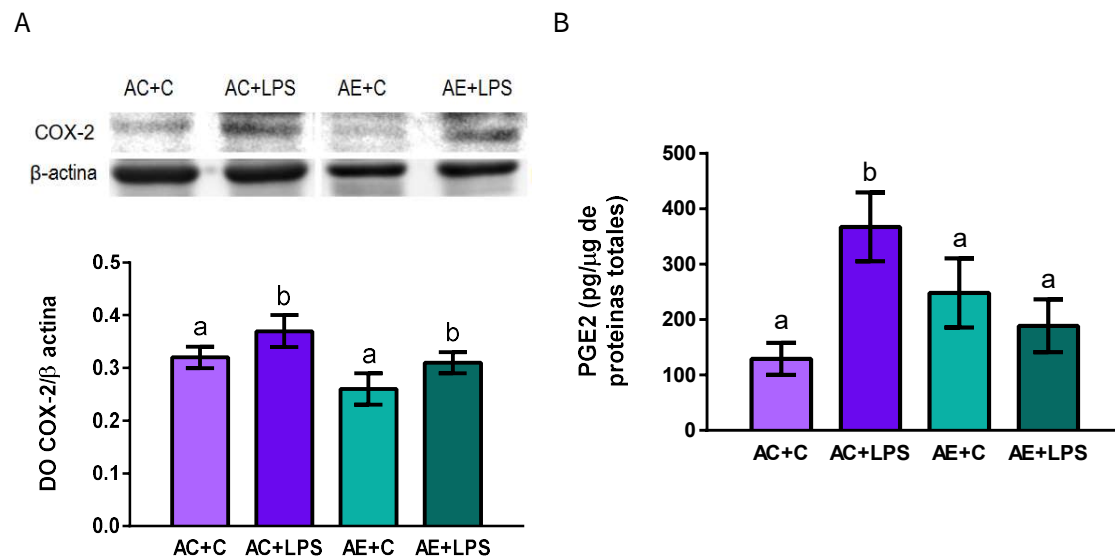


Figura 29: Niveles proteicos de (A) COX-2 y niveles de (B) PGE2 en cérvix de hembras preñadas en día 15 de gestación luego de la administración de LPS (o SF). Las muestras de cérvix fueron obtenidas 8h luego de la primera dosis de LPS (o SF). Los valores representan la media \pm EE. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). ANOVA de 2 factores, (A) test de Tukey y (B) test DGC. N=6 (panel A) y N=7 (panel B) animales en cada grupo.

El NO es un potente vasodilatador que podría favorecer el reclutamiento de células inmunes y se ha informado en numerosos trabajos como mediador involucrado en el borrado cervical. Es por ello, que decidimos medir en este tejido la actividad de la enzima NOS y los niveles proteicos de la NOSi. Observamos que el LPS induce un aumento en la expresión proteica de la NOSi en hembras provenientes tanto de AC como de AE (figura 30 A). Sin embargo, el incremento en la actividad de la NOS que se observa en las hembras AC al tratarlas con el LPS, no se observa en las hembras provenientes de AE (figura 30 B).

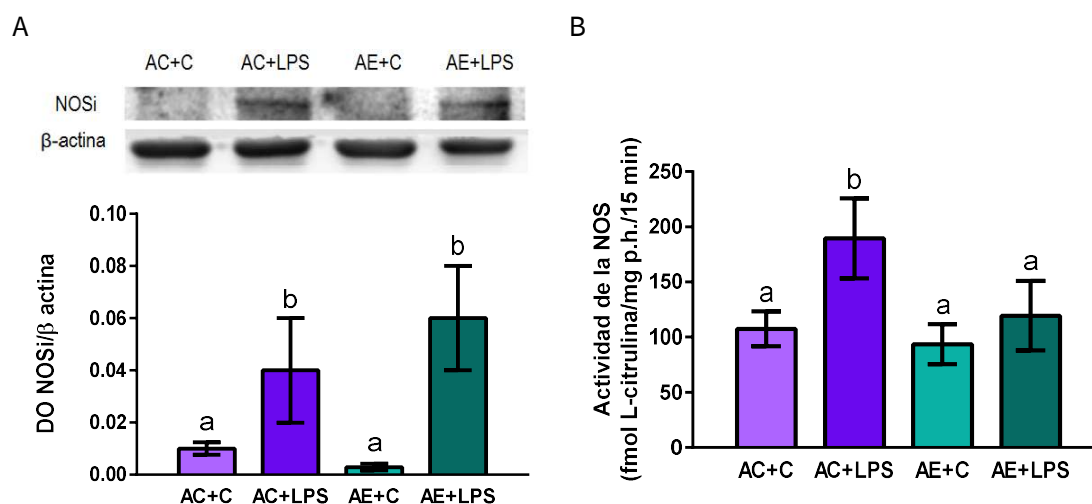


Figura 30: (A) Niveles proteicos de NOSi y (B) actividad de la NOS en cérvix de hembras preñadas en día 15 de gestación luego de la administración de LPS (o SF). Las muestras de cérvix fueron obtenidas 8h luego de la primera dosis de LPS (o SF). Los valores representan la media \pm EE. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). ANOVA de 2 factores, test de Tukey. N=7 animales en cada grupo.

El reclutamiento de células inmunes al cérvix, y en particular, de neutrófilos, está asociado al borramiento cervical que precede el PP.

Como una primera aproximación, decidimos analizar en este tejido, los niveles de mensajero de algunas citoquinas quimioattractantes de células inmunes: *ccl2*, *ccl3*, *ccl5*, *cxcl10* y *cxcl15*. Además, medimos los niveles de mensajero de la metaloproteína 8 (*Mmp8*), producida principalmente por neutrófilos (figura 31). Encontramos que el LPS induce un aumento significativo de los niveles de ARNm de *Ccl2*, *Ccl3*, *Ccl5* y *Cxcl10* sin encontrar diferencias entre los ambientes (figura 31 A, B, C y D). No encontramos diferencias significativas entre grupos para los niveles de ARNm de la quemoquina *Cxcl15* (figura 31 E).

Respecto de la MMP8, vimos que el LPS induce un aumento en los niveles de su mensajero en ambos grupos (AC y AE), sin haber diferencias significativas entre ellos (figura 31 F).

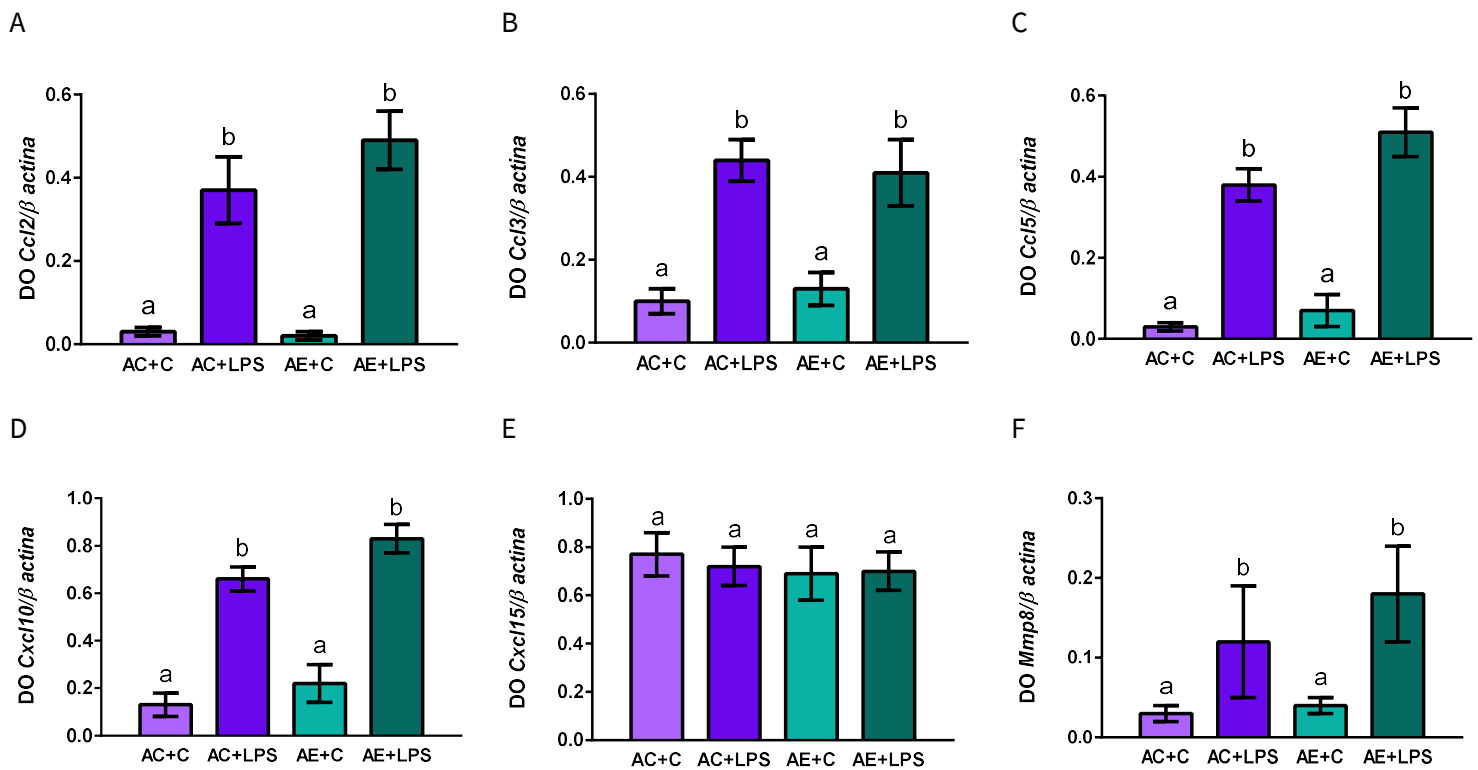


Figura 31: Niveles de ARNm de citoquinas quimioattractantes y de mmp8 en cérvix de hembras preñadas en día 15 de gestación luego de la administración de LPS (o SF). Las muestras de cérvix fueron obtenidas 5h luego de la primera dosis de LPS (o SF). Los valores representan la media \pm EE. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). ANOVA de 2 factores, test de Tukey. N=6 animales en cada grupo.

A continuación, decidimos estudiar el reclutamiento de neutrófilos en el tejido cervical luego de la administración de LPS. La identificación de los neutrófilos se realizó mediante el análisis de la forma característica de sus núcleos multilobulados (teñidos con Hoëchst) y la marca positiva para el marcador Ly6G. Cuantificamos el número de neutrófilos en 10 campos y los clasificamos según su ubicación en el corte como: L=luminares (en el lumen de vasos sanguíneos), I=intersticiales y E=epiteliales (figura 32). Observamos que el LPS produce un aumento del infiltrado de neutrófilos en el cérvix luego de 8h de la primera dosis, en las hembras provenientes de ambos ambientes y que la localización principal de estas células fue en el intersticio. Sin embargo, en las hembras que estuvieron en AE el número de neutrófilos infiltrantes es significativamente menor que en las provenientes de AC (Figura 32 B y C).

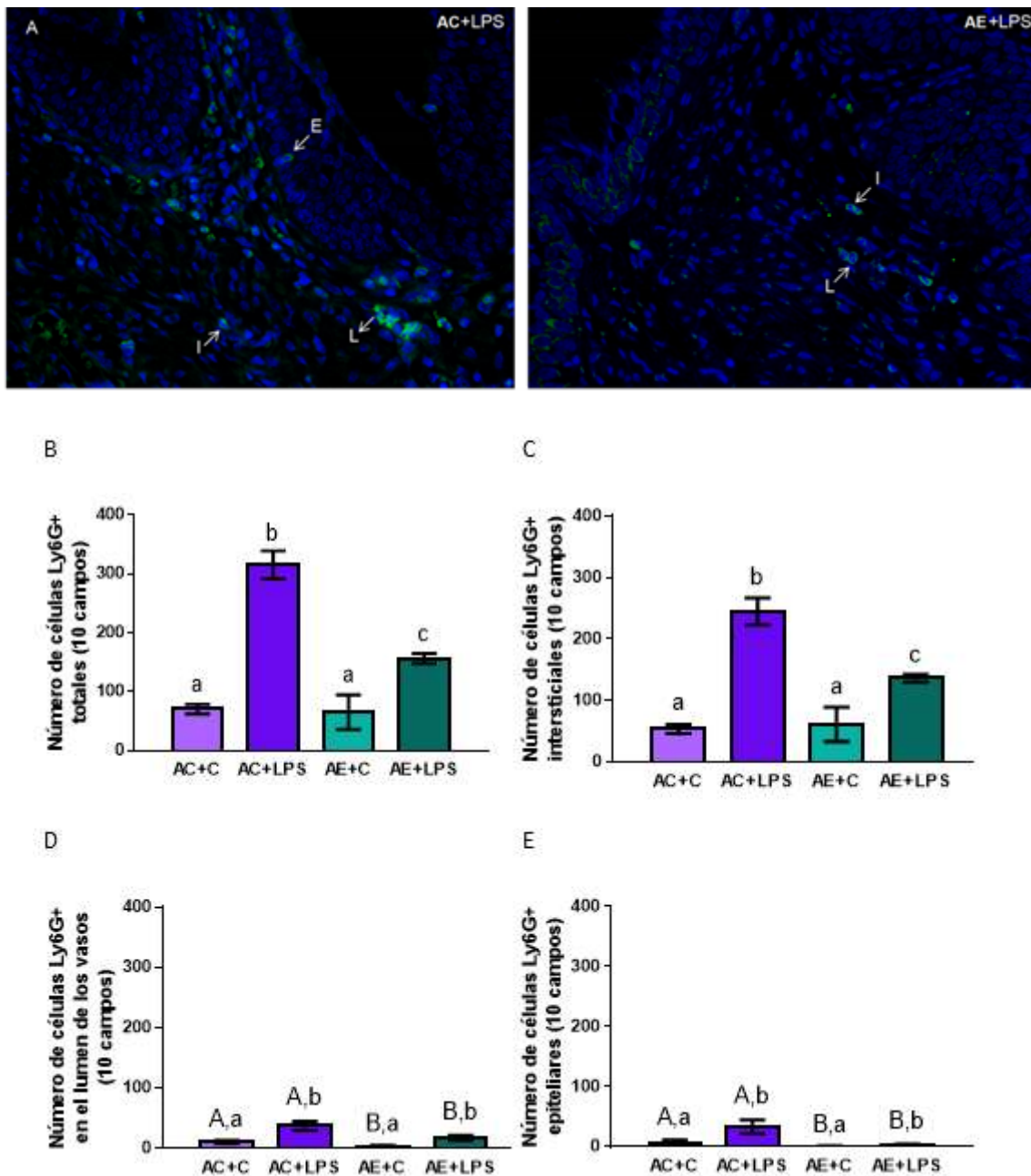


Figura 32: Análisis del Infiltrado de neutrófilos en el cérvix de hembras preñadas en día 15 de gestación luego de la administración de LPS (o SF). A) Fotos representativas de un campo. Las flechas blancas indican una célula Ly6G+ y la letra la ubicación: L=luminares, I=intersticiales, y E=epiteliales. Cuantificación de neutrófilos B) totales, C) intersticiales, D) luminares y E) epiteliales. Los valores representan la media \pm EE. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). En los paneles D y E las letras mayúsculas indican diferencias entre ambientes (AC y AE) y las minúsculas diferencias entre tratamientos (C y LPS). Se analizó mediante modelo lineal modelando la heterogeneidad de varianza. Test a posteriori DGC. N = 6.

Por último, decidimos medir la actividad gelatinasa de las metaloproteinasas (MMPs) 2 y 9 por zimografía, dado que se ha reportado que un aumento de la actividad de estas enzimas contribuye a la desorganización de la matriz extracelular del cérvix, necesaria para que ocurra el borrado cervical. Observamos que el LPS induce un aumento en la actividad de MMP9 en el grupo de AC, que no se observó en las hembras provenientes de AE (figura 33). La actividad de la MMP2 y de su forma inactiva pro-MMP2, no se encontraron moduladas.

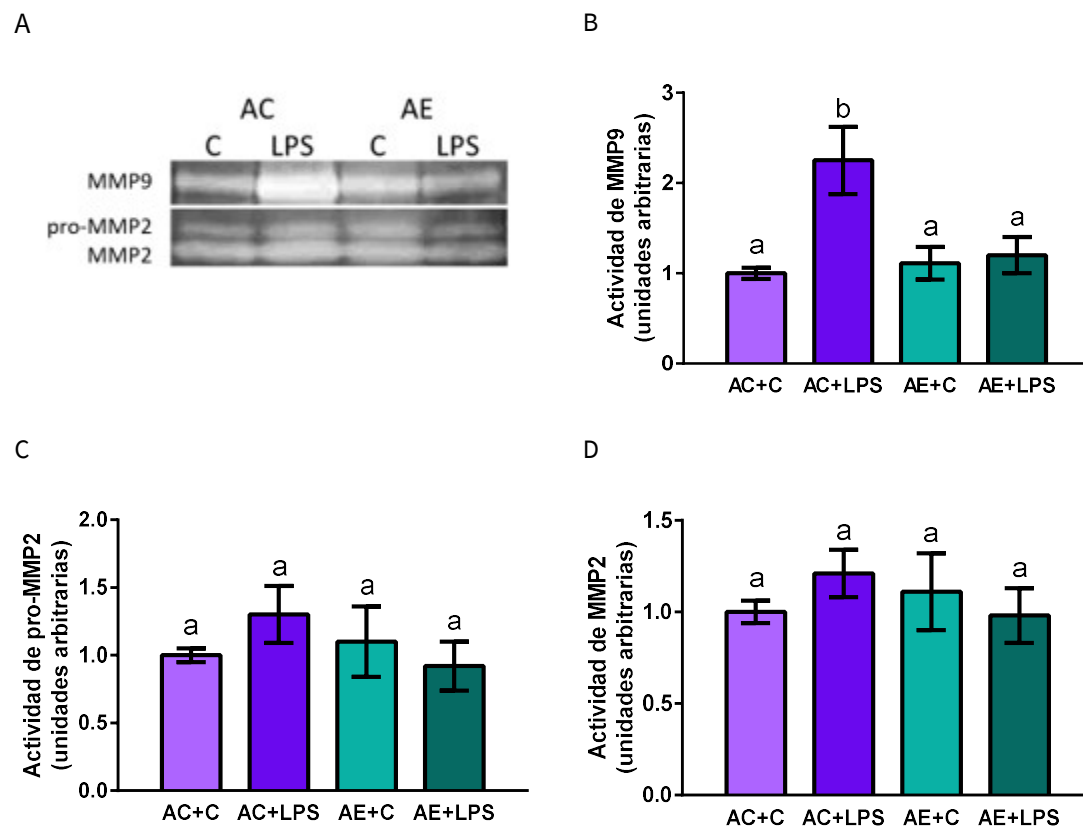


Figura 33: Actividad gelatinasa de las metaloproteinasas de matriz (MMPs) 9 y 2 en cérvix de hembras preñadas en día 15 de gestación luego de la administración de LPS (o SF). A) foto representativa del gel del zimograma. Cuantificación de la actividad de B) MMP9, C) pro-MMP2 y D) MMP2. Los valores representan la media \pm EE. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). ANOVA de dos factores, test de Tukey. N = 6.

15.5. Resumen del objetivo 2:

A modo de resumen de los resultados obtenidos en esta sección, se muestran en la figura 34 los mecanismos celulares y moleculares alterados en el útero y el cérvix de hembras expuesta a un AE o a un ambiente control ante el desafío inflamatorio inducido por la administración de LPS.

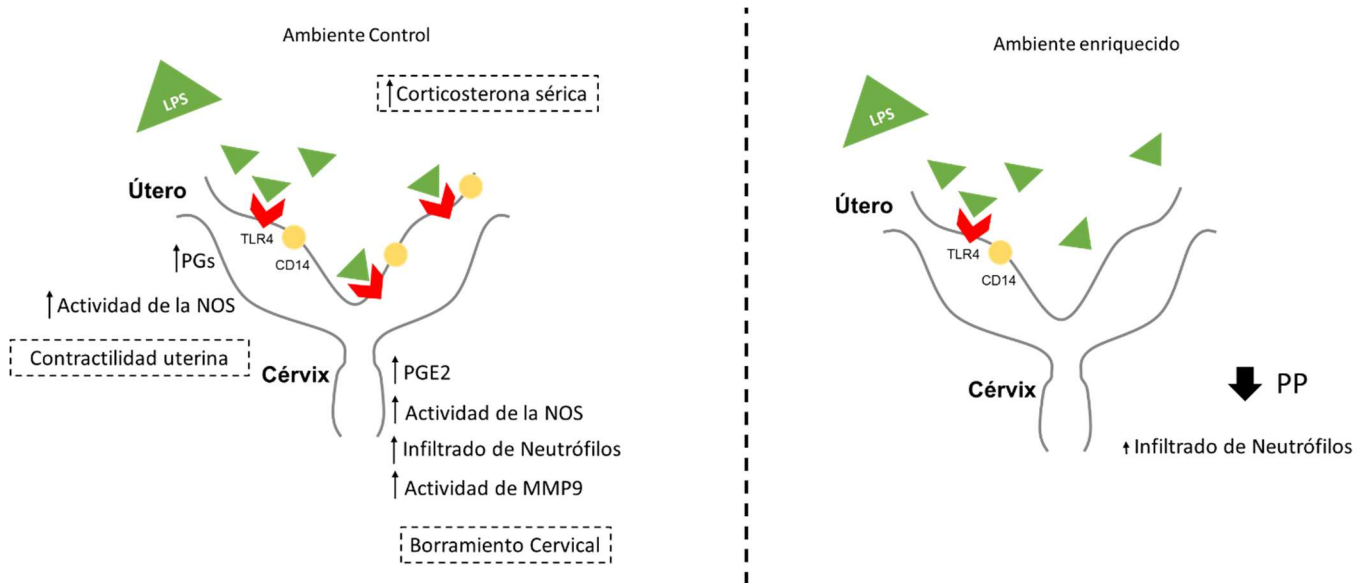


Figura 34: Resumen del objetivo 2.

16. Efecto del enriquecimiento ambiental materno y del desafío inflamatorio durante la gestación sobre la descendencia.

16.1. Efecto del enriquecimiento ambiental materno y el LPS sobre la unidad feto-placentaria en día 15 de gestación.

Como tercer objetivo quisimos evaluar si la exposición a un AE y/o el desafío inflamatorio inducido por la administración de LPS en el día 15 de gestación, tenían algún efecto sobre la descendencia.

Lo primero que nos propusimos estudiar fue la unidad feto-placentaria en el día 15 de gestación. Para ello, un grupo de madres fue tratada con LPS intraperitoneal y a las 8h de la primera dosis fueron sacrificadas para aislar las unidades feto-placentarias. En primer lugar, analizamos el peso de los fetos y de las placentas en día 15 de gestación. Además, calculamos la eficiencia placentaria (cociente entre el peso del feto y el peso de la placenta), como medida indirecta de la funcionalidad del órgano. Observamos que las placentas de fetos de madres provenientes de AE presentaron un tamaño significativamente menor que aquellas de fetos de madres provenientes de AC. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en el peso de los fetos, ni en la eficiencia placentaria (figura 35).

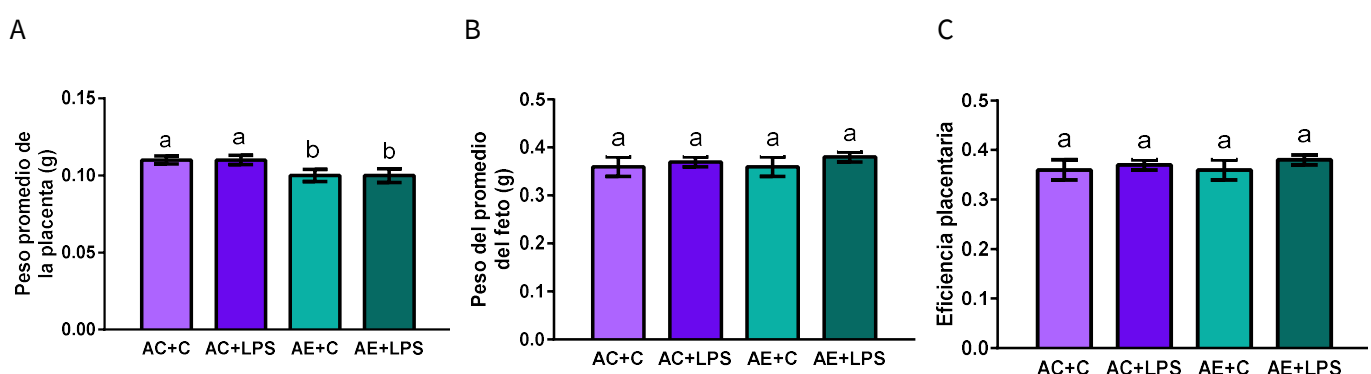


Figura 35: Peso de la placenta y el feto en día 15 de gestación. A) peso placentario B) peso fetal y C) Eficiencia placentaria (peso del feto/peso de la placenta). Se realizó un promedio del peso de los fetos y de las placentas por madre y luego se analizó estadísticamente. Los valores representan la media \pm EE. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). ANOVA de 2 factores, test de Tukey. N= 6-7 animales por grupo.

El líquido amniótico ejerce múltiples funciones durante la preñez, entre las que se encuentran funciones mecánicas como la de proteger a los fetos de las presiones externas, así como funciones inmunológicas. Es por eso que, partiendo de la hipótesis de que el AE podría estar modulando el sistema inmune de las hembras, decidimos analizar el líquido amniótico de las crías de madres provenientes de AC o de AE. Para todos los resultados de esta sección, la unidad experimental fue la madre ya que se aisló el líquido amniótico de todos sus fetos, se hizo un pool y se analizó como una única muestra. Las hembras fueron sacrificadas en el día 15 de gestación, a las 8h de haber administrado la primera dosis de LPS (o de vehículo). Se extrajo el líquido amniótico y se aislaron las células presentes para analizarlas por citometría de flujo. La fracción de líquido amniótico sin células se utilizó para analizar la presencia de citoquinas pro y antiinflamatorias.

En primer lugar, evaluamos los niveles de las citoquinas proinflamatorias interleuquina (IL) 6 y TNF α , y los niveles de la citoquina antiinflamatoria IL-10 por ELISA (figura 36). Observamos que el LPS indujo la producción de IL-6 en ambos grupos. Sin embargo, los niveles de IL-6 fueron 4 veces mayores en el líquido amniótico de hembras provenientes de AC en comparación con los niveles de las provenientes de AE. Por otro lado, observamos que las muestras de líquido amniótico de hembras provenientes de AE, presentaron niveles significativamente más altos de TNF α y de IL-10 en comparación con los niveles registrados en el líquido de las hembras provenientes de AC. Para estas dos citoquinas no observamos un efecto del LPS.

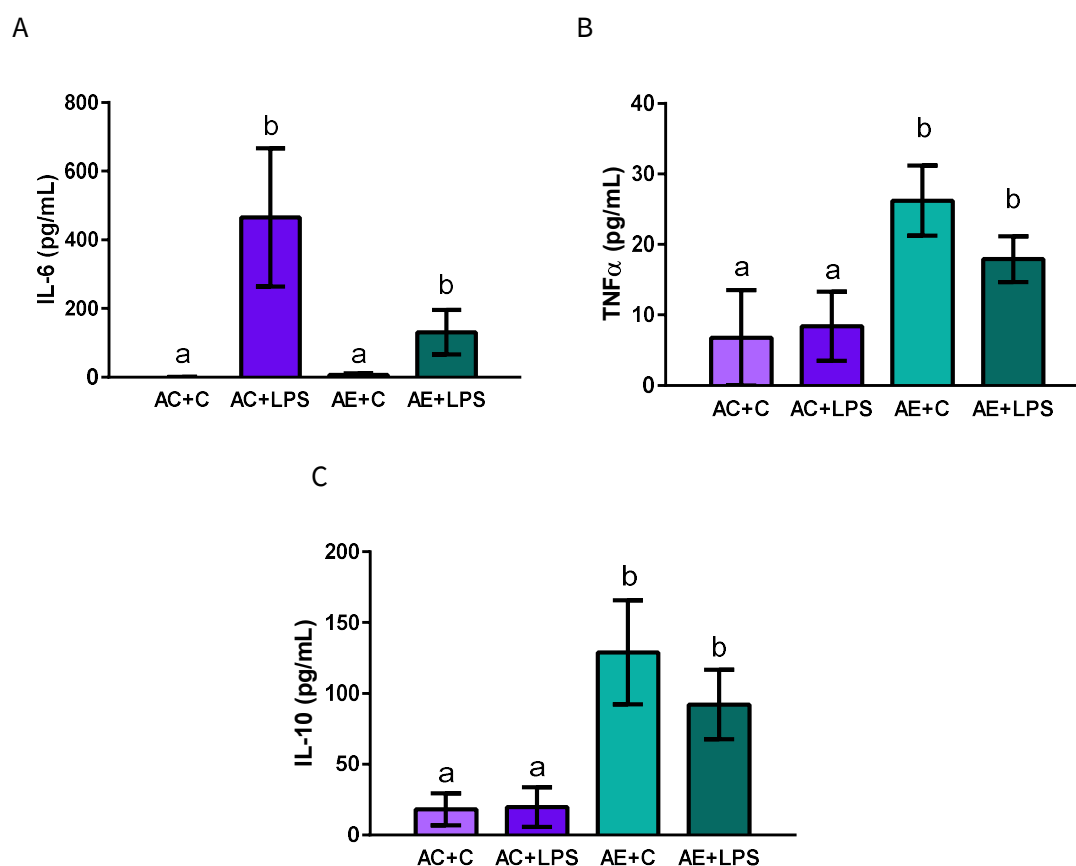


Figura 36: Niveles de citoquinas en el líquido amniótico de hembras preñadas en día 15 de gestación luego de la administración de LPS (o SF). Las muestras de líquido amniótico fueron obtenidas 8h luego de la primera dosis de LPS (o SF). Se muestran los niveles de (A) IL-6, (B) TNF α y (C) IL-10. Los valores representan la media \pm EE. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). ANOVA de 2 factores, test de Tukey. N= 4-6 animales por grupo.

La IL-22 es miembro de la familia de la IL-10 y es una citoquina que se produce frente a un estímulo inflamatorio, teniendo efectos antagónicos según el tejido en que se lo estudie. Recientemente se ha visto que la producción de IL-22 podía prevenir el PP y disminuir la muerte fetal inducida por la administración de LPS (Dambaeva *et al.*, 2018). Es por ello que decidimos analizar los niveles de IL-22 en el líquido amniótico de madres provenientes de AC o AE luego de la administración de LPS. Observamos que el LPS induce un aumento en la producción de IL-22 tanto en el líquido amniótico de madres provenientes de un ambiente control como enriquecido. Sin embargo, la producción de IL-22 en el grupo de AE en respuesta al estímulo con LPS fue 10 veces mayor en comparación con la del grupo AC (figura 37).

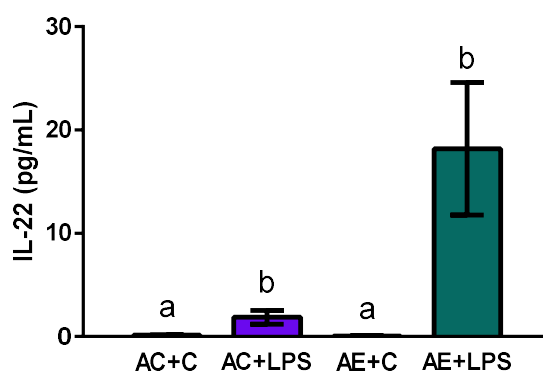


Figura 37: Niveles de IL-22 en el líquido amniótico de hembras preñadas en día 15 de gestación luego de la administración de LPS (o SF). Las muestras de líquido amniótico fueron obtenidas 8h luego de la primera dosis de LPS (o SF). Se determinaron los niveles de IL-22 por ELISA. Los valores representan la media \pm EE. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Análisis no paramétrico Kruskal-Wallis. N= 8 animales por grupo.

Por otro lado, la presencia de PGs en el líquido amniótico en mujeres ha sido asociada al desencadenamiento del PP con ruptura prematura de membranas. Además, se ha visto que la PGE2 tiene efectos inmunomoduladores y puede estimular la producción de IL-22 en diferentes tejidos (Duffin *et al.*, 2016). Por ello, decidimos medir los niveles de PGF2 α y PGE2 en el líquido amniótico. Observamos que el LPS induce un aumento de PGF2 α en ambos grupos, control y enriquecido. Sin embargo, la PGE2 solo aumenta en respuesta al estímulo con LPS en el grupo de AE (figura 38).

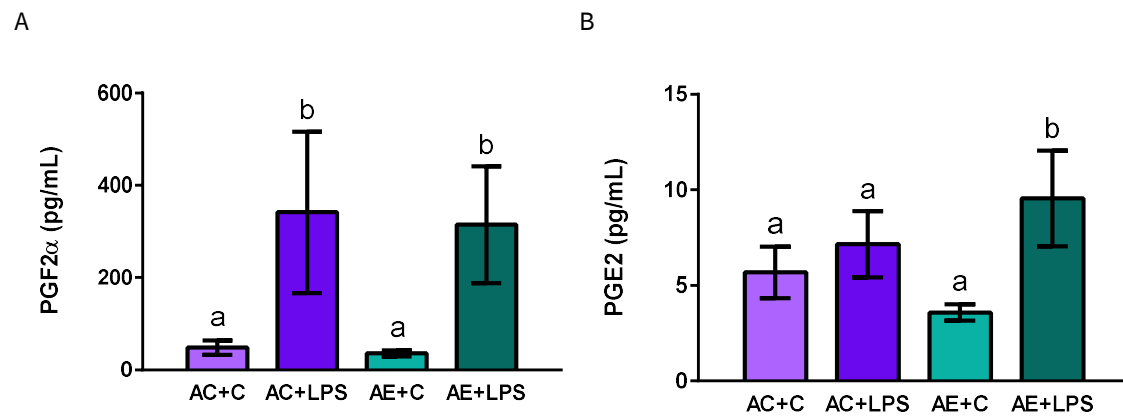


Figura 38: Niveles de (A) PGF2 α y (B) PGE2 en el líquido amniótico de hembras preñadas en día 15 de gestación luego de la administración de LPS (o SF). Las muestras de líquido amniótico fueron obtenidas 8h luego de la primera dosis de LPS (o SF). Los valores representan la media \pm EE. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). ANOVA de 2 factores, test de Tukey. N=6 animales en cada grupo.

Se ha descrito en el líquido amniótico la presencia diversos componentes de la inmunidad innata y adaptativa, tanto en humanos como en modelos animales. Además, se ha visto que estos componentes son diferentes en el líquido amniótico de mujeres con PP ya sea que este se haya desencadenado por un proceso inflamatorio asociado a una infección o no (Gomez-Lopez *et al.*, 2018).

Las células B, también han sido descritas en el líquido amniótico, y poco se sabe acerca de su fenotipo y rol durante la preñez. Decidimos analizar en primer lugar qué porcentaje de la población de los leucocitos totales (CD45+) presentes en el líquido amniótico, correspondía a células B (CD19+) en los diferentes grupos de estudio. Observamos que el líquido de madres provenientes de AE tenía un porcentaje mayor de células B en comparación con los provenientes de un AC. No vimos efecto del LPS sobre la población de células B (figura 39 B).

A continuación, quisimos evaluar si estas células B expresaban el marcador CD5, el cual es un marcador específico de células B1a. Estas células son parte del sistema inmune innato que se producen principalmente durante la vida fetal, lo que podría dar una idea del origen materno o fetal de las células B presentes en el líquido amniótico. Encontramos que solo un pequeño porcentaje de las células B del líquido amniótico expresaban el marcador CD5, mientras que

el mayor porcentaje eran CD5-, sin observar diferencias entre los grupos analizados (figura 39 C).

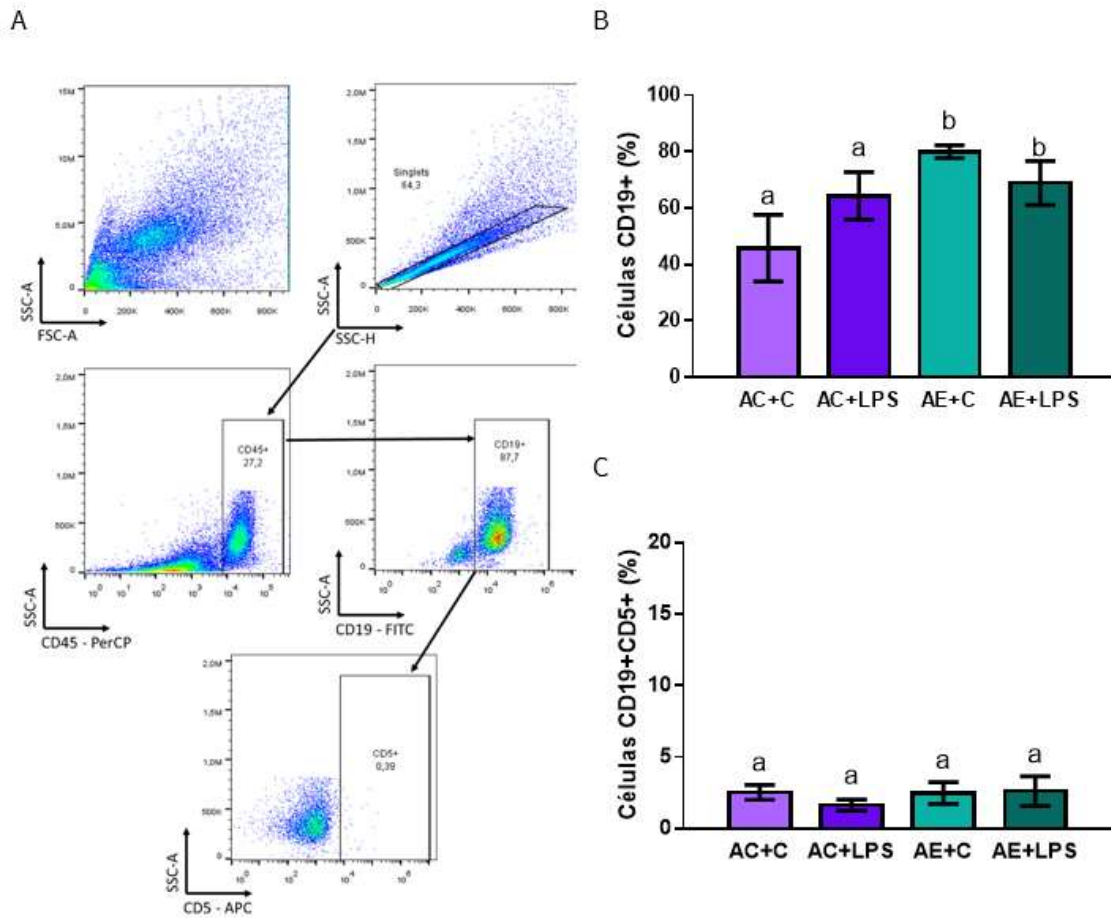


Figura 39: Porcentaje de células B en el líquido amniótico (CD19+). (A) Estrategia de selección de poblaciones. (B) Gráfico representativo del % de células CD19+. (C) Gráfico representativo del % de células CD19+CD5+. Las muestras de líquido amniótico fueron obtenidas 8h luego de la primera dosis de LPS (o SF). Los valores representan la media \pm EE. ANOVA de dos factores, test de Tukey. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). N = 6.

16.2. Efecto del enriquecimiento ambiental materno y del LPS sobre la descendencia durante la lactancia.

A continuación, quisimos evaluar si el enriquecimiento ambiental materno y el tratamiento con LPS en día 15 de gestación tenía algún efecto sobre la descendencia. Para ello, un grupo de animales expuestos a AC o a AE fueron tratados con LPS (o SF) en día 15 y se les permitió continuar con la gestación. El análisis de las crías, tanto durante la lactancia como durante la adultez, se realizó solamente con las crías de hembras que parieron a término (17,6% en AC,

y 50% en AE), dado que las crías que nacen prematuras nacen muertas o bien, no sobreviven a causa de su prematuridad.

Lo primero que analizamos fue el tamaño de la camada y la mortalidad perinatal. En la tabla 5 se puede observar que el tamaño de la camada fue similar entre los grupos (considerando crías vivas y muertas). Sin embargo, cuando analizamos la mortalidad perinatal, tanto el porcentaje de hembras que presentaron al menos una cría muerta, como el porcentaje de crías muertas dentro de la camada; fue mayor en el grupo proveniente de AC+LPS comparado al grupo AE+LPS.

Tabla 5: Comparación del tamaño de la camada, el porcentaje de madres que parieron al menos una cría muerta (incidencia de mortalidad) y el porcentaje de crías muertas dentro de la camada. El porcentaje de crías muertas incluye a las crías nacidas muertas y a las crías que nacieron vivas pero que murieron entre los días 1 y 7 postnatales.

	Tamaño de la camada	Incidencia de mortalidad (%)	Porcentaje promedio de crías muertas en la camada	n
AC + C	7±1	33,3	24,3	6
AC + LPS	7±1	66,7	78,1	6
AE + C	9±1	16,7	16,7	6
AE + LPS	8±1	20,0	16,7	5

Posteriormente analizamos el crecimiento de las crías, evaluando la ganancia en peso y el desarrollo de algunos parámetros de desarrollo físico durante la lactancia. No observamos diferencias en la ganancia en peso de las crías entre los 4 grupos (figura 40). Sin embargo, en el grupo AC+LPS el 50% de las madres presentó muerte perinatal de todas las crías luego del día 7 postnatal.

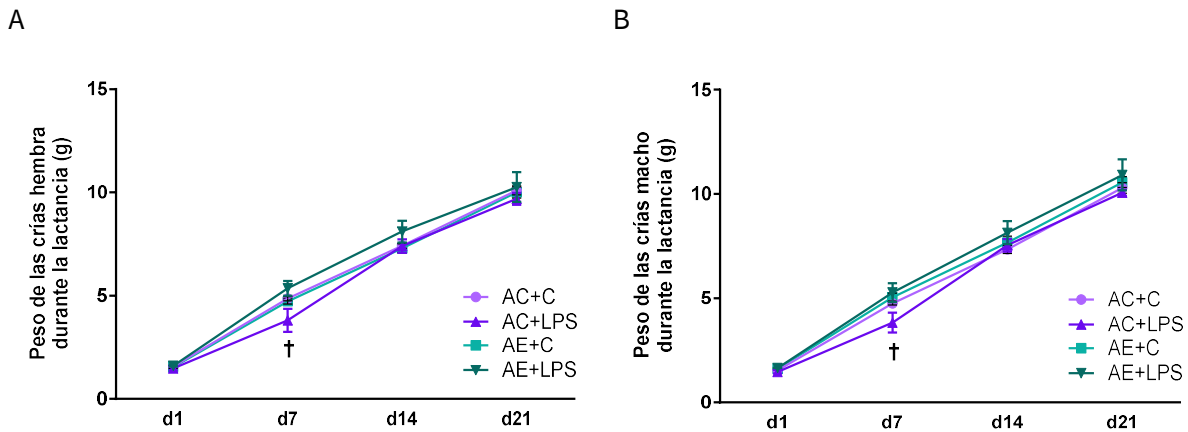


Figura 40: Peso de las crías durante la lactancia. (A) hembras y (B) machos. Los valores representan la media \pm EE. ANOVA de dos factores con medidas repetidas, test de Tukey. N = 6, d= día postnatal. † indica el 50% de muerte perinatal en el grupo tratado AC+LPS.

Ha sido informado que la exposición a un ambiente inflamatorio durante la vida intrauterina puede tener efectos nocivos sobre el desarrollo neurológico de la descendencia (Domínguez Rubio *et al.*, 2017; Shi *et al.*, 2019). Es por eso, que decidimos evaluar el día de separación del pabellón auricular, el día de erupción de los incisivos inferiores, y el día de apertura ocular, como parámetros de desarrollo de las crías durante la lactancia (Feria *et al.*, 2003).

En la figura 41 se puede observar que las crías de hembras provenientes de AC tratadas con vehículo no presentaron variabilidad para ninguno de los parámetros observados. Las crías de madres provenientes de AE, inyectadas con vehículo o tratadas con LPS, solo presentaron variabilidad en el día de erupción de los incisivos inferiores. Sin embargo, esta variabilidad no representa un retraso en la aparición de este parámetro.

En el grupo de madres proveniente de AC tratadas con LPS en d15 las crías provenientes de dos de las madres analizadas presentaron retrasos en todos los parámetros analizados. Si bien este grupo de crías presentó retrasos de dos días respecto a las crías de madres control inyectadas con vehículo, una vez que alcanzaron la instancia de desarrollo esperada, la apariencia general fue similar a la apariencia de las crías los controles. Esto indicaría un retraso en el desarrollo y no una incapacidad de desarrollo. Este efecto del LPS sobre las crías no se observó en el grupo proveniente de AE.

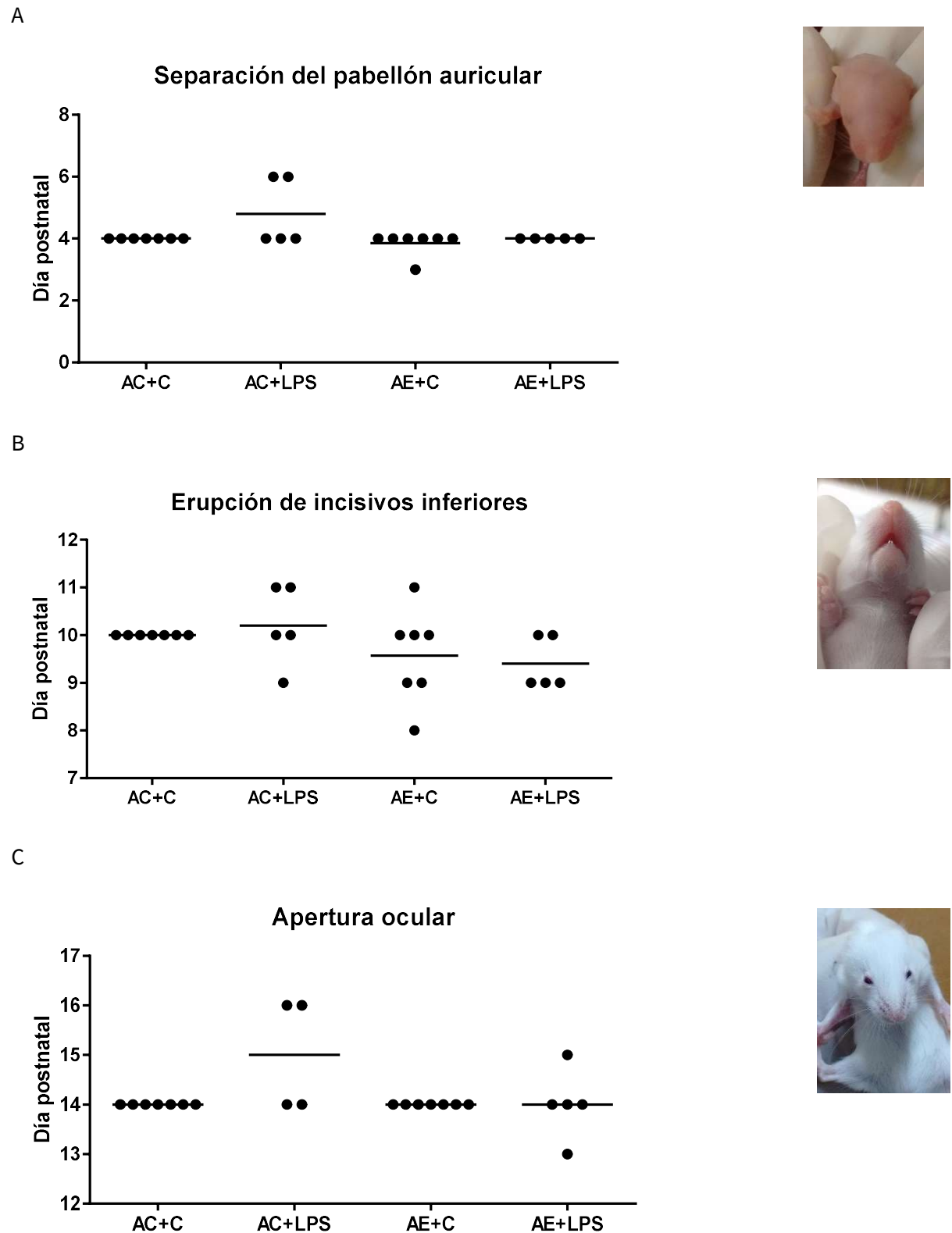


Figura 41: Parámetros de desarrollo de las crías durante la lactancia. Se muestran el día de (A) separación del pabellón auricular, (B) erupción de los incisivos inferiores y (C) apertura ocular. Se analizaron 2 crías al azar de la camada y se graficó la media por madre. Se muestra una foto representativa de cómo se determina la aparición de cada parámetro.

16.3. Análisis de la descendencia al llegar a la adultez.

Sabiendo que el ambiente intrauterino puede condicionar la predisposición a sufrir enfermedades en la vida adulta (Hipótesis de Barker), decidimos analizar si el enriquecimiento ambiental y/o la exposición a un desafío inflamatorio durante la vida intrauterina tenía efectos sobre el metabolismo de la descendencia adulta. Para ello, las crías de aquellas madres que parieron a término fueron alojadas en jaulas estándar de laboratorio luego del destete, hasta llegar a los 2 meses de edad.

Lo primero que analizamos fue el peso de las crías hembra y macho a los 2 meses de edad (figura 42 A y B). Además, calculamos la ganancia en peso desde el destete hasta la adultez (peso a los 2 meses – peso al destete) (figura 42 C y D). No observamos diferencias significativas en el peso a los 2 meses de edad en ningún caso. Tampoco observamos diferencias en la ganancia en peso.

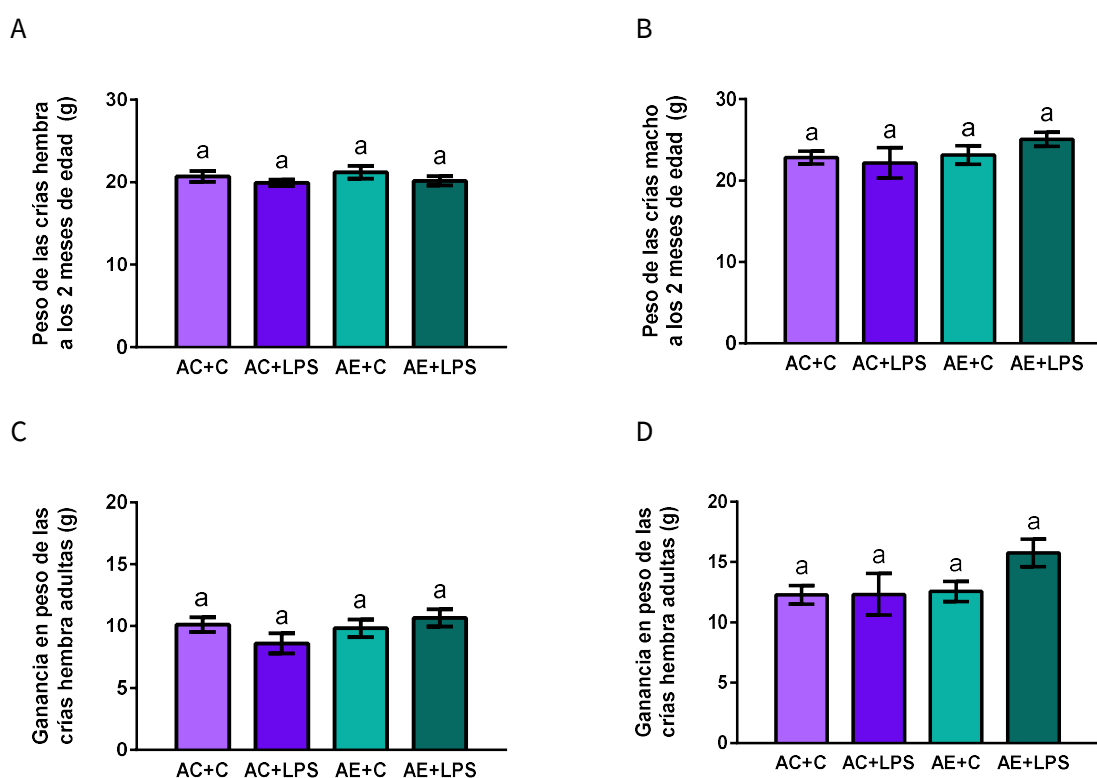


Figura 42: Peso de las crías al alcanzar la adultez. Se muestran el peso de las crías (A) hembra y (B) macho a los 2 meses de edad. Además, se muestra la ganancia en peso desde el destete hasta la adultez para las crías (C) hembra y (D) macho, calculada como la diferencia de peso entre ambos tiempos. Los valores representan la media \pm EE. Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). ANOVA de dos factores. N = 3-6 crías por grupo. Cada cría provino de una madre diferente.

A continuación, evaluamos los niveles de colesterol y triglicéridos en suero en las crías adultas (figura 43) y observamos que las crías macho, provenientes de madres tratadas con LPS, tenían ambos parámetros elevados en comparación con los controles. No observamos diferencias entre los grupos de AC y AE.

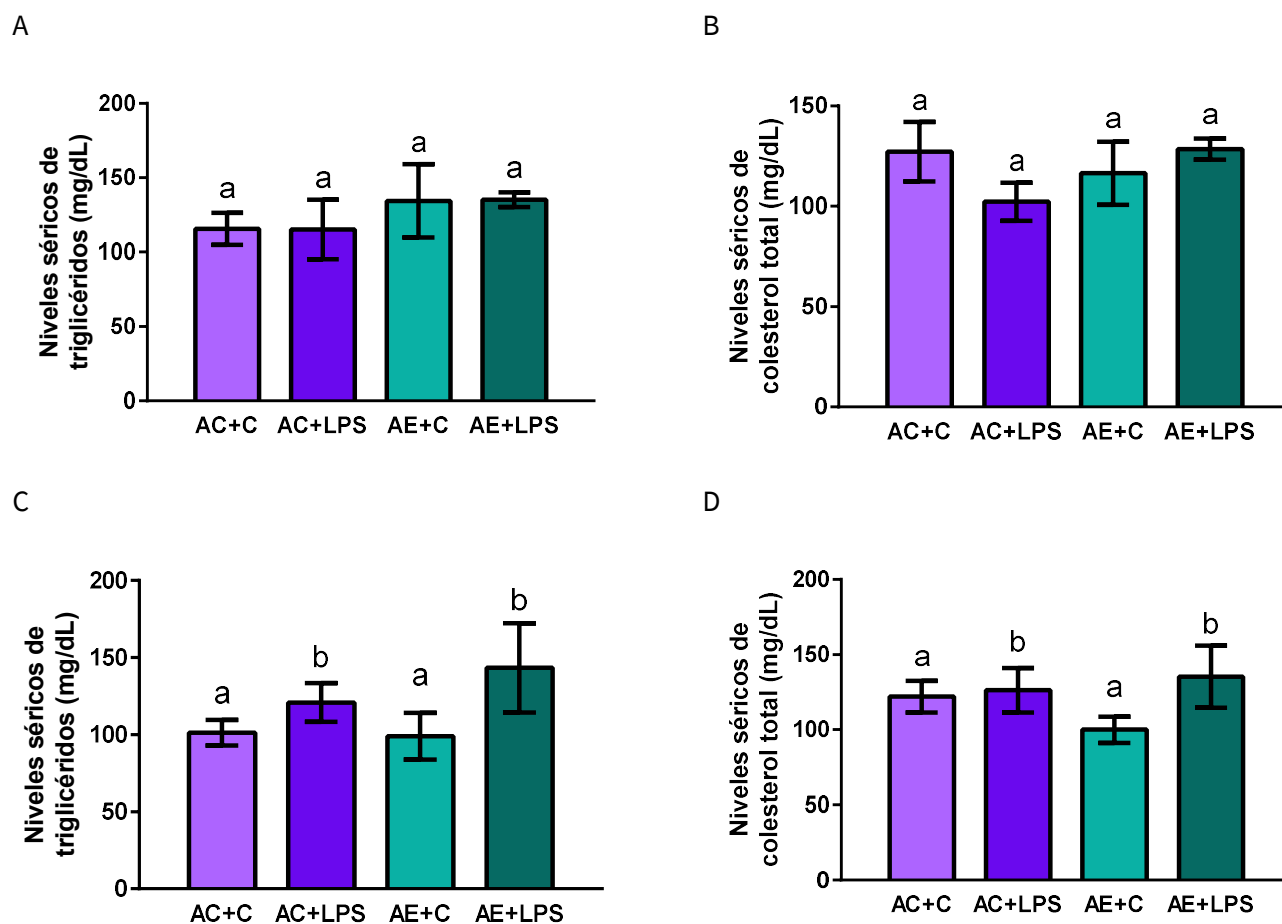


Figura 43: Niveles séricos de triglicéridos y colesterol total en las crías adultas de madres provenientes de AE o AC tratadas con LPS o vehículo. (A) y (B) corresponden a las mediciones de triglicéridos y colesterol séricos, respectivamente, en crías hembra y (C) y (D) en crías macho. Las mediciones fueron realizadas luego de 8h de ayuno. Los valores representan la media \pm EE. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). ANOVA de 2 factores, Test de Tukey. N= 4 animales por grupo en paneles A y B y N= 5-7 animales por grupo en paneles C y D.

Por último, pesamos los depósitos de tejido adiposo en las crías de 2 meses de edad, diferencialmente según el sexo. Para las hembras, analizamos el depósito abdominal, el gonadal y el retroperitoneal (figura 44). Para los machos, analizamos los depósitos gonadal-

abdominal y retroperitoneal (figura 45). Las crías hembra no presentaron diferencias significativas en el peso de los 3 depósitos de tejido adiposo para ningún grupo experimental. Sin embargo, las crías macho nacidas de madres que habían sido alojadas en AE, presentaron menos grasa en todos los depósitos analizados, en comparación con las crías macho de madres provenientes de AC. No vimos en ninguno de los casos, un efecto del LPS sobre el peso de los depósitos de tejido adiposo.

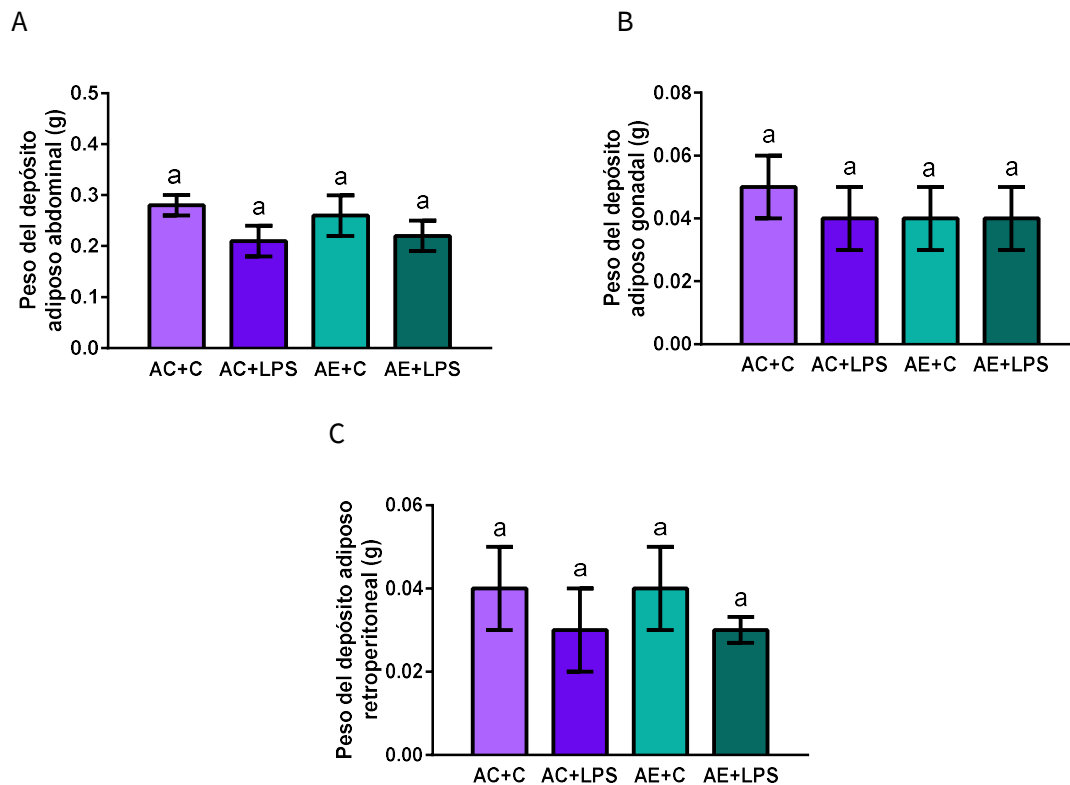


Figura 44: Peso de los depósitos de tejido adiposo de las crías hembra a los 2 meses de edad. A) Grasa abdominal, (B) grasa gonadal y C) grasa retroperitoneal. Los valores representan la media \pm EE. Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). ANOVA de 2 factores. N= 4-6 animales por grupo.

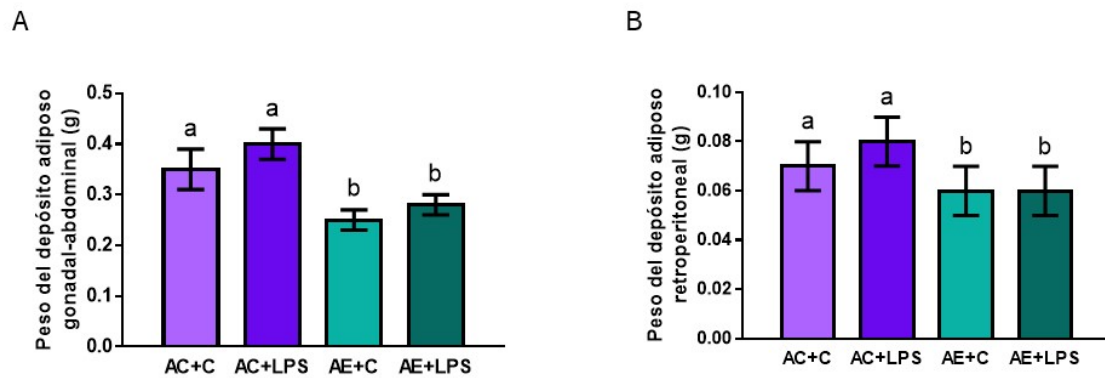


Figura 45: Peso de los depósitos de tejido adiposo de las crías macho a los 2 meses de edad. A) Grasa abdominal-gonadal y B) grasa retroperitoneal. Los valores representan la media \pm EE. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). ANOVA de 2 factores, test de Tukey. N= 4-6 animales por grupo.

16.4. Resumen del objetivo 3:

A modo de resumen de los resultados obtenidos en esta sección, se muestran en la figura 46 los mecanismos celulares y moleculares alterados en líquido amniótico de los fetos de hembras expuesta a AE o a un AC y la respuesta diferencial ante el desafío inflamatorio inducido por la administración de LPS. Estos cambios podrían estar asociados a la protección de los fetos que se observa en aquellas madres expuestas a AE.

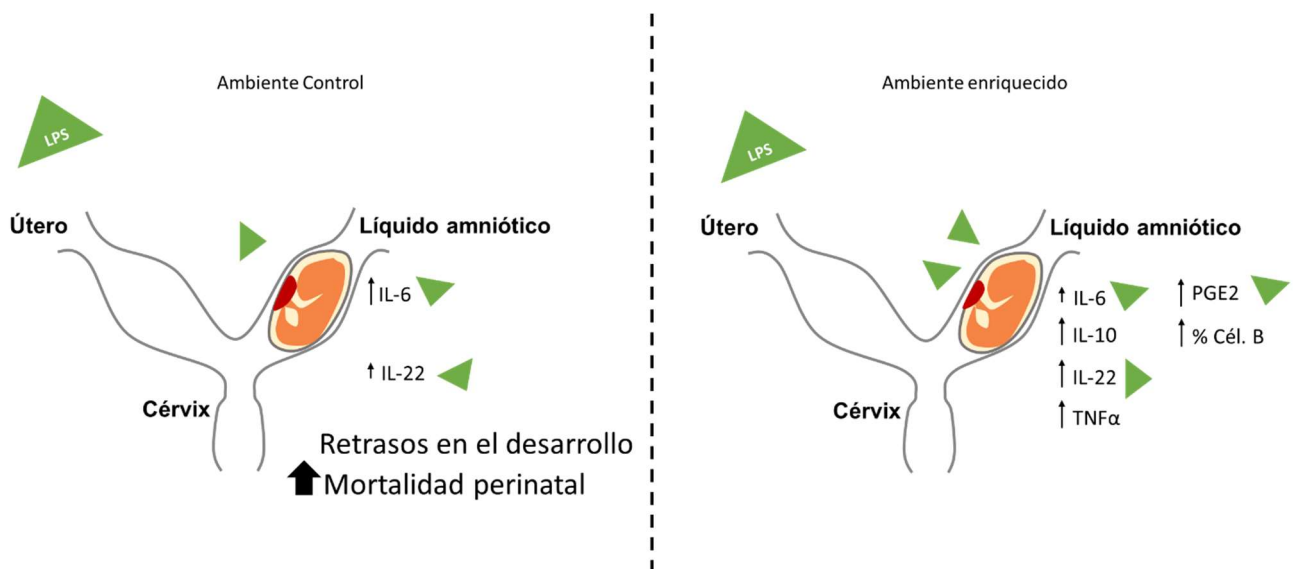


Figura 46: Resumen del objetivo 3.

17. Efecto del enriquecimiento ambiental materno solamente durante la gestación.

En último lugar, debido a que en humanos las intervenciones preconcepcionales suelen ser más escasas y además más difíciles de planificar, decidimos evaluar si realizar una intervención de enriquecimiento ambiental materno solo durante la gestación podría tener también efectos beneficiosos en la preñez y la salud de la descendencia. Para ello, hembras provenientes de un AC fueron puestas en apareo con machos de la misma cepa y en el momento de la aparición del tapón mucoso (día 0 de gestación) ingresaron al protocolo de enriquecimiento ambiental. A este grupo lo llamamos AE durante la preñez.

Lo primero que evaluamos fue el porcentaje de preñez (calculado como el % de hembras preñadas respecto a las que presentaron tapón) en las hembras provenientes de AC y de AE durante la preñez. No observamos diferencias significativas en el porcentaje de hembras preñadas entre ambos grupos (Tabla 6).

Tabla 6: Porcentaje de preñez en d15, de las hembras que estuvieron en apareo y presentaron tapón mucoso. Las hembras fueron expuestas a AE durante la preñez o a AC. Se presentan los datos como la media \pm el error estándar (EE) y como la mediana más el rango intercuartil (IQR). Para el análisis estadístico se utilizaron las medianas. Se realizó el análisis no paramétrico Kruskal-Wallis.

	Media \pm EE	Mediana (IQR)	N
AC	46,30 \pm 4,84	50,0 (36,7-52,2)	69
AE durante la preñez	54,05 \pm 15,45	41,45 (33,3-42,9)	33

Luego, las hembras expuestas a AE durante la preñez, que efectivamente quedaron preñadas fueron tratadas en el d15 con LPS. El protocolo (dosis y tiempos de administración) fue el mismo que el utilizado en la segunda sección de esta tesis. Como control, se utilizaron las mismas hembras AC que se muestran en la sección 2 de este apartado. Comparamos la tasa de PP y la mortalidad perinatal. Encontramos que el enriquecimiento ambiental materno durante la gestación parece tener un efecto en la disminución de la tasa de PP (Figura 47). Sin embargo, la diferencia no resultó estadísticamente significativa.

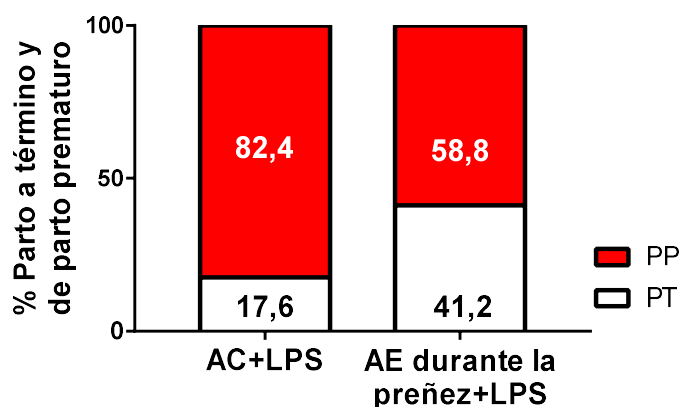


Figura 47: Porcentaje de hembras que tuvieron parto prematuro (PP) y parto a término (PT) luego de la administración de LPS en el día 15 de gestación. Se muestran los resultados para las hembras alojadas en AC y en AE durante la preñez. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los % de PP ($p>0,05$). Test de Chi-cuadrado. N=17 animales por grupo.

En último lugar, evaluamos la tasa de mortalidad perinatal en aquellas hembras que parieron a término (Tabla 7). Encontramos que el AE durante la preñez no protegió a las crías y que las tasas de mortalidad son similares a las de las madres provenientes de AC.

Tabla 7: Comparación de la mortalidad perinatal en hembras expuestas a AE durante la preñez o a AC.

Se evaluó la mortalidad de las crías en las hembras que parieron a término luego de la administración de LPS. Se muestra el porcentaje de madres que parieron al menos una cría muerta (incidencia de mortalidad) y el porcentaje de crías muertas dentro de la camada.

	Incidencia de mortalidad (%)	Porcentaje promedio de crías muertas por camada	N
AC + LPS	66,7	78,1	6
AE durante la preñez + LPS	71,4	61,4	7

Discusión.

El PP representa un gran problema para los sistemas de salud a nivel mundial, dado que haber nacido antes de término es la principal causa de mortalidad en niños y niñas menores de 5 años. Por otra parte, los bebés prematuros que sobreviven tienen mayores posibilidades de sufrir algún tipo de discapacidad de por vida, en particular aquellas relacionadas con el aprendizaje, así como problemas visuales y auditivos. Durante el año 2017 en nuestro país, la tasa de PP fue cercana al 9%, representando un aumento del 19,1% respecto a los 10 años precedentes. Además, durante ese periodo las defunciones neonatales de bebés nacidos pretérmino crecieron un 16,5%. La búsqueda de nuevas estrategias para prevenir el parto pretérmino y las secuelas en los neonatos es crucial para disminuir los costos económicos y sociales de este síndrome.

Los efectos positivos de la exposición a un AE sobre la morfología, la química y la función del cerebro en condiciones fisiológicas y patológicas han sido ampliamente estudiadas [Revisado por Sale y col. (2014)]. Sin embargo, no se ha estudiado si una estrategia similar podría ser beneficiosa en los tejidos reproductivos y en sus procesos fisiopatológicos.

El objetivo principal de este trabajo fue diseñar un protocolo de enriquecimiento ambiental y poner a prueba sus posibles efectos durante la gestación. Utilizando un modelo murino de PP inducido por un proceso inflamatorio, demostramos que la exposición a un AE (definido como un conjunto de estímulos no invasivos y biológicamente significativos de la vía sensorial y motora) previene el desencadenamiento del PP y tiene efectos beneficiosos sobre la salud de las crías. Este modelo de PP inducido por la administración sistémica de LPS (Cella *y col.*, 2010; Domínguez Rubio *y col.*, 2014; Bariani *y col.*, 2017) induce un ambiente proinflamatorio en el útero e imita los aspectos principales del PP inducido por infección en humanos. En líneas generales, este trabajo aporta evidencia sobre el efecto antiinflamatorio que tiene el enriquecimiento ambiental, modulando no solo la fisiología materna, sino también la respuesta inmune materna frente al desafío inflamatorio. Asimismo observamos un efecto protector del enriquecimiento ambiental materno sobre la salud de la descendencia, disminuyendo la mortalidad perinatal inducida por la administración de LPS y algunos de los efectos nocivos de la exposición al ambiente inflamatorio intrauterino durante la lactancia.

El AE induce cambios metabólicos en las hembras, entre los que encontramos niveles reducidos de colesterol y triglicéridos en sangre durante la gestación y menor ganancia de peso durante las seis semanas previas al apareo. Si bien el enriquecimiento ambiental combina una serie de estímulos, uno de los componentes principales es el aumento de la actividad física voluntaria, factor importante en la salud de todos los individuos. De hecho, se recomienda practicar ejercicio físico habitualmente en todos los momentos de la vida, incluso durante la gestación. La práctica de ejercicio está asociada a un aumento de la ingesta calórica y a la disminución del tejido adiposo (Slater y Cao, 2015; Neal *y col.*, 2017). Si bien no evaluamos los depósitos adiposos en hembras vírgenes, sí comprobamos que el enriquecimiento ambiental tiene efectos sobre la regulación de la adipogénesis, lo que podría reflejarse en un menor peso corporal. En concordancia con estas observaciones, Slater y Cao (2015) demostraron que ratones machos expuestos a AE tenían menor cantidad de tejido adiposo en todos los compartimentos analizados. Al quedar preñadas, el peso corporal de las madres provenientes de AE y AC se equiparó, debido, al menos en parte, al mayor desarrollo de tejido adiposo en las hembras de AE. El aumento de lipogénesis materna es una respuesta adaptativa importante durante la gestación y se corresponde con los requerimientos energéticos del feto (Straughen *y col.*, 2013). Knopp y colaboradores (1972) estudiaron la adipogénesis durante la gestación en ratas y observaron que la hiperfagia materna y la hiperinsulinemia son eventos característicos durante la segunda parte de la gestación. Dentro de este período identificaron dos fases metabólicas distintas. Inicialmente, cuando las necesidades energéticas placentaria y fetales son bajas (día 12 de gestación), el almacenamiento de grasa aumenta debido a una mayor conversión de glucosa en triglicéridos de tejido adiposo, ácidos grasos y una disminución de la liberación de ácidos grasos libres. Después del día 12 hasta el momento del parto, la efectividad de la insulina disminuye, así como la formación de ácidos grasos a partir de glucosa en el tejido adiposo y las reservas de grasa materna se movilizan cada vez más como ácidos grasos libres. Estos eventos están estrechamente sincronizados con el crecimiento de la unidad feto-placentaria. En concordancia con esto, las hembras provenientes de AE en día 15 de gestación, tenían más tejido adiposo y niveles más bajos de colesterol y triglicéridos en comparación con las AC. Por otro lado, no encontramos diferencias ni en la glucemia ni en la respuesta al test de tolerancia oral a la glucosa entre grupos. Si bien se necesita ahondar más en el metabolismo materno durante la gestación, la exposición de las hembras a un AE modula la adipogénesis, sin producir cambios en la glucemia. Más estudios se necesitan para evaluar si esto podría ser beneficioso para el crecimiento fetal y placentario.

Los efectos beneficiosos de la exposición a un AE en nuestro modelo de PP inducido por un proceso inflamatorio parecen estar mediados por una modulación de la respuesta inmune. Del mismo modo, Aranda y col. (2019) demostraron que el alojamiento de ratas en un AE previno el daño del nervio óptico inducido por LPS al reducir la expresión de proteínas de NOSi y COX-2, así como la expresión de ARNm de *Il-1 β* y *Tnf α* en un modelo de neuritis óptica experimental. En concordancia con estos resultados, Williamson y coautores (2012) demostraron que la expresión de ARNm hipocampal de *Ccl2*, *Ccl3*, *Cxcl2*, *Tnf α* e *Il-1 β* , luego de la administración de LPS, era significativamente menor en ratas alojadas en AE en comparación con animales control. Estos reportes, junto con nuestros resultados, sugieren que el enriquecimiento ambiental ejerce efectos antiinflamatorios y contribuye a un estado inmunoprotector. Aunque los mecanismos exactos por los cuales el AE protege contra la inflamación inducida por endotoxinas aún no se han explorado por completo, nosotros proporcionamos evidencia de que la disminución de la expresión de los receptores de unión a LPS, TLR4 y CD14 en el útero, podría explicar al menos parcialmente este efecto. Siguiendo en esta línea, Brod y col. (2017) demostraron que los ratones expuestos a AE tenían una mejor capacidad de eliminar la infección microbiana sistémica en un modelo de sepsis por ligadura y punción cecal. De manera comparable, se demostró que los macrófagos peritoneales obtenidos de ratones provenientes de AE mostraron una mayor actividad fagocítica y producción de quimioquinas in vitro (Otaki y col., 2018).

El desencadenamiento del PP es un proceso inflamatorio que involucra la síntesis de PGs y NO en el útero y el cérvix, entre otros mediadores. En nuestro modelo, observamos que el LPS induce un aumento de la expresión proteica de la COX-2 y de la NOSi en útero y cérvix, y que la exposición a AE no tiene efecto sobre esta inducción. Sin embargo, el enriquecimiento ambiental materno previno el aumento en la producción de PGs así como el aumento de la actividad de las NOS, luego de la administración de la endotoxina en ambos tejidos. Aunque estos resultados son aparentemente contradictorios, los niveles proteicos de las enzimas no siempre se corresponden con su efecto biológico. De hecho, la evidencia sugiere que, si bien el LPS aumenta los niveles proteicos de ambas enzimas, su actividad está disminuida en ratones expuestos a AE y esto se relaciona con la prevención del PP, dado que ambos sistemas están relacionados con el inicio de la contractilidad uterina y del remodelado cervical.

En el útero, observamos que los niveles basales de PGF2 α y PGE2 de hembras provenientes de AE se hallaban aumentados en comparación con los de ratones control (AC+C). Sin embargo, este aumento no se asocia al desencadenamiento de la contractilidad uterina, dado que no hay PP en el grupo AE+C. Esto sugiere, que en el grupo de animales alojados en AE, estos niveles de PGs son fisiológicos y mantienen el útero quiescente. Además, la actividad de la NOS está elevada en el grupo proveniente de AE en comparación con el grupo AC+C, sin presentar inducción luego de la administración de LPS. En concordancia con esto, se ha demostrado que niveles elevados de NO durante la gestación se asocian al mantenimiento de la quiescencia uterina en la preñez normal (Izumi y Garfield, 1995; Farina *y col.*, 2000; Cella *y col.*, 2010). Además, resultados previos de nuestro laboratorio muestran que existe una interacción entre las vías del NO y de las PGs en un modelo murino de reabsorción embrionaria inducida por LPS (Aisemberg *y col.*, 2007). En este trabajo, Aisemberg *y col.* demostraron que un dador de NO aumentó los niveles uterinos y deciduales de PGE2 y PGF2 α . Por otro lado, los inhibidores selectivos de la COX-2 inhibieron el aumento de la actividad de la NOS inducida por LPS en el útero. Además, el tratamiento con un inhibidor selectivo de la NOSi moduló los niveles basales de PGs en el útero y la decidua. Como mencionamos previamente, la actividad de la NOS estaba disminuida en el útero de ratones provenientes de AE en comparación con las AC luego de la administración de LPS. El hecho de que esta vía interactúe con la vía de producción de PGs podría explicar que no se induzca el aumento de la síntesis de PGs uterinas luego de la administración de la endotoxina, a pesar de que sí haya un aumento en la expresión proteica uterina de COX-2. Observamos resultados similares en el cérvix, donde la producción de PGE2 y la actividad de la NOS estaban disminuidas en el grupo proveniente de AE en comparación con las AC luego del tratamiento con LPS. Se ha demostrado que otra enzima importante en el remodelado cervical es la enzima que degrada PGs, la 15-PGDH (Törnblom *y col.*, 2004; Kishore *y col.*, 2017). De hecho, Kishore *y coautores* (2017) demostraron que la disminución de los niveles de la 15-PGDH es crucial para inducir el PP en un modelo murino. En este modelo, la sola administración de PGE2 no alteró la duración de la gestación, sin embargo, al combinarlo con un inhibidor de la 15-PGDH, los animales presentaron PP con muerte fetal. Al no tener información sobre la 15-PGDH en nuestro modelo, no podemos descartar que el enriquecimiento ambiental tenga efectos sobre la expresión de esta enzima y que eso se vea reflejado en los niveles de PGs que observamos.

Teniendo en cuenta estos resultados, proponemos que la exposición a un AE tiene efectos sobre las vías de producción de NO y PGs, modulando los niveles basales de PG en el útero y en el cérvix, evitando el aumento de la actividad NOS y de la síntesis de PGs inducido por LPS.

La regulación temporal y el correcto remodelado cervical son esenciales para evitar el paso prematuro del feto a través del canal de parto. La inflamación durante la gestación ha sido relacionada con el PP debido a que induce el ablandamiento y la maduración cervical prematura. En un modelo murino de inflamación inducida por LPS, se ha demostrado que la maduración cervical prematura se asocia con una afluencia de neutrófilos en el cuello uterino, una mayor expresión de la COX-2 y un aumento en la producción de PGE2 (Holt y col., 2011; Timmons y col., 2014). Además, se ha demostrado que la activación del sistema de complemento inducida por la presencia de endotoxinas aumenta la expresión y actividad de MMP-9 (Gonzalez y col., 2011a), lo que conduce a un aumento de la distensibilidad tisular del cuello uterino. De acuerdo con estas observaciones, nuestros resultados mostraron que la inflamación materna inducida por LPS se asocia con una mayor expresión cervical de COX-2 y mayor síntesis de PGE2. También observamos un aumento de la expresión de NOSi cervical inducida por la administración de la endotoxina, de acuerdo con informes anteriores sobre la participación de este mediador proinflamatorio en el PP (Törnblom y col., 2005; Nold y col., 2018). La exposición a AE previno los efectos de LPS sobre la producción cervical de PGE2 contribuyendo así a la prevención del ablandamiento cervical patológico y el PP. Además, observamos que la exposición a un AE previno la inducción de la actividad de la NOS cervical inducida por el LPS. Aunque los mecanismos moleculares por los cuales el NO contribuye a la maduración cervical siguen sin dilucidarse, se cree que, dado que es un potente agente vasodilatador, podría favorecer la invasión de macrófagos y neutrófilos en el cérvix. A su vez, contribuiría a la posterior producción de mediadores inflamatorios y la activación de metaloproteasas, involucradas en la degradación de la matriz extracelular, por parte de estas células (Gonzalez y col., 2011a, b). En este sentido, se ha demostrado que la maduración cervical mediada por LPS está asociada con un aumento de la quimiotaxis de neutrófilos (Holt y col., 2011; Nallasamy y col., 2018). De acuerdo con estos informes, encontramos que los niveles de ARNm de diferentes quemoquinas aumentaron en el cérvix de ratones hembra preñados luego de ser tratadas con LPS. Esto se vio reflejado en un mayor infiltrado de neutrófilos que se evitó parcialmente en el grupo expuesto a AE. Aunque el efecto de LPS en la expresión de ARNm fue similar en los grupos AC y AE, no sabemos cómo fue la expresión proteica de estas quemoquinas y su efecto biológico. Sin embargo, sí observamos una

disminución del reclutamiento de neutrófilos en el grupo AE-LPS en comparación con el grupo AC-LPS. Si bien se sabe que el reclutamiento de neutrófilos al cérvix precede al desencadenamiento del parto en modelos inflamatorios (Holt *y col.*, 2011), el significado biológico final del reclutamiento de estas células al cérvix no ha sido aún dilucidado, ya que la depleción de neutrófilos en ratones no previene el PP inducido por LPS (Timmons y Mahendroo, 2006; Rinaldi *y col.*, 2014; Filipovich *y col.*, 2015).

Otro evento importante en el remodelado cervical es la degradación de la matriz extracelular (MEC) mediada por MMPs. Particularmente, se ha demostrado que la MMP-9 está involucrada en el remodelado cervical prematuro en ratones tratados con LPS (Gonzalez *y col.*, 2011a). Esta enzima digiere no solo la gelatina sino también el colágeno I, III y IV (Bigg *y col.*, 2007), principales componentes de la MEC. En concordancia con estas observaciones, observamos que LPS indujo un aumento en la actividad cervical de MMP-9 en el grupo AC. Sin embargo, esto no se observó en el proveniente de AE sugiriendo que el enriquecimiento ambiental materno contribuye al mantenimiento de la estructura de la MEC.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que la exposición a AE previene los efectos nocivos de LPS en la función cervical, contribuyendo a la prevención del desencadenamiento del PP inducido por la administración sistémica de la endotoxina.

La mayoría de los estudios sobre AE y estrés prenatal se han centrado en la prevención del impacto negativo en el desarrollo del cerebro fetal y los efectos sobre la descendencia (Charil *y col.*, 2010; Sale *y col.*, 2014). Sin embargo, se ha prestado poca atención a los efectos del enriquecimiento ambiental sobre el resultado de la preñez y la salud materna. Nuestros resultados sugieren que la exposición, preconcepcional y durante la gestación, a un entorno enriquecido tiene efectos beneficiosos sobre el bienestar y el metabolismo materno durante la preñez. Además de modular algunos de los aspectos metabólicos de la fisiología materna discutidos previamente, la exposición a un AE previno el aumento de los niveles séricos de corticosterona inducido por la administración de LPS. Numerosa evidencia demuestra que la administración de LPS da como resultado la activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA), lo que resulta en un aumento de los niveles sanguíneos de glucocorticoides suprarrenales (Beishuizen y Thijs, 2003; Vakharia y Hinson, 2005; Mohn *y col.*, 2011). A su vez, los estresores psiconeuroinmunológicos y/o niveles elevados de ansiedad han asociado con la activación crónica del eje HPA junto con una mayor incidencia de PP (Latendresse, 2009; Wadhwa *y col.*, 2011; Vollrath *y col.*, 2016) y bajo peso al nacer en humanos (Vrekoussis *y col.*,

2010; Liou *y col.*, 2016). Resultados similares a los nuestros fueron reportados por Mlynarik *y col.* (2004) en ratas macho, donde los animales que habían sido alojadas en un AE presentaron una activación del eje HPA disminuida frente a un desafío con LPS en comparación con las ratas de un ambiente estándar. Se ha propuesto que el enriquecimiento ambiental puede tener un efecto de “estrés beneficioso” sobre los animales, preparándolos para tener una respuesta mejorada frente a una situación estresante posterior (Sparling *y col.*, 2018). Si bien en este trabajo no encontramos diferencias significativas en los niveles séricos de corticosterona entre las hembras AC y AE previo a ser tratadas con LPS, sí observamos que algunas de las hembras provenientes de AE tenían niveles más altos de corticosterona sérica en comparación con las AC, mientras que otro grupo de animales presentó niveles similares al grupo control. Proponemos que este comportamiento bimodal en las hembras AE podría deberse a que el enriquecimiento ambiental no tiene el mismo efecto sobre todas las hembras, pudiendo resultar, para algunas, un estrés beneficioso que las ayude a responder mejor frente a un posterior estresor, como puede ser la administración de LPS. Esto es coincidente con el hecho de que el 50% de las hembras tratadas con LPS no presentan parto pretérmino.

Los efectos nocivos de la exposición a un estímulo inflamatorio durante la vida uterina sobre la descendencia han sido ampliamente reportados por nuestro grupo y otros (Pujol Lopez *y col.*, 2015; Bariani *y col.*, 2017; Domínguez Rubio *y col.*, 2017; Shi *y col.*, 2019). Entre los efectos más recurrentes se encuentran el acortamiento de la duración de la gestación, la mortalidad de la descendencia en el útero y postnatal, y la recurrencia de secuelas en el sistema nervioso de las crías.

Núñez Estevez *y col.* (2020) han demostrado que el enriquecimiento ambiental materno, combinado con el AE postnatal protege a las crías de los efectos adversos sobre el desarrollo social de la administración de LPS durante la gestación en ratas. En aquel modelo, si bien no observaban mortalidad perinatal ni parto pretérmino, si observaban, al igual que nosotros, una activación del sistema inmune y un aumento de la corticosterona sérica materna.

Además de los efectos que el entorno proinflamatorio durante la vida intrauterina pueda tener sobre las crías, el tratamiento con LPS también puede tener efectos sobre el comportamiento materno, siendo este otro de los factores involucrados en la supervivencia de las crías. Recientemente, Mendes-Lima *y col.* (2020) han demostrado que la administración

de LPS a la madre durante el periodo de lactancia disminuye el comportamiento de cuidado materno y aumenta ligeramente el comportamiento depredador, sin inducir el comportamiento de enfermedad. Siguiendo en esta línea, Cutuli y col. (2015) demostraron que el enriquecimiento ambiental materno pre y postconcepcional tuvo efecto sobre el comportamiento materno, siendo este más complejo y mejorado en comparación con el de las hembras control. Además, la descendencia de madres provenientes de AE, mostró mejor rendimiento en algunos de los test comportamentales analizados en comparación con las crías provenientes de AC.

Los factores que contribuyen al aumento de la mortalidad perinatal inducida por la administración de LPS son numerosos y los efectos beneficiosos del AE podrían interferir con varios de ellos. Más experimentos son necesarios para dilucidar cuál de estos factores es el más importante, y los mecanismos por los cuales el enriquecimiento ambiental materno protege a la descendencia. Sin embargo, nuestros hallazgos en el líquido amniótico (LA) podrían explicar, al menos en parte, el efecto protector del AE sobre la salud de las crías. Entre los resultados más destacados, observamos que el LA proveniente de hembras expuestas a AE tenía niveles elevados de IL-10 en comparación con el proveniente de AC. Esta citoquina antiinflamatoria participa significativamente en la regulación de la respuesta inmunes contra autoantígenos y en la tolerancia frente a antígenos extraños (Mobini y col., 2016). Se han estudiado los niveles de IL-10 en LA de mujeres en distintos momentos de la gestación con y sin infección intraamniótica (IIA) siendo esta citoquina detectable en todo momento en embarazos normales (Gotsch y col., 2008). Además, niveles elevados de IL-10 en el LA se asociaron con el desencadenamiento del parto espontáneo a término y pretérmino. Mas aún, en aquellas mujeres con IIA, ya sea a término como pretérmino, también se observaron mayores concentraciones de IL-10 en el LA. Los autores de este trabajo proponen que la IL-10 en el LA cumple un rol fundamental en la regulación de la respuesta inmune *in vivo* al iniciar acciones que atenúan los efectos del proceso inflamatorio.

Por otro lado, se ha demostrado que la IL-6 es esencial en el desencadenamiento del parto a término y pretérmino en ratones (Yang y col., 2009; Robertson y col., 2010) y en humanos (Elbastawissi y col., 2000). Nosotros observamos que frente al desafío inflamatorio inducido por el LPS se induce un aumento en la producción de IL-6 en el líquido amniótico en ambos grupos. Sin embargo, a pesar de que estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas, en el grupo proveniente de AE, la inducción fue cuatro veces menor que en el grupo AC. Resultados similares obtuvieron Kentner y col. (2008) al tratar con LPS

intraperitoneal a ratas alojadas en AE y compararlas con ratas control. Estos autores midieron la producción de IL-6 en el cerebro y encontraron que el enriquecimiento ambiental disminuye levemente la producción de IL-6 en comparación con las ratas de AC tratadas con LPS.

Por otro lado, el LA obtenido de madres provenientes de AE presentó niveles más elevados de TNF- α en comparación con las AC, sin observarse diferencias por el tratamiento con LPS en ninguno de los grupos. Si bien esta es una citoquina proinflamatoria que ha sido asociada al desencadenamiento del PP, también se encuentra presente en el LA en condiciones fisiológicas y aumenta hacia el momento del parto (Vrachnis y col., 2012). Creemos que al modular el sistema inmune materno, el AE tiene efecto sobre la producción de citoquinas, sin embargo, este aumento de TNF- α no pareciera estar asociado a un proceso patológico ya que las crías provenientes de AE-C son normales y no muestran mortalidad perinatal en comparación con las AC. De hecho, concentraciones similares a las que encontramos nosotros en las hembras AE, no han sido asociadas al desencadenamiento del PP en un modelo murino inducido por LPS (Yang y col., 2009).

Respecto a los niveles de IL-22, una molécula efectora secretada por las células inmunes, observamos que el LPS induce un aumento en la producción de esta citoquina tanto en el LA de madres provenientes de un AC como de AE. Sin embargo, la producción de IL-22 en el grupo de AE fue diez veces mayor en comparación con la del grupo control en respuesta a la administración de LPS. Comparativamente, Dambeaeva y col. (2018) demostraron que la IL-22 aumenta en respuesta a la administración intrauterina de LPS y cumple un rol fundamental en el control del riesgo de PP inducido por inflamación. De hecho, estos autores proponen la administración de IL-22 como un tratamiento para prevenir el PP. Resultados similares encontraron Duffin y coautores (2016) en el intestino delgado en un modelo de inflamación sistémica inducido por la administración de LPS. Estos autores demostraron, además, que la producción de IL-22 está regulada por la producción de PGE2 en el intestino. Esto es consistente con nuestros resultados en el LA, donde además de encontrar niveles elevados de IL-22 en respuesta al LPS, encontramos niveles elevados de PGE2 en comparación con el grupo AC+LPS. Sin embargo, más estudios son necesarios para corroborar si la producción de IL-22 está regulada por la PGE2.

Durante el embarazo se requiere que el sistema inmune materno no solo no rechace al feto semi-alogénico sino que también sea capaz de proteger a la madre y al feto de infecciones

(Nguyen y Ward, 2012). Las funciones de la inmunidad innata y adaptativa, incluidas las células asesinas naturales, las células Th de tipo 1 o 2 (Th1 y Th2) y las células T reguladoras (Treg) han sido ampliamente estudiadas durante la gestación (Moffett-king, 2002; Saito *y col.*, 2010). Por el contrario, poco se sabe sobre el papel de las células B y la inmunidad mediada por anticuerpos durante el embarazo. Estas células son efectores y reguladores cruciales de las respuestas inmunes innatas y adaptativas que confieren inmunidad mediada por anticuerpos frente a patógenos, tanto a la madre como al feto, durante el embarazo y la lactancia (Nguyen y Ward, 2012). Sin embargo, las células B, se consideran una especie de “arma de doble filo” dado a que por un lado, contribuyen a la tolerancia al embarazo al secretar la citoquina inmunomoduladora IL-10, que ayuda a mantener la tolerancia hacia los antígenos fetales semi-alogénicos; mientras que por otro lado, pueden ser perjudiciales para el embarazo debido a su capacidad de producir autoanticuerpos (Jensen *et al.*, 2013; Muzzio *et al.*, 2013; Fettke *et al.*, 2014). De hecho, se ha demostrado la importancia de las células B productoras de IL-10 (B regulatorias o Breg) en la preñez temprana, regulando la producción de citoquinas proinflamatorias por parte de las células T CD4+ (Jensen *et al.*, 2012; Rolle *et al.*, 2013).

Nuestros resultados sugieren que el enriquecimiento ambiental materno modula la proporción de células B presentes en el líquido amniótico siendo esta población mayor en el grupo AE en comparación con el grupo AC. De manera comparable, Gurfein y coautores (2017) observaron que el enriquecimiento ambiental materno modula el fenotipo y la proporción de células B en el bazo. Más aún, Bommer y coautores (2019), han demostrado recientemente que el número de células B aumenta significativamente en el LA durante la fase aguda de PP inducido por LPS y demostraron, además, que estas células tienen la capacidad, una vez aisladas y cultivadas *in vitro*, de producir citoquinas pro y anti-inflamatorias. Si bien los resultados obtenidos en este trabajo, no nos permiten asegurar que las células B sean productoras de IL-10, el hecho de que el aumento de la proporción de células B se verifica al tiempo que se observa un aumento en la concentración de IL-10 en LA, nos permite especular que los linfocitos B podrían ser una de las poblaciones celulares encargadas de producir esta citoquina en este sitio y de este modo contribuir al estado tolerogénico general que observamos en las hembras provenientes de AE.

En líneas generales y en concordancia con lo que observamos en el útero y el cérvix, los resultados obtenidos del LA sugieren que el AE produce una respuesta más tolerogénica y

antiinflamatoria en respuesta a la administración sistémica de LPS que contribuiría a la protección del feto y de la gestación.

Al analizar el efecto del desafío inflamatorio y del AE materno sobre las crías nacidas a término, observamos efectos tanto durante la lactancia como al alcanzar la adultez. Por un lado, la administración materna de LPS provocó un aumento de la mortalidad perinatal discutido previamente. Por otro lado, el ambiente inflamatorio durante la gestación provocó un retraso en algunos parámetros de desarrollo analizados en la descendencia de madres provenientes de AC, lo que indicaría un efecto protector del AE sobre el desarrollo físico de las crías. En concordancia con este resultado, el efecto beneficioso del enriquecimiento ambiental materno sobre la descendencia fue también reportado por Caporali y col. (2014) quienes demostraron que la descendencia de ratas expuestas a AE adquirirían habilidades motoras complejas antes que las crías de madres provenientes de AC. Además, estos cambios estaban acompañados por cambios bioquímicos en el cerebro de las crías. Se ha propuesto que la administración de LPS durante la gestación puede tener el efecto de un “estresor inmune” resultando en un poderoso factor de programación del desarrollo fetal (Izvol'skaia y Sharova, Viktoria, 2018). De hecho, Núñez Estevez y coautores (2020) han demostrado que la activación del sistema inmune inducida por LPS durante la gestación induce cambios en la expresión de moléculas reguladoras de la epigenética tanto en la placenta como en el cerebro fetal. En este estudio demostraron, además, que el enriquecimiento ambiental materno también moduló la expresión de estos marcadores y que lo hizo de manera diferente según el sexo de las crías.

Al llegar a la adultez, observamos que el ambiente proinflamatorio inducido por el LPS durante la gestación tuvo un efecto sobre el metabolismo de la descendencia de manera diferente según el sexo biológico de las crías. Las crías machos de dos meses de edad, presentaron niveles elevados de colesterol y triglicéridos en suero, mientras que esto no se observó en las crías hembras. Además, los machos provenientes de madres expuestas a AE tenían menos grasa en todos los depósitos analizados en comparación con las crías provenientes de AC. Nuevamente no se observó modulación de la adipogénesis en las crías hembra. Cada día son más los reportes que demuestran que los efectos de programación fetal, ya sea frente a estímulos nocivos como a estímulos beneficiosos, son diferentes según cual sea el sexo biológico de la descendencia (Connors *y col.*, 2014; Gilman *y col.*, 2016; Dudele

y col., 2017; Schmidt *y col.*, 2019). En nuestro diseño experimental, las crías macho parecen ser más sensibles frente a los estímulos de programación fetal tanto nocivos (ambiente proinflamatorio) como beneficiosos (enriquecimiento ambiental). En concordancia con estas observaciones, Dudele *y col.* (2017) describieron, en un modelo murino, que el tratamiento materno con LPS programa la susceptibilidad de las crías a desarrollar un fenotipo de obesidad frente al consumo de una dieta alta en grasa durante la vida adulta y que esto varía según el sexo de las crías. Si bien se requieren más estudios para saber si las crías provenientes de madres tratadas con LPS serán más susceptibles a sufrir enfermedades metabólicas, aquí demostramos que el enriquecimiento ambiental también tiene efectos sobre la programación fetal, que se ven reflejados en la regulación de la adipogénesis, lo que podría contribuir a la protección de la descendencia frente a estímulos nocivos durante la vida adulta.

La salud mental materna pre y periconcepcional ha sido el foco de numerosos estudios que evalúan el efecto de ciertas intervenciones orientadas a reducir el estrés y la ansiedad, como la práctica de actividad física de tiempo libre, con intensidad de leve a moderada [revisado por Aune *y col.* (2017) y por Wen *y col.* (2017)], técnicas de relajación [revisado por Khianman *y col.* (2012)], atención y acompañamiento durante el embarazo por parte de parteras [revisada por Syall *y col.* (2016)] y otras intervenciones relacionadas con la inclusión social (Kieffer *y col.*, 2013). Numerosos estudios han informado una asociación inversa entre la práctica de actividad física y el desencadenamiento del PP. Se ha demostrado que la actividad física tiene efectos positivos sobre las complicaciones del embarazo, como la preeclampsia (Sorensen *y col.*, 2003; Meher y Duley, 2006), el exceso de peso gestacional (Löf *y col.*, 2008; Stuebe *y col.*, 2009) y diabetes gestacional (Aune *y col.*, 2017). Por otro lado, algunos estudios han demostrado que la práctica de yoga previene el PP y el bajo peso al nacer (Narendran *y col.*, 2005; Deshpye *y col.*, 2013). Como mencionamos previamente, aunque el ejercicio físico no es el objetivo principal de nuestro paradigma de enriquecimiento ambiental, la presencia de ruedas para correr, rampas y túneles brindó la oportunidad a los animales de este grupo experimental de practicar actividad física voluntaria que no estuvo presente en el AC. Por lo tanto, no podemos descartar la posibilidad de que algunos de los efectos beneficiosos de la exposición materna a AE en el resultado de la preñez puedan deberse en parte a una mayor actividad física. Los datos obtenidos en este trabajo, no nos permiten distinguir qué componentes del AE (estimulación motora, sensorial, cognitiva o social) son responsables de la protección de la gestación frente a un estímulo inflamatorio como lo es la administración

sistémica de LPS. Sin embargo, es probable que sea una combinación de factores que en conjunto contribuyen a la protección de la madre y los fetos.

La naturaleza no invasiva del enriquecimiento ambiental materno hace que esta herramienta sea particularmente interesante a la hora de pensar en nuevas estrategias para prevenir el PP. De hecho, el AE se ha propuesto como una “farmacoterapia endógena” para enfermedades relacionadas con el sistema nervioso, en las cuales la plasticidad neuronal no se obtiene mediante la administración externa de sustancias activas (Sale *y col.*, 2014; González Fleitas *y col.*, 2018) sino utilizando la estimulación ambiental para mejorar el potencial reparador espontáneo que posee el cerebro y también para influir en el desarrollo y la dinámica de la respuesta inmune (Brod *y col.*, 2017). Nuestros resultados sugieren, que la estrategia de enriquecimiento ambiental podría modular la fisiología materna, favoreciendo un estado inmunoprotector frente a un desafío inflamatorio y de estas manera prevenir el PP.

Nos resultó interesante testear el efecto del enriquecimiento ambiental solo durante la gestación, debido a que, en la mayoría de los casos, las intervenciones para prevenir enfermedades durante el embarazo en humanos se dan una vez que la mujer se entera que está embarazada. Si bien no observamos diferencias estadísticas en la ocurrencia de PP entre las hembras expuestas a AE durante la gestación y las AC si observamos una tendencia a disminuir la tasa de PP que probablemente resultaría estadística si se hubiera aumentado el número de animales. Sin embargo, no observamos un efecto protector del AE sobre la salud de la descendencia. Esto sugiere que el enriquecimiento ambiental debería ser preconcepcional. Sin embargo, el efecto que una estrategia de AE podría tener sobre la fisiología del embarazo humano debería estudiarse.

En general, nuestros resultados apuntan hacia los beneficios de la exposición, pre y periconcepcional, a un AE sobre el resultado de la gestación y la prevención del PP inducido por LPS. Incluso teniendo en cuenta las limitaciones de nuestro modelo animal, nuestros resultados están de acuerdo con la hipótesis del "efecto de madre sana" que propone que los efectos a largo plazo de un estilo de vida físico y mental saludable tanto pre como periconcepcional desempeñan un papel importante en el resultado del embarazo (Guendelman *y col.*, 2017). Idealmente, todas las mujeres que buscan un embarazo deberían tener fácil acceso a asesoramiento preconcepcional para manejar los factores de riesgo en el estilo de vida y la nutrición, así como el estrés y los problemas de salud mental.

Nuestros resultados contribuyen a la discusión sobre la necesidad de diseñar políticas públicas que implementen programas para mejorar la calidad de vida de las madres a fin de prevenir complicaciones durante el embarazo.

Además, proponemos que el diseño de un protocolo de enriquecimiento del ambiente materno para los humanos es factible y podría ser una terapia no invasiva y preventiva para las complicaciones del embarazo que podría disminuir la tasa de PP y las secuelas que pueden presentar los niños y niñas que nacen antes de tiempo.

Conclusiones.

- 1- El protocolo de enriquecimiento ambiental tiene efectos sobre la fisiología de las hembras, modulando el peso corporal, la adipogénesis y los niveles de colesterol y triglicéridos en sangre.
- 2- El enriquecimiento ambiental materno previene el desencadenamiento del PP inducido por el LPS a través de cambios moleculares y fisiológicos:
 - Inhibiendo el aumento de la corticosterona sérica.
 - Modulando la respuesta inflamatoria en el útero relacionada con la contractilidad uterina que se desencadena previa al PP.
 - Modulando la respuesta inflamatoria en el cérvix relacionada con el remodelado cervical que precede al PP.
- 3- El tratamiento con LPS tiene efectos sobre la salud de la descendencia:
 - Aumenta la mortalidad perinatal.
 - Produce un retraso en algunos parámetros de desarrollo físico de las crías durante la lactancia.
 - Modula los niveles de colesterol y triglicéridos en las crías macho al llegar a la adultez.
- 4- El enriquecimiento ambiental materno protege a la descendencia:
 - Previniendo la mortalidad perinatal
 - Evitando el retraso en los parámetros de desarrollo físico de las críasEsta protección está dada, al menos en parte, por una respuesta antiinflamatoria en el LA. Además, la exposición materna a un AE modula la adipogénesis de las crías macho en la edad adulta.
- 5- El protocolo de enriquecimiento ambiental acotado solo al periodo gestacional disminuye la tasa de PP, pero no disminuye la mortalidad perinatal.

Referencias.

- Agnieszka Płociennikowska, Aneta Hromada-Judycka , Kinga Borzecka KK** (2015) Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences* **72** 557–581.
- Aisemberg J, Vercelli C, Billi S, Ribeiro ML, Ogando D, Meiss R, McCann SM, Rettori V and Franchi AM** (2007) Nitric oxide mediates prostaglandins' deleterious effect on lipopolysaccharide-triggered murine fetal resorption. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104** 7534–7539.
- ALDERTON W.K, COOPER C.E. KRG** (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal* **357** 593–615.
- Ali M, Buhimschi I, Chwalisz K and Garfield RE** (1997) Changes in expression of the nitric oxide synthase isoforms in rat uterus and cervix during pregnancy and parturition. *Molecular Human Reproduction* **3** 995–1003.
- Anbe H, Okawa T, Sugawara N, Takahashi H, Sato A, Vedernikov YP, Saade GR and Garfield RE** (2007) Influence of progesterone on myometrial contractility in pregnant mice treated with lipopolysaccharide. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* **33** 765–771.
- Aranda ML, González Fleitas MF, Dieguez HH, Milne GA, Devouassoux JD, Keller Sarmiento MI, Chianelli M, Sande PH, Dorfman D and Rosenstein RE** (2019) Therapeutic benefit of environmental enrichment on optic neuritis. *Neuropharmacology* **145** 87–98.
- Ashokan A, Hegde A and Mitra R** (2016) Short-term environmental enrichment is sufficient to counter stress-induced anxiety and associated structural and molecular plasticity in basolateral amygdala. *Psychoneuroendocrinology* **69** 189–196.
- Aune D, Schlesinger S, Henriksen T, Saugstad OD and Tonstad S** (2017) Physical activity and the risk of preterm birth: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* **124** 1816–1826.
- Bakos J, Hlavacova N, Rajman M, Ondicova K, Koros C, Kitraki E, Steinbusch HWM and Jezova D** (2009) Enriched environment influences hormonal status and hippocampal brain derived neurotrophic factor in a sex dependent manner. *Neuroscience* **164** 788–797.
- Bariani MV, Correa F, Leishman E, Domínguez Rubio AP, Arias A, Stern A, Bradshaw HB and Franchi AM** (2017) Resveratrol protects from lipopolysaccharide-induced inflammation in the uterus and prevents experimental preterm birth. *Molecular Human Reproduction* **23** 571–581.
- Barker DJ** (1998) In utero programming of chronic disease. *Clinical Science (London, England: 1979)* **95** 115–128.
- Baylis S.A., Strijbos P.J.L.M., Sandra A., Russell R.J., Rijhsinghani A., Charles I.G. WCP** (1999) Temporal expression of inducible nitric oxide synthase in mouse and human placenta. *Molecular Human Reproduction* **5** 277–286.
- Beishuizen A and Thijs LG** (2003) Endotoxin and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Journal of Endotoxin Research* **9** 3–24.

- Bertram CA, Klopfleisch R, Erickson NA and Müller K** (2019) Uterus duplex bicollis , Vagina simplex in laboratory Guinea pigs (*Cavia porcellus*), rats (*Rattus norvegicus* forma domestica) and mice (*Mus musculus* forma domestica). *Anatomia Histologia Embryologia* **48** 388–393.
- Bigg HF, Rowan AD, Barker MD and Cawston TE** (2007) Activity of matrix metalloproteinase-9 against native collagen types I and III. *The FEBS Journal* **274** 1246–1255.
- Bommer I, Juriol L, Muzzio D, Valeff N, Ehrhardt J, Matzner F, Ziegler K, Malinowsky K, Ventimiglia MS, Zygmunt M et al.** (2019) Characterization of murine amniotic fluid B cells in normal pregnancy and in preterm birth. *Reproduction* **158** 369–376.
- de Boo HA and Harding JE** (2006) The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. *The Australian & New Zealand Journal of Obstetrics & Gynaecology* **46** 4–14.
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72** 248–254.
- Bredt DS and Snyder SH** (1989) Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86** 9030–9033.
- Brod S, Gobbetti T, Gittens B, Ono M, Perretti M and D’Acquisto F** (2017) The impact of environmental enrichment on the murine inflammatory immune response. *JCI Insight* **2** e90723.
- Cannon. R** (1998) Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem.* **44** 1809-19.
- Caporali P, Cutuli D, Gelfo F, Laricchiuta D, Foti F, De Bartolo P, Mancini L, Angelucci F and Petrosini L** (2014) Pre-reproductive maternal enrichment influences offspring developmental trajectories: motor behavior and neurotrophin expression. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* **8** 195.
- Cella M** (2007) Participación de los endocannabinoides, la Ciclooxygenasa- 1 (COX-1), la Ciclooxygenasa-2 (COX-2) y la Óxido Nítrico Sintasa (NOS) en la preñez y en el desencadenamiento del parto normal y pretérmino en ratón. *Tesis Doctoral (Área Ciencias Biológicas), UBA.*
- Cella M, Farina MG, Dominguez Rubio a. P, Di Girolamo G, Ribeiro ML and Franchi a. M** (2010) Dual effect of nitric oxide on uterine prostaglandin synthesis in a murine model of preterm labour. *British Journal of Pharmacology* **161** 844–855.
- Charil A, Laplante DP, Vaillancourt C and King S** (2010) Prenatal stress and brain development. *Brain Research Reviews* **65** 56–79.
- Connors EJ, Shaik a. N, Migliore MM and Kentner a. C** (2014) Environmental enrichment mitigates the sex-specific effects of gestational inflammation on social engagement and the hypothalamic pituitary adrenal axis-feedback system. *Brain, Behavior, and Immunity* **42** 178–190.
- Cunningham SD, Lewis JB, Shebl FM, Boyd LM, Robinson MA, Grilo SA, Lewis SM, Pruett AL and Ickovics JR** (2018) Group Prenatal Care Reduces Risk of Preterm Birth and Low Birth Weight: A Matched Cohort Study. *Journal of Women’s Health (2002).*

- Cutuli D, Caporali P, Gelfo F, Angelucci F, Laricchiuta D, Foti F, De Bartolo P, Bisicchia E, Molinari M, Farioli Vecchioli S *et al.* (2015) Pre-reproductive maternal enrichment influences rat maternal care and offspring developmental trajectories: behavioral performances and neuroplasticity correlates. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* **9** 1–18.
- Cuzzocrea, S.; Mazzon, E.; Calabro, G.; Dugo, L.; De Sarro, A.; Van de Loo FAJ. CAP (2000) Inducible Nitric Oxide Synthase—Knockout Mice Exhibit Resistance to Pleurisy and Lung Injury Caused by Carrageenan. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **162** 1859–1866.
- Cymeryng CB, Dada LA and Podestá EJ (1998) Effect of nitric oxide on rat adrenal zona fasciculata steroidogenesis. *Journal of Endocrinology* **158** 197–203.
- Dambaeva S, Schneiderman S, Jaiswal MK, Agrawal V, Katara GK, Gilman-sachs A, Hirsch E and Beaman KD (2018) Interleukin 22 prevents lipopolysaccharide- induced preterm labor in mice †. *Biology of Reproduction* **98** 299–308.
- Deshpande CS, Rakhshani A, Rakhshani A, Nagarathna R, Ganpat TS, Kurpad A, Maskar R, Nagendra HR, Sudheer DC, Abbas R *et al.* (2013) Yoga for high-risk pregnancy: a randomized controlled trial. *Annals of Medical and Health Sciences Research* **3** 341–344.
- Domínguez Rubio AP, Sordelli MS, Salazar AI, Aisemberg J, Bariani M V., Cella M, Rosenstein RE and Franchi AM (2014) Melatonin prevents experimental preterm labor and increases offspring survival. *Journal of Pineal Research* **56** 154–162.
- Domínguez Rubio AP, Correa F, Aisemberg J, Dorfman D, Bariani MV, Rosenstein RE, Zorrilla Zubilete M and Franchi AM (2017) Maternal administration of melatonin exerts short- and long-term neuroprotective effects on the offspring from lipopolysaccharide-treated mice. *Journal of Pineal Research* **63** e12439.
- Dorfman D, Aranda ML, González Fleitas MF, Chianelli MS, Fernandez DC, Sande PH and Rosenstein RE (2014) Environmental enrichment protects the retina from early diabetic damage in adult rats. *PloS One* **9** e101829.
- Dudele A, Hougaard KS, Kjølby M, Hokland M, Winther G, Elfving B, Wegener G, Nielsen AL, Larsen A, Nøhr MK *et al.* (2017) Chronic maternal inflammation or high-fat-feeding programs offspring obesity in a sex-dependent manner. *International Journal of Obesity* **41** 1420–1426.
- Duffin R, O'Connor RA, Crittenden S, Forster T, Yu C, Zheng X, Smyth D, Robb CT, Rossi F, Skouras C *et al.* (2016) Prostaglandin E2 constrains systemic inflammation through an innate lymphoid cell-IL-22 axis. *Science* **351** 1333–1338.
- Dusting, G.J., Selemidis, S., and Jiang F (2005) Mechanisms for suppressing NADPHoxidase in the vascular wall. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* **100 Suppl** 97–103.
- Ekman-Ordeberg G and Dubicke A (2012) Preterm Cervical Ripening in humans. *Facts Views Vis Obgyn* **4** 245–253.
- El-bastawissi AY, Williams MA, Riley DE, Hitti J and Krieger JN (2000) Amniotic fluid interleukin-6 and preterm delivery: A review. *Obstetrics & Gynecology* **7844** 1056–1064.
- Elovitz M a. and Mrinalini C (2004) Animal models of preterm birth. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **15** 479–487.

- Emanuela Ricciotti and GAF** (2012) Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **31** 986–1000.
- Farina M, Ribeiro ML, Ogando D, Gimeno M and Franchi AM** (2000) IL1alpha augments prostaglandin synthesis in pregnant rat uteri by a nitric oxide mediated mechanism. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)* **62** 243–247.
- Feria YL, Zamora LO and Curveco DL** (2003) Evaluación del desarrollo físico y funcional en ratas recién nacidas para su uso en estudios de toxicología perinatal y postnatal. *Revista de Toxicología En Línea* 16–28.
- Fettke F, Schumacher A, Costa S and Zenclussen AC** (2014) B cells: the old new players in reproductive immunology. *Frontiers in Immunology* **5** 1–10.
- Filipovich Y, Agrawal V, Crawford SE, Fitchev P, Qu X, Klein J and Hirsch E** (2015) Depletion of polymorphonuclear leukocytes has no effect on preterm delivery in a mouse model of Escherichia coli-induced labor. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **213** 697.e1-10.
- Finkelstein JZ, Duhau M, Fasola L and Escobar P** (2017) Mortalidad neonatal en Argentina. *Arch Argent Pediatr* **115** 343–349.
- Fortier M.A., Krishnaswamy K., Danyod G., Boucher-Kovalik S. CJA** (2008) A POSTGENOMIC INTEGRATED VIEW OF PROSTAGLANDINS IN REPRODUCTION: IMPLICATIONS FOR OTHER BODY SYSTEMS. *Journal of Physiology and Pharmacology* **59** 65–89.
- Franchi, A.M.; Faletti, A.; Gimeno, M.F.; Gimeno AL** (1985) Influence of sex hormones on prostaglandin dehydrogenase activity in the rat uterus. *Prostaglandins* **29** 953–960.
- Gibb W and Challis JRG** (2002) BASIS OF REPRODUCTIVE MECHANISMS OF TERM AND PRETERM BIRTH. *J Obstet Gynaecol Can* **24** 874–883.
- Gilman SE, Cherkerzian S, Buka SL, Hahn J, Hornig M and Goldstein JM** (2016) Prenatal immune programming of the sex-dependent risk for major depression. *Translational Psychiatry* **6** e822–e822.
- Gimeno A y col.** (1985) Prostaglandinas y compuestos relacionados. *E. Ateneo, Ed., Buenos Aires, Argentina.*
- Gomez-Lopez N, Romero R, Xu Y, Miller D, Leng Y, Panaitescu B, Silva P, Faro J, Alhousseini A, Gill N et al.** (2018) The immunophenotype of amniotic fluid leukocytes in normal and complicated pregnancies. *American Journal of Reproductive Immunology* **79** 1–17.
- Gonzalez JM, Franzke CW, Yang F, Romero R and Girardi G** (2011a) Complement activation triggers metalloproteinases release inducing cervical remodeling and preterm birth in mice. *American Journal of Pathology* **179** 838–849.
- Gonzalez JM, Dong Z, Romero R and Girardi G** (2011b) Cervical remodeling/ripening at term and preterm delivery: the same mechanism initiated by different mediators and different effector cells. *PloS One* **6** e26877.
- González Fleitas MF, Aranda ML, Dieguez HH, Devouassoux JD, Chianelli MS, Dorfman D and Rosenstein RE** (2018) Pre-ischemic enriched environment increases retinal resilience to acute ischemic damage in adult rats. *Experimental Eye Research* **178** 198–211.
- Gotsch F, Romero R, Kusanovic JP, Erez O, Espinoza J, Kim CJAI, Vaisbuch EDI, Than NG,**

- Mazaki-tovi S, Chaiworapongsa T *et al.*** (2008) The anti-inflammatory limb of the immune response in preterm labor, intra-amniotic infection / inflammation, and spontaneous parturition at term: A role for interleukin-10. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* **21** 529–547.
- Gotsch F, Gotsch F, Romero R, Erez O, Vaisbuch E, Kusanovic JP, Mazaki-Tovi S, Kim SK, Hassan S and Yeo L** (2009) The preterm parturition syndrome and its implications for understanding the biology, risk assessment, diagnosis, treatment and prevention of preterm birth. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* **22 Suppl 2** 5–23.
- Grote NK, Bridge JA, Gavin AR, Melville JL, Iyengar S and Katon WJ** (2010) A meta-analysis of depression during pregnancy and the risk of preterm birth, low birth weight, and intrauterine growth restriction. *Archives of General Psychiatry* **67** 1012–1024.
- Guendelman S, Broderick A, Mlo H, Gemmill A and Lindeman D** (2017) Listening to Communities: Mixed-Method Study of the Engagement of Disadvantaged Mothers and Pregnant Women With Digital Health Technologies. *Journal of Medical Internet Research* **19** e240.
- Gurfein BT, Hasdemir B, Milush JM, Touma C, Palme R, Nixon DF, Darcel N, Hecht FM and Bhargava A** (2017) Enriched environment and stress exposure influence splenic B lymphocyte composition. *PLoS ONE* **12** e0180771.
- Hegaard HK, Pedersen BK, Nielsen BB and Damm P** (2007) Leisure time physical activity during pregnancy and impact on gestational diabetes mellitus, pre-eclampsia, preterm delivery and birth weight: a review. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* **86** 1290–1296.
- Hegaard HK, Hedegaard M, Damm P, Ottesen B, Petersson K and Henriksen TB** (2008) Leisure time physical activity is associated with a reduced risk of preterm delivery. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **198** 180.e1-5.
- Hierholzer C, Harbrecht B, Menezes JM, Kane J, MacMicking J, Nathan CF, Peitzman AB, Billiar TR and Tweardy DJ** (1998) Essential role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after hemorrhagic shock. *The Journal of Experimental Medicine* **187** 917–928.
- Holt R, Timmons BC, Akgul Y, Akins ML and Mahendroo M** (2011) The molecular mechanisms of cervical ripening differ between term and preterm birth. *Endocrinology* **152** 1036–1046.
- Horvath G, Reglodi D, Vadasz G, Farkas J and Kiss P** (2013) Exposure to enriched environment decreases neurobehavioral deficits induced by neonatal glutamate toxicity. *International Journal of Molecular Sciences* **14** 19054–19066.
- Izumi H and Garfield RE** (1995) Relaxant effects of nitric oxide and cyclic GMP on pregnant rat uterine longitudinal smooth muscle. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* **60** 171–180.
- Izvolkskaia M and Sharova, Viktoria LZ** (2018) Prenatal Programming of Neuroendocrine System Development by Lipopolysaccharide: Long-Term Effects. *International Journal of Molecular Sciences* **19** 3695.
- Jensen F, Wallukat G, Herse F, Budner O, El-Mousleh T, Costa S-D, Dechend R and Zenclussen AC** (2012) CD19 + CD5 + Cells as Indicators of Preeclampsia. *Hypertension* **59** 861–868.

- Jensen F, Muzzio D, Soldati R, Fest S and Zenclussen AC (2013) Regulatory B10 Cells Restore Pregnancy Tolerance in a Mouse Model. *Biology of Reproduction* **89**.
- Jungling A, Reglodi D, Karadi ZN, Horvath G, Farkas J, Gaszner B and Tamas A (2017) Effects of postnatal enriched environment in a model of parkinson's disease in adult rats. *International Journal of Molecular Sciences* **18**.
- Kentner AC, Takeuchi A, James JS, Miki T, Seino S, Hayley S and Bielajew C (2008) The effects of rewarding ventral tegmental area stimulation and environmental enrichment on lipopolysaccharide-induced sickness behavior and cytokine expression in female rats. *Brain Research* **1217** 50–61.
- Khianman B, Pattanittum P, Thinkhamrop J and Lumbiganon P (2012) Relaxation therapy for preventing and treating preterm labour. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* CD007426.
- Kieffer EC, Caldwell CH, Welmerink DB, Welch KB, Sinco BR and Guzmán JR (2013) Effect of the healthy MOMs lifestyle intervention on reducing depressive symptoms among pregnant Latinas. *American Journal of Community Psychology* **51** 76–89.
- Kishore, Annavarapu Hari; Liang, Hanquan; Kanchwala, Mohammed; Xing, Chao; Ganesh, Thota; Akgul, Yucel; Posner, Bruce; Ready, Joseph M.; Markowitz, Sanford D.; Word RA (2017) Prostaglandin dehydrogenase is a target for successful induction of cervical ripening. *PNAS* **14** E6427–E6436.
- Knopp RH, Saudek CD, Arky RA and O'Sullivan JB (1973) Two Phases of Adipose Tissue Metabolism in Pregnancy: Maternal Adaptations for Fetal Growth. *Endocrinology* **92** 984–988.
- Kota Sunil K., Gayatri Kotni, Jammula Sruti, Kota Siva K., Krishna S. V. S., Meher Lalit K. MKD (2013) Review Article Endocrinology of parturition. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism* **17** 50–60.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227** 680–685.
- Langdon KD and Corbett D (2012) Improved Working Memory Following Novel Combinations of Physical and Cognitive Activity. *Neurorehabilitation and Neural Repair* **26** 523–532.
- Latendresse G (2009) The interaction between chronic stress and pregnancy: preterm birth from a biobehavioral perspective. *Journal of Midwifery & Women's Health* **54** 8–17.
- Lee, J., Bae, E. H., Ma, S. K., and Kim SW (2016) Altered Nitric Oxide System in Cardiovascular and Renal Diseases. *Chonnam Medical Journal* **52** 81.
- Leppert PC (1995) Anatomy and physiology of cervical ripening. *Clinical Obstetrics and Gynecology* **38** 267–279.
- Lindstrom T and Bennett P (2004) Transcriptional regulation of genes for enzymes of the prostaglandin biosynthetic pathway. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **70** 115–135.
- Liou S-R, Wang P and Cheng C-Y (2016) Effects of prenatal maternal mental distress on birth outcomes. *Women and Birth: Journal of the Australian College of Midwives* **29** 376–380.
- Löf M, Hilakivi-Clarke L, Sandin S and Weiderpass E (2008) Effects of pre-pregnancy physical

- activity and maternal BMI on gestational weight gain and birth weight. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* **87** 524–530.
- Mahendroo M** (2012) Cervical remodeling in term and preterm birth: insights from an animal model. *Reproduction* **143** 429–438.
- Di Marco I and Asprea I** (2015) Amenaza de parto pretérmino, atención de parto pretérmino espontáneo y rotura prematura de membranas. 21–27.
- McInnes IB, Leung B, Wei XQ, Gemmell CC and Liew FY** (1998) Septic arthritis following *Staphylococcus aureus* infection in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Journal of Immunology* **160** 308–315.
- Meher S and Duley L** (2006) Exercise or other physical activity for preventing pre-eclampsia and its complications. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* CD005942.
- Mendes-Lima T, Kirsten TB, Rodrigues PS, Sampaio AC., Felício LF, Rocha PRDA, Reis-Silva TM, Bondan EF, Martins MFM, Queiroz-Hazarbassanov N et al.** (2020) Prenatal LPS induces sickness behaviour and decreases maternal and predatory behaviours after an LPS challenge. *International Journal of Neuroscience* 1–13.
- Mering S and Jolkkonen J** (2015) Proper housing conditions in experimental stroke studies — special emphasis on environmental enrichment. *Frontiers in Neuroscience* **9** 106–114.
- Mlynarik M, Johansson BB and Jezova D** (2004) Enriched environment influences adrenocortical response to immune challenge and glutamate receptor gene expression in rat hippocampus. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1018** 273–280.
- Mobini M, Mortazavi M, Nadi S, Zare-bidaki M and Arababadi MK** (2016) Significant roles played by interleukin-10 in outcome of pregnancy. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* **19** 119-124.
- Moffett-King A** (2002) Natural killer cells and pregnancy. *Nature Reviews Immunology* **2** 656–663.
- Mohn CE, Fernandez-Solari J, De Laurentiis A, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M and Rettori V** (2011) Adrenal gland responses to lipopolysaccharide after stress and ethanol administration in male rats. *Stress* **14** 216–226.
- Muzzio D, Zenclussen AC and Jensen F** (2013) The Role of B Cells in Pregnancy: The Good and the Bad. *American Journal of Reproductive Immunology* **69** 408–412.
- Nallasamy S and Mahendroo M** (2017) Distinct Roles of Cervical Epithelia and Stroma in Pregnancy and Parturition. *Seminars in Reproductive Medicine* **35** 190–200.
- Nallasamy S, Akins M, Tetreault B, Luby-Phelps K and Mahendroo M** (2018) Distinct reorganization of collagen architecture in lipopolysaccharide-mediated premature cervical remodeling. *Biology of Reproduction* **98** 63–74.
- Narendran S, Nagarathna R, Narendran V, Gunasheela S and Nagendra HRR** (2005) Efficacy of yoga on pregnancy outcome. *Journal of Alternative and Complementary Medicine (New York, N.Y.)* **11** 237–244.
- Nguyen TG, Ward CM and Morris JM** (2012) To B or not to B cells-mediate a healthy start to life. *Clinical and Experimental Immunology* **171** 124–134.
- Nold C, Stone J, Graham M, Trinh J, Blanchette A and Jensen T** (2018) Is nitric oxide an

- essential mediator in cervical inflammation and preterm birth? *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* **31** 1735–1741.
- Núñez Estevez KJ, Rondón-Ortiz AN, Nguyen JQT and Kentner AC (2020) Environmental influences on placental programming and offspring outcomes following maternal immune activation. *Brain, Behavior, and Immunity* **83** 44–55.
- O’Neal TJ, Friend DM, Guo J, Hall KD and Kravitz AV (2017) Increases in Physical Activity Result in Diminishing Increments in Daily Energy Expenditure in Mice. *Current Biology* **27** 423–430.
- Olson DM, Skinner K CJ (1983) Prostaglandin output in relation to parturition by cells dispersed from human intrauterine tissues. *J Clin Endocrinol Metab.* **57**(4) 694–699.
- OMS (2018) OMS. In <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth>.
- Otaki M, Hirano T, Yamaguchi Y, Kaida K, Koshika S, Nagata K, Nishimura M, Kakinuma S, Shimada Y and Kobayashi Y (2018) Changes in the function and phenotype of resident peritoneal macrophages after housing in an enriched environment. *International Immunopharmacology* **65** 44–49.
- Park BS and Lee JO (2013) Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Experimental and Molecular Medicine* **45** e66.
- Patten AR, Yau SY, Fontaine CJ, Meconi A, Wortman RC and Christie BR (2015) The Benefits of Exercise on Structural and Functional Plasticity in the Rodent Hippocampus of Different Disease Models. *Brain Plasticity* **1** 97–127.
- Peacock JL, Marston L, Marlow N, Calvert SA and Greenough A (2012) Neonatal and infant outcome in boys and girls born very prematurely. *Pediatric Research* **71** 305–310.
- Pujol Lopez Y, Steinbusch HWM, Rutten B, Kenis G, Van Den Hove DL and Myint AM (2015) Effects of subcutaneous LPS injection on gestational length and intrauterine and neonatal mortality in mice. *NeuroImmunoModulation* **22** 274–278.
- Pustovrh MC, Jawerbaum A, Capobianco E, White V, López-Costa JJ and González E (2005) Increased matrix metalloproteinases 2 and 9 in placenta of diabetic rats at midgestation. *Placenta* **26** 339–348.
- Ravanos K, Dagklisa T, Petousisa S, Margioula-Siarkoua C PY and PN (2015) Gynecological Endocrinology Factors implicated in the initiation of human parturition in term and preterm labor: a review Factors implicated in the initiation of human parturition in term and preterm labor: a review. *Gynecological Endocrinology* **31** 679–683.
- Read CP, Word RA, Ruscheinsky MA, Timmons BC and Mahendroo MS (2007) Cervical remodeling during pregnancy and parturition: Molecular characterization of the softening phase in mice. *Reproduction* **134** 327–340.
- Rienzo JA, Guzman AW and Casanoves F (2002) A multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics* **7** 129–142.
- Rinaldi SF, Catalano RD, Wade J, Rossi AG and Norman JE (2014) Decidual neutrophil infiltration is not required for preterm birth in a mouse model of infection-induced preterm labor. *Journal of Immunology* **192** 2315–2325.

- Roberts D, Brown J, Medley N and Dalziel SR** (2017) Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2017** CD004454.
- Robertson SA, Christiaens I, Dorian CL, Zaragoza DB, Care AS, Banks AM and Olson DM** (2010) Interleukin-6 is an essential determinant of on-time parturition in the mouse. *Endocrinology* **151** 3996–4006.
- Rolle L, Memarzadeh Tehran M, Morell-García A, Raeva Y, Schumacher A, Hartig R, Costa S-D, Jensen F and Zenclussen AC** (2013) Cutting Edge: IL-10-Producing Regulatory B Cells in Early Human Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology* **70** 448–453.
- Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, Gotsch F, Hassan S, Erez O, Chaiworapongsa T and Mazor M** (2006) The preterm parturition syndrome. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* **113** 17–42.
- Rosselli M, Keller PJ and Dubey RK** (1998) Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Human Reproduction Update* **4** 3–24.
- Rubens CE, Sadovsky Y, Muglia L, Gravett MG, Lackritz E and Gravett C** (2014) Prevention of preterm birth: Harnessing science to address the global epidemic. *Science Translational Medicine* **6** 262sr5.
- Saito S, Nakashima A, Shima T and Ito M** (2010) Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology* **63** 601–610.
- Sale A, Cenni MC, Clussi F, Putignano E, Chierzi S and Maffei L** (2007) Maternal enrichment during pregnancy accelerates retinal development of the fetus. *PLoS ONE* **2** 1–8.
- Sale A, Berardi N and Maffei L** (2014) Environment and brain plasticity: towards an endogenous pharmacotherapy. *Physiological Reviews* **94** 189–234.
- Sandall J, Soltani H, Gates S, Shennan A and Devane D** (2013) Midwife-led continuity models versus other models of care for childbearing women. *Cochrane Database of Systematic Reviews* CD004667.
- Schmidt, H.H. & Walter, U.** (1994) NO at work. *Cell* **78** 919-25.
- Schmidt M, Lax E, Zhou R, Cheishvili D, Ruder AM, Ludiro A, Lapert F, Macedo da Cruz A, Sandrini P, Calzoni T et al.** (2019) Fetal glucocorticoid receptor (Nr3c1) deficiency alters the landscape of DNA methylation of murine placenta in a sex-dependent manner and is associated to anxiety-like behavior in adulthood. *Translational Psychiatry* **9** 23.
- Shi Z, Vasquez-Vivar J, Luo K, Yan Y, Northington F, Mehrmohammadi M and Tan S** (2019) Ascending Lipopolysaccharide-Induced Intrauterine Inflammation in Near-Term Rabbits Leading to Newborn Neurobehavioral Deficits. *Developmental Neuroscience* **40** 534–546.
- Slater AM and Cao L** (2015) A protocol for housing mice in an enriched environment. *Journal of Visualized Experiments* **2015** 1–8.
- Sorensen TK, Williams MA, Lee I-M, Dashow EE, Thompson M Lou and Luthy DA** (2003) Recreational physical activity during pregnancy and risk of preeclampsia. *Hypertension* **41** 1273–1280.
- Sparling JE, Mahoney M, Baker S and Bielajew C** (2010) The effects of gestational and

- postpartum environmental enrichment on the mother rat: A preliminary investigation. *Behavioural Brain Research* **208** 213–223.
- Sparling JE, Baker SL and Bielajew C** (2018) Effects of combined pre- and post-natal enrichment on anxiety-like, social, and cognitive behaviours in juvenile and adult rat offspring. *Behavioural Brain Research* **353** 40–50.
- Stouffer RL and Hennebold JD** (2015) *Structure, Function, and Regulation of the Corpus Luteum*. Elsevier Inc.
- Straughen JK, Trudeau S and Misra VK** (2013) Changes in adipose tissue distribution during pregnancy in overweight and obese compared with normal weight women. **3** e84-5.
- Stuebe AM, Oken E and Gillman MW** (2009) Associations of diet and physical activity during pregnancy with risk for excessive gestational weight gain. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **201** 58.e1-8.
- Stygar D, Wang H, Vladic YS, Ekman G, Eriksson H and Sahlin L** (2002) Increased level of matrix metalloproteinases 2 and 9 in the ripening process of the human cervix. *Biology of Reproduction* **67** 889–894.
- Sykes L, MacIntyre DA, Teoh TG and Bennett PR** (2014) Anti-inflammatory prostaglandins for the prevention of preterm labour. *Reproduction* **148** R29–R40.
- Takahashi H, Okawa T, Asano K and Fujimori K** (2012) Effect of lipopolysaccharide on the production of prostaglandin E2 and inhibition of uterine contractions by nitric oxide in pregnant inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* **38** 714–720.
- Tamura T, Kumagai N, Ph D, Yokoyama M and Ph D** (2015) Impact of Preoperative Environmental Enrichment on Prevention of Development of Cognitive Impairment following Abdominal Surgery in a Rat Model. *Anesthesiology* **123** 1–11.
- Timmons BC and Mahendroo MS** (2006) Timing of Neutrophil Activation and Expression of Proinflammatory Markers Do Not Support a Role for Neutrophils in Cervical Ripening in the Mouse1. *Biology of Reproduction* **74** 236–245.
- Timmons B, Akins M and Mahendroo M** (2010) Cervical remodeling during pregnancy and parturition. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **21** 353–361.
- Timmons BC, Reese J, Socrate S, Ehinger N, Paria BC, Milne GL, Akins ML, Auchus RJ, McIntire D, House M *et al.*** (2014) Prostaglandins are essential for cervical ripening in LPS-mediated preterm birth but not term or antiprogestin-driven preterm ripening. *Endocrinology* **155** 287–298.
- Törnblom SA, Maul H, Klimaviciute A, Garfield RE, Byström B, Malmström A and Ekman-Ordeberg G** (2005) mRNA expression and localization of bNOS, eNOS and iNOS in human cervix at preterm and term labour. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E* **3** 33.
- Törnblom SA, Patel FA, Byström B, Giannoulis D, Malmström A, Sennström M, Lye SJ, Challis JR EG** (2004) 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase and Cyclooxygenase 2 Messenger Ribonucleic Acid Expression and Immunohistochemical Localization in Human Cervical Tissue during Term and Preterm Labor. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **89** 2909–2915.

- Vakharia K and Hinson JP** (2005) Lipopolysaccharide directly stimulates cortisol secretion by human adrenal cells by a cyclooxygenase-dependent mechanism. *Endocrinology* **146** 1398–1402.
- Viaro, F., Nobre, F. and Evora PR** (2000) Expression of nitric oxid synthases in the pathophysiology of cardiovascular diseases. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* **74** 380–393.
- Vollrath ME, Sengpiel V, Landolt MA, Jacobsson B and Latal B** (2016) Is maternal trait anxiety a risk factor for late preterm and early term deliveries? *BMC Pregnancy and Childbirth* **16** 286.
- Vrachnis N, Karavolos S, Iliodromiti ZOE, Sifakis S, Siristatidis C, Mastorakos G and Creatsas G** (2012) Impact of Mediators Present in Amniotic Fluid on Preterm Labour. *In Vivo* **812** 799–812.
- Vrekoussis T, Kalantaridou SN, Mastorakos G, Zoumakis E, Makrigiannakis A, Syrrou M, Lavasidis LG, Relakis K and Chrousos GP** (2010) The role of stress in female reproduction and pregnancy: an update. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1205** 69–75.
- Vreugdenhil ACE, Rousseau CH, Hartung T, Greve JWM, van 't Veer C and Buurman WA** (2003) Lipopolysaccharide (LPS)-Binding Protein Mediates LPS Detoxification by Chylomicrons. *The Journal of Immunology* **170** 1399–1405.
- Wadhwa PD, Entringer S, Buss C and Lu MC** (2011) The contribution of maternal stress to preterm birth: Issues and considerations. *Clinics in Perinatology* **38** 351–384.
- Wen J, Xun P, Chen C, Quan M, Wang R, Liu Y and He K** (2017) Non-occupational physical activity during pregnancy and the risk of preterm birth: a meta-analysis of observational and interventional studies. *Scientific Reports* **7** 44842.
- Wi S, Lee JW, Kim M, Park C-H and Cho S-R** (2018) An Enriched Environment Ameliorates Oxidative Stress and Olfactory Dysfunction in Parkinson's Disease with α -Synucleinopathy. *Cell Transplantation* **27** 831–839.
- Williamson LL, Chao A and Bilbo SD** (2012) Environmental enrichment alters glial antigen expression and neuroimmune function in the adult rat hippocampus. *Brain, Behavior, and Immunity* **26** 500–510.
- Word RA, Li X, Hnat M and Carrick K** (2007) Dynamics of Cervical Remodeling during Pregnancy and Parturition: Mechanisms and Current Concepts. *Seminars in Reproductive Medicine* **25** 69–80.
- Wurfel M, Kunitake T, Lichenstein H KJ and WS** (1994) Lipopolysaccharide (LPS)-binding Protein Is Carried on Lipoproteins and Acts as a Cofactor in the Neutralization of LPS. *J Exp Medicine* **180** 1025–1035.
- Yang Q, El-Sayed Y, Rosenberg-Hasson Y, Hirschberg DL, Nayak NR, Schilling J and Madan A** (2009) Multiple cytokine profile in plasma and amniotic fluid in a mouse model of pre-term labor. *American Journal of Reproductive Immunology* **62** 339–347.
- Yellon SM** (2017) Contributions to the dynamics of cervix remodeling prior to term and preterm birth†. *Biology of Reproduction* **96** 13–23.
- Yoshida K, Jayyosi C, Lee N, Mahendroo M and Myers KM** (2019) Mechanics of cervical

remodelling: Insights from rodent models of pregnancy. *Interface Focus* **9** 20190026.