

**DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA,
GINECOLOGÍA Y PEDIATRÍA**

FACULTAD DE MEDICINA



**VNiVERSIDAD
D SALAMANCA**

Tesis Doctoral

**FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL
VASCULAR EN LA MADURACIÓN
PULMONAR EN RATAS TRATADAS CON
CORTICOIDES PRENATALES SOMETIDAS A
HIPOXIA Y RECUPERADAS CON AIRE O
HIPEROXIA**

Ana Remesal Escalero

2008

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	4
Interés del tema	4
1.1. DESARROLLO PULMONAR	6
1.1.1. Fases del desarrollo pulmonar	7
1.1.1.a. Fase embrionaria	7
1.1.1.b. Fase pseudoglandular	7
1.1.1.c. Fase canalicular	8
1.1.1.d. Fase sacular	8
1.1.1.e. Fase alveolar	8
1.1.2. Desarrollo pulmonar postnatal	9
1.1.3. Desarrollo vascular	10
1.2. VEGF	12
1.2.1. Familia VEGF	12
1.2.2. Receptores del VEGF	14
1.2.3. Regulación del VEGF	18
1.2.4. Regulación de los Receptores del VEGF	20
1.2.5. Interdependencia del VEGF con otros factores angiogénicos	20 22
1.2.6. VEGF y sus receptores en el desarrollo embrionario	22
1.2.7. Papel del VEGF en el desarrollo pulmonar	26
1.2.8. VEGF en el pulmón	27
1.2.9. Papel del VEGF en el síndrome de distrés respiratorio	29
1.2.10. VEGF en la hipertensión pulmonar	31
1.2.11. VEGF y displasia broncopulmonar	34
1.2.12. VEGF e hipoplasia pulmonar	34
1.3. OTROS FACTORES DE CRECIMIENTO	34
1.4. HIPOXIA	35

1.4.1.	Respuesta metabólica y ventilatoria a la hipoxia	35
1.4.2.	Efectos celulares y moleculares de la hipoxia	36
1.5.	HIPEROXIA	40
1.5.1.	Respuesta metabólica y ventilatoria a la hiperoxia	40
1.5.2.	Efectos celulares y moleculares de la hiperoxia	40
1.6.	CORTICOIDES. DEXAMETASONA Y BETAMETASONA	45
1.6.1.	Características bioquímicas y farmacológicas	46
1.6.1.1.	Farmacocinética	47
1.6.1.2.	Mecanismo de acción	49
1.6.2.	Dexametasona vs betametasona	50
1.6.3.	Acción de los corticoides en la maduración pulmonar	51
2.	HIPÓTESIS DE TRABAJO	56
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	59
3.1.	Sujetos	60
3.2.	Diseño experimental	60
3.3.	Estudio del metabolismo	64
3.4.	Recogida del material pulmonar	64
3.5.	Extracción y preparación de pulmones para el análisis inmunohistoquímico del VEGF	65
3.5.1.	Matrices de tejidos (“tissue microarrays”)	66
3.6.	Análisis inmunohistoquímico del VEGF	66
3.6.1.	Análisis por densitometría	68
3.7.	Análisis de ARNm del VEGF	70
3.7.1.	Extracción de pulmones para el análisis de ARNm	70
3.7.2.	Aislamiento de ARN total desde el tejido pulmonar	70
3.7.3.	Determinación de ARN del VEGF	71
3.7.3.1.	Síntesis de primera cadena de ADNc	71
3.7.3.2.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	72
3.7.4.	Análisis por densitometría	73
3.8.	Análisis estadístico	74
4.	RESULTADOS	76

4.1. Crecimiento. Peso y longitud.	77
4.2. Metabolismo	81
4.2.1. Diferencia de Temperatura	81
4.2.2. Oxígeno consumido	84
4.2.3. CO ₂ producido	86
4.3. VEGF	88
4.3.1. Animales de 0 días de vida	94
4.3.1.1. ARNm del VEGF	94
4.3.1.2. Inmunohistoquímica del VEGF	98
4.3.2. Animales de 4 días de vida	102
4.3.2.1. ARNm del VEGF	102
4.3.2.2. Inmunohistoquímica del VEGF	105
4.3.3. Animales de 14 días de vida	109
4.3.3.1. ARNm del VEGF	109
4.3.3.2. Inmunohistoquímica del VEGF	111
4.3.4. Evolución cronológica de la expresión del VEGF	115
4.3.4.1. ARNm del VEGF	115
4.3.4.2. Inmunohistoquímica del VEGF	116
5. DISCUSIÓN	118
6. CONCLUSIONES	144
7. BIBLIOGRAFÍA	148
8. ABREVIATURAS	173

1. INTRODUCCIÓN

El tratamiento con glucocorticoides prenatales, las nuevas estrategias de ventilación mecánica, la administración de surfactante y el empleo de óxido nítrico han mejorado la supervivencia de los niños prematuros, cuyo desarrollo pulmonar intraútero ha sido interrumpido durante la fase canalicular, emergiendo una nueva forma de displasia broncopulmonar¹⁻³.

Actualmente se ha comunicado que los niños con riesgo de desarrollar displasia broncopulmonar eran los que nacían con menos de 28 semanas de gestación, cuando estaban iniciando los procesos paralelos de alveolización y desarrollo del lecho capilar alveolar⁴. Se ha descrito que tenían menos enfermedad respiratoria aguda severa que los niños que desarrollaban la forma clásica de displasia broncopulmonar. En la histología pulmonar se ha descrito una detención del desarrollo alveolar incluyendo simplificación alveolar y crecimiento vascular dismórfico³.

Se ha planteado la necesidad de identificar los factores participantes en el desarrollo pulmonar para el tratamiento más efectivo de estos niños^{1,4}. Se ha mostrado que el complejo proceso de la alveolización, requería la coordinación adecuada de múltiples interacciones paracrinas entre componentes fibroblásticos, epiteliales, microvasculares pulmonares y con la matriz extracelular. Así mismo se ha observado que defectos en uno de estos componentes, podían tener repercusiones en todo el desarrollo alveolar. Las bases para la prevención o tratamiento del daño en la alveolización dependían de la clarificación de estas interrelaciones complejas que sucedían durante el desarrollo pulmonar normal^{5,6}.

Se ha visto que el daño pulmonar perinatal, en recién nacidos con pulmones en la fase canalicular tardía del desarrollo pulmonar, interrumpía la secuencia normal de crecimiento pulmonar y daría lugar a un modelo histológico de “simplificación alveolar” (pocos y grandes alveolos con pocos septos), pérdida de pequeñas arterias pulmonares y disminución de la densidad capilar^{2,4}.

Según los estudios de Thébaud², los mecanismos y las vías de señalización - transducción que regulaban el desarrollo alveolar normal permanecían aún poco entendidos y los mecanismos sobre como se alteraban estas vías en las enfermedades eran aún menos conocidos.

En estudios experimentales recientes se ha mostrado que el desarrollo de la circulación pulmonar y la alveolización estaban fuertemente coordinados³ pudiendo tener la modulación de factores de crecimiento vascular, un potencial terapéutico para las enfermedades pulmonares caracterizadas por la pérdida irreversible de estructuras alveolares².

1.1. DESARROLLO PULMONAR

Ha sido mostrado que para formar una gran superficie de intercambio de gas entre la vía respiratoria y la circulación, el endodermo pulmonar experimentaba una gran morfogénesis de bifurcación y alveolización, acoplada con angiogénesis y vasculogénesis⁷.

Se ha comunicado que muchos factores estaban implicados en el desarrollo pulmonar, como por ejemplo los receptores tirosina quinasa y sus ligandos que modulaban positivamente el crecimiento pulmonar, así como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que iniciaba la vasculogénesis, o como el factor de crecimiento de transformación β (TGF- β) que tenía un efecto inhibitor. También se han mostrado interrelaciones entre los factores de crecimiento y los estímulos físicos como los movimientos respiratorios del feto^{1,7,8}.

La fase de desarrollo del pulmón al nacimiento se ha visto que variaba mucho entre distintas especies. El pulmón del recién nacido humano tenía sólo una pequeña fracción del número de alveolos del adulto y con una red capilar inmadura. La rata nacía con unos pulmones un poco más inmaduros al nacimiento que el pulmón humano, experimentando los mismos pasos de

desarrollo postnatal. El estudio de pulmón de rata ha sido considerado como un modelo excelente para el estudio del desarrollo postnatal⁹.

El desarrollo pulmonar postnatal incluía la formación de alveolos desde sáculos respiratorios inmaduros por medio de septación, maduración de unidades epiteliales y mesenquimales y el desarrollo del sistema capilar alveolar¹⁰.

En las ratas, la septación alveolar se iniciaba entre los días 3-4 postnatales continuando durante la segunda semana de desarrollo postnatal¹⁰.

1.1.1. FASES DEL DESARROLLO PULMONAR

El desarrollo pulmonar prenatal en humanos ha sido dividido en cuatro fases: embrionaria, pseudoglandular, canalicular y alveolar siendo la edad de transición de una fase a otra muy variable¹.

1.1.1.a. Fase embrionaria

En humanos durante la fase embrionaria (hasta la 7 semana de gestación), el brote pulmonar aparecía como un divertículo ventral del intestino anterior y a las 6 semanas los dos pulmones se podían distinguir como órganos separados en el tórax. A los 34 días de gestación, cada brote pulmonar estaba provisto de una arteria pulmonar que se extendía desde el tracto de salida del corazón. En la cara ventral de cada brote pulmonar, una vena pulmonar conectaba con la aurícula izquierda¹.

Recientemente se ha comunicado que se producían factores de crecimiento y moléculas de señalización que actuaban de una manera paracrina entre el epitelio y el mesénquima. Factores como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de transformación de crecimiento β (TGF- β), Shh (Sonic Hedgehog), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y el factor morfogénico óseo 4 (BMP-4) con sus respectivos receptores y sus moléculas de señalización intracelular⁶.

1.1.1.b. Fase pseudoglandular

Durante la fase pseudoglandular (5-17 semanas de gestación) la división más distal centrífuga de la vía aérea en el mesénquima daba lugar a la vía aérea preacinar a nivel de los bronquiolos terminales que empezaban a estar presentes en la 17 semana de gestación. El músculo liso fuertemente seguido

por cartílago, glándulas submucosas y tejido conectivo se desarrollaban en la nueva pared formada por las vías aéreas con un epitelio que comenzaba a diferenciarse¹.

Cada nuevo brote formado tenía un halo de túbulos endoteliales alrededor. Los nuevos vasos se formaban por vasculogénesis en el mesénquima, la vía aérea actuaba como plantilla para los vasos pulmonares, y la división preacinar de arterias y venas también se completaría a las 17 semanas de gestación¹.

Se ha demostrado que los estímulos físicos podían estimular la expresión genética de factores de crecimiento y sus receptores¹¹.

1.1.1.c. Fase canalicular

Durante la fase canalicular (16-27 semanas de gestación) las vías aéreas preacinares aumentaban en tamaño, mientras que las vías aéreas periféricas continuaban su división para formar los bronquíolos respiratorios (dos o tres generaciones) y más allá los conductos alveolares saculares. Durante las 20-22 semanas de gestación, las células epiteliales alargadas tipo I y cuboidales tipo II se identificaban revistiendo todos los espacios aéreos saculares. Las células tipo II desarrollaban cuerpos lamelares alrededor de la 24 semana de gestación, 4-5 semanas antes que el surfactante se detectara en el líquido amniótico. Las arterias y venas continuaban su desarrollo a lo largo de la vía aérea probablemente por angiogénesis. Durante esta fase, el adelgazamiento del epitelio en la periferia del pulmón donde subyacen los capilares pulmonares daba lugar a la formación de una barrera de intercambio de gas tan delgada como la del adulto (alrededor de 0,6 μm). Esto era suficiente para mantener la vida en niños extremadamente prematuros¹.

1.1.1.d. Fase sacular

En la fase sacular (24 semanas-38 semanas) los bordes de los sáculos con discretas bandas de elastina y músculo, formaban pequeñas crestas que subdividían las paredes. Entre la semana 28 y 32 de gestación, estas crestas se alargaban para producir los primitivos alveolos, con doble red capilar¹.

1.1.1.e. Fase alveolar

Durante la fase alveolar (36 semanas a 1-2 años postnatal) la maduración de los alveolos en forma de cáliz con un solo capilar se producía por elongación de los sáculos, ahora llamados ductos alveolares, y parte de la

pared del bronquiolo respiratorio. El número de alveolos se incrementaba con la edad gestacional, y a término se habían formado aproximadamente entre un tercio y la mitad del número en el adulto¹, que tenía más de 300 millones de alveolos, siendo la alveolización un proceso claramente postnatal⁹.

Ha sido demostrado que el incremento en el volumen pulmonar del final de la gestación, se debía sobre todo al incremento en el número de alveolos. Además, el incremento en la superficie alveolar estaba en relación lineal con la edad y el peso¹.

Las características estructurales en la fase alveolar han sido muy bien descritas existiendo muchas similitudes entre el pulmón humano y el de rata. Estudios morfológicos y cuantitativos del pulmón de rata han contribuido ampliamente a nuestro conocimiento de como se forman los alveolos. En ratas la formación alveolar ocurría en un corto periodo de unos 10 días, desde el día 4 postnatal al 14⁹. Los canales y sáculos del pulmón de rata recién nacida estaban revestidos de paredes gruesas y lisas con un estrato central de tejido conectivo limitado por una red capilar a cada lado, denominados septos primarios. En el día 7 todos los septos habían tomado una apariencia de panal con un gran número de pequeñas crestas que se proyectaban en los espacios aéreos. Estas crestas se denominaron septos secundarios y formaban el contorno de los futuros alveolos. Como los septos primarios, los septos secundarios mostraban una doble red capilar cuya localización estaba directamente interconectada con el margen libre de la cresta. Las fibras elásticas se localizaban en el extremo de las crestas⁹.

A la repentina y masiva aparición de alveolos en el parénquima pulmonar se ha denominado “alveolización en masa”. En humanos un fenómeno similar se iniciaba justo antes del nacimiento y tenía lugar en los primeros 6 meses de vida. En este periodo los septos secundarios proliferaban y el pulmón humano se parecía fuertemente al pulmón de rata de la segunda semana de vida⁹.

1.1.2. DESARROLLO POSTNATAL

Al nacimiento el pulmón humano poseía el total de conductos de las vías aéreas y millones de espacios respiratorios periféricos, la mayoría en fase sacular, cuyas paredes estaban formadas de septos gruesos, con un estrato

central de tejido conectivo entre dos redes de capilares, esto significaba que en esta fase inmadura, los capilares tenían contacto con los espacios aéreos sólo por un lado, estando el otro cubierto por un grueso estrato de tejido conectivo que limitaba con otra red capilar. La organización en el adulto era completamente diferente: la pared interalveolar contenía sólo una única red capilar que limitaba a ambos lados con el alveolo⁹.

Según los estudios de Burri⁹, los alveolos, tanto en el pulmón humano como en el de rata se formaban, después del periodo inicial comentado anteriormente, de forma mucho más lenta. En ratas, las áreas preferenciales de adición posterior de nuevos alveolos eran las áreas subpleurales. También se ha estimado que en el crecimiento normal, el número de alveolos se incrementaba por un factor de dos, después de completarse la formación alveolar en masa.

Muchos estudios han mostrado la existencia de un periodo crítico de septación y de formación de los vasos pulmonares y han proporcionado la evidencia adicional de que eventos precoces podían influir más tarde en la anatomía pulmonar, función pulmonar, y en el desarrollo de enfermedades pulmonares¹².

1.1.3. DESARROLLO VASCULAR

El desarrollo vascular en el pulmón ha sido mostrado como determinante en la maduración de la estructura pulmonar y una correcta angiogénesis y vasculogénesis eran necesarias para la construcción con éxito del órgano^{13,14}

Las interacciones entre las vías aéreas y los vasos sanguíneos eran críticas para el desarrollo pulmonar normal, sugiriendo que una coordinada relación de factores de crecimiento vasculares por parte de las células epiteliales respiratorias promovía el desarrollo alveolar^{2,4,14}.

Jakkula y cols.¹⁵ administraron a ratas neonatales agentes antiangiogénicos, SU-5416, talidomida y fumagilina, observaron una disminución en la alveolización y en el crecimiento pulmonar, con histología similar al pulmón con displasia.

Mike van Tuyl y cols.¹⁴ encontraron que la inhibición de la vascularización in vitro daba lugar a un descenso importante en la

morfogénesis de la vía aérea, sugiriendo que el desarrollo vascular pulmonar era un factor determinante para la morfogénesis pulmonar.

Schwarz y cols.¹⁶ mostraron que la inhibición de la neovascularización con polipéptido II activador del monocito endotelial (EMAPII) daba lugar a una detención de la morfogénesis de la vía aérea.

A su vez se ha descrito que el desarrollo vascular pulmonar dependía de interacciones recíprocas con el epitelio pulmonar. Gebb y Shannon¹⁷ mostraron que las células mesenquimales cultivadas en ausencia de células epiteliales degeneraban significativamente y se observaban pocas células positivas para el VEGFR-2 (receptor 2 del VEGF). En contraste, el mesénquima pulmonar recombinado con epitelio pulmonar contenía abundantes células positivas para VEGFR-2 y su distribución espacial era similar a la que observaron in vivo en pulmón fetal y neonatal en ratas. En el estudio in vivo de pulmón encontraron células precursoras vasculares, con expresión positiva del VEGFR-2, en el mesénquima en proximidad al desarrollo del epitelio, desde el día fetal 11.

Recientemente se ha visto que el desarrollo vascular se producía durante todas las fases de desarrollo pulmonar. La formación de la vascularización pulmonar incluía tres procesos: angiogénesis, que daba lugar a los vasos centrales por brotes de nuevos vasos desde vasos preexistentes^{18,19}; vasculogénesis, que daba lugar a los vasos periféricos por diferenciación in situ de células mesenquimales en hemangioblastos¹⁹⁻²¹; y fusión entre los sistemas central y periférico creando la circulación pulmonar¹⁸.

Los estudios de Burri⁹ han puesto de manifiesto que en el pulmón humano, la maduración microvascular se iniciaba muy precozmente y tenía lugar en parte durante la alveolización, finalizando a la edad de 2-3 años.

Análisis genéticos han demostrado que las interacciones célula a célula y célula-matriz extracelular, así como factores de crecimiento y de transcripción estaban implicados en el desarrollo vascular⁶.

Estudios recientes han puesto de manifiesto que uno de los factores más importantes relacionado con el proceso descrito anteriormente era claramente el VEGF^{2,14}.

1.2. VEGF

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) ha sido mostrado como un potente mitógeno para las células endoteliales^{14,20,22,23}, además de quimiotáctico para estas células (Abhay J. Bhatt 2000-6) y uno de los más potentes mediadores de regulación vascular influyendo en la vasculogénesis, en la angiogénesis^{4,14,19,20} y en la permeabilidad vascular para agua y proteínas^{14,20,24,25}. Los estudios de Senger y cols.²⁴, Dvorak y cols.²⁶ y Roberts y Palade²⁷ han demostrado el potente efecto sobre la permeabilidad vascular, que era 50000 veces mayor que la histamina produciendo fenestración en las células endoteliales in vivo e in vitro. Además se ha presentado al VEGF como factor necesario para la supervivencia de células endoteliales, sobre todo en condiciones de hiperoxia^{20,28,29}.

En 1996, los estudios de Ferrara y cols.³⁰ y Carmeliet³¹ mostraron un papel crítico del VEGF en vasculogénesis y angiogénesis embrionaria viéndose mortalidad de embriones de ratón con la inactivación de un simple alelo del VEGF.

1.2.1. Familia VEGF

Se han identificado en los últimos años bastantes miembros de la familia VEGF incluyéndose VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, y el factor de crecimiento de la placenta (PlGF)^{18,25}. Estructuralmente se han incluido en la familia genética VEGF/PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas)³².

La molécula **VEGF-A**, una de las más estudiadas, fue identificada hace 19 años por Leung³³ y Keck³⁴. El VEGF-A tenía dos grandes actividades biológicas: la capacidad de estimular la proliferación celular de células endoteliales y la posibilidad de incrementar la permeabilidad vascular. También se ha descrito al VEGF-A como promotor de la supervivencia y migración de las células endoteliales³².

Se ha descrito al VEGF como una glicoproteína homodimérica de 45 KDa ligada a la heparina, por medio de residuos básicos de arginina manteniéndose así en la membrana basal^{13,18,25}.

Se ha identificado el gen humano del VEGF en el cromosoma 6p21.3 organizado en ocho exones, separados por siete intrones. Así mismo se han

descrito varias isoformas del VEGF con 121, 145, 165, 183, 189 y 206 aminoácidos respectivamente^{18,35}.

Se ha mostrado a la isoforma VEGF₁₂₁ como una isoforma soluble, mientras que el VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆ y el 60-70% del VEGF₁₆₅ se encontraban en asociación con células o en la matriz extracelular. Ha sido observado que la mayoría de las isoformas del VEGF-A tenían un dominio de unión a la heparina que interactuaba con las células que asociaban proteoglicanos heparán sulfato; habiéndose encontrado que la ausencia del dominio de unión a la heparina de la isoforma VEGF₁₂₁ daba lugar a pérdida de actividad mitógena^{30,31,35}.

La isoforma VEGF₁₈₈, se ha asociado al proceso de alveolización incrementándose significativamente poco antes del nacimiento³⁶, se ha visto que permanecía elevada en el pulmón durante el periodo postnatal y en el adulto³⁷.

Se ha descrito a la isoforma VEGF₁₆₅ como la isoforma predominante del VEGF siendo a la que se refiere la abreviatura VEGF y la que se ha visto que jugaban papel central en el desarrollo vascular^{18,25,32,35}.

El **VEGF-B** se ha encontrado fundamentalmente en el corazón, formando heterodímeros con VEGF, pudiendo modular su señalización³⁵. Wanstall y cols.³⁸ han mostrado como el bloqueo del VEGF-B en ratones contribuía al desarrollo de hipertensión pulmonar atribuyendo un papel al VEGF-B en el remodelamiento vascular pulmonar.

El **VEGF-C** y **VEGF-D** estarían implicados en el desarrollo del sistema linfático³⁹.

VEGF-E ha sido identificado en el genoma de parapoxvirus Orf y mostraba aproximadamente un 25% de aminoácidos idénticos con el VEGF-A de mamíferos, mostrando además niveles equivalentes de actividad mitótica en células endoteliales y de permeabilidad vascular activando el receptor VEGFR-2⁴⁰.

Recientemente se ha identificado en serpientes venenosas proteínas de la familia VEGF, **svVEGF**, que podían contribuir al incremento de la toxicidad en el envenenamiento³².

PIGF, factor de crecimiento de la placenta fue descubierto en 1991 en placenta humana⁴¹, se expresaba en la placenta, corazón, pulmón, tiroides,

cerebro y músculo esquelético. PlGF estimulaba la angiogénesis e inducía permeabilidad vascular cuando se coinyectaba con VEGF. La ausencia de PlGF tenía efectos despreciables en el desarrollo vascular pero su pérdida daría lugar a un daño en la angiogénesis, extravasación plasmática y crecimiento colateral en situaciones de isquemia, inflamación, cicatrización y cáncer^{35,42}.

El estudio realizado por Tsao y cols.⁴³ en niños pretérmino, puso de manifiesto que el PlGF estaba elevado en sangre de cordón en niños pretérmino que posteriormente desarrollaron displasia broncopulmonar, siendo un factor de riesgo independiente. En trabajos previos realizados por estos autores habían encontrado que la sobreexpresión de PlGF en ratones daba lugar a un incremento del espacio aéreo similar al de la displasia broncopulmonar y que el PlGF exógeno inhibía la proliferación y promovía la muerte celular de los neumocitos tipo II de ratón *in vitro*⁴⁴. Además mostraron en el ratón que el ARNm del PlGF se detectaba en los pulmones durante la fase sacular y que era inhibido rápidamente después de que se había completado la alveolización. En el estudio realizado en humanos por Tsao y cols.⁴³ observaron que los niveles de PlGF en sangre de cordón se correlacionaban negativamente con la edad gestacional, sugiriendo que el PlGF podía tener un papel fundamental durante el desarrollo pulmonar humano actuando sinérgicamente con el VEGF.

1.2.2. Receptores del VEGF

La actividad biológica del VEGF dependía de su reacción con receptores específicos. Se han identificado tres receptores diferentes de la familia de receptores tirosina quinasa: VEGFR-1/Flt-1 (“fms like tirosina quinasa”), VEGFR-2/Flk-1 (“fetal liver quinasa-1”) o receptor de dominio quinasa (KDR) y VEGFR-3 (Flt-4)⁴⁵⁻⁴⁷.

Se ha descrito que VEGFR-1 y VEGFR-2 tenían un dominio extracelular similar a inmunoglobulina así como un único dominio transmembrana tirosina quinasa y que se expresaban en gran variedad de células^{18,25,35}.

Waltenberger y cols.⁴⁸ fueron los primeros en mostrar que los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 daban lugar a diferentes eventos celulares dependientes del VEGF.

Gille y cols.⁴⁹ para elucidar las distintas contribuciones de cada receptor a la señalización celular por VEGF, emplearon VEGF mutante selectivo para VEGFR-1 o VEGF mutante selectivo para VEGFR-2 valorando sus funciones en células endoteliales de vena umbilical humana, observaron que el VEGF selectivo para VEGFR-1 era incapaz de generar señal mitogénica, como evidenciaba también su incapacidad para estimular actividad ERK y que la activación del receptor VEGFR-2 por el VEGF selectivo para este receptor era suficiente para causar migración celular siendo estimuladas las vías fosfatidilinositol 3-quinasa y la vía fosfolipasa C γ 1. Mostraron también en un estudio in vivo sobre la córnea en ratas, que el VEGF selectivo del VEGFR-2 era capaz de inducir angiogénesis y la estimulación de VEGFR-2 pero no de VEGFR-1 que era responsable de la inducción de permeabilidad vascular por VEGF.

El **VEGFR-1**, fue descubierto por Quinn y cols.⁵⁰ como una proteína de 180 KDa con afinidad para VEGF-A, VEGF-B, PlGF y svVEGF. Se ha descrito su expresión en las células endoteliales y en los macrófagos, monocitos y células madre hematopoyéticas³² y que era esencial para la organización de los vasos embrionarios. Se ha visto que los embriones de ratón desprovistos de VEGFR-1 unían tubos de células endoteliales como canales vasculares anómalos y fallecían en el útero debido a una carencia de la organización estructural de las paredes vasculares⁵¹ y que la mutación de VEGFR-1 daba lugar a ratones con células endoteliales bien diferenciadas pero con fallo en estas células para organizarse en estructuras vasculares normales⁵².

Kanno y cols.⁵³ observaron que el bloqueo de VEGFR-1 con anticuerpos prevenía la migración pero no la proliferación de las células endoteliales, en células de vena umbilical humana en respuesta al VEGF-A, indicando la implicación del VEGFR-1 en la migración de células endoteliales.

Bussolati y cols.⁵⁴ en un estudio realizado en células endoteliales de vena umbilical humana, observaron que la liberación de NO estimulada por VEGF se inhibía por bloqueo del receptor VEGFR-1 y que el VEGFR-1 vía NO regulaba negativamente la proliferación celular endotelial mediada por VEGFR-2.

Carmeliet P y cols.⁴² han descrito que el VEGFR-1 incrementaba la señal producida por la unión VEGF/VEGFR-2 durante la angiogénesis en bastantes condiciones patológicas.

Se ha comunicado que el **VEGFR-2**, proteína de 200-230 KDa, tenía afinidad por el VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y svVEGF³². Se ha visto que se expresaba por las células endoteliales vasculares, siendo considerado el marcador más precoz de los precursores de células endoteliales⁵⁵. Ha sido descrito que los neumocitos tipo II, los progenitores de células hematopoyéticas y las células tumorales también expresaban VEGFR-2¹³. Además se ha encontrado expresión de VEGFR-2 en células endoteliales linfáticas pudiendo estar implicado en la linfangiogénesis⁵⁶.

Desde su identificación por Terman y cols.⁴⁶ el VEGFR-2 ha sido relacionado en la mayoría de los efectos del VEGF en las células endoteliales como proliferación celular, producción de NO y prostaciclina, angiogénesis y permeabilidad vascular^{13,25,57}. En contraste, como se ha descrito anteriormente, la activación del VEGFR-1 no inducía proliferación de células endoteliales⁵⁷.

Ratones sin VEGFR-2 se morían siendo embriones, con ausencia de vasculogénesis y angiogénesis, lo que ha indicado el papel fundamental del VEGFR-2 en la biología vascular⁵⁸.

Ha sido descrito que la activación del VEGFR-2 daba lugar a la autofosforilación de varios residuos de tirosina en el dominio quinasa, entre ellos los residuos de tirosina 1175 y 1214^{32,59}, seguido por la unión de proteínas que contenían el dominio Src homólogo-2 con fosfotirosinas. Se ha comunicado que el VEGFR-2 desencadenaba la proliferación celular implicando la activación de la vía Erk y la asociación con cadherina vascular-endotelial. El VEGFR-2 mediaba la activación del fosfatidilinositol 3 quinasa / vía Akt que mediaba a su vez, la supervivencia celular endotelial. La unión del ligando a VEGFR-2 era seguida de activación de quinasas de adhesión focal, p38 MAPK, y paxilina, esto capacitaba para la migración de células endoteliales. La permeabilidad inducida por VEGF estaba mediada por su interacción con Src, la activación de p38 MAPK y por la activación de la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS)^{13,25,32,60} (Fig.1).

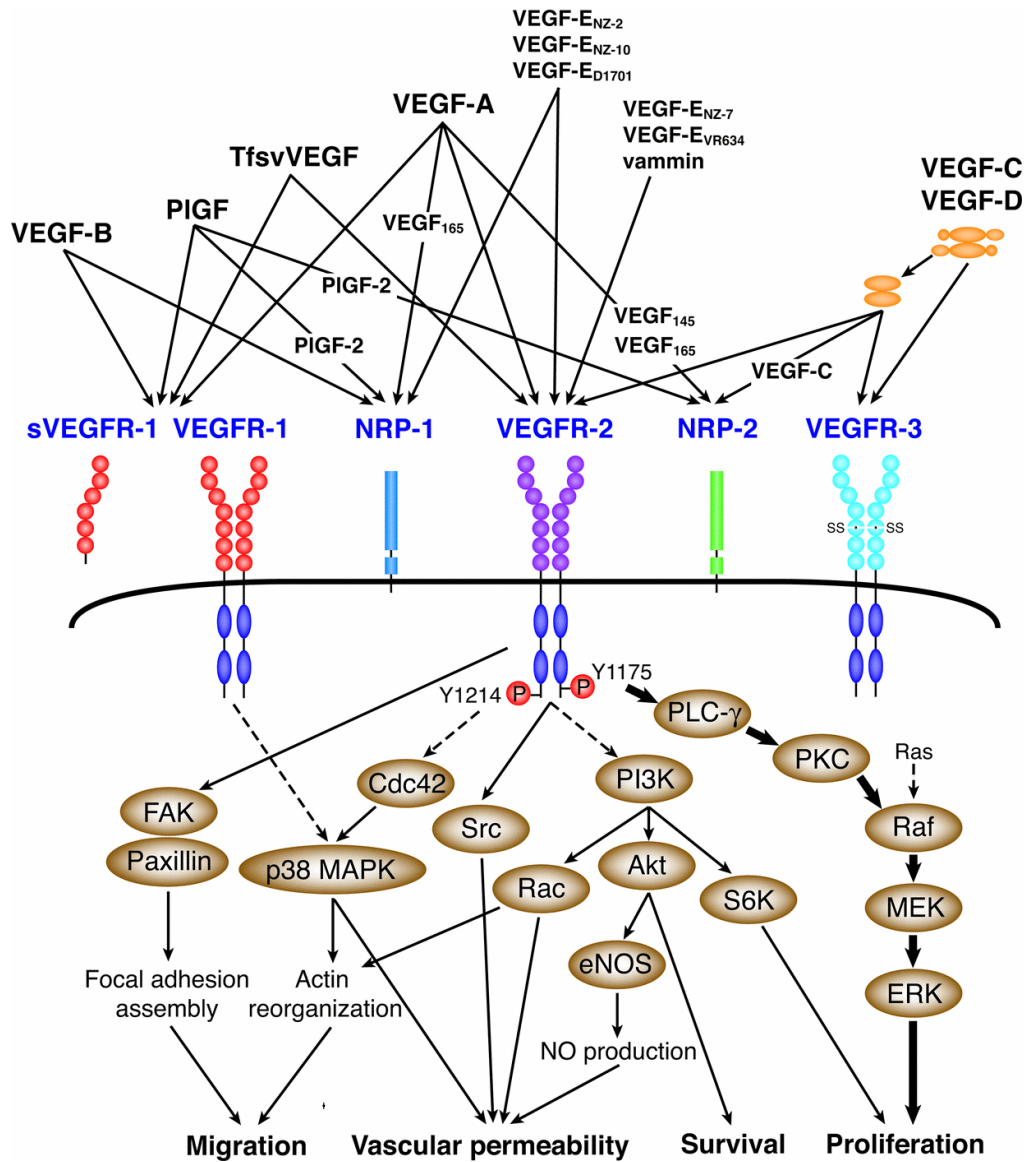


Figura 1: Señalización celular inducida por VEGF. Tomada de: Takahashi³² pág. 230.

Shen y cols.⁶¹ observaron que existía sinergismo entre el VEGF, a través de su acción sobre el receptor VEGFR-2, y el TNF α (factor de necrosis tumoral α) estimulando el factor tisular (TF) en células endoteliales humanas que podía ser crítico en la angiogénesis fisiológica. El incremento de TF podía facilitar la migración celular, siendo un paso importante en la formación de vasos.

El VEGFR-3 se ha incluido como miembro de la misma familia pero sólo se unía al VEGF-C y VEGF-D y se expresaba predominantemente en el endotelio de vasos linfáticos^{18,25,35,47}. MaKinen y cols.⁶² observaron que la sobreexpresión del VEGFR-3 soluble en la piel de ratón inhibía la

linfangiogénesis fetal e inducía una regresión de vasos linfáticos ya formados. Además la expresión de VEGFR-3 mutante específico para VEGF-C, en la piel inducía el crecimiento de vasos linfáticos sin influir en la arquitectura de vasos sanguíneos indicando que la estimulación del VEGFR-3 era suficiente para inducir linfangiogénesis. La estimulación del VEGFR-3 también protegía a las células endoteliales linfáticas de la apoptosis⁶³.

La **Neurofilina-1**, una glicoproteína de superficie celular de 130-140 KDa, se identificó en principio como receptor para semaforinas en el sistema nervioso⁶⁴, era también un receptor para isoformas de VEGF y PlGF³².

Se ha comunicado que la neurofilina-1 incrementaba la efectividad de la señal de transducción de VEGFR-2^{18,25,65}. Recientes estudios han mostrado que este efecto era resultado de la formación de un complejo VEGFR-2 y Neurofilina-1^{66,67}.

1.2.3. Regulación del VEGF

Se ha comunicado que la expresión genética del VEGF estaba regulada por muchos factores^{18,29} incluida la hipoxia que era un fuerte inductor del VEGF, incrementando la transcripción genética y la estabilidad del ARN^{4,20,25}, factores de crecimiento, citoquinas y otras moléculas extracelulares¹⁸.

El VEGF se ha descrito como miembro prototipo de genes que induce la hipoxia. La transcripción del ARNm del VEGF inducida por la hipoxia se ha mostrado que estaba mediada por la unión del factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1) al sitio de unión del HIF-1 en el promotor del VEGF⁶⁸.

El HIF-1 fue descrito originalmente como un mediador crítico para inducir la expresión del gen de la eritropoyetina por la hipoxia y se ha mostrado que activa la transcripción de muchos genes incluyendo la tirosina hidroxilasa, la óxido nítrico sintetasa y varios enzimas glicolíticos de un modo hipoxia dependiente^{69,70,70,71}.

El HIF-1 se ha visto que tenía un papel importante en la angiogénesis activando la transcripción de los genes que codificaban los factores de crecimiento incluyendo VEGF, angiopoyetina-1 y angiopoyetina 2, el factor de crecimiento de la placenta (PlGF) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)⁷².

Ha sido descrito que el control transcripcional del VEGF residía en una región llave del promotor a aproximadamente -930 desde el lugar de inicio de transcripción en una región de 50-bp que reaccionaba a la hipoxia, a oncoproteínas como el c-Myc y a activadores del factor de crecimiento^{18,70,73}.

Se ha observado que ratones que carecían de HIF-1 tenían una elevada letalidad en la mitad de la gestación y que se asociaba con una gran regresión vascular debida a una extensa apoptosis de células endoteliales⁷⁴.

Además de la inducción del gen de transcripción del VEGF se ha mostrado que la hipoxia también promovía la estabilización del ARNm del VEGF, que era lábil bajo condiciones de tensión normal de oxígeno, mediante proteínas que se unían a secuencias localizadas en la región 3' del VEGF ARNm^{75,76}. También se ha visto evidencia de que la elevación de la transcripción de VEGF ARNm mediada por hipoxia estaba también regulada por sitios que se encontraban en la región 5' del VEGF ARNm⁶⁸. Además del sitio de unión del HIF-1, en la región promotora del VEGF, han sido descritos muchos sitios de unión de factores de transcripción como AP-1, AP-2, Egr-1, Sp-1 y muchos otros que estaban implicados en la regulación de la transcripción del VEGF^{77,78}.

Masatsugu Ema y cols.⁶⁹ aislaron el ADNc que codificaba la proteína que denominaron HLF (factor similar al factor inducible por la hipoxia) o HIF-2 α , factor de transcripción muy relacionado a HIF-1.

En el pulmón en desarrollo la expresión de ARNm del HLF fue encontrada paralelamente a la expresión de ARNm del VEGF mientras que los bajos niveles de ARNm del HIF-1 α no cambiaban. Estos resultados sugirieron que el HLF podía inducir la transcripción del gen VEGF en condiciones de normoxia^{20,69,79}.

Se ha visto que el HLF se expresaba abundantemente en el núcleo de neumocitos alveolares y en las células endoteliales y mesenquimales, mientras que el HIF-1 α se ha detectado en el epitelio bronquiolar⁸⁰. Estos autores observaron que la hipoxia también podía activar el HLF y que la delección del gen HLF causaba distrés respiratorio y muerte al nacimiento en ratones.

Ha sido mostrado que el gen humano VEGF contenía sitios de unión para factores de crecimiento como: el factor de crecimiento epidérmico (EGF),

el factor de crecimiento de transformación α (TGF- α) y β (TGF- β), el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), que actuarían como factores de transcripción^{13,18,22,25,68,81}.

Estas observaciones han sugerido la relación paracrina o autocrina de factores cooperantes con la hipoxia local en la regulación del VEGF^{18,25}.

Finalmente se ha visto que la prostaglandina E₂, los estrógenos¹³, la hormona estimulante del tiroides (TSH) y la hormona adrenocorticotropa (ACTH) podían también incrementar la expresión del ARNm del VEGF¹⁸.

1.2.4. Regulación de los receptores del VEGF

Se ha encontrado que el promotor del VEGFR-1 incluía un sitio de unión para el HIF⁸². En cambio aunque la hipoxia incrementaba la expresión genética de VEGFR-2, en el promotor de este receptor, en ratones y en humanos no se encontraron elementos relacionados con HIF, sugiriendo que la hipoxia estimulaba posiblemente de forma indirecta la expresión del VEGFR-2, posiblemente vía generación y acción del factor de necrosis tumoral α (TNF- α)¹³. Waltenberger y cols.⁸³ documentaron que la hipoxia daba lugar a incremento de la estabilidad del ARNm de VEGFR-2.

El VEGF podía incrementar los receptores VEGFR-2 y VEGFR-1 in vitro como se ha mostrado en estudios realizados por Shen y cols.⁸² en cultivos de células donde observaron que el tratamiento con VEGF incrementaba la expresión del VEGFR-2 incrementando su transcripción genética y su acción era a través del propio receptor VEGFR-2. También observaron que el NO regulaba negativamente la expresión del VEGFR-2.

1.2.5. Interdependencia del VEGF con otros factores angiogénicos

El desarrollo vascular sería el resultado de la colaboración entre tres familias de factores de crecimiento: VEGFs, angiopoyetinas y efrinas.

El VEGF iniciaba la formación de vasos por vasculogénesis y angiogénesis, la angiopoyetina-1 y efrina B₂ se requerían para la remodelación y maduración de los vasos inmaduros iniciales, habiéndose visto que era

importante que todos estos factores colaborasen en perfecta armonía para la formación de vasos funcionales^{2,4,18,29}. Ha sido mostrado que la angiopoyetina-1 se unía al receptor TIE-2 del endotelio y estimulaba la señal de transducción responsable de la estabilización y maduración de los vasos sanguíneos⁸⁴, también se ha asociado con el reclutamiento y mantenimiento de la asociación de células de soporte periendoteliales⁸⁵.

B Thébaud y cols.² observaron capilares más maduros y menos permeables cuando realizaron terapia génica combinada con genes de VEGF y angiopoyetina-1 que sólo con el gen de VEGF en ratas expuestas a hiperoxia durante el desarrollo pulmonar.

La angiopoyetina-1 y su receptor TIE-2 (receptor tirosina quinasa) se ha mostrado que estaban incrementados durante el desarrollo pulmonar. Ha sido observado en animales que carecían de angiopoyetina-1 y de TIE-2 que fallecían con anomalías vasculares en el desarrollo embrionario precoz^{86,87}.

Thurston y cols.⁸⁸ administraron angiopoyetina I recombinante a ratones recién nacidos y a ratones adultos. Observaron que la angiopoyetina inducía un aumento de la circunferencia vascular, de modo específico en venas. Esta acción era debida a la posibilidad de que la angiopoyetina actuaba como promotor de la proliferación de células endoteliales en ausencia de brotes vasculares, esta acción la observaron sólo durante el periodo postnatal, previo a la cuarta semana, definiéndose una ventana crítica de plasticidad vascular en el desarrollo neonatal.

Por otro lado se ha descrito que la angiopoyetina-2 tenía alta afinidad por el TIE-2 y podía actuar como antagonista de TIE-2. En las células epiteliales alveolares la expresión de angiopoyetina -2 era inducida por la hiperoxia y se ha visto que el daño oxidativo, la muerte celular, la inflamación, la permeabilidad y la mortalidad estaban descendidos en ratones sin angiopoyetina-2⁴.

También se ha comunicado que EMAP II (polipéptido II activador de monocitos endoteliales), una proteína anti-angiogénica, tenía un papel durante el desarrollo alveolar como regulador negativo de la formación vascular. Ha sido observado que EMAP II se mantenía en niveles de expresión bajos durante la vida postnatal y en el adulto, con la excepción de una oleada que se correlacionaba con la maduración microvascular, sugiriéndose que el

crecimiento vascular era regulado negativamente cuando sucedía la fusión de la red de doble capilar en uno sólo¹⁶. Ha sido mostrado un incremento de EMAP II en el tejido pulmonar de niños con displasia broncopulmonar así como en modelo de corderos prematuros, sugiriendo que esta proteína contribuía a la interrupción del desarrollo vascular de la displasia broncopulmonar⁸⁹.

1.2.6. VEGF y sus receptores en el desarrollo embrionario

Durante el desarrollo embrionario, la expresión del VEGF ha sido detectada, en los primeros días después de la implantación, en las células gigantes del trofoblasto, sugiriendo un papel de este factor en la inducción del crecimiento vascular en la decidua, placenta y membranas vasculares. Más tarde en los estados de desarrollo en embriones de ratón o rata, el ARNm del VEGF se ha visto expresado en muchos órganos incluyendo corazón, columna vertebral, pulmón, riñón y en la médula espinal y cerebro^{90,91}.

En el feto humano (16-22 semanas) la expresión del ARNm del VEGF se ha detectado en todos los tejidos siendo más abundante en pulmón, riñón y bazo⁹².

Estudios de hibridación in situ han mostrado la expresión del ARNm de VEGFR-2 en el saco vitelino y en el mesodermo intraembrionario primero y más tarde en los angioblastos, endocardio y endotelio de pequeños y grandes vasos^{50,93}. Otros estudios han demostrado que la expresión de ARNm del VEGFR-2 era primero detectada en el mesodermo proximal-lateral embrionario que daba lugar al corazón. Se ha sugerido que el VEGFR-2 podía ser el marcador más precoz de los precursores de células endoteliales⁵⁵.

Flamme y cols.⁹⁴ identificaron el VEGF y su receptor VEGFR-2 en el embrión de codorniz cuyo modelo de expresión era consistente con el modelo encontrado durante la embriogénesis de ratón, este modelo de expresión durante la embriogénesis en diferentes especies ha sugerido un mayor papel del sistema de transducción VEGF/VEGFR-2 en la vasculogénesis y angiogénesis.

1.2.7. Papel del VEGF en el desarrollo pulmonar

La vía de señalización del VEGF se ha mostrado como fundamental en la vasculogénesis, particularmente durante el desarrollo fetal pulmonar^{13,17}. La expresión de VEGF y VEGFR-2 se ha demostrado en vías aéreas tubulares y

en células mesenquimales vasculares durante el desarrollo fetal e in vitro en cultivos que contenían elementos epiteliales y mesenquimales de pulmón fetal¹⁷.

Maniscalco y cols.²⁹ encontraron en monos una asociación temporal entre el incremento de PECAM-1 (molécula de adhesión plaquetaria de células endoteliales) y el incremento de VEGF sugiriendo un papel en la vasculogénesis pulmonar.

La máxima expresión del VEGF en neumocitos tipo II de ratón se ha visto que es durante la fase canalicular, después descendía hasta alcanzar niveles que se mantenían en la vida adulta³⁷.

Lassus y cols.⁹⁵ encontraron una mayor concentración de VEGF en aspirado traqueal de niños pretérmino que en el de niños que han nacido a término. Levy y cols.⁹⁶ encontraron en pulmón fetal que la expresión del VEGF era mayor en las fases canalicular y sacular.

En estudios realizados por Bhatt y cols.²⁰ en un modelo en ratones, la cantidad de ARNm del VEGF se triplicó durante las primeras dos semanas postnatales, fase de alveolización y expansión de la microvascularización. La cantidad de ARNm del VEGFR-2 se incrementó en paralelo. En estos estudios por hibridación in situ se mostró que el VEGF ARNm estaba localizado principalmente en las células epiteliales de los espacios aéreos distales.

La expresión de ARNm del VEGFR-1 y VEGFR-2 también se incrementó durante el desarrollo pulmonar normal en ratón^{8,17} y estos receptores se localizaron en las células endoteliales de los vasos pulmonares en proximidad al epitelio en desarrollo³⁷. Esta relación espacial sugirió que el VEGF jugaba un importante papel en el desarrollo del lecho capilar alveolar^{2,4}.

Del Moral y cols.⁹⁷ mostraron que el VEGF₁₆₄ exógeno inducía la morfogénesis bronquial en cultivos de pulmón embrionario de ratón. El efecto del VEGF sobre el epitelio debía ser de forma indirecta por interrelación con el mesénquima ya que sólo encontraron expresión de VEGFR-2 en células mesenquimales.

La expresión del ARNm de VEGF y de la proteína VEGF se localizó en las células epiteliales distales en el pulmón fetal humano en el segundo semestre de gestación¹⁹ y sus niveles aumentaron con el tiempo.

Más recientemente FA Groenman y cols.⁹⁸ observaron la expresión de VEGF en el epitelio en el primer trimestre de gestación en humanos, así como la expresión de VEGFR-2 en células mesenquimales adyacentes al epitelio y en estructuras vasculares del mesénquima.

Zhao y cols.⁹⁹ en un modelo en ratones con injertos pulmonares en la cápsula renal, determinaron la función del VEGF en la formación pulmonar. Inhibiendo el VEGF observaron una inhibición del desarrollo vascular y una alteración significativa del desarrollo epitelial existiendo una diferenciación celular normal.

La ausencia de las isoformas VEGF₁₆₄ y VEGF₁₈₈ dieron lugar a un descenso en el desarrollo vascular periférico y un retraso en la formación de espacios aéreos en pulmones de ratón¹⁴.

Se ha visto que la inhibición de VEGF daba lugar a una inhibición de la angiogénesis y alveolización en el desarrollo pulmonar en ratas. Además el bloqueo durante periodos cortos de tiempo del VEGF también reducía el número de islotes sanguíneos y de células endoteliales que expresaban VEGFR-2¹³.

B Thébaud y cols.² realizaron estudios in vitro e in vivo en pulmón de rata mostrando que la inhibición de la señal de VEGF detenía la alveolización dando un modelo similar a la displasia broncopulmonar y al enfisema.

Empleando el bloqueante Su-5416 del receptor de VEGF antes o después del nacimiento daba lugar a una vascularización pulmonar y alveolización reducidas^{3,14,100}.

Por otra parte la sobreexpresión del VEGF₁₆₄ en el epitelio de la vía aérea distal durante el desarrollo pulmonar daba lugar a un incremento¹⁰¹ o disminución de la vascularización peritubular¹⁰², dependiendo del momento de sobreexpresión. En estos estudios también se vieron alteraciones en la morfogénesis pulmonar.

Se han detectado altos niveles de proteína VEGF y de ARNm de VEGF en el desarrollo pulmonar, teniendo el VEGF un papel central en la formación de los vasos pulmonares y también en las interacciones epitelio-endotelio que eran críticas para el desarrollo pulmonar normal^{18,19,99}.

Se ha establecido un lazo regulador en el cual el VEGF derivado del epitelio, inducía el desarrollo vascular y el endotelio reenviaría señales

directamente o indirectamente vía el compartimento mesenquimal, que estimulaban la diferenciación y bifurcación epitelial¹⁴.

Según los estudios de Yamamoto y cols.¹⁰³ la formación de septos primarios dependía de las interacciones entre el epitelio respiratorio y los vasos subyacentes, estableciendo la dependencia del desarrollo capilar pulmonar con el VEGF-A derivado del epitelio. Además mostraron que el HGF (factor de crecimiento del hepatocito), factor derivado del endotelio, mediaba la señal recíproca desde los vasos al epitelio respiratorio para la adecuada formación de septos primarios, existiendo una malformación de estos septos si se producía una delección selectiva del gen del receptor de HGF.

Brown y cols.⁶⁵ en un estudio in vitro con cultivos celulares de pulmón humano en el segundo semestre, hallaron receptor VEGFR-2 y Neurofilina I en las células epiteliales, sugiriendo un posible papel autocrino del VEGF en la proliferación y diferenciación de células epiteliales alveolares humanas. Además mostraron que con VEGF exógeno se incrementaban parámetros de diferenciación tisular y proliferaban las células epiteliales de la vía aérea distal teniendo morfología de neumocitos tipo II e incrementándose la producción de distintos componentes del surfactante.

El VEGF estimulaba la producción de surfactante pulmonar por los neumocitos tipo II^{13,18,23,25,60} dando lugar a una maduración pulmonar y a la prevención del desarrollo del síndrome de distrés respiratorio del recién nacido¹⁸.

Compernelle y cols.⁸⁰ realizaron un estudio en ratones prematuros donde observaron un incremento en la producción de proteínas del surfactante B y C después del tratamiento con VEGF, mostrando que las células tipo II expresaban VEGFR-2. Aunque los mecanismos precisos por los que el VEGF estimulaba la síntesis de surfactante aún no han sido bien determinados, parece que el VEGF estimulaba la síntesis del Factor Activador de Plaquetas (PAF), un potente inductor de glucogenolisis en el pulmón fetal y que activaba la proteína quinasa C, un regulador central de la secreción de surfactante y del metabolismo del glucógeno.

Ha sido mostrado¹⁰⁴ que la supresión del VEGF daba lugar a muerte celular endotelial sugiriendo que el VEGF podía ser también un factor de supervivencia para células endoteliales.

1.2.8. VEGF en el pulmón

Aunque el VEGF ha sido caracterizado como mitógeno para células endoteliales vasculares, muchos estudios han identificado la presencia del VEGF en distintos tipos de células en muchos órganos. Se ha descrito que el pulmón presentaba el más alto nivel de expresión del gen VEGF habiéndose detectado el VEGF y sus receptores en neumocitos tipo II, células epiteliales de las vías aéreas, células mesenquimales, células de músculo liso de la vía aérea y vasculares, macrófagos y neutrófilos^{18,95,105}. Los altos niveles de proteína VEGF en el epitelio respiratorio tenían una función de reservorio fisiológico¹⁸. En el pulmón, el ARNm de VEGF y la proteína también se han localizado en la membrana basal subyacente a las células epiteliales^{2,4,28,65}

Soportando la teoría de la importancia de los neumocitos tipo II como origen del VEGF en el pulmón se ha demostrado la expresión de ARNm para VEGF en una subpoblación de neumocitos tipo II en pulmón de conejo y la producción de ARNm para VEGF por parte de los neumocitos tipo II en el adulto durante la recuperación del daño hiperóxico¹⁹.

El VEGF se ha detectado en muchas clases de fluidos biológicos y células del parénquima pulmonar siendo considerablemente más altos los niveles de VEGF en fluidos broncoalveolares que en sangre, teniendo un papel en la biología del endotelio pulmonar normal¹⁸.

Se ha demostrado la importancia del VEGF en las funciones de las células endoteliales sobre la síntesis de óxido nítrico (NO) y prostaciclina (PGI₂)¹⁰⁶, así como la función de estas sustancias sobre la vasodilatación en la circulación pulmonar¹⁰⁷. El VEGF activaba la NO sintetasa de las células endoteliales que a su vez mediaba en los efectos proangiogénicos del VEGF¹⁰⁸. El NO también mediaba en los efectos de permeabilidad del VEGF¹⁰⁹, posiblemente implicando a Src o Yes quinasas. Las propiedades de supervivencia del VEGF se han relacionado con la activación de Bcl-2¹¹⁰, survivina, inhibidores de la apoptosis¹¹¹, y las propiedades de morfogénesis vascular con la actividad de la quinasa ligada a la integrina¹¹² y con el factor de respuesta sérica¹¹³.

Se ha visto que el incremento de los niveles pulmonares fetales de VEGF, VEGFR-1 y VEGFR-2 continuaba en el pulmón perinatal,

duplicándose los niveles aproximadamente al día 6 postnatal, y esto era paralelo en roedores⁷⁹. Sin embargo durante el periodo crítico de adaptación pulmonar a la vida postnatal, se requerían unos niveles normales de VEGF en el pulmón y una señalización de VEGFR-2 normal como han demostrado los estudios de Voelkel y cols.¹³ que observaron que la neutralización de VEGFR-2 con un anticuerpo monoclonal durante la primera semana de vida causaba daño alveolar. Le Cras y cols.¹¹⁴ mostraron que grandes incrementos en la expresión genética de VEGF pulmonar en ratones recién nacidos daban lugar a pérdida de la integridad de la barrera alveolo capilar, hemorragia pulmonar, hemosiderosis, enfisema y simplificación alveolar, presentando estos ratones incremento de distrés respiratorio e incremento de la mortalidad.

En un estudio realizado por Bhatt y cols.²⁰ en un modelo de ratón encontraron mayores niveles de ARNm del VEGF en el pulmón adulto que en el pulmón en desarrollo, sugiriendo un posible papel en el mantenimiento de la microvascularización normal y en la integridad de la ya establecida barrera aire-sangre. En este sentido se ha demostrado que el tratamiento crónico en ratas adultas con SU5416, bloqueador de los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2, daba lugar a enfisema, sugiriendo que el VEGF se requería también para el mantenimiento de las estructuras alveolares y vasculares pulmonares en el adulto¹¹⁵.

En estado de enfermedad, la expresión del VEGF y sus receptores se ha visto afectada y a menudo se ha relacionado con la patofisiología y las características particulares de cada enfermedad por lo que el VEGF en el pulmón, según Andriana I Papaioannou, sería un buen amigo si estaba presente en el lugar adecuado, en la cantidad adecuada y en el tiempo adecuado¹⁸.

1.2.9. Papel del VEGF en el síndrome de distrés respiratorio

En el síndrome de distrés respiratorio, el VEGF tenía un papel importante aunque controvertido¹¹⁶, regulando la permeabilidad vascular y la supervivencia de las células endoteliales. Tanto en modelos de animales como en humanos con distrés respiratorio, se ha observado que bajos niveles de VEGF en el pulmón se asociaban con un peor pronóstico¹¹⁷⁻¹¹⁹. Mura y cols.¹¹⁶ observaron, en un modelo de daño pulmonar agudo en ratones adultos, que

existían cambios dinámicos en la expresión de VEGF y sus receptores con un incremento inicial y posteriormente una reducción en la expresión.

Según Kaner y cols.¹²⁰, Karpaliotis y cols.¹²¹ y Becker y cols.¹²², la sobreexpresión del VEGF tenía un papel importante en el desarrollo de edema pulmonar, regulando directamente la permeabilidad vascular para el agua y proteínas. Sin embargo otros estudios en animales y en humanos han mostrado un papel protector del VEGF en el síndrome de distrés respiratorio^{35,117,118}.

En los estadios iniciales los diferentes agentes que producen daño pulmonar y las citocinas proinflamatorias estimulaban la producción y liberación del VEGF desde las células tipo II, macrófagos alveolares y neutrófilos^{13,18,23}. Por tanto, la barrera epitelial-endotelial estaba expuesta a altas concentraciones de VEGF, que incrementaba la permeabilidad vascular y daba lugar a edema intersticial^{13,18}.

Durante el desarrollo del daño pulmonar, la alteración de las células epiteliales alveolares reducía la producción de VEGF y disminuía la detección en el lavado broncoalveolar¹⁸. En esta misma línea Fehrenbach y cols.¹²³ mostraron, en un modelo de isquemia reperfusión en ratas, un descenso en la expresión de VEGF sobre todo por daño en las células alveolares tipo II.

La liberación de VEGF desde otros órganos y de los leucocitos circulantes podía contribuir a la elevación de la concentración sérica en pacientes con síndrome de distrés respiratorio. Posteriormente durante la recuperación del daño pulmonar las células alveolares se reparaban e incrementaban la producción local de VEGF con un papel importante en la reparación y angiogénesis a través del receptor VEGFR-2¹⁸. En este sentido se ha visto que la producción de VEGF estimulada por IL-13 en ratones transgénicos, conducía a una protección después del daño pulmonar por hiperoxia aguda¹¹⁹.

En niños pretérmino, hijos de madre con rotura prematura de membranas o corioamnionitis, se ha observado que los niveles de VEGF en el pulmón estaban incrementados e influían en la maduración pulmonar y en el menor distrés respiratorio, y los niveles de VEGF en aspirado traqueal eran más bajos en los que tenían distrés respiratorio más severo²³. Grover y cols.¹²⁴ en un modelo de distrés respiratorio severo en corderos pretérmino, hallaron una disminución en la expresión de las proteínas HIF-1 α , HIF-2 α y de ARNm

de VEGF, encontrando duplicado el dominio prolil hidroxilasa-2 (PHD-2). La actividad de la prolil hidroxilasa se ha mostrado que era necesaria para la degradación de HIF³⁶.

Compernelle y cols.⁸⁰ demostraron, en ratones pretérmino, que HIF-2 α y VEGF eran críticos para la maduración pulmonar fetal. La pérdida de HIF-2 α , la ausencia de isoformas críticas de VEGF o la inhibición de VEGF en el útero detenían la maduración pulmonar y causaban síndrome de distrés respiratorio al nacimiento debido a una producción insuficiente de surfactante. Encontraron que cuando administraban VEGF intra-amniótico a fetos o VEGF intratraqueal después del nacimiento, el VEGF incrementaba la conversión de glucógeno almacenado a surfactante, mejorando la función pulmonar. Al mismo tiempo protegía a los ratones extremadamente prematuros de desarrollar distrés respiratorio severo y prolongaba su supervivencia. En este estudio obtuvieron una eficiencia comparable al tratamiento con glucocorticoides prenatales pero sin sus efectos adversos.

El resultado de la actividad biológica del VEGF, en el síndrome de distrés respiratorio, dependía de las condiciones fisiopatológicas, del tiempo y del grado de daño endotelial y epitelial. El VEGF podía ser la causa del desarrollo de distrés respiratorio o por el contrario un mediador para su recuperación^{18,125}.

1.2.10. VEGF en la hipertensión pulmonar

La implicación de factores endoteliales en la alta resistencia vascular pulmonar fetal ha sido ampliamente estudiada en animales estando su ontogenia poco estudiada en el pulmón fetal humano. La máxima expresión de eNOS y VEGF justo antes del estado alveolar del desarrollo pulmonar indicaba un papel clave de estos dos mediadores en la maduración pulmonar. En el periodo perinatal se ha observado que la expresión de eNOS y VEGF era muy baja y la expresión de endotelina-1 y sus receptores muy alta. Esto sugería que mediadores diferentes al NO participaban en la gran vasodilatación pulmonar del recién nacido humano. Receptores ET-B, fuertemente expresados en el pulmón humano desde la mitad de la gestación hasta el nacimiento se ha visto que tenían efectos vasodilatadores en el recién nacido. Se ha mostrado que canales de K sensibles a ATP mediaban la vasorelajación en animales recién

nacidos y eran muy expresados en el desarrollo pulmonar humano, pero su papel en la adaptación de la resistencia vascular pulmonar al nacimiento aún no ha sido establecido^{96,126}.

Los mecanismos responsables de la caída de la resistencia vascular postnatal han sido muy discutidos pero parece ser que la rápida dilatación inicial de los vasos pulmonares estaría estimulada por la ventilación mecánica y por la tensión de oxígeno^{1,127}.

Le Cras y cols.¹²⁸ observaron que el tratamiento con una sola dosis de SU-5416, inhibidor del VEGF, a ratas recién nacidas el primer día de vida era la causa de hipertensión pulmonar severa a las tres semanas de edad y que persistía en el adulto. Sus estudios han sugerido que la disrupción precoz de la señalización del VEGF en el pulmón del recién nacido podía contribuir a una predisposición a hipertensión pulmonar del adulto a largo plazo.

Muchos estudios han sugerido un papel importante del VEGF en la patogénesis de la hipertensión pulmonar^{127,129-133}; sin embargo hay otros estudios que han sugerido que el VEGF era importante en atenuar el desarrollo de hipertensión pulmonar, posiblemente protegiendo las células endoteliales de la lesión y apoptosis^{134,135}.

El VEGF y sus receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 jugaban un papel importante en las lesiones plexiformes que se veían en los pulmones con hipertensión pulmonar^{136,137} y podían tener un papel en la patogénesis de la hipertensión pulmonar estimulando una angiogénesis disregular¹³⁶. La carencia de VEGF causaba la muerte de células endoteliales por daño en la vía de los receptores tirosina quinasa y la sobreexpresión experimental de VEGF producía estructuras que parecían lesiones plexiformes¹³².

También se ha propuesto al VEGF como protector en el desarrollo de hipertensión pulmonar ya que estimulaba la liberación de NO desde el endotelio vascular e incrementaba la expresión de la NO sintetasa¹³⁸. El óxido nítrico ayudaba a modular la resistencia vascular pulmonar en el útero y contribuía a la caída postnatal en la resistencia^{1,127}.

En un estudio realizado en corderos, Grover y cols.¹³⁰ mostraron una reducción de la expresión de VEGF pulmonar en un modelo experimental de hipertensión pulmonar persistente del recién nacido. Además mostraron que la

inhibición selectiva de la isoforma 165 del VEGF sería la causa de la hipertensión pulmonar.

Recientes estudios¹²⁷ han mostrado que el daño en la vía de señalización de VEGF podía contribuir a la patogénesis de la hipertensión pulmonar. La disminución de la expresión pulmonar del VEGF descrita en su modelo experimental de hipertensión pulmonar en ovejas, sería la causa de las anomalías estructurales y funcionales que encontraban y observaron que la mejoría de la hipertensión pulmonar en el tratamiento con VEGF se producía a través de la estimulación de producción de NO.

1.2.11 VEGF y displasia broncopulmonar

La primera definición de displasia broncopulmonar fue dada por Northway en 1967¹³⁹ como: enfermedad pulmonar crónica durante la infancia a consecuencia de la terapia con ventilación mecánica y oxígeno, para el síndrome de distrés respiratorio, después del nacimiento prematuro. Tradicionalmente la displasia broncopulmonar ha sido definida por la persistencia de signos y síntomas respiratorios, la necesidad de oxígeno suplementario para tratar la hipoxemia, y alteraciones radiológicas a la semana 36 de edad corregida.

Con las nuevas posibilidades terapéuticas la displasia broncopulmonar se ha visto que afecta a niños pretérmino muy inmaduros, y se ha sugerido que su patogénesis era más por una detención del desarrollo pulmonar normal que por volutrauma o inflamación¹⁴⁰. La hipoplasia alveolar y los cambios dismórficos de la microvascularización pulmonar han sido hallazgos consistentes en los modelos animales de displasia broncopulmonar y en necropsias de niños que habían fallecido con displasia broncopulmonar^{29,141-144}.

Dentro de los mecanismos que detienen el desarrollo alveolar en la displasia broncopulmonar han sido implicados: el estrés oxidativo, la ventilación mecánica, factores proinflamatorios, glucocorticoides, péptidos similares a la bombesina y la pobre nutrición^{140,145}.

Los niños prematuros presentaban una microvascularización no desarrollada y el daño pulmonar por hiperoxia y citoquinas inflamatorias eran tóxicas para las células endoteliales¹⁴⁶⁻¹⁴⁹. Teniendo en cuenta el papel crítico de las células endoteliales durante el desarrollo pulmonar, las estrategias que

alteraban la señal del VEGF durante la etapa fetal y perinatal darían lugar a displasia broncopulmonar^{13,100}.

La importancia del VEGF durante el crecimiento del pulmón fetal ha conducido a la teoría vascular de la displasia broncopulmonar, que ha tenido una importancia considerable en el daño pulmonar debido a la prematuridad, ventilación mecánica y tratamiento con hiperoxia durante la vida perinatal¹³.

La histología pulmonar predominante en la autopsia de los niños con displasia broncopulmonar se ha caracterizado por una detención en el desarrollo pulmonar, incluyendo el desarrollo alveolar y el crecimiento vascular^{3,100,140,145,150,151}.

Bhatt y cols.¹⁴³ mostraron un descenso en la expresión de VEGF, VEGFR-1 y TIE-2 en pulmones de niños que habían fallecido con displasia broncopulmonar, y que presentaban capilares dismórficos, lo que sugirió una detención del desarrollo de la vascularización pulmonar.

Ambalavanam y Novak¹⁵² encontraron niveles menores de VEGF en el aspirado traqueal de niños pretérmino con ventilación mecánica, en las primeras 24 horas de vida, que desarrollaron displasia broncopulmonar respecto a los que no la desarrollaron. En cambio en el estudio realizado por Currie y cols.¹⁵³ en el lavado broncoalveolar al nacimiento de niños que desarrollaron displasia broncopulmonar comparado con niños que no la desarrollaron, el VEGF era indetectable al nacimiento y se incrementaba de un modo similar en ambos grupos.

Estudios experimentales en ratas han sugerido que la inhibición de la actividad del receptor del VEGF reducía la alveolización y el crecimiento vascular dando lugar a cambios histológicos en el pulmón que se asemejaban a los encontrados en la displasia broncopulmonar¹⁰⁰.

El descenso de VEGF en la displasia broncopulmonar tenía implicaciones en la supervivencia de las células endoteliales. Además el VEGF inhibía el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y por tanto la apoptosis de las células endoteliales¹⁴³. También se ha descrito que la inhibición de los receptores del VEGF en el pulmón inmaduro reducía la expresión de la óxido nítrico sintetasa (NOS) y de la bioactividad del óxido nítrico (NO) y más tarde contribuía al desarrollo del daño estructural y funcional de la displasia broncopulmonar^{18,100,154}.

B Thébaud y cols.² realizaron tratamiento mediante terapia génica intratraqueal con VEGF a ratas expuestas a hiperoxia durante el desarrollo pulmonar y observaron una mayor supervivencia y una preservación y restauración de la alveolización normal incluso cuando el tratamiento se realizaba estando ya instaurada la displasia broncopulmonar. La transferencia del gen del VEGF también incrementaba la expresión de la NO sintetasa, sugiriendo que parte de los efectos beneficiosos del VEGF podían ser mediados por NO.

Kunig y cols.^{3,151} realizaron tratamiento con VEGF recombinante humano a ratas recién nacidas durante y después de la exposición a la hiperoxia observando un aumento en el crecimiento vascular y mejorando la alveolización. El tratamiento con VEGF después del daño producido por hiperoxia en ratas recién nacidas mejoraba la alveolización, el crecimiento vascular y el crecimiento pulmonar y prevenía el desarrollo de displasia broncopulmonar.

En los estudios comentados anteriormente^{2,3}, el VEGF inducía capilares inmaduros, muy permeables y edema pulmonar. Sin embargo combinando la transferencia génica de VEGF y Angiopoyetina 1 se preservaba la alveolización y mejoraba la angiogénesis con más capilares maduros y menos permeables².

Estos estudios aumentarían nuevas posibilidades para el tratamiento de los niños con displasia broncopulmonar severa, con las reservas que conlleva la extrapolación de estos hallazgos en modelos de roedores al tratamiento de la enfermedad en humanos.

De Paepe y cols.¹⁴⁴, en niños con displasia broncopulmonar, han sugerido que los cambios en la arquitectura pulmonar no eran simplemente resultado de una disminución en la angiogénesis, describiendo un incremento en la densidad capilar pulmonar en niños que habían estado durante mucho tiempo con ventilación mecánica.

Akeson y cols.¹⁰² estudiaron ratones transgénicos que expresaban más VEGF₁₆₄ en células epiteliales de la vía aérea proximal y/o distal. Observaron que cuando la mayor expresión del VEGF₁₆₄ era en la vía aérea proximal no se produjeron alteraciones en la unión de las redes vasculares del pulmón, que si se produjeron cuando la expresión fue mayor en la vía aérea distal,

demostrando que se requería una expresión espacial precisa del VEGF-A para el adecuado desarrollo del modelo vascular durante la morfogénesis pulmonar, indicando que hay que tener precaución en el uso de VEGF como agente terapéutico en recién nacidos.

Diversos estudios han sugerido que el NO podía modular el crecimiento vascular y la alveolización en el feto¹⁵⁴⁻¹⁵⁷. Han mostrado un papel crítico de la señalización VEGF-NO durante el crecimiento y el desarrollo pulmonar a través de la modulación de la expresión de eNOS y la producción de NO. Se ha observado que el tratamiento con NO inhalado, preservaba la arquitectura alveolar en modelos experimentales de displasia broncopulmonar y disminuía la incidencia de displasia broncopulmonar en niños prematuros con fallo respiratorio^{2,154}.

Balasubramaniam y cols.¹⁵⁸ en un modelo en ratones observaron una reducción en la expresión del VEGF pulmonar, del VEGFR-2, de la NO sintetasa y del receptor de eritropoyetina cuando eran sometidos a hiperoxia en el periodo neonatal pero no en la edad adulta. Esta diferencia podía contribuir a la mayor susceptibilidad a la hiperoxia en el periodo de desarrollo pulmonar y al mayor daño en vasos pulmonares y crecimiento alveolar en la displasia broncopulmonar.

1.2.1.2. VEGF e hipoplasia pulmonar

La hipoplasia pulmonar se ha asociado clínicamente con anomalías de la vascularización y circulación pulmonar. Chinoy y cols.⁸⁴ en un modelo experimental de ratones con hipoplasia pulmonar observaron niveles significativamente menores de VEGF y de su receptor VEGFR-2 en los pulmones hipoplásicos comparados con los pulmones normales, sugiriendo que la inhibición del VEGF y de su receptor VEGFR-2 reducía la morfogénesis vascular pulmonar y contribuía a la formación de pulmones hipoplásicos.

1.3. OTROS FACTORES DE CRECIMIENTO

Además del VEGF, se han estudiado otros factores de crecimiento relacionados con el desarrollo pulmonar. El factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento del hepatocito (HGF) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas

(PDGF) han sido los factores más implicados. La señal de estos factores de crecimiento era través de los receptores transmembrana tirosina quinasa que daban lugar a un efecto positivo en la morfogénesis pulmonar. En contraste factores de crecimiento como los de la familia del factor de crecimiento transformador (TGF), cuya señal es a través de receptores transmembrana serina treonina quinasa, daban lugar a un efecto inhibitor en la proliferación de células epiteliales pulmonares y por tanto negativo en la regulación de la morfogénesis pulmonar¹⁵⁹.

1.4. HIPOXIA

1.4.1. Respuesta metabólica y ventilatoria a la hipoxia

La función esencial del pulmón es el intercambio gaseoso para satisfacer las necesidades de oxígeno del organismo y para la eliminación de dióxido de carbono producido por el metabolismo.

Se ha descrito que la hiperventilación era la primera respuesta que se daba ante la exposición a la hipoxia^{160,161}.

Cross y cols.¹⁶² hace 50 años mostraron que los recién nacidos expuestos a concentraciones menores de oxígeno ($FiO_2 = 0,15$) disminuían su consumo de oxígeno. Además observaron que este descenso de la tasa metabólica durante la hipoxia causaba un descenso de la temperatura corporal que era beneficioso para la supervivencia en ambiente hipóxico.

Estudios experimentales en mamíferos recién nacidos, llevados a cabo entre los años 1950 a 1960 mostraron que con niveles moderados de hipoxia también ocurría la situación de hipometabolismo¹⁶³.

Los recién nacidos de numerosas especies, entre ellas las ratas, tras los primeros 15-30 minutos de exposición a la hipoxia tenían hiperpnea y el volumen minuto pulmonar disminuía, como respuesta a la disminución del metabolismo, a este fenómeno se denominó “respuesta bifásica”¹⁶⁴.

Varias evidencias experimentales^{160,161,165} apoyaron la idea que el hipometabolismo que se daba en la hipoxia no era una respuesta forzada sino una respuesta regulada o “conformismo regulado”.

Se ha descrito que el metabolismo hipóxico era más marcado en especies pequeñas que tenían un consumo de oxígeno referido al peso corporal

más alto. Hill¹⁶³ fue la primera en demostrar el efecto de la edad y el tamaño en la magnitud del hipometabolismo durante la hipoxia.

Un factor que estaba implicado en el descenso del consumo de oxígeno durante la hipoxia era la inhibición de la termogénesis¹⁶⁶.

La respuesta ventilatoria a la hipoxia tras el nacimiento ha sido muy estudiada en el neonato a término¹⁶⁷, y especialmente en niños pretérmino¹⁶⁸. En ambos estudios durante la exposición a la hipoxia, los neonatos mostraban una respiración bifásica con un aumento de la frecuencia ventilatoria en los primeros minutos secundaria a la estimulación de quimiorreceptores, principalmente de la zona carotídea. En la segunda fase existía una disminución de la frecuencia ventilatoria; sobre todo en niños prematuros. No se ha aclarado el origen de esta respuesta pero como intraútero el feto tenía valores de PaO₂ de 20 mmHg no era necesario el mantenimiento de la ventilación de forma continua. En ratas recién nacidas, se ha mostrado que exposiciones repetidas de forma intermitente a la hipoxia, provocaban una mayor estimulación de quimiorreceptores carotídeos y una posterior depresión ventilatoria¹⁶⁹.

Aún no han sido descritos los mecanismos exactos de respuesta metabólica y ventilatoria a la hipoxia aunque se han implicado múltiples factores¹⁷⁰⁻¹⁷² incluyendo CO₂, adenosina, endorfinas y GABA.

Hay autores que han considerado que existía una coordinación central de este proceso¹⁶⁰, se ha propuesto al hipotálamo como parte central de dicha integración¹⁶⁶.

1.4.2. Efectos celulares y moleculares de la hipoxia

La hipoxia se ha considerado como un potente estímulo que era capaz de producir cambios complejos en múltiples vías de señalización¹⁰.

La hipoxia perjudicaba el desarrollo pulmonar antes y después del nacimiento, afectando a la adaptación a la vida extrauterina y causando un alto índice de morbilidad y mortalidad. Podía producir un daño irreversible tanto a las vías aéreas como a los vasos, particularmente en los pulmones inmaduros de los niños prematuros, donde la hipoxia se daba con más frecuencia que en niños a término¹.

Son muchos los estudios que han descrito que el desarrollo pulmonar normal necesitaba un ambiente de hipoxia relativa en el útero^{13,14,98,173}. Los requerimientos de oxígeno se han considerado menores en la vida fetal que postnatalmente teniendo además en cuenta que el desplazamiento de la curva de disociación de la hemoglobina fetal aumentaba la accesibilidad del oxígeno¹.

Muchos estudios han mostrado que el ambiente fetal con poco oxígeno era beneficioso para el desarrollo embrionario^{174,175} y para la organogénesis cardiovascular¹⁷⁶ y renal¹⁷⁷. Estudios preliminares en ratas han mostrado que la hipoxia mantenía la morfogénesis pulmonar *in vitro*¹⁷⁸. Acarregui y cols.¹⁹ observaron, en cultivos de pulmón fetal humano en el segundo trimestre de gestación, que con una tensión de oxígeno fetal tenían incrementada la expresión de VEGF comparados con pulmones cultivados en un ambiente con FiO_2 de 0,21. La morfogénesis de la vía aérea en el útero estaría controlada por el desarrollo vascular pulmonar regulado por oxígeno^{13,14}.

Lee YM y cols.¹⁷⁹ realizaron un estudio en embriones de ratón empleando un marcador de hipoxia, el pimonidazol, mostrando que las regiones positivas estaban presentes en embriones bajo un proceso normal de proliferación y diferenciación. Encontraron que el modelo de expresión de VEGF y HIF-1 α coincidía espacio-temporalmente con las regiones positivas para pimonidazol apoyando la teoría de que la hipoxia, en la embriogénesis, actuaba como un fuerte inductor de la angiogénesis y vasculogénesis induciendo la formación de la red vascular embrionaria.

El espacio intervelloso en la placenta se abría a la sangre materna después de la 10-12 semana de gestación en humanos, y la saturación de oxígeno de la sangre suministrada al feto pasaría de 2-3% a 8-10%^{180,181}. La degradación placentaria de HIF-1 α tenía lugar después de la semana 10 de gestación, al mismo tiempo que se incrementaba la oxigenación placentaria¹⁸².

FA Groenman y cols.⁹⁸ investigaron la expresión espacial y temporal de la vía HIF/VEGF en el pulmón y mostraron que todas las moléculas examinadas se expresaban simultáneamente sugiriendo que los mecanismos de regulación HIF estaban desde la semana 8 de gestación. La expresión de HIF-1 α no disminuía después de la semana 10 de gestación ni existía un descenso en la expresión de VEGF después del incremento en la saturación de oxígeno

fetal que podía ser debido a que el pulmón se mantenía en un ambiente bajo en oxígeno durante su desarrollo debido a la circulación fetal y la elevada resistencia vascular pulmonar.

El suministro de oxígeno al feto se veía reducido por la disminución de oxígeno a la madre (por ejemplo en altitudes elevadas) o por un descenso del flujo sanguíneo como en la insuficiencia placentaria y en madres fumadoras. La hipoxia fetal daba lugar a una inhibición de los movimientos respiratorios fetales, hipertensión pulmonar y a un incremento de la resistencia de la vía aérea¹⁸³⁻¹⁸⁵.

Massaro y cols.¹⁸⁶ describieron en sus estudios que los sáculos pulmonares de ratas nacidas de madres que fueron mantenidas en una atmósfera hipóxica durante la gestación, fueron anormalmente grandes 2 días después del nacimiento y la septación de estos sáculos estaba atenuada, dando lugar a una reducción en el número de alveolos. Este daño prenatal podía perjudicar el desarrollo a largo plazo. En contraste el desarrollo alveolar no estaba alterado en cobayas y ovejas que vivían en elevadas altitudes, especies cuyo desarrollo alveolar tenía lugar principalmente en el útero.

El bloqueo de la septación de los alveolos tras la exposición a la hipoxia en ratas recién nacidas estaba asociado a un incremento en el nivel de TGF β y de sus receptores TGF β I y II. El TGF β I se ha descrito que era también un regulador del desarrollo vascular¹⁰. Observaron que los efectos de la hipoxia sobre la actividad TGF β y la expresión de sus receptores era edad dependiente, observándose sólo en el desarrollo pulmonar postnatal pero no en ratas adultas.

Según los estudios de Haworth¹⁸⁷ la hipoxia era una causa frecuente de hipertensión pulmonar persistente del recién nacido. Esta condición se caracterizaba por un fallo en la remodelación estructural postnatal, daño en la relajación dependiente e independiente del endotelio y un exceso de agonistas vasoconstrictores¹⁸⁸. Los vasos pulmonares de niños que han sufrido hipoxia intraútero o intraparto, no se adaptaban a la vida extrauterina, permaneciendo las arterias pulmonares periféricas contraídas y con las paredes engrosadas, como en el feto. Los que sobrevivían tenían una reducción permanente en la densidad de las arterias periféricas.

La hipoxia precoz predisponía a una respuesta más vigorosa ante cualquier agresión posterior. Así se ha observado que siguiendo un periodo de hipoxia perinatal en ratas que tenían reducido el número de alveolos y la densidad de las arterias pulmonares, la re-exposición a la hipoxia a las dos semanas daba lugar a un mayor incremento en la presión del ventrículo derecho, respecto a los animales que no habían sido previamente expuestos. La hipoxia precoz podía dar lugar a cambios patológicos a largo plazo¹⁸⁹.

Estudios experimentales han mostrado que la respuesta a la hipoxia estaba relacionada con la edad y el grado de maduración pulmonar alcanzado en el momento de la exposición. En ratas expuestas a FiO₂ de 0.13 durante el periodo de septación alveolar (2-14 días) el número de alveolos estaba reducido, mientras que la exposición a la hipoxia después de la septación no variaba el número de alveolos¹⁸⁶.

El desarrollo de las arterias periféricas y los alveolos era interdependiente en condiciones de normoxia o hipoxia¹.

Mike van Tuyl y cols.¹⁴ mostraron en un estudio realizado in vitro, que en un ambiente de bajas concentraciones de oxígeno (FiO₂ 0.03) se estimulaba la morfogénesis vascular y de la vía aérea. Observaron que bajas concentraciones de oxígeno estimulaban la vascularización y esto se acompañaba de un incremento significativo de la molécula de adhesión plaquetaria (PECAM-1) y de un aumento significativo de la expresión de VEGF.

Acarregui y colaboradores¹⁹ mostraron que la producción de ARNm para VEGF estaba incrementada en cultivos de pulmón fetal, tanto en células epiteliales de la vía aérea como en células mesenquimales, en un ambiente pobre en oxígeno.

Estudios realizados por Tudor y cols.¹⁹⁰ en cultivos de pulmón de rata adulta y por Pham y cols.¹⁹¹ en células epiteliales tipo II in vitro e in vivo sometidos a hipoxia aguda mostraron un incremento en el ARNm del VEGF. Estudios realizados por Christou y cols.¹⁹² en rata adulta in vivo sometidos a hipoxia aguda no observaron un incremento en el ARNm del VEGF, hecho que si observaron tras hipoxia crónica.

Gerber y cols.⁷⁰ en estudios realizados in vitro en células endoteliales de vena umbilical humana expuestas a la hipoxia observaron que el gen del

receptor VEGFR-1 estaba inducido por la hipoxia, en contraste el ARNm de VEGFR-2 de células expuestas a la hipoxia no estaba incrementado.

Waltenberger y cols.⁸³ observaron un aumento del VEGFR-2 in vivo siendo determinante en este aumento la contribución de factores paracrinos y eventos post-transcripcionales inducidos por la hipoxia.

La hipoxia inducía, por mecanismos celulares y moleculares, la estimulación de la expresión de VEGF, estos mecanismos no eran uniformes y dependían del tipo de célula. En células no epiteliales, como miocitos cardiacos, osteoblastos y en células endoteliales el mecanismo primario era la activación transcripcional del gen VEGF por el HIF-1¹⁹³⁻¹⁹⁵. Los resultados obtenidos en células epiteliales de retina y células de glioma han mostrado que la inducción por la hipoxia del VEGF ocurría por un incremento en la estabilidad del ARNm^{196,197}. Se ha propuesto que la hipoxia estimulaba la producción de especies reactivas de oxígeno que activaban el HIF e incrementaban la expresión del VEGF¹⁹⁸.

1.5. HIPEROXIA

1.5.1. Respuesta metabólica y ventilatoria a la hiperoxia

Se ha descrito que la hiperoxia ocasionaba en mamíferos recién nacidos, una caída inmediata en la ventilación, que era mayor en recién nacidos prematuros que en recién nacidos a término¹⁹⁹. Este hecho se interpretó como una reducción aguda en la estimulación de los quimiorreceptores, que se manifestaba como un descenso significativo en el volumen corriente. Después de esta respuesta inmediata, la ventilación aumentaba por encima de los valores de normoxia. Esta elevación de la ventilación era debida, en parte, a un aumento de la tasa metabólica (consumo de oxígeno y producción de anhídrido carbónico) producida por la hiperoxia.

1.5.2. Efectos celulares y moleculares de la hiperoxia

Se ha demostrado la toxicidad de la hiperoxia para las células y tejidos debido a la acumulación de especies reactivas de oxígeno²⁰⁰. Se ha descrito estrés oxidativo en animales²⁰¹, y en recién nacidos humanos que respiraban una atmósfera enriquecida en oxígeno^{202,203}. Además durante la hipoxia se

acumulaba hipoxantina, un metabolito de la purina, que en la presencia de xantina oxidasa es oxidado a ácido úrico durante la reoxigenación²⁰⁴. Esto generaba una explosión de radicales libres de oxígeno que no eran capaces de neutralizar las defensas antioxidantes, causando daño en las estructuras celulares²⁰⁵.

Las especies reactivas de oxígeno modulaban las vías de señal de transducción que estimulaban la proliferación celular y el exceso de especies reactivas de oxígeno podía causar muerte celular por apoptosis²⁰⁰.

Estudios recientes han mostrado la implicación de las especies reactivas de oxígeno en la cascada mitogénica iniciada por los receptores tirosina quinasa de muchos factores de crecimiento. Colavitti y cols.²⁰⁶ han identificado especies reactivas de oxígeno como mediadores implicados en la señal de transducción de VEGFR-2, eran hallazgos que podían resultar paradójicos sabiendo que la angiogénesis tenía lugar a bajas concentraciones de oxígeno, sin embargo las situaciones de completa anoxia eran muy infrecuentes en condiciones fisiológicas. Hay estudios que han mostrado que las concentraciones de oxígeno bajas formaban radicales libres de oxígeno mediante un mecanismo que implicaba un flujo anormal de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial¹⁹⁸.

Se ha demostrado que ante una situación de estrés oxidativo se producía limpieza de los radicales libres por moléculas antioxidantes intracelulares o circulantes y por la intervención de los enzimas antioxidantes, superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa²⁰⁷.

El nacimiento pretérmino en aire ambiente, antes del desarrollo completo de las defensas antioxidantes, producía una hiperoxia relativa, que contribuía a detener la alveologénesis¹². Esta hiperoxia relativa podía interferir con el desarrollo vascular pulmonar normal⁴.

Los niños prematuros con pulmones inmaduros con frecuencia necesitaban niveles altos de oxígeno inspirado que eran tóxicos para el epitelio alveolar y las células endoteliales¹⁴⁶⁻¹⁴⁸. La hiperoxia era un factor causal en el desarrollo de displasia broncopulmonar en recién nacidos pretérmino^{143,208}.

Los estudios de los mecanismos del daño pulmonar por hiperoxia se han centrado principalmente en dos tipos de células, las células endoteliales y las células epiteliales alveolares. Inmediatamente después del daño celular

endotelial había un acumulo de células inflamatorias en el espacio vascular, y fuga de líquido rico en proteínas al intersticio. Las células epiteliales alveolares activamente movilizaban agua y sal desde los espacios aéreos distales manteniendo el intercambio de gas. Después del daño por hiperoxia, la función de las células epiteliales alveolares estaba dañada, disminuyendo la capacidad de reabsorción de líquido por la bomba Na/K ATPasa y alterándose las proteínas del surfactante y la acumulación de lípidos. Se producía necrosis y apoptosis de las células de la pared alveolar contribuyendo al daño pulmonar por hiperoxia²⁰⁹.

Se ha visto que el periodo perinatal era crítico para la adecuada adaptación pulmonar a la vida postnatal. El daño pulmonar perinatal podía interferir el crecimiento pulmonar, dando lugar a anomalías en la estructura y función pulmonar que podían persistir en la edad pediátrica y adulta. Algunas de las intervenciones para facilitar la adecuada oxigenación, como la administración de oxígeno empeoraban el daño pulmonar subyacente y alteraban el crecimiento alveolar por interferencia con factores de crecimiento esenciales como el VEGF²¹⁰

El efecto de la hiperoxia en el pulmón postnatal podía variar de acuerdo al tiempo de exposición, al grado de hiperoxia y a la edad y especies del modelo utilizado. McGrath- Morrow y cols.²¹⁰ en ratones, encontraron diferencias entre el daño pulmonar producido por hiperoxia y el daño por bloqueo de VEGFR-2 siendo más persistente el daño producido por hiperoxia y teniendo los pulmones expuestos a hiperoxia un menor índice mitótico y un mayor incremento en la apoptosis.

Roberts RJ y cols.²¹¹ mostraron que las ratas recién nacidas expuestas a FiO₂ de 1 tenían un descenso del numero de capilares por el efecto tóxico del oxígeno sobre las células endoteliales. Kunig y cols.³ observaron que los pulmones sometidos a hiperoxia tenían una disminución del número de alveolos y menor crecimiento vascular.

Aunque la hiperoxia era capaz de inhibir el crecimiento pulmonar a través de diversos mecanismos, estudios clínicos y experimentales recientes han sugerido que el daño en la señalización del VEGF tenía un papel importante en la patogénesis de la displasia broncopulmonar^{2,3,13,29,100,212}.

B Thébaud y cols.² mostraron en el pulmón en desarrollo de rata que la hipoalveolización irreversible inducida por oxígeno estaba asociada con una disminución en la expresión del VEGF y un menor crecimiento vascular. Se ha mostrado en muchos otros estudios que la hiperoxia descendía los niveles de VEGF, tanto si la hiperoxia era aguda^{212,213} como si era prolongada^{2,100,214}.

Wageenaar y cols.²¹⁵ investigaron la expresión génica mediante análisis de “microarray” de ADN en el pulmón de ratas pretérmino expuestas a hiperoxia prolongada observando un descenso del VEGF y su receptor VEGFR-2.

Se ha observado que los niveles de ARNm del VEGF disminuían de una manera dosis dependiente cuando se incrementaba la exposición al oxígeno en estudios in vitro¹⁹.

Las células endoteliales eran especialmente sensibles al estrés oxidativo y la disminución de VEGF que se daba en la hiperoxia aumentaba aún más la susceptibilidad del endotelio al daño por hiperoxia^{3,100} y a la mayor pérdida de estas células tras hiperoxia aguda²⁰. Durante la exposición a la hiperoxia se producía una destrucción de la microvascularización pulmonar deteniéndose la regeneración endotelial esencial para la reparación del daño pulmonar inducido por oxígeno²⁸.

Klekamp y cols.²¹⁶ documentaron una reducción del VEGF en pulmones de ratas expuestas a hiperoxia (FiO₂ >0,95 entre los días postnatales 6 y 14), asociado con apoptosis de células alveolares y reducción en la expresión de VEGFR-2 y VEGFR-1.

Maniscalco y cols.²⁹ encontraron que los monos pretérmino tratados con oxígeno tenían un descenso del 70% de la proteína PECAM-1 y 27% de descenso en la densidad capilar con presencia de capilares dismórficos comparado con el grupo control. Observaron un descenso del ARNm del VEGF soportando la hipótesis de que el desarrollo de displasia broncopulmonar podía ser el resultado de la disrupción del programa genético de factores angiogénicos y de la expresión de receptores de células endoteliales.

Watkins y cols.²⁸ encontraron que en el daño por hiperoxia tanto en conejos recién nacidos como en conejos adultos, la proporción de VEGF₁₈₉ disminuía reestableciéndose los valores normales durante la recuperación en

normoxia. Observaron que las proporciones de VEGF₁₆₅ y de VEGF₁₂₁ se incrementaban durante la hiperoxia volviendo a valores normales durante la recuperación. Las formas oxidadas VEGF₁₆₅ y VEGF₁₂₁ perdían su capacidad de unión al VEGFR-2 y esta no se restauraba después del daño oxidativo⁶⁸.

Zimová y cols.²¹⁷ en un modelo de exposición a hiperoxia en ratones, observaron un descenso en ARNm de VEGF que era menor cuando se administraba ácido retinoico.

La disminución de la expresión del VEGF en la hiperoxia podía relacionarse con la supresión de la expresión del factor inducible por la hipoxia 2- α (HIF2- α ó HLF)^{29,100}. También el HIF se inhibía con el incremento en de los niveles de oxígeno⁴.

Hosford y cols.⁷⁹ en un estudio realizado en ratas recién nacidas mostraron que la expresión del VEGF y de VEGFR-1 y VEGFR-2 estaba disminuida los días 12 y 14 después de la exposición a ambiente hiperóxico durante el periodo crítico de desarrollo alveolar (de los días 4 a 14). Observaron que en condiciones de normoxia existía una fuerte correlación del HLF con el VEGF. Esta correlación se perdía después de la hiperoxia, sugiriendo que bajos niveles de HLF, después de la exposición a altas concentraciones de O₂, no estimulaban la expresión del VEGF.

Roper y cols.²¹⁸ encontraron que las células tipo II expuestas a hiperoxia in vivo exhibían guanina oxidada, aunque morfológicamente se observaron intactas. El daño por hiperoxia se producía por la interacción de especies reactivas de oxígeno con macromoléculas como el ADN, lípidos y proteínas. El daño sobre el ADN consistía en rotura de hebra, modificaciones de bases, cambios en las cromátidas hermanas y oxidación de guanina a 8-oxoG.

El daño oxidativo de los tejidos podía exacerbarse por el daño en la señalización del VEGF. Se ha observado que el VEGF inducía manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) y oxido nítrico, implicados en la limpieza de especies reactivas de oxígeno¹⁰⁴. Siner y cols.²¹⁹ han mostrado en ratones transgénicos que expresaban VEGF humano, que el VEGF inducía citoprotección a través de la inducción de hem-oxigenasa 1 y que además de acción antioxidante tenía capacidad de disminuir la apoptosis. Además el VEGF confería citoprotección por un mecanismo A1-dependiente, regulador

crítico en el daño pulmonar y muerte celular inducidos por la hiperoxia. Hua He y cols.¹⁰⁶ mostraron que en ratones transgénicos que expresaban más VEGF 165, se incrementaban los niveles de proteína y ARNm de A1 teniendo mayor supervivencia en condiciones de hiperoxia con FiO2 de 1.

Maniscalco y cols.¹⁰⁴ en un estudio realizado en primates pretérmino sometidos a hiperoxia de 6 a 10 días, encontraron un incremento de p53 en las células epiteliales distales, teniendo este hecho, correlación con el descenso de la expresión del VEGF en estas células. Además encontraron daño oxidativo del ADN con incremento de 8-oxoG que sería el mecanismo de incremento de p53.

En un estudio realizado en ratones para detectar las células alveolares tipo II, Min Yee y cols.²²⁰ observaron una pérdida de estas células tras la exposición a hiperoxia que sería la causa del descenso de VEGF en la hiperoxia.

En los estudios realizados por Maniscalco y cols.^{29,221} se ha descrito que el VEGF se expresaba en células tipo II con poca proteína C del surfactante, por tanto el cambio en el fenotipo de células epiteliales distales que se observaba en la situación de hiperoxia, con más células con alta cantidad de proteína C del surfactante, daba lugar a un descenso en la producción de VEGF.

También se ha observado que el estrés oxidativo inactivaba la señal de supervivencia del VEGF en células endoteliales a través de la acción de peroxinitrito¹⁹.

Por otro lado estudios in vitro e in vivo han mostrado la inducción de VEGF ante especies reactivas de oxígeno²²²⁻²²⁴. Becker y cols.¹²² mostraron un incremento del VEGF en un modelo de isquemia pulmonar en hurones con independencia del oxígeno y Corne y cols.¹¹⁹ en un modelo en ratones observaron un incremento en los niveles de VEGF en lavado broncoalveolar después de 72 horas de exposición a FiO2 de 1.

1.6. CORTICOIDES: DEXAMETASONA Y BETAMETASONA

Uno de los grandes avances de la medicina perinatal en los últimos 25 años ha sido la administración prenatal de corticoides a las mujeres embarazadas con parto inminente a las 24-34 semanas de gestación para la

inducción de la maduración pulmonar fetal. Desde su introducción por Liggins en 1972²²⁵, el uso de corticoides se ha asociado a menor riesgo de distrés respiratorio, de hemorragia intraventricular y de mortalidad neonatal²²⁵⁻²³¹.

Los esteroides prenatales mejoraban la función pulmonar postnatal, la mecánica y el intercambio de gas, y daban lugar a una mejor distensibilidad y oxigenación y como resultado menos días de ventilación mecánica y menores necesidades de oxígeno^{232,233}.

Se han realizado muchos estudios para investigar los efectos adversos de los corticoides prenatales con resultados dispares con relación a la retinopatía²³⁴⁻²³⁶, a la sepsis neonatal y enterocolitis necrotizante^{229,230,237,238}, a la parálisis cerebral^{236,239-241} y a la displasia broncopulmonar^{236,242-247}.

Roberts D y Dalziel S²³⁸ en el año 2006 publicaron una revisión de 21 estudios publicados hasta octubre 2005 que incluían 3885 mujeres y 4269 niños. El tratamiento con corticoides prenatales no incrementaba el riesgo de mortalidad materna, corioamnionitis o sepsis durante el puerperio y estaban asociados con una reducción de la mortalidad neonatal, del síndrome de distrés respiratorio, de la hemorragia intraventricular, de la enterocolitis necrotizante, de las necesidades de soporte ventilatorio y de la sepsis neonatal.

Aunque se han planteado pocas cuestiones sobre los efectos beneficiosos de los corticoides prenatales en la maduración fetal, aún no ha habido respuesta sobre cual era la preparación óptima^{238,247}.

Los únicos corticoides que se han recomendado para su empleo de forma prenatal en la práctica clínica han sido la dexametasona y la betametasona^{228,230,231}, ambos pasaban fácilmente la vía transplacentaria y tenían actividades biológicas similares²⁴⁷.

1.6.1. Características químicas y farmacológicas

La dexametasona y la betametasona se han incluido dentro del grupo farmacológico de los glucocorticoides sintéticos. Su estructura química sólo variaba en la orientación del grupo metilo en la posición 16 del anillo esteroideo siendo configuración α en la dexametasona y β en la betametasona (Fig.2)^{248,249}. Ha sido comprobado que su acción era 25-30 veces mayor que la hidrocortisona. Su duración de acción era de larga duración y no tenían actividad mineralocorticoide.

Tanto la dexametasona-fosfato sódico, como la betametasona-fosfato sódico, eran derivados solubles en agua de los esteroides no fosfatados respectivos, dexametasona y betametasona. Ambos eran profármacos y no eran activos hasta que no se hidrolizaba el fosfato que esterificaba el esteroide.

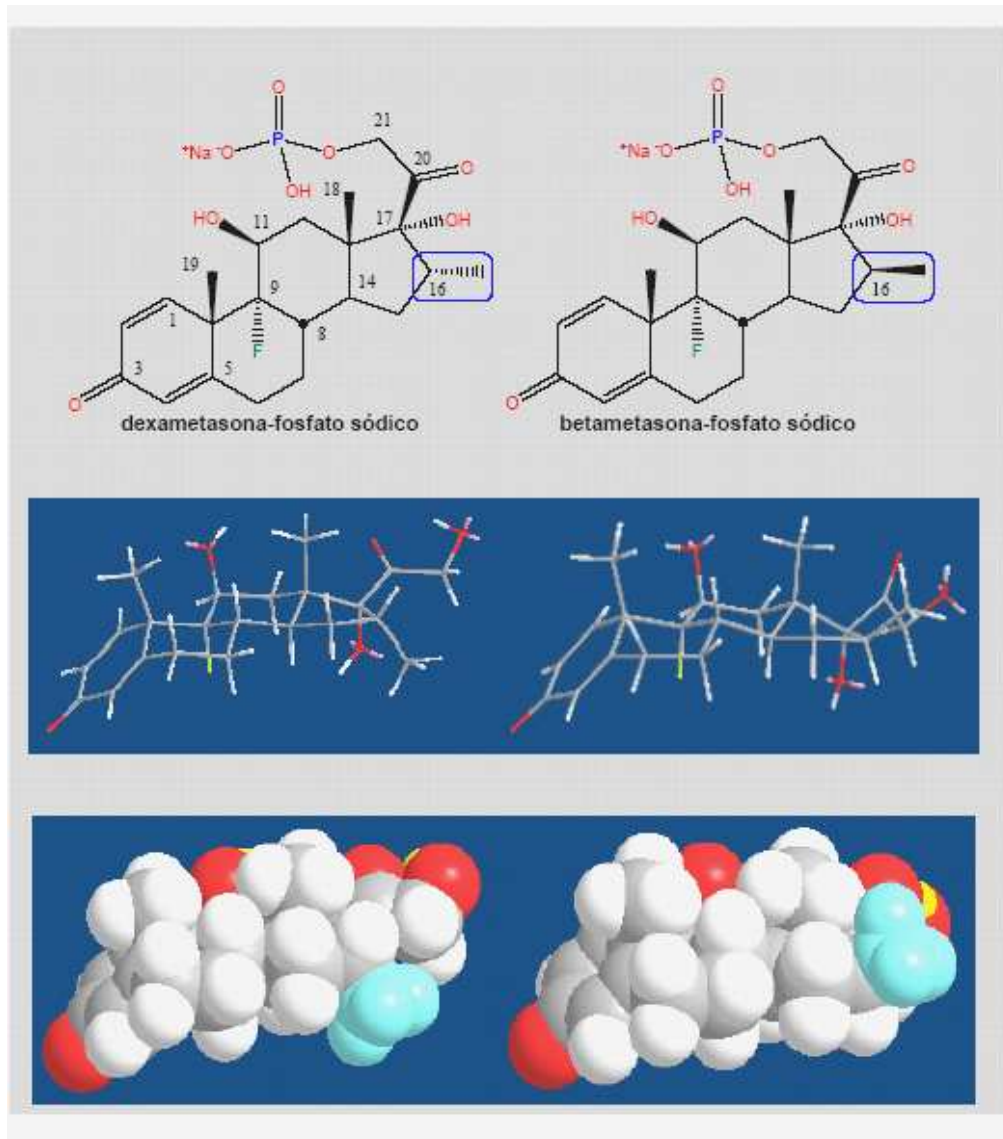


Figura 2. Estructura química de dexametasona y de betametasona. Tomada de la tesis de la Dr^a San Feliciano²⁵⁰

1.6.1.1. Farmacocinética

Las máximas concentraciones plasmáticas se han obtenido al cabo de 1-2 horas. La duración de la acción dependía del modo de administración y de la vascularización del lugar de inyección. La vida media biológica de ambos fármacos oscilaba entre 36 y 54 horas. Se unían débilmente a las proteínas

plasmáticas y tenía actividad sólo la forma libre. El fármaco se distribuía rápidamente en riñones, intestino, hígado, piel y músculos.

Los corticoides cruzaban la barrera placentaria y la biodisponibilidad del feto era varias veces menor que en la madre debido al metabolismo placentario²⁵¹.

Liggins²⁵² determinó que la concentración de corticoide en la vena umbilical era aproximadamente un 30% de la concentración venosa materna .

En 1960 Osinski²⁵³ describió que el principal sistema regulador de la exposición fetal a corticoides se encontraba en la placenta. Los corticoides como sustancias lipófilas que eran atravesaban las membranas fácilmente²⁵⁴ pero la placenta tenía un sistema de enzimas deshidrogenasa²⁵⁵ que transformaban las formas biológicamente activas de los esteroides maternos en formas inertes, aunque se ha estimado que permitían el paso de un 10-20% de formas activas que eran necesarias para el desarrollo y maduración fetal²⁵⁶.

El feto poseía un sistema enzimático propio productor y conversor de hormonas esteroideas que jugaba también un papel esencial en el desarrollo y maduración fetal²⁵⁶.

Hasta la mitad de la gestación predominaba la formación de cortisona y posteriormente la formación de cortisol²⁵⁷.

La enzimas que formaban parte de este sistema enzimático placentario y fetal eran la 11 β hidroxisteroide deshidrogenasa de tipo 1 (11 β -HSD-1) y de tipo 2 (11 β -HSD-2), en concreto se ha visto que la 11 β -HSD-2 actuaba metabolizando formas biológicamente activas de glucocorticoides (cortisol y corticosterona) en formas inertes (cortisona) (Fig. 3)^{256,258,259}.

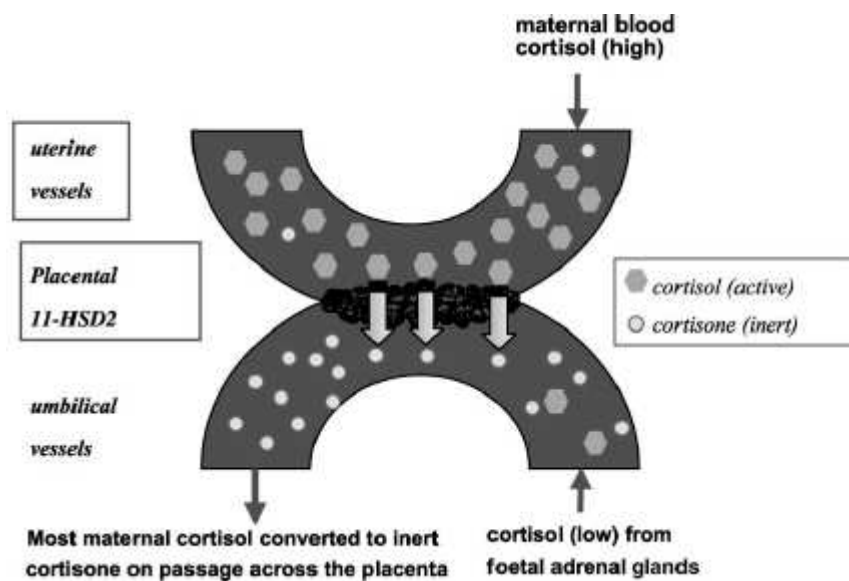


Figura 3. Sistema enzimático placentario para corticoides. Tomada de: Seckl JR. *European Journal of Endocrinology* 2004; 151:50.

La dexametasona y la betametasona atravesaban la placenta, en su mayor parte de forma activa y tenían poca afinidad para 11 β -HSD-2²⁶⁰. Además se ha sugerido²⁶¹ que la dexametasona administrada a ratas madres gestantes tenía cierto efecto inhibitor de la enzima 11 β -HSD-2 estando expuesto el feto a niveles más altos de corticoide.

También se ha publicado que la hipoxia era un factor importante en la regulación de 11 β -HSD-2^{262,263}.

En el feto los corticoides se metabolizaban en el hígado dando lugar a productos inactivos que se eliminaban por la orina con una vida media de eliminación de 1,8 a 3,5 horas²⁵⁶.

Para la maduración pulmonar se ha recomendado su administración con un intervalo de 12 ó 24 horas sin diferencias en los resultados entre una y otra pauta²⁶⁴.

1.6.1.2. Mecanismo de acción.

Los estudios de Besran²⁶⁵ y Bolt²⁶⁶, han puesto de manifiesto que los glucocorticoides actuaban a través de receptores citoplasmáticos específicos, induciendo respuestas que modificaban la transcripción y la síntesis de proteínas. Se ha demostrado que inhibían la síntesis de determinadas proteínas proinflamatorias y aumentaban la expresión de proteínas antiinflamatorias.

Se ha descrito el receptor glucocorticoide (GR) como un polipéptido de 94 KD, con dos formas α y β . El GR β se ha localizado en el núcleo de células pulmonares fetales y adultas en humanos y el GR α en el citoplasma²⁶⁷. El gen que codifica estos receptores se ha localizado en el brazo largo del cromosoma 5²⁶⁸.

Se ha visto que el número de receptores variaba con la edad gestacional y era diferente según el tipo celular. La expresión del GR se ha detectado en el segundo mes de gestación en humanos, fundamentalmente en el epitelio bronquial y en las células de los sacos terminales, esto sugería un papel modulador de los corticoides en el desarrollo pulmonar²⁶⁹. Además se ha demostrado que estas estructuras pulmonares presentaban baja expresión de 11 β -HSD-2 que permitía la producción de altas concentraciones de glucocorticoides en el pulmón humano²⁷⁰.

1.6.2. Dexametasona vs. betametasona

Se ha visto que la diferencia estructural entre la dexametasona y la betametasona (Fig. 2), era responsable de importantes diferencias en efectos no genómicos y genómicos celulares, como en la expresión de los receptores de glutamato²⁷¹ y de los canales de transporte de iones²⁷².

Estudios en animales y en humanos han descrito que el empleo de la dexametasona, comparada con la betametasona, se ha asociado a un incremento del riesgo de resultados adversos neurológicos. El estudio de Baud y cols.²³⁹ puso de manifiesto que la dexametasona, comparada con la betametasona, se asociaba a un incremento del riesgo de leucomalacia quística periventricular.

También se han descrito los posibles efectos neurotóxicos del preservante metabisulfito sódico que se usaba en la dexametasona disponible comercialmente²⁷³. Los mecanismos de la neurotoxicidad por sulfito podían estar relacionados con la formación de cisteína-S-sulfato, un potencial metabolito excitotóxico de los sulfitos que era estructuralmente similar al glutamato, y a la generación de radicales de oxígeno y sulfuro. Sin embargo se han planteado cuestiones de cómo la dosis de sulfitos administrada prenatalmente a la madre provocaba efectos en el feto²³⁶.

Lee y cols.²³⁶ observaron que la administración de betametasona prenatal se asociaba con una reducción del riesgo de mortalidad neonatal con

descenso del riesgo de otros resultados adversos neonatales como la retinopatía y la hemorragia intraventricular, comparada con la administración de dexametasona prenatal.

Jobe y cols.²⁷⁴ en un estudio realizado en corderos encontraron que la mejor respuesta en la maduración pulmonar se obtenía con la administración prenatal de la mezcla de betametasona fosfato y betametasona acetato. Feldman y cols.²⁴⁷ observaron un descenso en el síndrome de distrés respiratorio y en la displasia pulmonar en niños pretérmino cuyas madres habían recibido betametasona comparado con madres que habían recibido dexametasona.

1.6.3 Acción de los glucocorticoides en la maduración pulmonar

El desarrollo pulmonar fetal y postnatal estaba fuertemente modulado por glucocorticoides^{19,20}. Sin embargo los efectos de los glucocorticoides sobre el pulmón pretérmino se han presentado confusos y complejos. Podían interferir en la alveolización y al mismo tiempo podían inducir maduración estructural por adelgazamiento del mesénquima y maduración funcional estimulando el sistema del surfactante¹⁴⁰.

Bunton y Plopper.²⁷⁵ en estudio en primates observaron que la formación postnatal de los alveolos estaba en gran parte impedida por el tratamiento con glucocorticoides prenatales, que aceleraban el adelgazamiento de la pared alveolar con la fusión de las dos líneas de capilares e inhibía la formación de nuevos septos por terminación precoz del proceso de septación. Massaro y Massaro.²⁷⁶ encontraron hallazgos similares en ratas y Willet y cols.^{277,278} en corderos. Nuestro grupo también ha observado una disminución en la tabicación pulmonar producida por la administración de glucocorticoides prenatales (dexametasona y betametasona) en ratas recién nacidas²⁷⁹⁻²⁸¹.

Oshika E y cols.²⁸² mostraron en cultivos de pulmón de embriones de rata que el tratamiento con dexametasona daba lugar a una detención del crecimiento, bifurcación anómala, dilatación de túbulos proximales y supresión de la proliferación de células epiteliales de túbulos distales. En las ratas el tratamiento con dexametasona postnatal detiene la septación²⁸³ y acelera el adelgazamiento alveolar, dando lugar a pulmones enfisematosos^{284,285}.

Schellenberg y Liggins²⁸⁶ administraron dexametasona a ratas gestantes, estudiando sus efectos sobre el desarrollo pulmonar de las crías durante la vida fetal y postnatal. Los resultados revelaron una inhibición del crecimiento pulmonar y corporal, además de una reducción del contenido de ADN, en las ratas tratadas con dexametasona. La dexametasona parecía afectar a las poblaciones celulares productoras de elastina y a las productoras de colágeno durante el desarrollo fetal del pulmón.

En estudios *in vitro*, en cultivos de fibroblastos pulmonares humanos, se ha observado que la dexametasona inhibía la proliferación de fibroblastos y la actividad quimiotáctica de forma dosis dependiente²⁸⁷.

También se han descrito interrelaciones entre los corticoides y el VEGF^{19,288,289}.

En los estudios realizados por Vento y cols.²⁹⁰ en recién nacidos pretérmino, los niveles de VEGF pulmonar estaban incrementados en el grupo no tratado con dexametasona frente al tratado. En estos estudios el TGF- β 1 también estaba incrementado en el grupo que no recibía tratamiento, además los niveles de TGF- β 1 eran mayores en los niños que desarrollaban displasia broncopulmonar. Vyas y Kotecha²⁹¹ no encontraron influencias del tratamiento prenatal con corticoides sobre la expresión de TGF- β 1 en el líquido de lavado broncoalveolar de niños pretérmino.

Acarregui y cols.¹⁹ en un estudio realizado *in vitro* en pulmón humano hallaron niveles incrementados de ARNm del VEGF cuando los tejidos pulmonares se mantenían en dexametasona durante 4 días desde el inicio de incubación en FiO₂ 0.20. En cambio cuando el epitelio era primero incubado en FiO₂ 0.20 y después tratado con dexametasona, los niveles de ARNm no estaban incrementados. Según estos autores la dexametasona inducía la diferenciación en células tipo II y este hecho era el responsable de las variaciones en los niveles de VEGF.

Muchos estudios *in vitro* han mostrado la fuerte regulación negativa de la dexametasona que inhibía la inducción de la expresión del VEGF en diferentes tipos de células incluyendo las células epiteliales alveolares²⁹²⁻²⁹⁵. En sentido contrario, en un estudio en ratones realizado por Bhatt y cols.²⁰ que administraban dexametasona (0,1-5mg/Kg/día) del 6 al 9 día postnatal,

analizaron el ARNm del VEGF y el ARNm del VEGFR-2 en pulmón y observaron que se incrementaban con el aumento de dosis de dexametasona. También analizaron los efectos de la dexametasona sobre la cantidad del ARNm de HLF- α que se ha asociado a un incremento en la transcripción de VEGF en normoxia e hipoxia. En el grupo tratado con dexametasona a 5mg/Kg/día se triplicaba la cantidad de HLF- α en el pulmón y era un posible mecanismo de los efectos de la dexametasona sobre el ARNm del VEGF pulmonar. No había diferencias entre el grupo tratado con dexametasona y el grupo control en el estudio de la proteína VEGF. El tratamiento con dexametasona no alteró el modelo de células que expresaban VEGF, expresándolo sobre todo las células del epitelio alveolar distal. La dexametasona administrada en el segundo trimestre incrementaba el ARNm del VEGF en pulmón fetal humano¹⁹.

Se ha observado que la dexametasona disminuía los niveles de ARNm del VEGF en la línea celular osteoblástica²⁹⁴ y que inhibía los efectos de la inducción por PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas) y por PAF (factor de activación plaquetario) sobre los niveles de ARNm del VEGF en células de músculo liso^{292,293}.

Hewitt y cols.²⁹⁶ mostraron que la expresión del VEGF estaba disminuido en placenta de ratas gestantes cuando se administraba dexametasona.

Lassus y cols.^{23,95} en estudios realizados en niños pretérmino no encontraron diferencias en la concentración de VEGF en aspirado traqueal entre niños que habían recibido corticoides prenatales y los que no los habían recibido. Tampoco encontraron diferencias en la concentración de VEGF en los niños pretérmino que se trataron con dexametasona postnatal de forma precoz²⁹⁷. Experimentalmente en estudio realizado en corderos Suzuki y cols.²⁹⁸ no encontraron diferencias en los niveles de ARNm del VEGF entre el grupo tratado con betametasona prenatal y el grupo que no recibió tratamiento.

Por otro lado D'Angio y cols.²⁹⁹ han descrito niveles más altos de VEGF en aspirado traqueal en niños pretérmino que recibían dexametasona.

Compernelle y cols.⁸⁰ en un estudio realizado en ratones, observaron que la dexametasona prenatal estimulaba la expresión del VEGF fetal cuando se administra a bajas dosis (0,8mg/Kg), pero suprimía la producción del VEGF

cuando se administraba a dosis altas (2,4 mg/Kg). Las excesivas cantidades de glucocorticoides podían neutralizar los efectos beneficiosos neumotróficos del VEGF.

Roubliova y cols.³⁰⁰ realizaron un estudio en conejos recién nacidos donde observaron que administrando a la madre betametasona los días 25 y 26 de gestación se producía un incremento en el VEGF pulmonar.

Lassus y cols.²⁹⁷ observaron una disminución de HGF (factor de crecimiento del hepatocito), con actividad mitogénica de células epiteliales, en aspirado traqueal tanto con tratamiento prenatal como postnatal con glucocorticoides en niños pretérmino. La dexametasona suprimía la expresión genética del HGF e inhibía factores de crecimiento responsables de la inducción de la expresión de ARNm de HGF.

Además se ha mostrado que los glucocorticoides inhibían las citoquinas inflamatorias de las cuales se ha visto que la interleuquina 1 y 6 inducían la expresión de HGF in vitro^{301,302}. La dexametasona, a través de su efecto en el HGF, tenía influencia adversa en el desarrollo pulmonar y en la reparación del daño pulmonar agudo en el pulmón de los niños pretérmino²⁹⁷. También en estudios realizados por Liu y cols.³⁰³ se ha mostrado que la dexametasona inhibía el IGF-I teniendo repercusión en la alveolización.

Se ha visto que existía un equilibrio entre el ácido retinoico y los glucocorticoides durante el desarrollo pulmonar normal. Las alteraciones en este equilibrio producían a una alveolización anómala³⁰⁴. Se ha observado que la supervivencia de ratas recién nacidas expuestas a oxígeno mejoraba con el tratamiento simultáneo de ácido retinoico y dexametasona, lo que sugería un posible efecto complementario³⁰⁵. El ácido retinoico podía compensar los efectos de aceleración de los corticoides sobre la maduración septal persistiendo el beneficio del tratamiento con glucocorticoides en la maduración epitelial pulmonar⁵. También se ha observado que los niveles de vitamina A en sangre eran más altos en niños prematuros ventilados cuya función respiratoria mejoraba con el tratamiento con glucocorticoides³⁰⁶.

Gille y cols.³⁰⁷, en un estudio in vitro en queratinocitos humanos observaron que en las células tratadas con glucocorticoides el ARNm del VEGF era rápidamente degradado en menos de 2 horas. La disminución en la

estabilidad del ARNm podía ser uno de los mecanismos de la inhibición de los glucocorticoides sobre la expresión del VEGF.

Massaro y cols.¹² comunicaron que en todas las especies la septación, tanto si era prenatal como postnatal, ocurría durante un periodo en el que la concentración plasmática de glucocorticoides era baja y la septación finalizaba cuando la concentración de glucocorticoides aumentaba.

Los estudios de Massaro¹² y Clerch³⁰⁸ han demostrado que la administración de glucocorticoides a las ratas o ratones durante el periodo de septación, cuando la concentración plasmática de corticoides era normalmente baja, dañaba la septación espontánea y el desarrollo de la vascularización pulmonar, dando lugar a hipertensión pulmonar. No existía septación posterior espontánea ni vasculogénesis espontánea después de interrumpirse el tratamiento con corticoides (probado en ratas hasta los 95 días), demostrándose así que existía un periodo crítico para el desarrollo de estos eventos. Dicho de otro modo, si uno de los procesos moleculares responsables de estos procesos arquitectónicos se interrumpía, no había reconstitución espontánea. En estos estudios el análisis de microarrays de la expresión de genes pulmonares identificó la regulación negativa por dexametasona del VEGFR-2 con la inhibición de la septación.

En cambio Tschanz y colaboradores²⁸⁵ han mostrado en un estudio realizado en ratas recién nacidas a las que administraron corticoides los primeros 4 días de vida, que el pulmón tenía una capacidad de recuperarse del daño producido por los corticoides cuando estos se suspendían.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La importancia de la hipoxia en la maduración pulmonar (alveolización), así como la administración de corticoides (dexametasona y betametasona) prenatales a madres gestantes con riesgo de parto prematuro, nos hizo plantearnos el presente trabajo para estudiar la acción de la hipoxia y su recuperación en aire o hiperoxia, sobre el metabolismo (temperatura, oxígeno consumido, anhídrido carbónico producido) y sobre uno de los factores de crecimiento, el VEGF, que tiene un papel fundamental sobre el desarrollo y maduración pulmonar.

Además, la administración de corticoides (dexametasona y betametasona) prenatales, utilizados para acelerar la maduración pulmonar, parece tener un efecto beneficioso sobre la evolución de los recién nacidos prematuros, sin haberse dado una recomendación sobre la utilización preferente de uno de ellos. Hay diferencias clínicas entre los recién nacidos prematuros que han recibido dexametasona prenatal o betametasona prenatal.

Por otro lado hay discrepancias en los resultados comunicados en la literatura de la acción de la hipoxia, de la hiperoxia y de los corticoides sobre el VEGF.

En el presente trabajo hemos diseñado un modelo experimental translacional en ratas recién nacidas sometidas a hipoxia y recuperadas en hiperoxia o aire, tanto en crías de madres controles como en recién nacidos de madres gestantes que recibieron corticoides (dexametasona o betametasona). Creíamos que el efecto de la hipoxia y su recuperación en hiperoxia así como la acción de los corticoides prenatales en ratas recién nacidas modificaría el metabolismo y la expresión del VEGF pulmonar y para comprobarlo planteamos los siguientes objetivos:

1. Estudiar los efectos de la hipoxia y su recuperación tanto en hiperoxia como en aire, en ratas recién nacidas y valorar su repercusión en el metabolismo y sobre la expresión del VEGF en el pulmón inmaduro.
2. Analizar la acción de los corticoides (dexametasona y betametasona) prenatales sobre el metabolismo y la expresión del VEGF en el pulmón inmaduro.
3. Comparar los cambios producidos en el metabolismo y en la expresión del VEGF pulmonar entre las distintas situaciones experimentales y entre la dexametasona y betametasona.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los experimentos fueron realizados siguiendo la normativa de la Directiva del Consejo de las Comunidad Europea (DOCE L 222; 24/08/1999).

3.1 SUJETOS

Se utilizaron ratas recién nacidas Wistar homocigóticas, obtenidas por reproducción endogámica en el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Salamanca, siguiendo las Normas Internacionales para el cuidado de los animales. Para conseguir la reproducción, se mantuvieron parejas de ratas jóvenes adultas durante 2 noches. Las ratas preñadas fueron separadas en jaulas independientes tres días antes del parto.

Las ratas adultas tenían acceso libre a comida y agua. Se empleó como alimento pienso completo para animales de experimentación (Rodent Toxicology Diet), con la siguiente composición alimentaria: proteína bruta (16,2%), celulosa bruta (3,5%), fósforo (0,55%), grasa bruta (2,8%), cenizas brutas (5,3%), calcio (0,75%) y aditivos (vitaminas A, D3, E y antioxidante etoxiquín).

Las ratas recién nacidas, utilizadas para este estudio, recibieron alimentación materna. Todas ellas tenían entre 6-8 horas de vida cuando se inició el estudio.

3.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

Las ratas preñadas parieron de forma natural a los 22 días de gestación. Las crías fueron mezcladas y repartidas al azar, formando camadas de 11-12 crías por madre. Para permitir la aceptación de las crías, por la madre correspondiente, fueron frotadas con defecaciones de la madre.

Se realizaron los siguientes grupos de estudio:

1. Grupo Control (C): Ratas recién nacidas, de madres que recibieron solución salina como placebo.
2. Grupo Dexametasona (D): Ratas recién nacidas, cuya madre recibió dexametasona previa al parto.
3. Grupo Betametasona (B): Ratas recién nacidas, cuya madre recibió betametasona previa al parto.

Los distintos grupos de estudio fueron divididos en distintos subgrupos según la situación experimental realizada a día 0:

1. Aire (A): Grupo de ratas mantenidas en aire durante el estudio.
2. Hipoxia (H): Grupo de ratas sometidas a hipoxia ($FiO_2 = 0.1$) durante dos horas.
3. Hipoxia + Aire (HA): Grupo de ratas sometidas a hipoxia ($FiO_2 = 0.1$) durante dos horas y recuperadas con aire ($FiO_2 = 0.21$) durante dos horas.
4. Hipoxia + Hiperoxia (HH): Grupo de ratas sometidas a hipoxia ($FiO_2 = 0.1$) durante dos horas y recuperadas con hiperoxia ($FiO_2 = 1$) durante dos horas.

Administración del tratamiento:

El tratamiento se realizó los días 20 y 21 de gestación, mediante inyección intravenosa (i.v.) de dexametasona, betametasona o suero salino fisiológico a las ratas madre, en la vena marginal de la cola.

Las dosis empleadas de dexametasona y betametasona intravenosas fueron establecidas a partir de las dosis de estos fármacos utilizadas en la práctica clínica, y su uso experimental en roedores para la maduración pulmonar^{264,309-311}.

En este estudio fueron utilizados los siguientes preparados comerciales a las siguientes dosis:

Dexametasona: Fortecortín® (1ml = 4 mg de dexametasona fosfato sódico). Dosis: 0,4 mg/Kg/día repartidos en dos dosis con un intervalo de 12 horas, durante dos días consecutivos (días 20 y 21 de gestación). El fármaco fue diluido en suero salino fisiológico.

Betametasona: Celestone® (1ml = 4 mg de betametasona fosfato sódico). Dosis 0,4 mg/Kg/día repartidos en dos dosis con un intervalo de 12

horas, durante dos días consecutivos (días 20 y 21 de gestación). El fármaco fue diluido en suero salino fisiológico.

El grupo control recibió el mismo número de dosis de placebo de suero salino fisiológico i.v. Braun®.

Como se ha referido los distintos grupos de estudio fueron divididos en subgrupos, según se muestra en la tabla 1:

GRUPOS	SUBGRUPOS DÍA 0	SUBGRUPOS DÍA 4	SUBGRUPOS DÍA 14
CONTROL	A (n = 11) H (n = 11) HA (n = 11) HH (n = 11)	A (n = 11) HA (n = 11) HH (n = 11)	A (n = 11) HA (n = 11) HH (n = 11)
DEXAMETASONA	A (n = 11) H (n = 11) HA (n = 11) HH (n = 11)	A (n = 11) HA (n = 11) HH (n = 11)	A (n = 11) HA (n = 11) HH (n = 11)
BETAMETASONA	A (n = 11) H (n = 11) HA (n = 11) HH (n = 11)	A (n = 11) HA (n = 11) HH (n = 11)	A (n = 11) HA (n = 11) HH (n = 11)

Tabla 1. Grupos y subgrupos experimentales.

Las ratas se pesaron y se tallaron diariamente.

Al nacimiento (día 0) entre las 6 y 8 horas de vida, los animales se sometieron a una de las siguientes situaciones experimentales:

Aire.

Hipoxia.

Hipoxia y recuperación con aire.

Hipoxia y recuperación con hiperoxia

Tras ello, todos los animales se mantuvieron en aire hasta ser sacrificados, para la obtención de muestras a los: 0 días, 4 días y 14 días de vida.

Para la realización de las distintas situaciones, los experimentos se llevaron a cabo introduciendo al animal en una cámara transparente de

metacrilato, cerrada herméticamente, que permitía visualizar los animales (Fig. 4).



Figura 4. Cámara y analizador de gases.

La cámara estaba conectada a un sistema de entrada del gas y a un sistema de salida para la medición del oxígeno consumido y el CO₂ producido mediante un medidor de gases modelo SERVOMEX 1440 Gas Analyser (Fig. 4).

En el caso del grupo que recibió aire, la jaula estaba conectada a una botella de aire medicinal comprimido. En el grupo de ratas sometidas a hipoxia se mezcló aire con nitrógeno proveniente de una botella conteniendo N₂ (H₂O <3 ppm; O₂ <2 ppm; CnHm <0,5 ppm). La hiperoxia se consiguió conectando la cámara a una botella de oxígeno medicinal. Durante cada experimento, se mantuvo un flujo constante, medido por un manómetro incorporado a la botella. Durante todos los experimentos se midió la FiO₂ de oxígeno inspirado dentro de la cámara, y ésta se mantuvo constante, según la fase en 0,21; 0,10 ó 1.

Se introdujo también en el interior de la jaula, un termómetro para controlar la temperatura durante el periodo de estudio. Dicha temperatura se mantuvo constante e igual a la temperatura de la cámara mediante una lámpara de calor radiante.

3.3. ESTUDIO DEL METABOLISMO

Diferencia de temperatura

Se midió la temperatura corporal de las ratas con un termómetro digital al inicio y al final de cada experimento.

Determinación del oxígeno consumido y del CO₂ producido

El oxígeno consumido se determinó por la diferencia entre el oxígeno del flujo que entra y sale de la cámara herméticamente cerrada en la que está respirando el animal.

El CO₂ producido por el animal se determinó por la diferencia del CO₂ a la salida y entrada de la cámara herméticamente cerrada, en la que está respirando el animal.

La valoración de ambos gases se realizó al final del experimento, tras cierre del flujo durante 1 minuto, según técnicas aprendidas por miembros de nuestro equipo investigador con Mortola³¹², en el Departamento de Fisiología de la Universidad McGill, Montreal (Canadá).

3.4. RECOGIDA DEL MATERIAL PULMONAR

Para proceder a la recogida del material, se siguieron básicamente las pautas descritas por Frank y Groseclose^{313,314} y aprendidas personalmente por miembros de nuestro equipo en los laboratorios de los autores.

Se utilizaron 15 animales por cada grupo y situación experimental para la obtención de muestras para el estudio por inmunohistoquímica, salvo en la situación experimental de hipoxia que se utilizaron 5. Se utilizaron 18 animales por cada grupo y situación experimental para la obtención de muestras para la determinación de ARNm del VEGF, salvo en la situación experimental de hipoxia que se utilizaron 6.

Los animales fueron anestesiados intraperitonealmente con pentotal sódico, a dosis de 30 mg/kg (previamente diluido en agua destilada estéril: 0.5 mg/10 ml agua).

A los animales de 0 días de vida, les fueron extraídos los pulmones y procesados para su análisis tras finalizar cada uno de los experimentos: la

exposición a aire, hipoxia, hipoxia más aire o hipoxia más hiperoxia. A los animales para ser estudiados a los 4 y 14 días de vida, tras finalizar cada uno de los experimentos al nacimiento, se les mantuvo con la madre en aire ambiente hasta alcanzar la edad programada por lo que no se da el subgrupo de hipoxia ya que equivale al subgrupo hipoxia más aire.

3.5. EXTRACCIÓN Y PREPARACIÓN DE PULMONES PARA EL ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE VEGF

Tras anestesiarse al animal, se abrió el tórax para exponer los pulmones y el cuello para localizar la tráquea. Con un catéter tipo abbocath® se canalizó la tráquea y se prefundió formol tamponado al 10%, a una presión de 20 cm de H₂O, para lograr la expansión y fijación de ambos pulmones en las ratas. Una vez expandidos los pulmones, se ligó la tráquea, fueron extraídos del animal y se introdujeron en un recipiente con el fijador.

A continuación se mantuvieron en el fijador un máximo de 24 horas y se realizó su inclusión en parafina.

3.5.1. Matrices de tejidos (“tissue microarrays”)

Para el estudio se confeccionaron ocho “tissue microarrays” (Fig. 5) con inclusión de muestras pulmonares procedentes de 5 animales por grupo y situación experimental. Todas las muestras se incluyeron por triplicado (bloques de los grupos experimentales de 14 días de vida) o por quintuplicado (bloques de los grupos experimentales de 0 y 4 días de vida), siguiendo los criterios establecidos por Kononen et al³¹⁵.

Se prepararon los bloques donantes de parafina, con un mínimo aconsejado de 2 mm de profundidad tisular y con una adecuada preservación antigénica durante el proceso de fijación. Se seleccionó la zona elegida en el bloque de parafina. Se confeccionó una plantilla, identificando todos los cilindros y su disposición en el array adjudicándoles un número para identificar el animal, el grupo y la fase experimental (Fig. 6). En un bloque de parafina en blanco, de 40 x 25 mm, utilizado como receptor de las muestras titulares, se introdujeron los cilindros seleccionados con agujas de 0,6 mm (muestras de los animales de 0 días de vida), 1mm (muestras de los animales de 4 días de vida) y 2 mm (muestras de los animales de 14 días de vida), ajustando la profundidad de descenso de las agujas aproximadamente a 3mm. Una vez terminado, se

introdujo el bloque en una estufa a 50°C durante 10 minutos aproximadamente. Esto permite que los cilindros del tejido se adhieran mejor a la parafina en los agujeros del “array” del bloque receptor. Se cortaron a 3-4 micras y a partir de aquí se procesaron los cortes histológicos como cualquier corte de tejido.

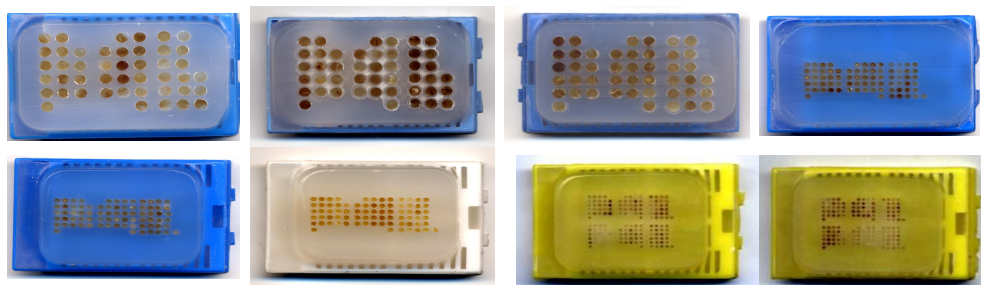


Figura 5. Imagen los bloques de parafina utilizados para el estudio.

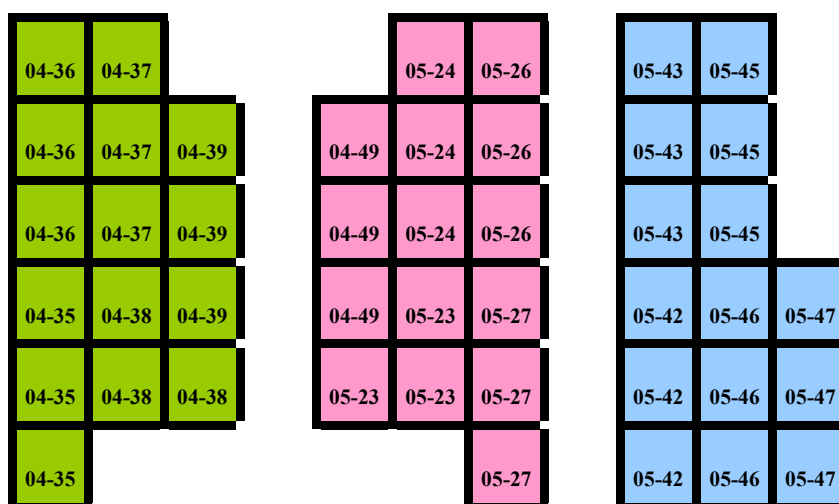


Figura 6. Modelo de una de las plantillas empleadas en el estudio. Correspondiente al bloque 1.

3.6. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DEL VEGF

La técnica de inmunohistoquímica fue realizada sobre los cortes histológicos de 3-5 micras obtenidos del “tissue microarrays”, que incluían las muestras de los distintos grupos y fases experimentales (Fig.7). Se realizó de forma simultánea en los ocho “tissue microarrays” para reducir al mínimo la posible variabilidad interensayo debida a las condiciones de tinción.

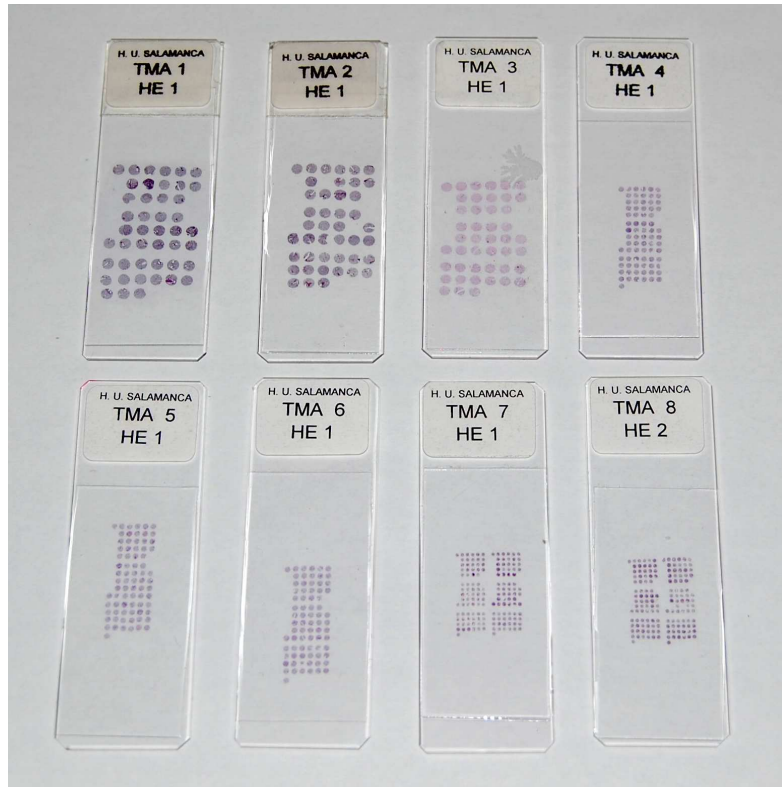


Figura 7. Cortes histológicos empleados en el estudio.

La incubación del anticuerpo y los reactivos utilizados (Tabla 2) fue realizada de modo automático mediante el procesador OPTIMAX PLUS (A. Menarini Diagnostics, San Diego). El anticuerpo primario utilizado para el estudio fue el anti-VEGF-A humano de conejo (sc-152 Santa Cruz Biotech, Santa Cruz) empleando una dilución 1:100.

El protocolo seguido para la realización de la técnica inmunohistoquímica fue el detallado en la tabla 2: sistema Polímero “vision biosistem”. Posteriormente se procedió a la deshidratación y montaje.

Acción	Temperatura(°C)	tiempo
Desparafinar	72°	
Alcohol		5'
Lavado		5'
Recuperación de Ag		30'
Lavado	35°	5'
Peroxidasa		8'
Lavado		5'
Ac primario		50'
Lavado		5'
Post-primario		8'
Lavado		2'
Polímero		8'
Lavado		2'
Agua destilada		5'
DAB=diaminobencidina		5'
Lavado		5'
DAB		5'
Lavado		5'
Agua destilada		5'

Tabla 2. Protocolo para técnica de inmunohistoquímica.

3.6.1. Análisis por densitometría

Se emplearon técnicas de procesamiento de imágenes para realizar el análisis de densidad óptica (DO) sobre los cortes histológicos del tejido sólo con inmunotinción para el VEGF. Se obtuvieron imágenes digitales de ocho bits en la escala de grises (Fig. 8) con microscopio Zeiss Axioscop 40 equipado con una cámara digital (Axiocam MRc5, Zeiss).

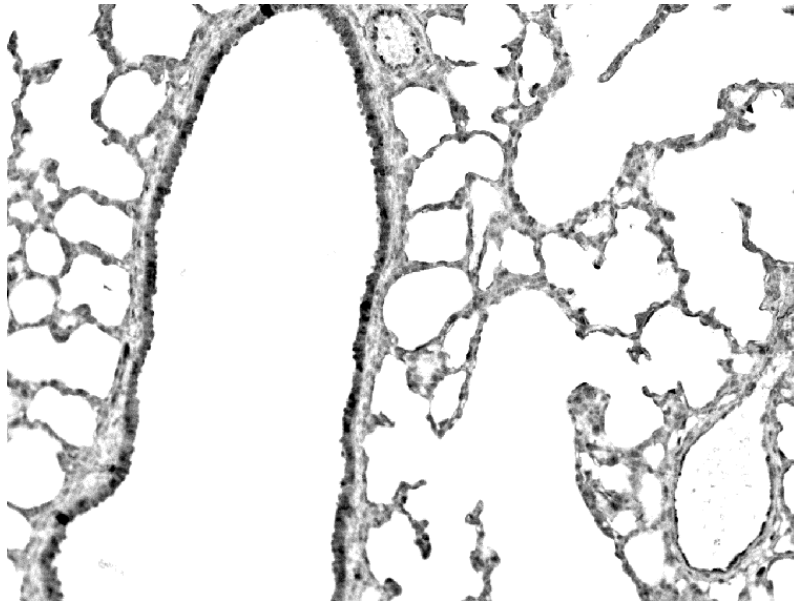


Figura 8. Imagen en escala de grises de corte histológico de pulmón con inmunotinción para el VEGF

Las imágenes fueron analizadas empleando el programa ImageJ (Rasband, W.S., National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2008). Los valores en píxel de 0 y 255 corresponden a los colores negro y blanco respectivamente. Para mantener las condiciones de iluminación idénticas, dentro del margen dinámico de la cámara digital, entre las diferentes sesiones de captura de imagen los ajustes de todos los componentes se mantuvieron inalterados y la iluminación real fue ajustada por la intensidad de la lámpara de microscopio y empleando filtros de densidad neutra en el microscopio. Además al principio de cada sesión se obtuvieron distribuciones de niveles de grises similares sobre una lámina porta objeto vacía. Para reducir al mínimo el riesgo de influir en los resultados por fluctuaciones en la iluminación, antes de cada sesión de captura, se capturaron las imágenes digitales con un filtro escalonado de densidad óptica (NT32-599, Edmund Optics, York, Reino Unido) y los valores de grises fueron calibrados en niveles de densidad óptica, empleando por tanto niveles de densidad óptica en vez de medidas de niveles de grises. Se capturaron las imágenes digitales ($367803,65 \mu\text{m}^2 - 1292 \times 968$ pixels) para cada cilindro del “tissue microarray”, empleando un objetivo 20X (PL Fluorar, N.A.: 0,50). Para cada imagen, los píxeles que correspondían al área que parecía tener inmunotinción para el VEGF fueron segmentados por el umbral visual y las medidas fueron

limitadas al área seleccionada. Se obtuvieron medidas de media de densidad óptica.

3.7. EL ANÁLISIS DE ARNm.

3.7.1. Extracción de pulmones para el análisis de ARNm

Después de anestesiar al animal, se abrió el abdomen y se seccionaron los vasos abdominales para favorecer la exanguino. Se abrió el tórax y, después de retirar la orejuela izquierda para facilitar así el drenaje, los pulmones fueron rápidamente perfundidos, vía ventrículo derecho, para realizar la exanguino pulmonar completa. La perfusión se realizó con tampón fosfato salino (PBS Sigma) hasta que los pulmones estuvieron completamente limpios y libres de sangre. Los pulmones extraídos se dividieron en porciones de 20 mgrs que fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta su utilización. En todo momento se tomaron medidas para prevenir la contaminación por RNAsas. Se utilizaron 6 animales por cada subgrupo experimental.

3.7.2. Aislamiento de ARN total desde el tejido pulmonar

El ARN total fue extraído del tejido pulmonar empleando el RNeasy Mini Kit (QIAGEN) según el protocolo para aislamiento de ARN total desde tejido animal que se describe a continuación:

1. El tejido pulmonar se homogeneizó en 600 µl de tampón RLT (tampón de lisis) con un homogeneizador Omni 1.000 (Omni International, Inc. Waterbury, Connecticut)
2. Se centrifugó el tejido lisado durante 3 minutos a 14000 rpm en microcentrífuga (Beckman Coulter Microfuge® 18 Centrifuge) recogiendo el sobrenadante.
3. El lisado se mezcló con 600 µl de etanol 70% .
4. Se dispensaron 700 µl de la muestra a una columna RNeasy mini colocada en un tubo colector y se centrifugó durante 15 seg a 14000 rpm para adherir el ARN a la membrana de silica-gel. Se descartó el flujo sobrante. Por cada volumen que excedió de 700 µl se aplicaron alícuotas sucesivamente en la columna RNeasy y se centrifugó, descartando el flujo sobrante después de cada paso de centrifugación.

5. Se lavó membrana con tampón RW1 (700 μ l) y se centrifugó durante 15 seg a 15000 rpm.
6. Se lavó la membrana dos veces con tampón RPE (500 μ l) y se centrifugó durante 2 minutos a 14000 rpm.
7. Se centrifugó en microcentrífuga a velocidad máxima durante 3 minutos.
8. El ARN se eluyó dos veces con 40 μ l de agua libre en RNasas.
9. La integridad del ARN se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1% con tinción con bromuro de etidio (Fig. 9). El ARN total fue almacenado a -20°C hasta su uso para la síntesis de ADNc.

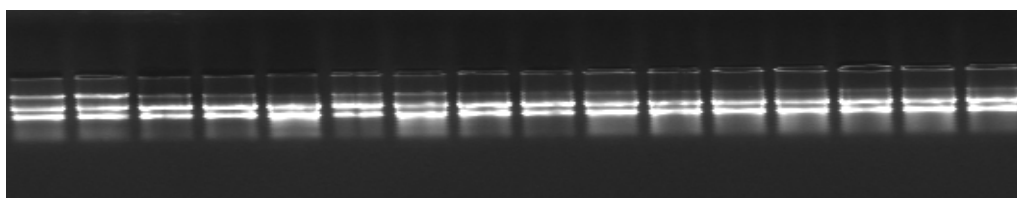


Figura 9. Gel de electroforesis de ARN total.

3.7.3. DETERMINACIÓN DE ARNm DE VEGF

El VEGF ARNm fue determinado mediante RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa por transcripción inversa).

Las reacciones de transcripción inversa y amplificación de ADN se realizarán en dos pasos:

3.7.3.1. Síntesis de primera cadena de ADNc

Se empleó la SuperScript™ III RT (Invitrogen) para sintetizar la primera cadena de ADNc empleando los siguientes 19 μ l de reacción para 5 μ g de ARN total:

1. Se mezclaron 200-500 ng de oligo(dT)₁₂₋₁₈ (1 μ l de la dilución 0,25 μ g/ μ l), 5 μ g de ARN total (1 μ l), 1 μ l de dNTP Mix 10mM y 10 μ l de agua libre en RNasas. Se incubaron a 65°C durante 5 minutos en termociclador (MWG-BIOTECH), posteriormente en hielo durante 1 minuto y se centrifugaron.
2. Se añadieron 4 μ l de 5X first strand buffer, 1 μ l de DTT 0,1M y 1 μ l de SuperScript™ III RT (200 U/ μ l) y se mezcló con vórtex.

3. Se incubó a 50°C durante 45 minutos y se inactivó por calentamiento durante 70°C durante 15 minutos, todos estos procesos se realizaron automáticamente mediante termociclador.

Se almacenaron las muestras a -20°C hasta su amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

3.7.1.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se amplificó el ADNc por PCR utilizando el sistema PCR Master Mix (PROMEGA). La reacción se llevó a cabo en frío y en campana de flujo laminar (Telstar BH-10), añadiendo 12,5 µl de PCR Master Mix, 2X (Taq ADN polimerasa 50 U/ml, suministrada en una reacción tampón pH 8,5, 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP, 3mM MgCl₂), 3 µl de ADNc, 1 µl de cada cebador y 7,5 µl de agua libre en nucleasas. El volumen final de reacción fue de 25 µl. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador MWG-BIOTECH.

Los cebadores (Tabla 3) que se emplearon fueron diseñados a partir de la secuencia de ADN M32167 del gen VEGF³¹⁶ suministrados por TIB MOLBIOL de forma liofilizada, fueron reconstituidos con agua estéril libre de nucleasas y se almacenaron a -20°C en alícuotas de 10 µl a una concentración molar de 10 µM. Generaron diferentes productos, dependiendo de isoforma de VEGF amplificada, VEGF₁₂₀ de 431 bp (equivalente a la isoforma humana VEGF₁₂₁), VEGF₁₆₄ de 563 bp (equivalente a la isoforma humana VEGF₁₆₅) y VEGF₁₈₈ de 635 bp (equivalente a la isoforma humana VEGF₁₈₉).

Los cebadores (Tabla 3) que se emplearon como control fueron de GAPDH (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa) que generó un producto de 623 bp. Fueron reconstituidos con agua estéril libre de nucleasas y se almacenaron a -20°C en alícuotas de 10 µl a una concentración molar de 10 µM.

Gen	Secuencia de cebadores
VEGF	5'- CACCGCCTTGGCTTGTACAT- 3'
	5'- CTGCTCTCTTGGGTGCACTG- 3'
GAPDH	5'- ATGGTGAAGGTCGGTGTCAACG-3'
	5'- GATGCAGGGATGATGTTCTGGG- 3'

Tabla 3. Secuencia de cebadores empleados para VEGF y GAPDH.

El programa de amplificación que se llevó a cabo en el termociclador MWG-BIOTECH se muestra en la siguiente tabla (tabla 4):

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	94°C	5'	
Desnaturalización	94°C	1'	40
Anillamiento	50°C	1'	
Extensión	72°C	1'	
Extensión	72°C	10'	

Tabla 4. Programa de amplificación por PCR.

Los resultados de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2% con tinción con bromuro de etidio empleando el marcador MARKER VIII (Genómica), visualizados con luz ultravioleta (Viber Lourmat) y capturada la imagen con cámara digital incorporada (VisiDoc-It™ Imaging System UVP).

3.7.1.3. Análisis por densitometría

Para la cuantificación del ARNm se midió la intensidad de las bandas por densitometría empleando el programa ImageJ (Rasband, WS, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2008). Se empleó la opción de análisis de gel. Sobre las imágenes digitales de 8 bits de los geles de electroforesis se seleccionaron las bandas. El programa generó un gráfico con el perfil de intensidades, se definió el área de

interés y se obtuvieron medidas del área seleccionada (Fig.10). Las mediciones se realizaron por triplicado.

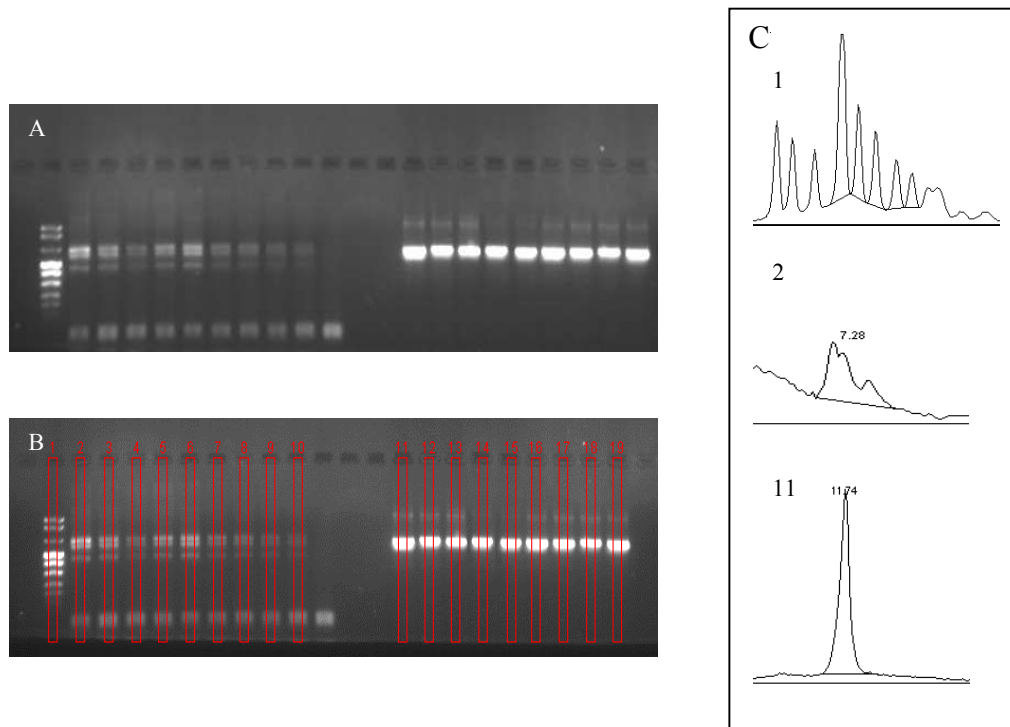


Figura 10. A Imagen de gel de electroforesis. B Imagen de gel de electroforesis con bandas seleccionadas. C Gráfico de perfil de intensidades con números correspondientes a la banda seleccionada. 1 perfil de intensidades del marcador de peso molecular, 2 perfil de intensidades del gen VEGF, 11 perfil de intensidad del gen GAPDH.

La normalización se realizó a partir de la intensidades de las bandas del marcador de concentración conocida (Fig.11). Los resultados se expresaron por la relación VEGF/GAPDH.

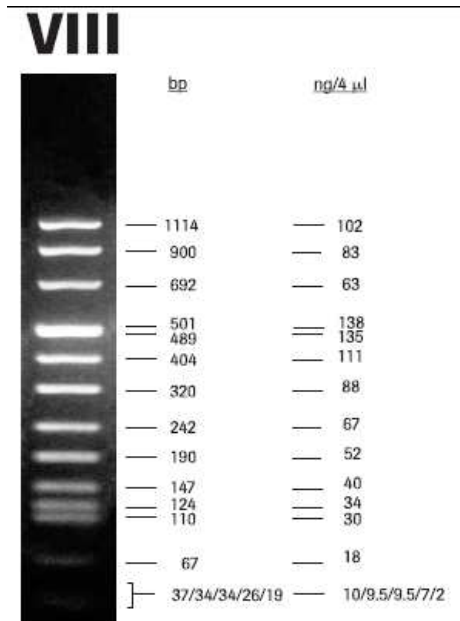


Figura 11. Concentración de los fragmentos del marcador de peso molecular.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico fue realizado empleando el programa SPSS versión 12.0. Se incluyó:

Estadística descriptiva: valoración de medidas de tendencia central (media aritmética) y de dispersión (desviación estándar).

La comparación de medias se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) previo estudio de homogeneidad de varianza. Cuando un valor F fue mayor que el valor crítico para una p de 0,05, las comparaciones entre los grupos se realizaron con el test de Tamhane 2 cuando las varianzas eran diferentes y con el test de Bonferroni cuando no había diferencias entre las varianzas.

4. RESULTADOS

4.1. CRECIMIENTO. PESO Y LONGITUD

Los pesos de las ratas al nacimiento los hemos expresado como media y desviación estándar (DS). Las ratas que recibieron dexametasona prenatal tuvieron un peso al nacimiento menor respecto al grupo control siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$) en los subgrupos de “hipoxia”, “hipoxia + aire” e “hipoxia + hiperoxia”. Las ratas que recibieron betametasona prenatal tuvieron un peso al nacimiento menor que el grupo control en todos los subgrupos con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) (Tabla 5) (Fig.12). No hubo diferencias significativas (NS) entre el grupo de dexametasona prenatal y el grupo de betametasona prenatal.

	Control		Dexametasona		Betametasona	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Aire	6,09	0,60	5,50	0,31	5,18*	0,21
Hipoxia	6,12	0,34	5,09*	0,15	5,21*	0,38
Hipoxia + Aire	5,77	0,29	4,99*	0,28	4,91*	0,42
Hipoxia + Hiperoxia	6,12	0,54	5,23*	0,30	4,99*	0,24

Tabla 5. Peso de las ratas (en gramos), según grupos y subgrupos. Día 0. * $p < 0,001$ respecto a su homólogo del grupo control.

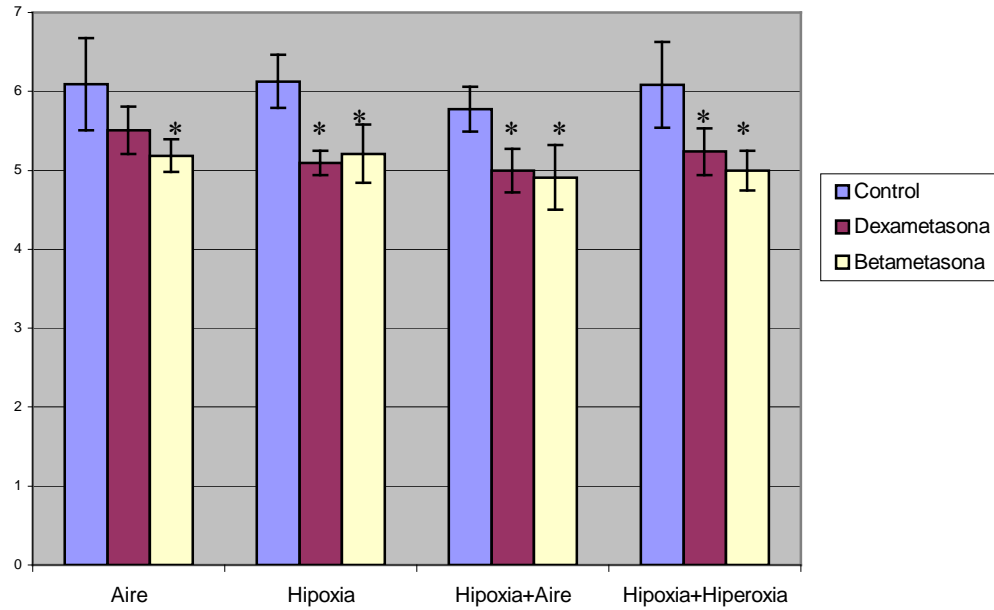


Figura 12. Peso de las ratas (en gramos). Día 0. * $p < 0,001$ respecto su homólogo del grupo control.

La longitud de las ratas al nacimiento la hemos expresado como media y desviación estándar (DS). No se objetivaron diferencias significativas (NS) en los valores de la longitud entre los distintos grupos y subgrupos al nacimiento (día 0) (Tabla 6) (Fig.13).

	Control		Dexametasona		Betametasona	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Aire	4,88	0,34	4,42	0,30	4,71	0,29
Hipoxia	4,43	0,40	4,78	0,25	4,77	0,27
Hipoxia + Aire	4,48	0,28	4,58	0,33	4,76	0,20
Hipoxia + Hiperoxia	4,64	0,19	4,79	0,19	4,75	0,29

Tabla 6. Longitud de las ratas (cm), según grupos y subgrupos. Día 0.

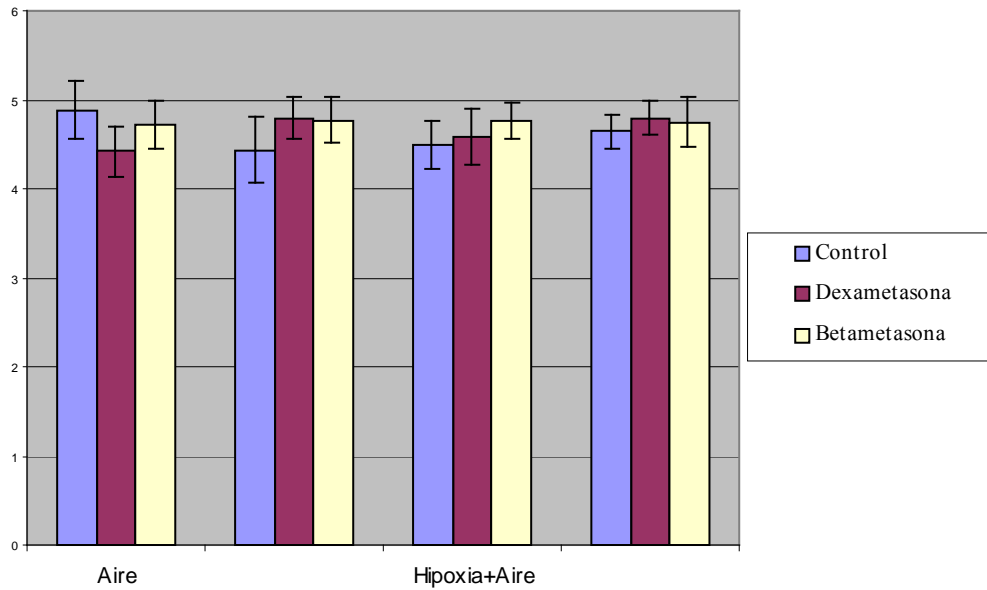


Figura 13. Longitud de las ratas (cm) según grupos y subgrupos

Respecto al peso corporal, en el grupo control se observó un aumento progresivo con la edad. Dicho incremento fue más pronunciado a partir del 4º día de edad (Fig.14).

En los grupos dexametasona y betametasona también se produjo este incremento de peso gradual y más pronunciado a partir del 4º día, pero los valores alcanzados a la edad de 14 días, fueron menores respecto al grupo control, con diferencias significativas ($p < 0,001$) (Fig.14). Comparando el grupo que recibió dexametasona prenatal con el grupo que recibió betametasona prenatal los pesos alcanzados a los 14 días fueron menores en el primer grupo, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) (Fig.14).

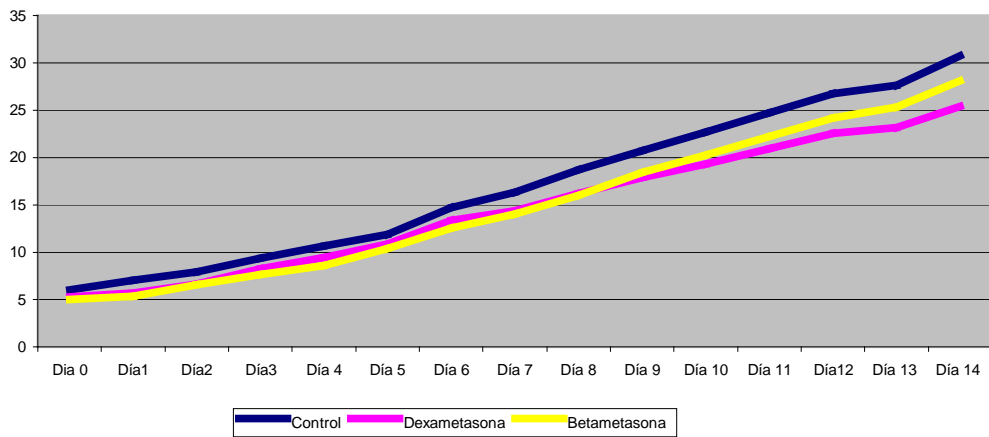


Figura 14 . Evolución del peso (g) de las ratas desde el día 0 hasta el 14 posnatal, según grupo experimental.

Respecto a la longitud de las ratas, en el grupo control se observó un aumento lineal con la edad (Fig. 15).

En los grupos dexametasona y betametasona también se produjo este incremento de longitud gradual, pero los valores alcanzados fueron menores que los del grupo control a la edad de 14 días con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) (Fig.15) No se observaron diferencias significativas (NS) entre los grupos de dexametasona prenatal y betametasona prenatal.

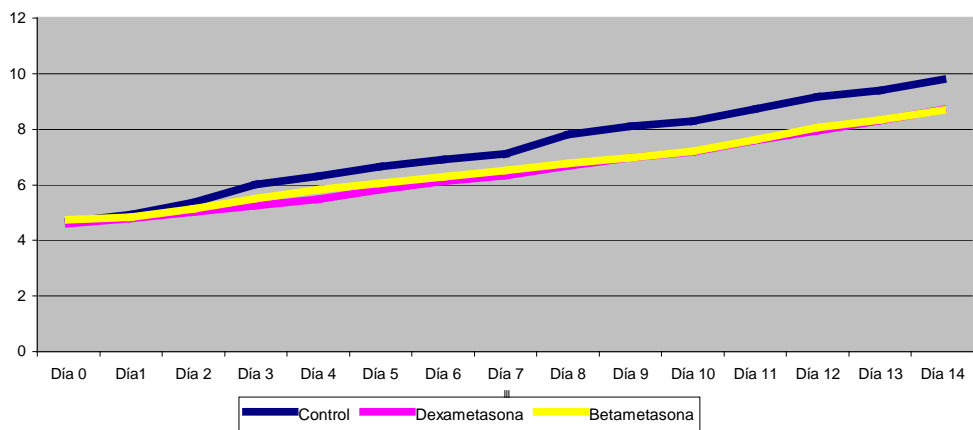


Figura 15. Evolución la de longitud (cm) de las ratas desde el día 0 al día 14 postnatal, según grupo experimental.

4.2. METABOLISMO:

4.2.1. DIFERENCIA DE TEMPERATURA

Los resultados obtenidos de las diferencias de temperatura entre final e inicio de cada experimento y según subgrupos los hemos expresado como media y desviación estándar (DS) (Tabla 7).

	Control		Dexametasona		Betametasona	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Aire	-0,02	0,01	-0,03	0,004	-0,02	0,02
Hipoxia	-1,07**	0,13	-0,06*†	0,023	-0,05*	0,026
Hipoxia + Aire	-0,41**	0,06	-0,04*	0,023	-0,04*	0,028
Hipoxia + Hiperoxia	-0,26**	0,04	-0,02*	0,009	-0,05*	0,026

Tabla 7. Diferencia de temperatura (°C) * $p < 0,001$ vs misma situación experimental (“aire”, “hipoxia”, “hipoxia + aire”, “hipoxia + hiperoxia”) del grupo control; ** $p < 0,001$ vs. situación experimental aire del mismo grupo (control, dexametasona, betametasona). † $p < 0,05$ vs situación experimental aire del mismo grupo (control, dexametasona, betametasona)..

Aire

Las ratas del grupo control no tuvieron prácticamente diferencia de temperatura después y antes de esta situación experimental ($-0,02 \pm 0,01^\circ\text{C}$). La diferencia de temperatura en el grupo de ratas tratadas con dexametasona prenatal fue de $-0,03 \pm 0,004^\circ\text{C}$. La diferencia de temperatura en ratas tratadas con betametasona prenatal fue de $-0,02 \pm 0,02^\circ\text{C}$. Las diferencias entre el grupo control y los grupos tratados con corticoides prenatales no fueron estadísticamente significativas (NS) (Tabla 7)(Fig.16).

Hipoxia

En el grupo control se observó, tras la situación de hipoxia, un descenso en la temperatura de $-1,07 \pm 0,13^\circ\text{C}$. La diferencia de temperatura en el grupo de ratas tratadas con dexametasona prenatal fue de $-0,06 \pm 0,023^\circ\text{C}$. La diferencia de temperatura en ratas tratadas con betametasona prenatal fue de $-0,05 \pm 0,026^\circ\text{C}$. Las diferencias entre el grupo control y los grupos tratados con corticoides prenatales fueron estadísticamente significativas ($p < 0,001$) (Tabla 7) (Fig.16).

Hipoxia y recuperación con aire

La temperatura del grupo control cuando se expuso a hipoxia más aire, sufrió un descenso de $-0,41 \pm 0,06^{\circ}\text{C}$. En el grupo de ratas tratadas con dexametasona prenatal la temperatura descendió mucho menos: $-0,04 \pm 0,023^{\circ}\text{C}$. En el grupo tratado con betametasona prenatal la temperatura también descendió mucho menos que en el grupo control: $-0,04 \pm 0,028^{\circ}\text{C}$. Las diferencias entre el grupo control y los grupos tratados con corticoides prenatales fueron estadísticamente significativas ($p < 0,001$) (Tabla 7) (Fig. 16).

Hipoxia y recuperación con hiperoxia

El cambio producido en la temperatura de las ratas del grupo control, tras hipoxia más hiperoxia fue de $-0,26 \pm 0,04^{\circ}\text{C}$. El grupo que recibió dexametasona prenatal disminuyó menos su temperatura: $-0,02 \pm 0,009^{\circ}\text{C}$. En las ratas tratadas con betametasona prenatal, también se produjo una disminución menor de la temperatura con respecto al grupo control: $-0,05 \pm 0,026$. Las diferencias entre los grupos tratados con corticoides prenatales y el grupo control fueron estadísticamente significativas ($p < 0,001$) (Tabla 7) (Fig.16).

También se analizaron los cambios producidos en las diferentes situaciones experimentales (“aire”, “hipoxia”, “hipoxia + aire”, “hipoxia + hiperoxia”) dentro del mismo grupo, objetivándose una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$) en el descenso de la temperatura en las ratas expuestas a hipoxia en el grupo control comparada con los animales del subgrupo “aire” del mismo grupo. En las situaciones experimentales de “hipoxia + aire” e “hipoxia + hiperoxia” siguió existiendo una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$) en el descenso de la temperatura en los animales del grupo control comparándolos con la situación “aire” del mismo grupo. En el grupo de dexametasona prenatal existió un descenso de la temperatura en las ratas expuestas a hipoxia respecto a la situación experimental “aire” del mismo grupo ($p < 0,05$). No existieron diferencias significativas (NS) en los resultados obtenidos de los animales correspondientes a las situaciones experimentales de “hipoxia + aire” e “hipoxia + hiperoxia” respecto a los resultados obtenidos en los animales del subgrupo experimental “aire” dentro del grupo dexametasona prenatal. En el grupo de betametasona prenatal no hemos encontrado diferencias significativas

(NS) entre la situación experimental “aire” y la situaciones de “hipoxia”, “hipoxia + aire” e “hipoxia + hiperoxia” (Tabla 7)(Fig.16).

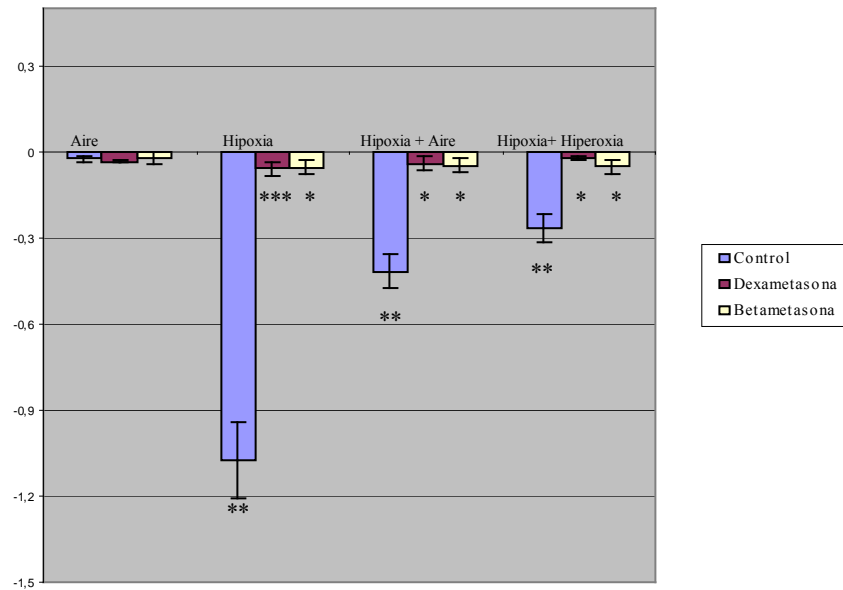


Figura 16 . Diferencia de temperatura según subgrupos. * $p < 0,001$ vs grupo control en la misma situación experimental (“aire”, “hipoxia + aire”, “hipoxia + hiperoxia”). ** $p < 0,05$ vs situación aire del mismo grupo experimental (control, dexametasona, betametasona).

4.2.2. OXÍGENO CONSUMIDO

Los valores de oxígeno consumido de los distintos subgrupos (diferencia de O₂ a la entrada y salida de la cámara) se detallan a continuación, se expresan como media y desviación estándar (Tabla 8) (Fig.17).

	Control		Dexametasona		Betametasona	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Aire	3,93	0,21	3,6	0,58	3,7	0,52
Hipoxia	2,23**	0,29	2,5**	0,44	2,56**	0,29
Hipoxia + Aire	3,37**	0,24	2,86*†	0,25	2,76***	0,25
Hipoxia + Hiperoxia	2,93**	0,37	3,80*‡	0,38	3,96*‡	0,12

Tabla 8. Diferencia de oxígeno (%) a la entrada y la salida de la cámara en los subgrupos. *p<0,001 respecto al grupo control. **p<0,001 vs situación experimental “aire” del mismo grupo. †p<0,005 vs situación experimental “aire” del mismo grupo. ‡p<0,001 respecto a la situación experimental “hipoxia + aire” del mismo grupo.

Aire

En las ratas del grupo control de la situación experimental “aire”, la diferencia de oxígeno fue de $3,93 \pm 0,21$. En el grupo tratado con dexametasona prenatal fue de $3,6 \pm 0,58$. En el grupo tratado con betametasona prenatal fue de $3,7 \pm 0,52$. Aunque los valores en los dos grupos que recibieron corticoides prenatales fueron menores respecto al grupo control, la diferencia no fue significativa (NS) (Tabla 8) (Fig.17).

Hipoxia

El oxígeno consumido por las ratas del grupo control de la situación experimental “hipoxia” fue de $2,23 \pm 0,29$, en el caso del grupo tratado con dexametasona prenatal fue $2,5 \pm 0,44$ y en el grupo tratado con betametasona prenatal fue de $2,56 \pm 0,29$. Aunque los valores en los dos grupos que recibieron corticoides prenatales fueron mayores respecto al grupo control, la diferencia no fue significativa (NS) (Tabla 8) (Fig.17).

Hipoxia y recuperación con aire

Las ratas sometidas a hipoxia y recuperadas con aire del grupo control presentaron un valor de oxígeno consumido de $3,37 \pm 0,23$. El valor de

oxígeno consumido en esta situación experimental en el grupo de ratas tratadas con dexametasona prenatal fue de $2,86 \pm 0,24$ y en el grupo tratado con betametasona prenatal de $2,76 \pm 0,24$, siendo las diferencias de estos dos grupos (tratados con corticoides prenatales) respecto al grupo control estadísticamente significativas ($p < 0,001$) (Tabla 8) (Fig.17).

Hipoxia y recuperación con hiperoxia

En los animales del grupo control, tras hipoxia y recuperación con hiperoxia, el oxígeno consumido fue de $2,93 \pm 0,36$. En los del grupo tratado con dexametasona prenatal el valor fue de $3,80 \pm 0,37$ y en los animales del grupo tratado con betametasona prenatal fue de $3,96 \pm 0,12$ con diferencias significativas ($p < 0,001$) de estos dos últimos grupos (tratados con corticoides prenatales) respecto al grupo control (Tabla 8) (Fig.17).

También se analizaron los cambios producidos en el consumo de oxígeno obtenido de los animales de experimentación en las diferentes situaciones experimentales dentro del mismo grupo, objetivándose una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$) en el consumo de oxígeno, que fue menor, en las ratas del subgrupo experimental “hipoxia” en los tres grupos experimentales (control, dexametasona prenatal y betametasona prenatal) comparada con los resultados obtenidos en los animales del subgrupo experimental “aire” del mismo grupo. También fue menor el consumo de oxígeno, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,005$), en los animales del subgrupo experimental de “hipoxia más aire” en los tres grupos experimentales (control, dexametasona prenatal y betametasona prenatal) comparado con el consumo de oxígeno obtenido en los animales de la situación experimental “aire”. En los animales del grupo control, en la situación “hipoxia + hiperoxia”, el consumo de oxígeno fue menor, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$), respecto al obtenido en los animales de la situación experimental “aire”. Los resultados obtenidos en los grupos que recibieron corticoides prenatales no presentaron diferencias significativas (NS) al comparar los resultados obtenidos en los animales de la situación experimental “hipoxia + hiperoxia” con los obtenidos en la situación experimental “aire” (Tabla 8) (Fig.17).

En los grupos que recibieron corticoides prenatales se observó un mayor consumo de oxígeno en la situación experimental de “hipoxia +

hiperoxia”, cuyos resultados fueron estadísticamente significativos ($p < 0,001$) respecto a los obtenidos en los animales de la situación experimental de “hipoxia + aire” dentro del mismo grupo (Tabla 8) (Fig.17).

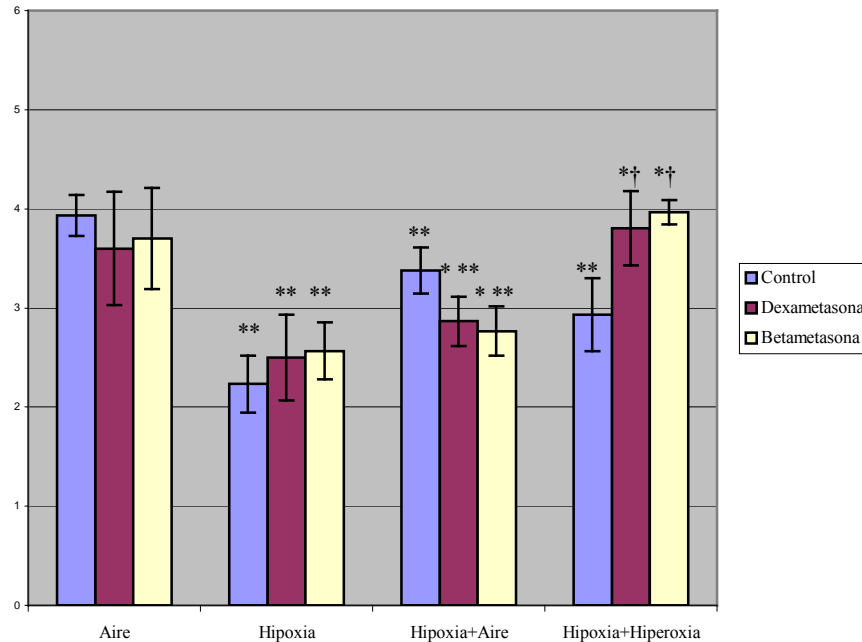


Figura 17. Diferencia de oxígeno (%) a la entrada y la salida de la cámara en los distintos subgrupos. * $p < 0,001$ respecto al grupo control. ** $p < 0,005$ vs situación experimental “aire” del mismo grupo. † $p < 0,001$ respecto “hipoxia + aire” del mismo grupo.

4.2.3. CO₂ PRODUCIDO

Los valores medios y la desviación estándar de cada subgrupo se han expuesto a continuación (Tabla 9).

	Control		Dexametasona		Betametasona	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Aire	0,061	0,005	0,056	0,004	0,053*	0,006
Hipoxia	0,027**	0,003	0,028**	0,006	0,027**	0,001
Hipoxia + Aire	0,057	0,007	0,053	0,004	0,054	0,005
Hipoxia + Hiperoxia	0,057	0,007	0,051	0,003	0,052	0,004

Tabla 9. Diferencia de CO₂ (%) entre la salida y entrada de la cámara en los subgrupos. * $p < 0,05$ respecto al grupo control en su misma situación experimental. ** $p < 0,001$ vs. situación experimental “aire” del mismo grupo.

Aire

En las ratas del grupo control en situación experimental “aire”, el CO₂ producido fue de $0,061 \pm 0,005$. En el grupo tratado con dexametasona prenatal el valor obtenido fue inferior, de $0,056 \pm 0,004$ sin significación estadística (NS). En los animales del grupo tratado con betametasona prenatal el valor obtenido también fue inferior, $0,053 \pm 0,006$ con diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto los valores obtenidos en los animales del grupo control (Tabla 9) (Fig.18).

Hipoxia

Para las ratas del grupo control sometidas a hipoxia, el CO₂ producido fue de $0,027 \pm 0,003$. En los animales del grupo tratado con dexametasona prenatal fue de $0,028 \pm 0,006$ y en los del grupo tratado con betametasona prenatal fue de $0,027 \pm 0,001$. No hubo diferencias significativas (NS) entre los grupos, en esta situación experimental (Tabla 9) (Fig.18).

Hipoxia y recuperación con aire

Las ratas del grupo control sometidas a hipoxia y recuperadas con aire (subgrupo “hipoxia + aire”), presentaron un valor de CO₂ producido de $0,057 \pm 0,006$. Las ratas del grupo tratado con dexametasona prenatal, en esta misma situación experimental, fue de $0,053 \pm 0,004$ y en el grupo tratado con betametasona prenatal fue de $0,054 \pm 0,005$. Entre los distintos grupos no hubo diferencias estadísticamente significativas (NS) (Tabla 9) (Fig.18).

Hipoxia y recuperación con hiperoxia

En los animales del grupo control tras hipoxia y recuperación con hiperoxia (subgrupo “hipoxia + hiperoxia”), el CO₂ producido fue de $0,057 \pm 0,007$. En los animales del grupo tratado con dexametasona prenatal y en esta misma situación experimental, fue de $0,051 \pm 0,002$ y en el grupo tratado con betametasona prenatal fue de $0,052 \pm 0,004$. Los resultados obtenidos en los distintos grupos experimentales no presentaron diferencias estadísticamente significativas (NS) (Tabla 9) (Fig.18).

También se compararon los resultados obtenidos de los animales de las diferentes situaciones experimentales (“aire”, “hipoxia”, “hipoxia + aire”, “hipoxia + hiperoxia”) dentro del mismo grupo (control, dexametasona prenatal y betametasona prenatal), objetivándose una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$) en la producción de CO₂, que fue

menor, en las ratas expuestas a “hipoxia” en los tres grupos experimentales (control, dexametasona prenatal y betametasona prenatal) comparada con los resultados obtenidos de los animales de la situación experimental “aire” del mismo grupo (Tabla 9) (Fig.18).

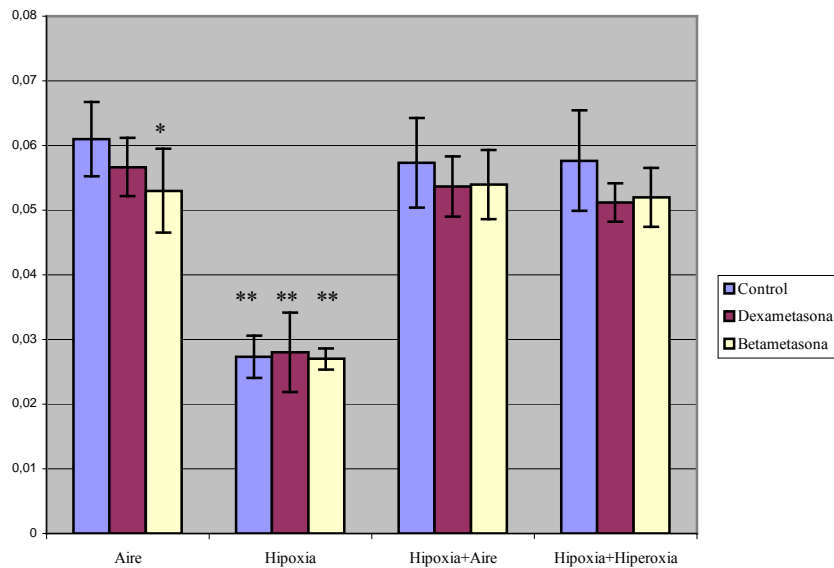


Figura 18. Diferencia de CO₂ (%) entre la salida y entrada de la cámara en los subgrupos. *p<0,05 respecto al grupo control. **p<0,001 vs. situación experimental “aire” del mismo grupo.

4.3. VEGF

Los resultados obtenidos de las diferentes muestras de este estudio respecto al VEGF, los agruparemos según la edad de los animales en el momento de su análisis: 0 días, 4 días y 14 días.

Para una mejor comprensión de los resultados, en el análisis de los diferentes días expondremos primero los resultados obtenidos para la expresión del ARNm del VEGF, y en segundo lugar los resultados de la expresión del VEGF obtenidos por inmunohistoquímica. Posteriormente expondremos los resultados obtenidos en los diferentes grupos y situaciones experimentales analizando y comparando la evolución entre los tres días de vida de los animales estudiados.

ARNm del VEGF pulmonar

Las bandas obtenidas de VEGF pulmonar y las bandas del control GAPDH, se ilustran en las figuras (Fig.19)(Fig.20)(Fig.21). Los niveles de expresión de ARNm de GAPDH fueron estables en todos los grupos experimentales.

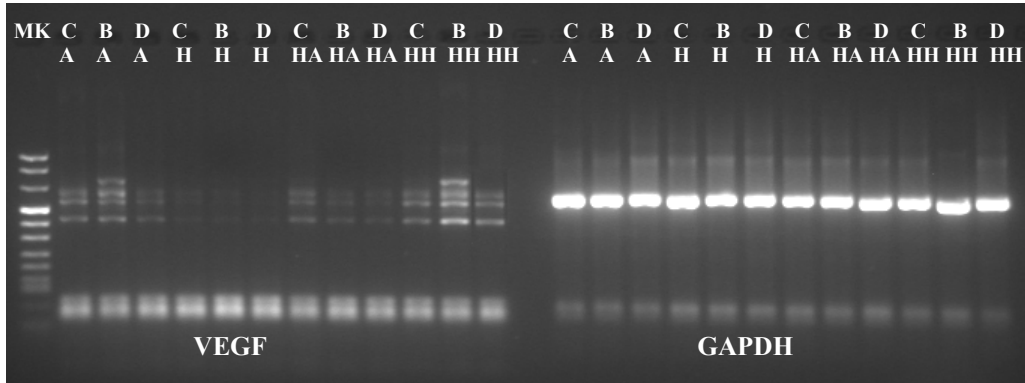


Figura 19. Fotografía de gel de electroforesis representando las bandas de ARNm de VEGF y de GAPDH obtenidas de los diferentes subgrupos experimentales el día 0.

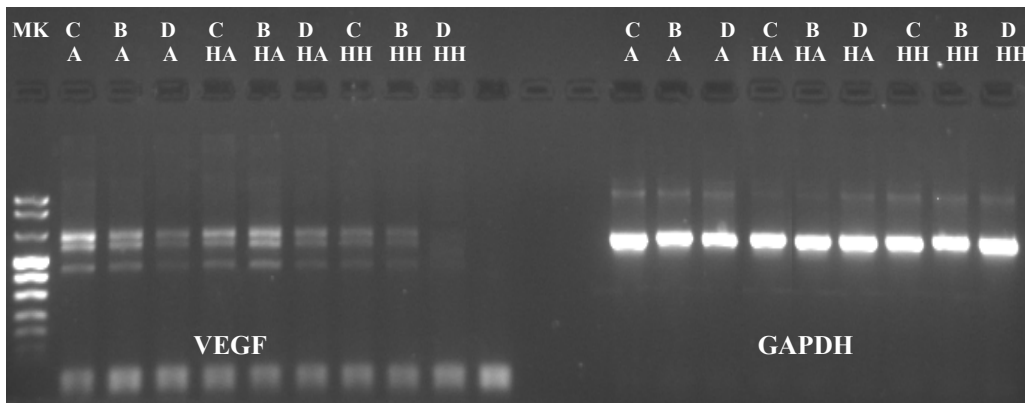


Figura 20. Fotografía de gel de electroforesis representando las bandas de ARNm de VEGF y de GAPDH obtenidas de los diferentes subgrupos experimentales el día 4.

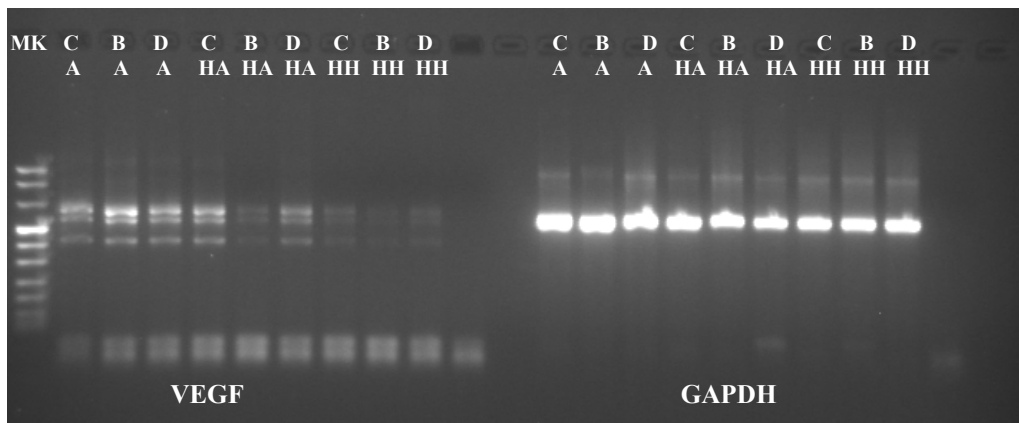


Figura 21. Fotografía de gel de electroforesis representando las bandas de ARNm de VEGF y de GAPDH obtenidas de los diferentes subgrupos experimentales el día 14.

Inmunohistoquímica

La distribución de la inmunotinción del VEGF era muy abundante en las células epiteliales de la vía aérea distal y células alveolares (neumocitos), también se observaba en células endoteliales, células musculares de la pared vascular y en células intersticiales (Fig.22).

El estudio semicuantitativo de la expresión de esta proteína en el citoplasma celular, obtenidas por densitometría, han puesto de manifiesto diferencias importantes entre los grupos y situaciones experimentales del presente estudio (Fig.23)(Fig.24)(Fig.25).

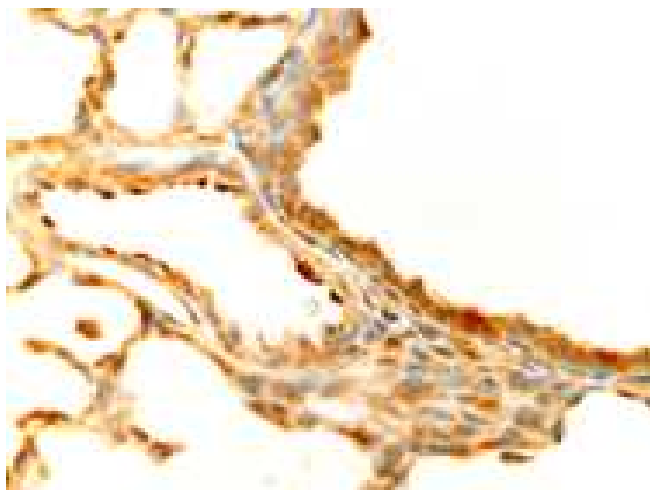


Figura 22. Inmunotinción del VEGF.

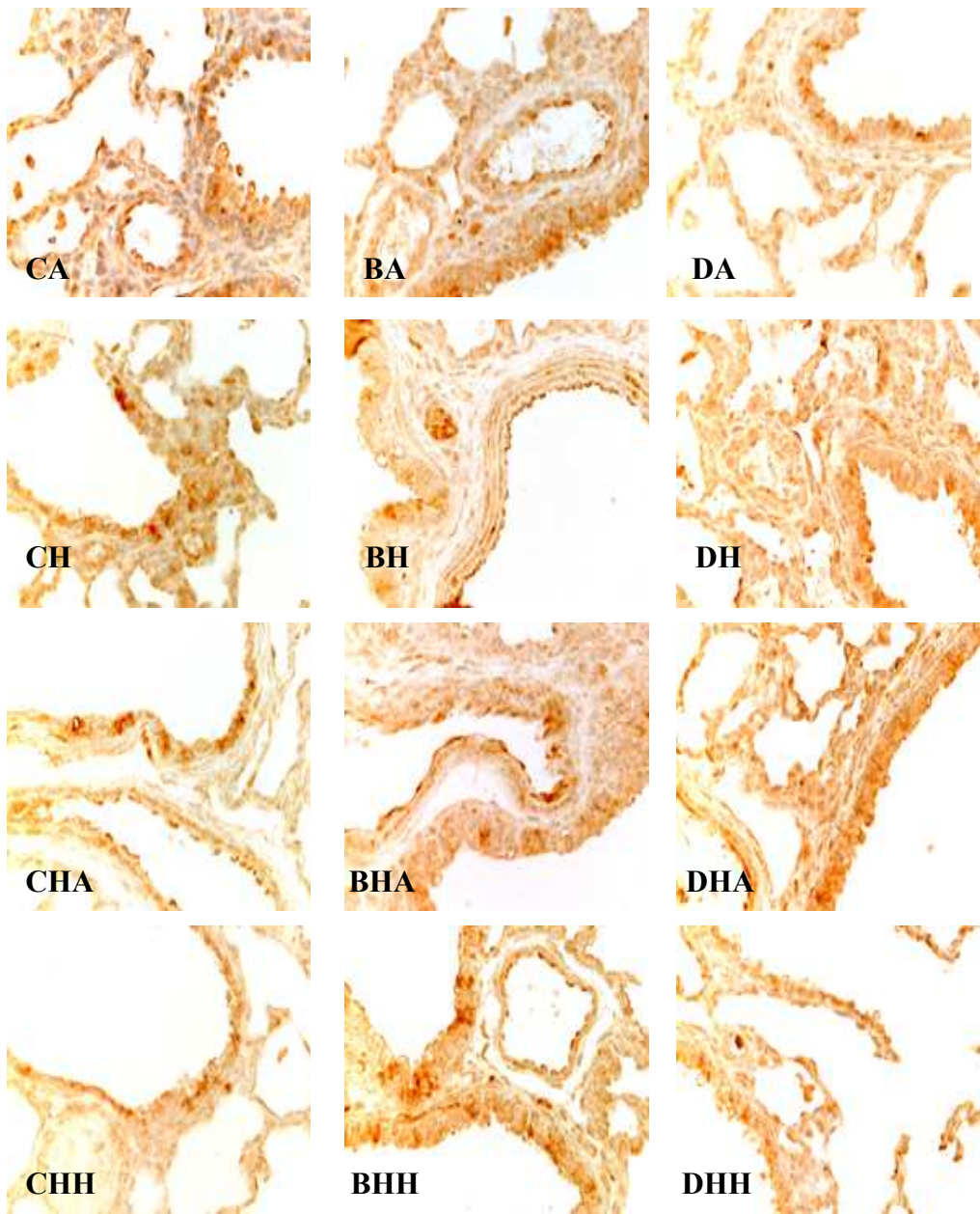


Figura 23. Inmunotinción del VEGF pulmonar en los distintos grupos y situaciones experimentales. Día 0

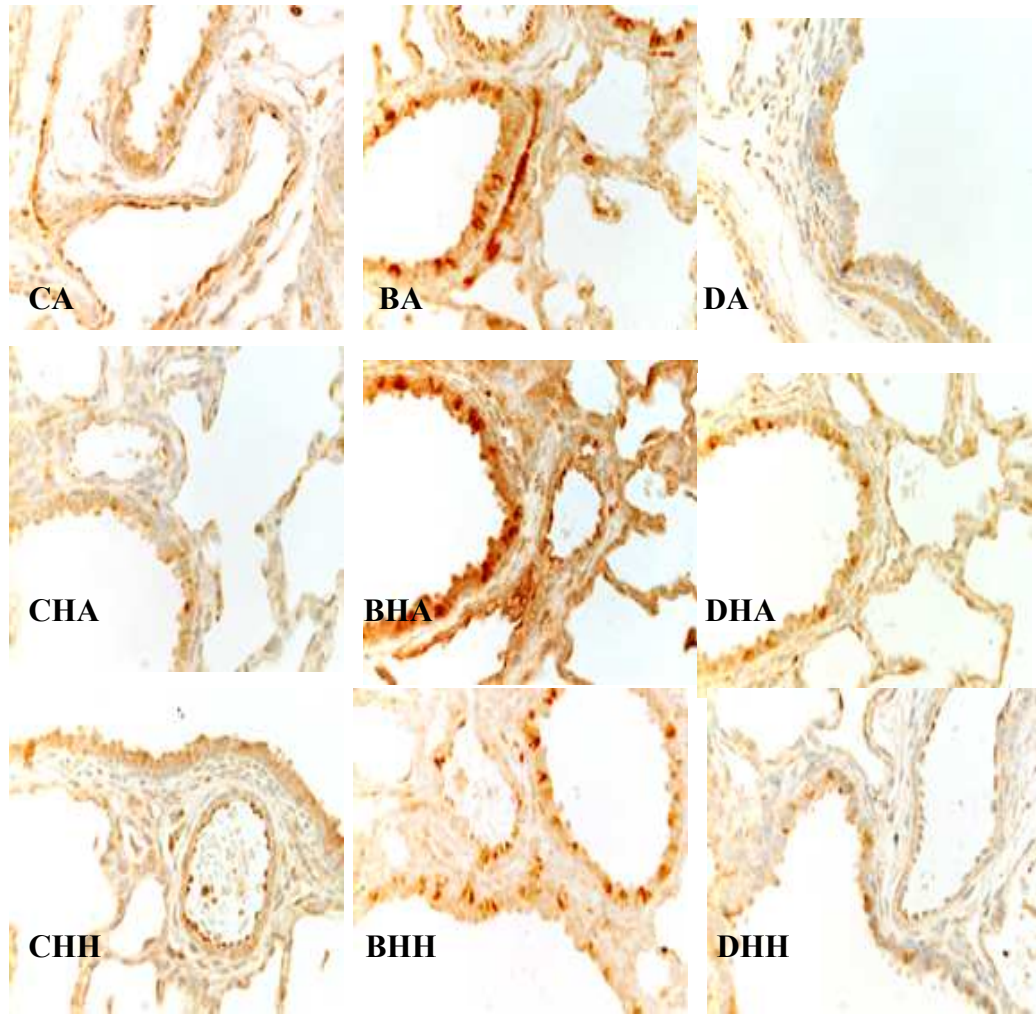


Figura 24. Inmunotinción del VEGF pulmonar en los distintos grupos y situaciones experimentales. Día 4

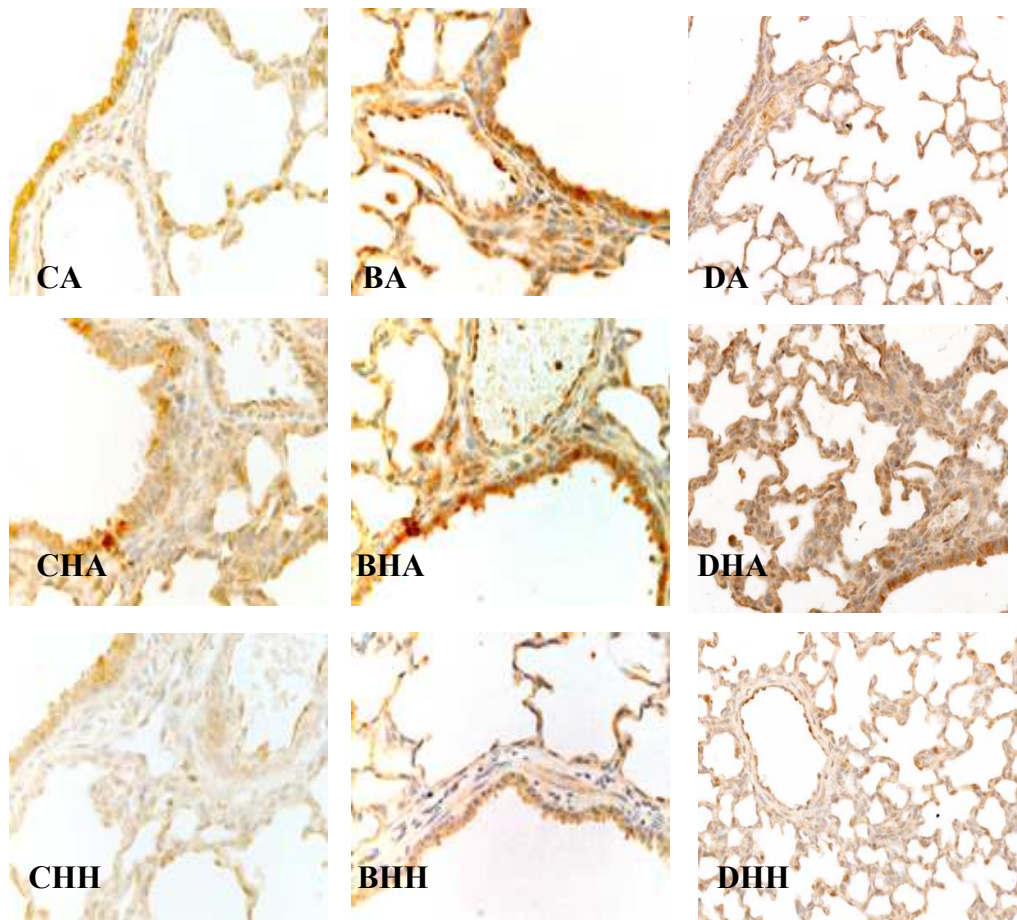


Figura 25. Inmunotinción del VEGF pulmonar en los distintos grupos y situaciones experimentales. Día 14

4.3.1 ANIMALES DE 0 DÍAS DE VIDA

4.3.1.1. ARNm del VEGF pulmonar día 0

Los valores medios de ARNm VEGF/ARNm GAPDH y la desviación estándar, obtenidos por densitometría, de cada subgrupo experimental, se exponen a continuación (Tabla 10).

	Control		Dexametasona		Betametasona	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Aire	0,116851	0,028843	0,093276	0,040236	0,196833	0,142826
Hipoxia	0,096737	0,058460	0,077528	0,030319	0,102054	0,031548
Hipoxia + Aire	0,143683	0,106586	0,105458	0,075469	0,100747	0,058556
Hipoxia+ Hiperoxia	0,107797	0,048955	0,084985	0,038690	0,315537	0,112001

Tabla 10. Valores de ARNm VEGF/ARNm GAPDH obtenidos por densitometría. Día 0

El estudio comparativo y su significación estadística, de los resultados de ARNm VEGF/ARNm GAPDH, obtenidos por densitometría, los presentamos en la tabla (Tabla 11).

Grupos 1° / 2°	VEGF/GAPDH 1°		VEGF/GAPDH 2°		p
	Media	SD	Media	SD	
CA < BA	0,116851	0,028843	0,196833	0,142826	1,000
CA > DA			0,093276	0,040236	1,000
CA > CH			0,096737	0,058460	1,000
CA < CHA			0,143683	0,106586	1,000
CA > CHH			0,107797	0,048955	1,000
CH < BH	0,096737	0,058460	0,102054	0,031548	1,000
CH > DH			0,077528	0,030319	1,000
CH < CHA			0,143683	0,106586	1,000
CH < CHH			0,107797	0,048955	1,000
CHA > BHA	0,143683	0,106586	0,100747	0,058556	1,000
CHA > DHA			0,105458	0,075469	1,000
CHA > CHH			0,107797	0,048955	1,000
CHH > DHH	0,107797	0,048955	0,084985	0,038690	1,000
CHH < BHH *			0,315537	0,112001	0,010
BA > DA	0,196833	0,142826	0,093276	0,040236	0,987
BA > BH			0,102054	0,031548	0,997
BA > BHA			0,100747	0,058556	0,997
BA < BHH			0,315537	0,112001	0,987
BH > BHA	0,102054	0,031548	0,100747	0,058556	1,000
BH < BHH *			0,315537	0,112001	0,010
BH > DH			0,077528	0,030319	0,983
BHA < BHH *	0,100747	0,058556	0,315537	0,112001	0,007
BHA < DHA			0,105458	0,075469	1,000
BHH > DHH *	0,315537	0,112001	0,084985	0,038690	0,005
BHH > CA °			0,116851	0,028843	0,018
DA < DHA	0,093276	0,040236	0,105458	0,075469	1,000
DA > DHH			0,084985	0,038690	1,000
DA > DH			0,077528	0,030319	1,000
DH < DHA	0,077528	0,030319	0,105458	0,075469	1,000
DH < DHH			0,084985	0,038690	1,000
DHA > DHH	0,105458	0,075469	0,084985	0,038690	1,000

Tabla 11. Tabla de valores de ARNm VEGF/ARNm GAPDH obtenidos por densitometría, comparando entre si los diferentes grupos y situaciones experimentales *p≤ 0,01. °p< 0,05. Día 0.

El grupo que recibió betametasona prenatal tenía aumentada la expresión de ARNm del VEGF respecto al grupo que recibió dexametasona prenatal en las situaciones experimentales de “aire” e “hipoxia”, sin diferencias significativas (NS) y con diferencias significativas ($p < 0,01$) en la situación experimental de “hipoxia + hiperoxia”. No se observaron diferencias significativas en la situación experimental “hipoxia + aire” (NS) (Tabla 11) (Fig.26).

Comparado los resultados obtenidos en el grupo que recibió betametasona prenatal con los obtenidos en el grupo control, el grupo que recibió betametasona prenatal tenía aumentada la expresión de ARNm del VEGF en las situaciones experimentales de “aire” e “hipoxia”, sin diferencias significativas (NS) y con diferencias significativas ($p = 0,01$) en la situación experimental de “hipoxia + hiperoxia”. No se observaron diferencias significativas en la situación experimental “hipoxia + aire” (NS). El grupo que recibió betametasona prenatal en la situación experimental de “hipoxia + hiperoxia” tenía mayor expresión del ARNm del VEGF comparado con el grupo control en la situación experimental “aire” ($p < 0,05$) (Tabla 11) (Fig.26).

El grupo que recibió dexametasona prenatal tuvo menor expresión del ARNm del VEGF comparado con el grupo control en todas las situaciones experimentales sin significación estadística (NS) (Tabla 11) (Fig.26).

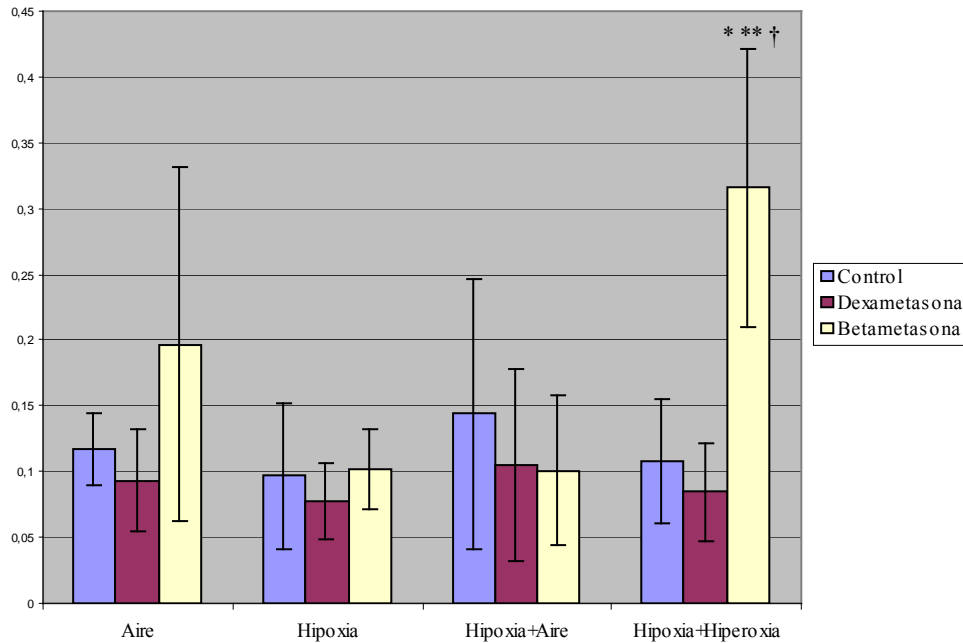


Figura 26. Valores de ARNm VEGF/ARNm GAPDH obtenidos por densitometría en los diferentes grupos y subgrupos experimentales. Día 0. * $p \leq 0,01$ respecto a su homólogo en el grupo control. ** $p \leq 0,01$ betametasona vs su homólogo en el grupo de dexametasona. † $p < 0,05$ respecto al subgrupo control aire.

Cuando se compararon, dentro de un mismo grupo, las distintas situaciones experimentales, se observaron una mayor expresión del ARNm del VEGF en la situación experimental de “hipoxia + hiperoxia” en el grupo que ha recibido betametasona prenatal comparado con la situación experimental de “hipoxia” ($p < 0,01$) y con la situación experimental de “hipoxia + aire” ($p < 0,01$). También fue mayor la expresión del ARNm del VEGF en la situación experimental de “hipoxia + hiperoxia” respecto a la situación experimental de “aire” sin diferencias significativas (NS) (Tabla 11) (Fig.27).

En los grupos control y dexametasona no se observaron diferencias significativas (NS) al comparar entre sí las distintas situaciones experimentales aunque observamos, en ambos grupos, una mayor expresión del ARNm del VEGF en la situación experimental de “hipoxia + aire” respecto al resto de situaciones experimentales (Tabla 11) (Fig.27).

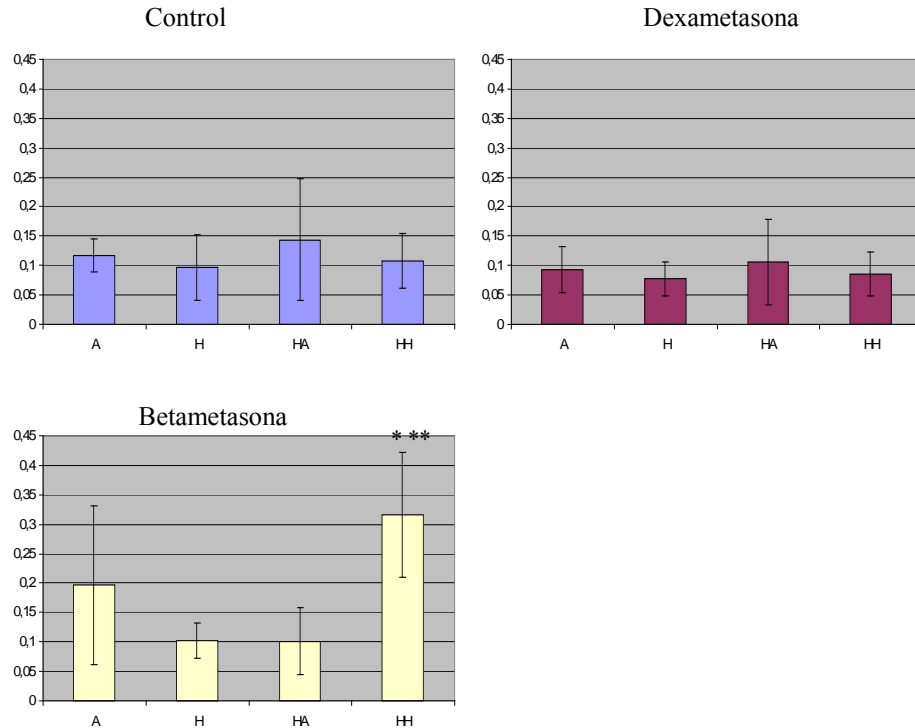


Figura 27. Valores de ARNm: VEGF/ARNm GAPDH, obtenidos por densitometría. Día 0. * $p < 0,01$ respecto a la situación experimental “hipoxia + aire” dentro del mismo grupo experimental. ** $p < 0,01$ respecto a la situación experimental “hipoxia” dentro del mismo grupo experimental.

4.3.1.2. Inmunohistoquímica del VEGF día 0

Los valores medios con su desviación estándar en los diferentes grupos y situaciones experimentales los observamos en la tabla (Tabla 12).

El estudio comparativo y su significación estadística, de los resultados de la expresión del VEGF, determinados por densitometría, en los cortes histológicos con inmunotinción para el VEGF los presentamos en la tabla (Tabla 13).

	Control		Dexametasona		Betametasona	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Aire	0,135642	0,012076	0,124604	0,007501	0,145018	0,006961
Hipoxia	0,148113	0,007793	0,133930	0,005817	0,162514	0,016860
Hipoxia + Aire	0,144713	0,006808	0,134184	0,011156	0,163463	0,013506
Hipoxia+ Hiperoxia	0,129687	0,010446	0,132023	0,009314	0,168170	0,014647

Tabla 12. Valores en densidad óptica de la inmunotinción del VEGF de los distintos grupos y situaciones experimentales. Día 0

Grupos 1° / 2°	Densidad óptica 1°		Densidad óptica 2°		p
	Media	SD	Media	SD	
CA < BA	0,135642	0,012076	0,145018	0,006961	0,108
CA > DA °			0,124604	0,007501	0,020
CA < CH °			0,148113	0,007793	0,006
CA < CHA			0,144713	0,006808	0,125
CA > CHH			0,129687	0,010446	0,990
CA < BH*			0,162514	0,016860	0,000
CA < BHA*			0,163463	0,013506	0,000
CA < BHH*			0,168170	0,014647	0,000
CH < BH	0,148113	0,007793	0,162514	0,016860	0,065
CH > DH *			0,133930	0,005817	0,000
CH > CHA			0,144713	0,006808	1,000
CH > CHH *			0,129687	0,010446	0,000
CHA < BHA °	0,144713	0,006808	0,163463	0,013506	0,003
CHA > DHA °			0,134184	0,011156	0,017
CHA > CHH *			0,129687	0,010446	0,000
CHH < DHH	0,129687	0,010446	0,132023	0,009314	1,000
CHH < BHH *			0,168170	0,014647	0,000
BA > DA *	0,145018	0,006961	0,124604	0,007501	0,000
BA < BH °			0,162514	0,016860	0,007
BA < BHA °			0,163463	0,013506	0,004
BA < BHH *			0,168170	0,014647	0,000
BH < BHA	0,162514	0,016860	0,163463	0,013506	1,000
BH < BHH			0,168170	0,014647	1,000
BH > DH *			0,133930	0,005817	0,000
BHA < BHH	0,163463	0,013506	0,168170	0,014647	1,000
BHA > DHA *			0,134184	0,011156	0,000
BHH > DHH *			0,168170	0,014647	0,132023
DA < DHA	0,124604	0,007501	0,134184	0,011156	0,060
DA < DHH			0,132023	0,009314	0,275
DA < DH *			0,133930	0,005817	0,001
DH < DHA	0,133930	0,005817	0,134184	0,011156	1,000
DH > DHH			0,132023	0,009314	1,000
DHA > DHH			0,134184	0,011156	0,132023

Tabla 13. Tabla de valores de expresión del VEGF, por inmunotinción, obtenidos por densitometría, comparando entre si los diferentes grupos y situaciones experimentales. *p≤ 0,001; °p<0,05. Día 0.

El grupo que recibió betametasona prenatal tenía aumentada la inmunotinción del VEGF respecto al grupo que había recibido dexametasona prenatal en todas las situaciones experimentales (“aire”, “hipoxia”, “hipoxia + aire”, “hipoxia + hiperoxia”) con significación estadística ($p < 0,001$) (Tabla 13) (Fig.28).

Las diferentes situaciones experimentales del grupo que recibió betametasona prenatal, comparadas con sus homólogas del grupo control, tenían mayor expresión (inmunotinción) del VEGF, siendo estadísticamente significativo para las situaciones experimentales de “hipoxia + aire” ($p < 0,005$) e “hipoxia + hiperoxia” ($p < 0,001$). Igualmente la inmunotinción del VEGF fue mayor en el grupo que recibió betametasona prenatal en las situaciones experimentales de “hipoxia”, “hipoxia + aire” e “hipoxia + hiperoxia”, respecto al grupo control en la situación experimental de “aire” con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) (Tabla 13) (Fig.28).

Las diferentes situaciones experimentales del grupo que recibió dexametasona prenatal, comparadas con sus homólogas del grupo control, tenían menor expresión (inmunotinción) del VEGF, siendo estadísticamente significativas, en las situaciones experimentales de “aire” ($p < 0,05$), “hipoxia” ($p < 0,001$) e “hipoxia + aire” ($p < 0,05$) (Tabla 13) (Fig.28).

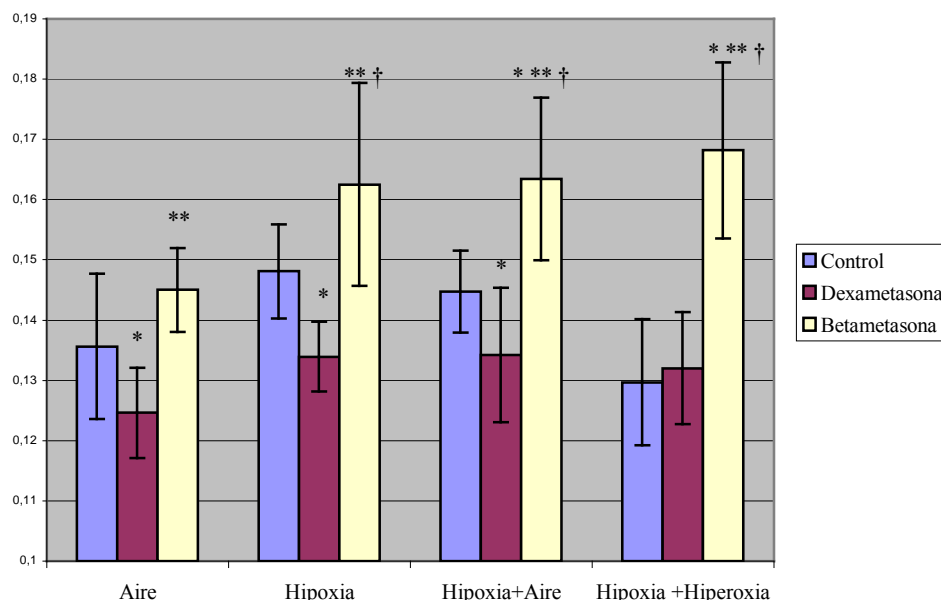


Figura 28. Representación gráfica de los valores de la expresión del VEGF por inmunotinción (densidad óptica). Día 0. * $p < 0,05$ vs grupo control. ** $p < 0,001$ betametasona vs dexametasona. † $p < 0,001$ respecto al subgrupo control aire.

Cuando comparamos, dentro de un mismo grupo, las distintas situaciones experimentales, se observó que en la situación experimental de “hipoxia” respecto a la situación experimental “aire”, existía una mayor inmunotinción del VEGF, en todos los grupos con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) (Tabla 13)(Fig.29).

En la situación experimental de “hipoxia + aire”, respecto a la situación aire, obtuvimos una mayor inmunotinción del VEGF en todos los grupos con significación estadística en el grupo que había recibido betametasona prenatal ($p < 0,005$) (Tabla 13) (Fig.29).

Cuando comparamos la situación de “hipoxia” con la situación de “hipoxia + aire” del mismo grupo, no se observaron diferencias significativas (NS) (Tabla 13) (Fig.29).

En el grupo control, la inmunotinción del VEGF estaba disminuida en la situación de “hipoxia + hiperoxia”, al compararla con el resto de situaciones experimentales, siendo esta diferencia estadísticamente significativa respecto a la situación experimental de “hipoxia” ($p < 0,001$) y a la situación experimental de “hipoxia + aire” ($p < 0,001$) (Tabla 13) (Fig.29).

En el grupo que había recibido dexametasona prenatal, la inmunotinción del VEGF en la situación de “hipoxia + hiperoxia” era muy similar a la de las situaciones de “aire”, “hipoxia” e “hipoxia + aire” sin diferencias significativas (NS) (Tabla 13) (Fig.29).

En el grupo que había recibido betametasona prenatal, la situación de “hipoxia + hiperoxia” tenía una inmunotinción del VEGF similar a las situaciones de “hipoxia” e “hipoxia + aire”, sin significación estadística (NS). Sin embargo la inmunotinción del VEGF, en esta situación experimental (hipoxia + hiperoxia) presentaba diferencias significativas ($p < 0,001$), respecto a la situación aire (Tabla 13)(Fig.29).

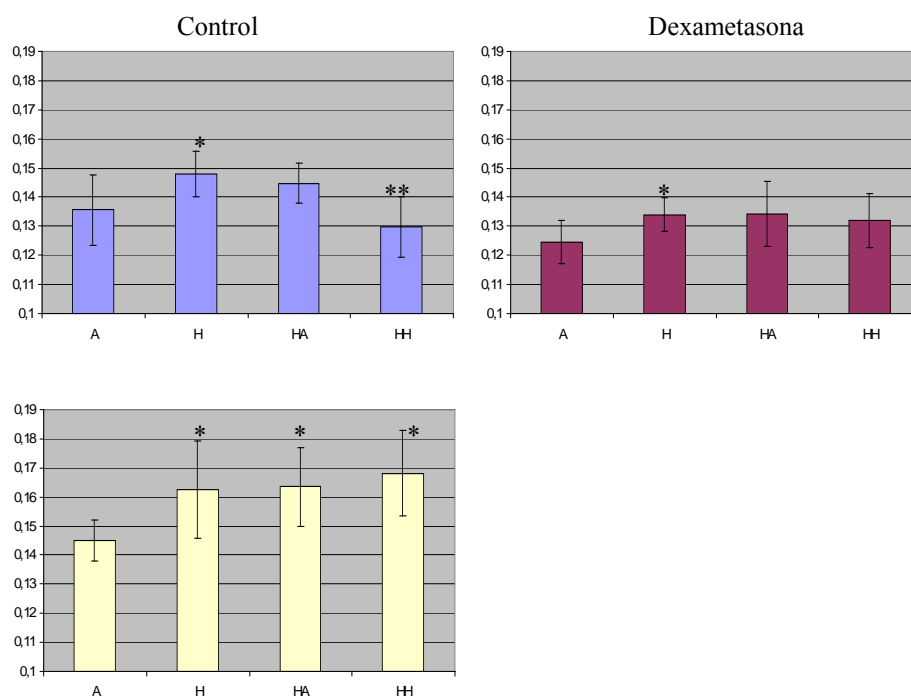


Figura 29. Representación gráfica de los valores de la expresión del VEGF por inmunotinción (densidad óptica), en cada grupo experimental con sus diferentes situaciones experimentales. Día 0. * $p < 0,05$ respecto a aire. ** $p < 0,001$ respecto a hipoxia más aire.

4.3.2 ANIMALES DE 4 DÍAS DE VIDA

4.3.2.1 ARNm del VEGF pulmonar día 4

Los valores medios de ARNm VEGF/ARNm GAPDH y la desviación estándar obtenidos por densitometría de cada subgrupo experimental se exponen a continuación (Tabla 14).

El estudio comparativo y su significación estadística, de los resultados de ARNm VEGF/ARNm GAPDH, obtenidos por densitometría, los presentamos en la tabla (Tabla 15).

	Control		Dexametasona		Betametasona	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Aire	0,337356	0,190166	0,222670	0,115746	0,299095	0,157937
Hipoxia + Aire	0,138863	0,055205	0,100172	0,066729	0,263982	0,094282
Hipoxia+ Hiperoxia	0,226061	0,151252	0,054726	0,038748	0,198935	0,101723

Tabla 14. Valores de ARNm VEGF/ARNm GAPDH obtenidos por densitometría. Día 4.

Grupos 1° / 2°	VEGF/GAPDH 1°		VEGF/GAPDH 2°		p
	Media	SD	Media	SD	
CA > BA	0,337356	0,190166	0,299095	0,157937	1,000
CA > DA			0,222670	0,115746	0,968
CA > CHA			0,138863	0,055205	0,140
CA > CHH			0,226061	0,151252	0,993
CHA < BHA	0,138863	0,055205	0,263982	0,094282	0,080
CHA > DHA			0,100172	0,066729	0,998
CHA < CHH			0,226061	0,151252	0,952
CHH > DHH	0,226061	0,151252	0,054726	0,038748	0,082
CHH > BHH			0,198935	0,101723	1,000
BA > DA	0,299095	0,157937	0,222670	0,115746	1,000
BA > BHA			0,263982	0,094282	1,000
BA > BHH			0,198935	0,101723	0,990
BHA > BHH	0,263982	0,094282	0,198935	0,101723	0,995
BHA > DHA *			0,100172	0,066729	0,013
BHH > DHH *	0,198935	0,101723	0,054726	0,038748	0,015
DA > DHA	0,222670	0,115746	0,100172	0,066729	0,200
DA > DHH*			0,054726	0,038748	0,012
DHA > DHH	0,100172	0,066729	0,054726	0,038748	0,936
DHA < CA*			0,337356	0,190166	0,043
DHH < CA*	0,054726	0,038748	0,337356	0,190166	0,011

Tabla 15. Tabla de valores de ARNm VEGF/ARNm GAPDH obtenidos por densitometría, comparando entre si los diferentes grupos y situaciones experimentales *p≤ 0,05. Día 4.

El grupo que recibió betametasona prenatal tenía aumentada la expresión de ARNm del VEGF respecto al grupo que recibió dexametasona prenatal en todas las situaciones experimentales, sin diferencias significativas en la situación experimental “aire” (NS) y con significación estadística en la situación experimental de “hipoxia + aire” (p<0,05) y en la situación experimental de “hipoxia + hiperoxia” (p<0,05) (Tabla 15) (Fig.30).

Comparado con el grupo control, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (NS) (Tabla 15) (Fig.30).

El grupo que ha recibido dexametasona prenatal tenía menor expresión del ARNm del VEGF comparado con el grupo control en todas las situaciones experimentales sin diferencias estadísticamente significativas (NS). Se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar las situaciones de “hipoxia + aire” e “hipoxia + hiperoxia” en el grupo que recibió dexametasona prenatal, con menor expresión del ARNm del VEGF, respecto al grupo control aire ($p < 0,05$) (Tabla 15) (Fig.30).

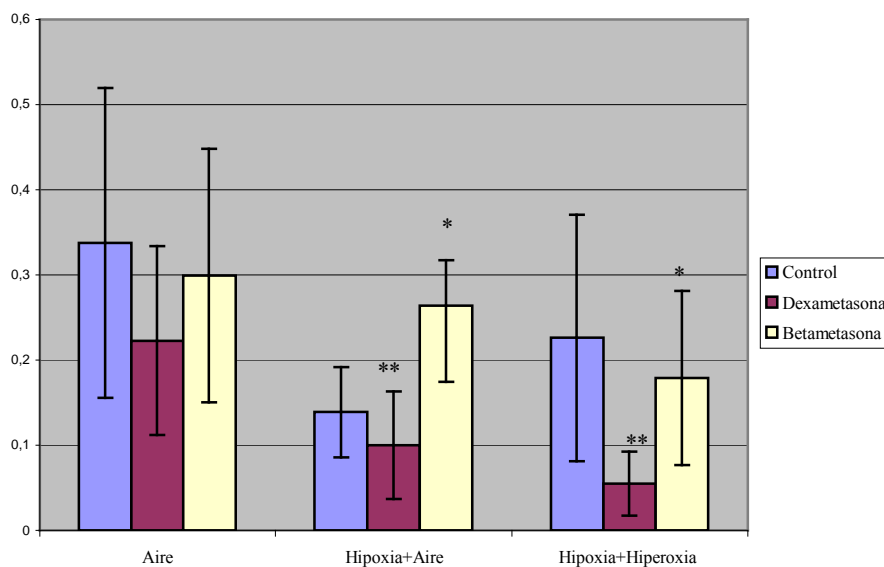


Figura 30. Valores de ARNm VEGF/ARNm GAPDH obtenidos por densitometría en los diferentes grupos y subgrupos experimentales. Día 4. * $p \leq 0,05$ betametasona vs dexametasona en la misma situación experimental. ** $p < 0,05$ respecto al subgrupo control aire.

Cuando se comparan dentro de un mismo grupo las distintas situaciones experimentales, se observó una menor expresión del ARNm del VEGF en las situaciones experimentales de “hipoxia + aire” e “hipoxia + hiperoxia” respecto la situación experimental “aire”, tanto en los grupos que habían recibido corticoides prenatales como en el grupo control, con diferencias estadísticamente significativas en el grupo de dexametasona prenatal entre las situaciones experimentales de “hipoxia + hiperoxia” y “aire” ($p < 0,05$) y sin hallazgos estadísticamente significativos en el resto de situaciones (NS) (Tabla 15) (Fig. 31).

Cuando comparamos la situación experimental de “hipoxia + aire” con la situación experimental de “hipoxia + hiperoxia”, en los grupos que

recibieron corticoides prenatales la expresión del ARNm del VEGF fue menor en la situación de “hipoxia + hiperoxia” sin diferencias significativas (NS) y en el grupo control fue menor en la situación hipoxia más aire sin significación estadística (NS) (Tabla 15) (Fig. 31).

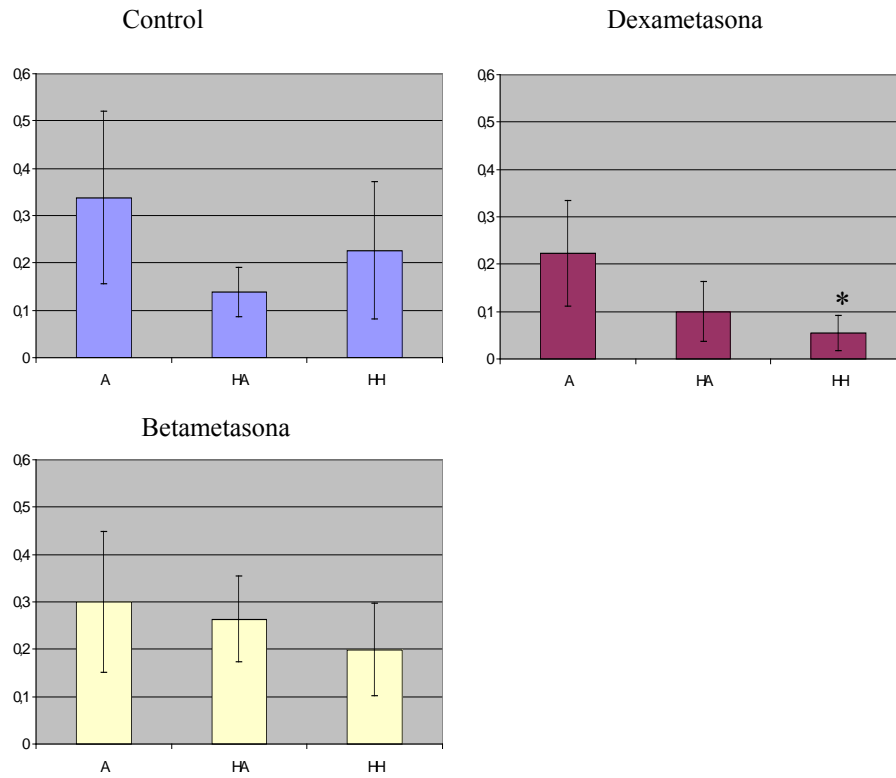


Figura 31. Valores de ARNm: VEGF/ARNm GAPDH, obtenidos por densitometría. Día 4. * $p < 0,05$ respecto a la situación experimental “aire”, dentro del mismo grupo experimental.

4.3.2.2. Inmunohistoquímica del VEGF día 4

Los valores medios con su desviación estándar en los diferentes grupos y situaciones experimentales los observamos en la tabla 16.

El estudio comparativo y la significación estadística, de los resultados de la expresión del VEGF, determinados por densitometría, en los cortes histológicos con inmunotinción para el VEGF los presentamos en la tabla 17.

	Control		Dexametasona		Betametasona	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Aire	0,156171	0,009370	0,118270	0,009768	0,162845	0,015628
Hipoxia + Aire	0,142742	0,015322	0,131900	0,006458	0,176588	0,016321
Hipoxia+ Hiperoxia	0,128504	0,012499	0,122433	0,005470	0,168800	0,013152

Tabla 16. Valores en densidad óptica de la inmunotinción del VEGF de los distintos grupos y situaciones experimentales Día 4

Grupos 1° / 2°	Densidad óptica 1°		Densidad óptica 2°		p
	Media	SD	Media	SD	
CA < BA	0,156171	0,009370	0,162845	0,015628	0,985
CA > DA *			0,118270	0,009768	0,000
CA > CHA °			0,142742	0,015322	0,032
CA > CHH *			0,128504	0,012499	0,000
CHA < BHA *	0,142742	0,015322	0,176588	0,016321	0,000
CHA > DHA			0,131900	0,006458	0,108
CHA > CHH °			0,128504	0,012499	0,032
CHH > DHH	0,128504	0,012499	0,122433	0,005470	0,708
CHH < BHH *			0,168800	0,013152	0,000
BA > DA *	0,162845	0,015628	0,118270	0,009768	0,000
BA < BHA			0,176588	0,016321	0,220
BA < BHH			0,168800	0,013152	1,000
BHA > BHH	0,176588	0,016321	0,168800	0,013152	0,957
BHA > DHA *			0,131900	0,006458	0,000
BHH > DHH *	0,168800	0,013152	0,122433	0,005470	0,000
DA < DHA *	0,118270	0,009768	0,131900	0,006458	0,000
DA < DHH			0,122433	0,005470	0,978
DHA > DHH *	0,131900	0,006458	0,122433	0,005470	0,000
DHA < CA *			0,162845	0,015628	0,000
DHH < CA *	0,122433	0,005470	0,162845	0,015628	0,000

Tabla 17. Tabla de valores de expresión del VEGF, por inmunotinción, obtenidos por densitometría, comparando entre si los diferentes grupos y situaciones experimentales *p≤ 0,001; °p<0,05. Día 4.

El grupo que recibió betametasona prenatal tenía aumentada la inmunotinción del VEGF respecto al grupo que recibió dexametasona prenatal en todas las situaciones experimentales con significación estadística ($p < 0,001$) (Tabla 17)(Fig.32).

Las diferentes situaciones experimentales del grupo que recibió betametasona prenatal, comparadas con sus homólogos del grupo control, tenían mayor expresión (inmunotinción) del VEGF, siendo estadísticamente significativo para las situaciones experimentales de “hipoxia + aire” e “hipoxia + hiperoxia” ($p < 0,001$) (Tabla 17)(Fig. 32).

Las diferentes situaciones experimentales del grupo que recibió dexametasona prenatal, comparadas con sus homólogos del grupo control, tenían menor expresión (inmunotinción) del VEGF, siendo estadísticamente significativo en la situación “aire” ($p < 0,001$) (Tabla) (Fig.). La inmunotinción del VEGF fue también menor en el grupo que recibe dexametasona prenatal en las situaciones de hipoxia más aire e hipoxia más hiperoxia respecto a la situación aire del grupo control, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) (Tabla 17)(Fig.32).

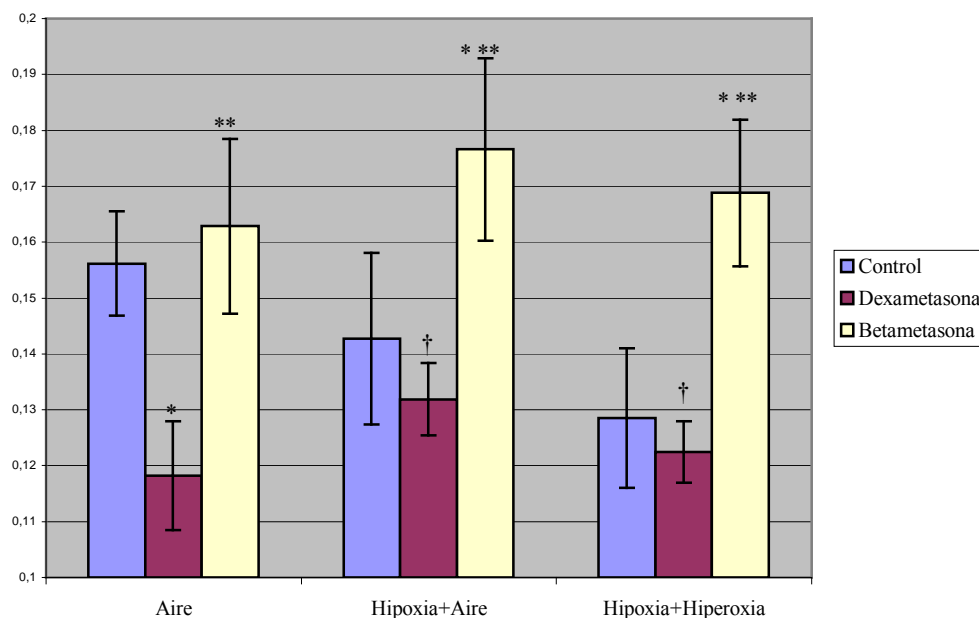


Figura 32. Representación gráfica de los valores de la expresión del VEGF por inmunotinción (densidad óptica). Día 4. * $p < 0,001$ vs grupo control. ** $p < 0,001$ betametasona vs dexametasona. † $p < 0,001$ respecto al subgrupo control aire.

Cuando comparamos, dentro de un mismo grupo las distintas situaciones experimentales, se observó que la recuperación en aire tras la hipoxia comparada con la situación experimental “aire” tenía una mayor inmunotinción para el VEGF en los grupos que habían recibido corticoides prenatales, con significación estadística en el grupo que había recibido dexametasona prenatal ($p < 0,001$) y no significativo en el grupo que ha recibido betametasona prenatal (NS). En el grupo control la situación de “hipoxia + aire” tenía menor inmunotinción para el VEGF comparada con la situación experimental de “aire”, con significación estadística ($p < 0,05$) (Tabla 17) (Fig.33).

En el grupo control la inmunotinción del VEGF fue menor, con diferencias estadísticamente significativas, en la situación experimental de “hipoxia + hiperoxia” respecto a la situación experimental “aire” ($p < 0,001$) y respecto a la situación experimental de “hipoxia + aire” ($p < 0,05$) (Tabla 17) (Fig.33).

En el grupo que recibió dexametasona prenatal la inmunotinción del VEGF, en la situación experimental de “hipoxia + hiperoxia”, fue menor comparada con las situación experimental “hipoxia + aire” siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$) (Tabla 17) (Fig.33).

En el grupo que recibió betametasona prenatal no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (NS) al comparar las diferentes situaciones experimentales realizadas en el estudio (“aire”, “hipoxia + aire” e “hipoxia + hiperoxia”) (Tabla 17) (Fig.33).

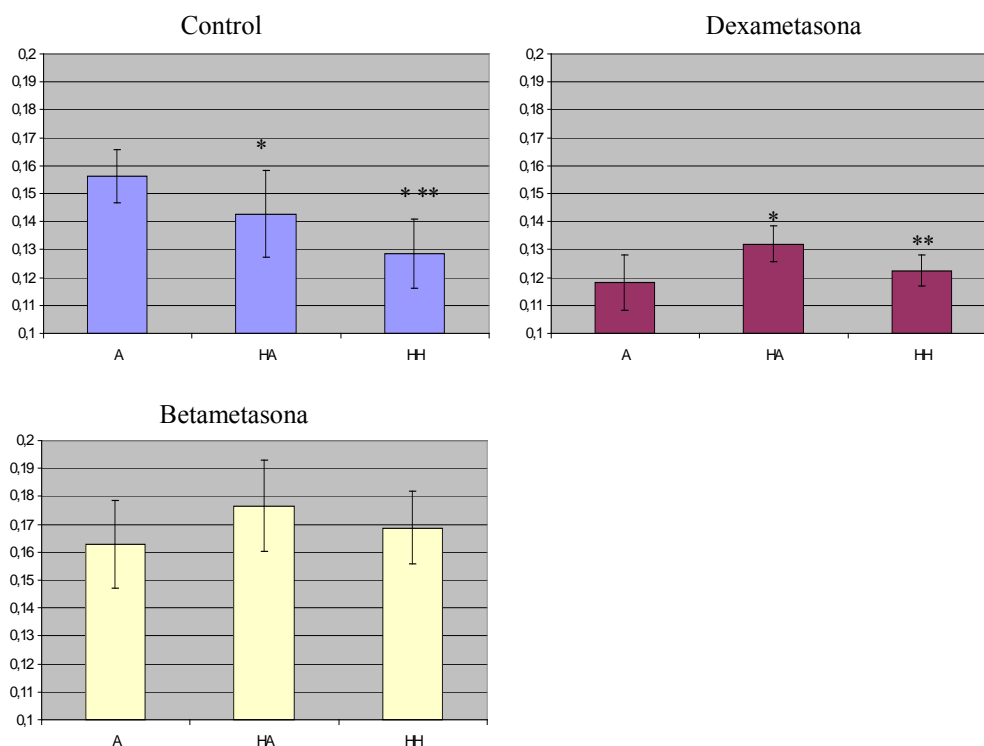


Figura 33. Representación gráfica de los valores de la expresión del VEGF por inmunotinción (densidad óptica), en cada grupo experimental con sus diferentes situaciones experimentales. Inmunotinción del VEGF (densidad óptica) Día 4. * $p < 0,05$ respecto a aire . ** $p < 0,05$ respecto hipoxia más aire.

4.3.3. ANIMALES DE 14 DÍAS DE VIDA

4.3.3.1 ARNm del VEGF día 14.

Los valores medios de ARNm VEGF/ARNm GAPDH obtenidos por densitometría y la desviación estándar de cada subgrupo se exponen a continuación (Tabla 18).

El estudio comparativo y su significación estadística, de los resultados de ARNm VEGF/ARNm GAPDH, obtenidos por densitometría, los presentamos en la tabla (Tabla 19).

	Control		Dexametasona		Betametasona	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Aire	0,101195	0,023089	0,186669	0,084058	0,299671	0,177619
Hipoxia + Aire	0,131776	0,089781	0,113271	0,035567	0,092053	0,051715
Hipoxia+ Hiperoxia	0,069701	0,038473	0,044733	0,024343	0,045360	0,017204

Tabla 18. Valores de ARNm VEGF/ARNm GAPDH obtenidos por densitometría.. Día 14.

Grupos 1° / 2°	VEGF/GAPDH 1°		VEGF/GAPDH 2°		p
	Media	SD	Media	SD	
CA < BA	0,101195	0,023089	0,299671	0,177619	0,136
CA < DA			0,186669	0,084058	0,056
CA < CHA			0,131776	0,089781	1,000
CA > CHH			0,069701	0,038473	0,414
CHA > BHA	0,131776	0,089781	0,092053	0,051715	0,998
CHA > DHA			0,113271	0,035567	1,000
CHA > CHH			0,069701	0,038473	0,646
CHH > DHH	0,069701	0,038473	0,044733	0,024343	0,805
CHH > BHH			0,045360	0,017204	0,738
BA > DA	0,299671	0,177619	0,186669	0,084058	0,932
BA > BHA			0,092053	0,051715	0,103
BA > BHH °			0,045360	0,017204	0,027
BHA > BHH	0,092053	0,051715	0,045360	0,017204	0,135
BHA < DHA			0,113271	0,035567	1,000
BHH > DHH	0,045360	0,017204	0,044733	0,024343	1,000
BHH < CA *			0,101195	0,023089	0,000
DA > DHA	0,186669	0,084058	0,113271	0,035567	0,203
DA > DHH *			0,044733	0,024343	0,000
DHA > DHH *	0,113271	0,035567	0,044733	0,024343	0,001
DHH < CA*	0,044733	0,024343	0,101195	0,023089	0,000

Tabla 19. Tabla de valores de ARNm VEGF/ARNm GAPDH obtenidos por densitometría, comparando entre si los diferentes grupos y situaciones experimentales *p≤ 0,001. °p< 0,05. Día 14.

El grupo que ha recibido betametasona prenatal tenía aumentada la expresión de ARNm del VEGF respecto al grupo que recibió dexametasona prenatal y al grupo control en la situación experimental de “aire” sin significación estadística (NS) (Tabla 19).

En las situaciones experimentales de “hipoxia + aire” e “hipoxia + hiperoxia” los grupos que habían recibido corticoides prenatales tenían menor expresión del ARNm del VEGF respecto al grupo control aunque sin significación estadística (NS) (Tabla 19).

La expresión del ARNm del VEGF fue menor en la situación experimental de “hipoxia + hiperoxia” respecto a la situación experimental de

“aire” en todos los grupos experimentales, y esta diferencia era significativa estadísticamente en el grupo que había recibido betametasona prenatal ($p < 0,05$) y en el grupo que ha recibido dexametasona prenatal ($p = 0,001$). Se observaron también diferencias estadísticamente significativas al comparar las situaciones experimentales de “hipoxia + hiperoxia” en los grupos que habían recibido dexametasona prenatal y betametasona prenatal al compararlos con la situación experimental “aire” del grupo control ($p < 0,001$) (Tabla 19) (Fig.34).

La expresión del ARNm del VEGF también era menor en la situación de “hipoxia + hiperoxia” respecto a la situación “hipoxia + aire” en todos los grupos, con significación estadística en el grupo que había recibido dexametasona prenatal ($p = 0,001$) (Tabla 19) (Fig.34).

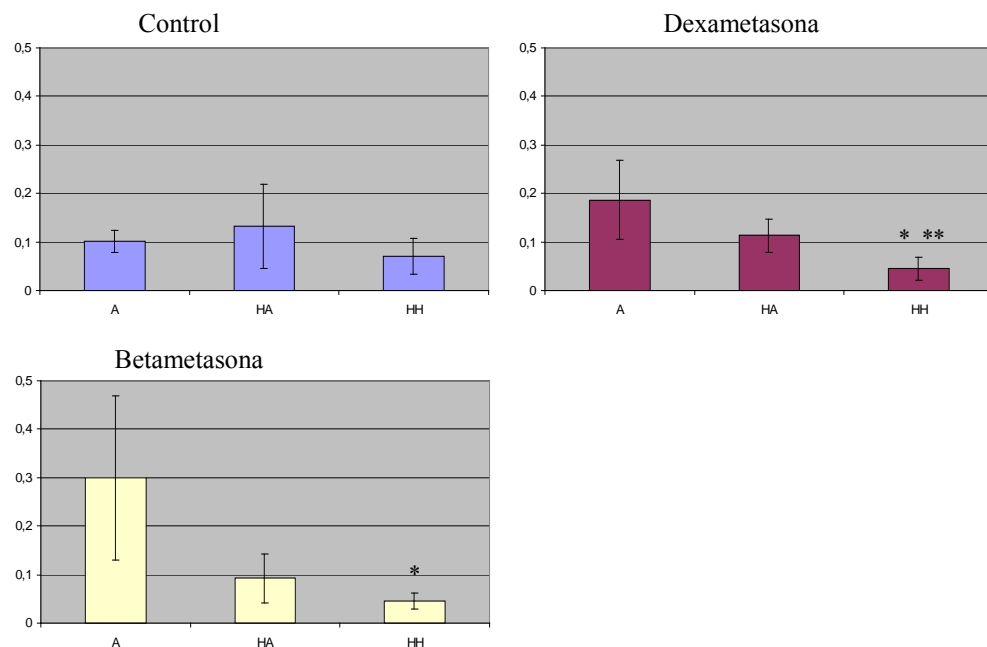


Figura 34. Valores de ARNm: VEGF/ARNm GAPDH, obtenidos por densitometría Día 14. * $p < 0,05$ respecto a la situación experimental de “aire” (dentro del mismo grupo). ** $p < 0,001$ respecto a la situación experimental de “hipoxia + aire” (dentro del mismo grupo).

4.3.3.2. Inmunohistoquímica del VEGF día 14.

Los valores medios con su desviación estándar en los diferentes grupos y situaciones experimentales los observamos en la tabla (Tabla 20).

El estudio comparativo y su significación estadística, de los resultados de la expresión del VEGF, determinados por densitometría, en los cortes

histológicos con inmunotinción para el VEGF los presentamos en la tabla (Tabla 21).

	Control		Dexametasona		Betametasona	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Aire	0,119161	0,011817	0,125448	0,013031	0,150792	0,010616
Hipoxia + Aire	0,116129	0,008242	0,133470	0,009085	0,139536	0,010218
Hipoxia+ Hiperoxia	0,106289	0,010785	0,119977	0,010792	0,134476	0,018979

Tabla 20. Valores en densidad óptica de la inmunotinción del VEGF de los distintos grupos y situaciones experimentales. Día 14.

Grupos 1° / 2°	Densidad óptica 1°		Densidad óptica 2°		p
	Media	SD	Media	SD	
CA < BA *	0,119161	0,011817	0,150792	0,010616	0,000
CA < DA			0,125448	0,013031	0,879
CA > CHA			0,116129	0,008242	1,000
CA > CHH *			0,106289	0,010785	0,001
CHA < BHA *	0,116129	0,008242	0,139536	0,010218	0,000
CHA < DHA *			0,133470	0,009085	0,000
CHA > CHH °			0,106289	0,010785	0,002
CHH < DHH *	0,106289	0,010785	0,119977	0,010792	0,000
CHH < BHH *			0,134476	0,018979	0,000
BA > DA *	0,150792	0,010616	0,125448	0,013031	0,000
BA > BHA °			0,139536	0,010218	0,005
BA > BHH °			0,134476	0,018979	0,002
BHA > BHH	0,139536	0,010218	0,134476	0,018979	0,998
BHA > DHA			0,133470	0,009085	0,663
BHH > DHH ”	0,134476	0,018979	0,119977	0,010792	0,007
DA < DHA	0,125448	0,013031	0,133470	0,009085	0,368
DA > DHH			0,119977	0,010792	0,944
DHA > DHH*	0,133470	0,009085	0,119977	0,010792	0,001

Tabla 21. Tabla de valores de expresión del VEGF, por inmunotinción, obtenidos por densitometría, comparando entre si los diferentes grupos y situaciones experimentales *p≤ 0,001; °p<0,005, ”p<0,05. Día 14.

El grupo que recibió betametasona prenatal tenía aumentada la inmunotinción del VEGF respecto al grupo que recibió dexametasona prenatal siendo estadísticamente significativo para las situaciones experimentales de “aire” ($p < 0,001$) e “hipoxia + hiperoxia” ($p < 0,05$) (Tabla 21)(Fig 35).

Las diferentes situaciones experimentales del grupo que recibió betametasona prenatal, comparadas con sus homólogos del grupo control, tenían mayor expresión (inmunotinción) del VEGF, siendo estadísticamente significativo en todas las situaciones experimentales ($p < 0,001$)(Tabla 21)(Fig 35).

Las diferentes situaciones experimentales del grupo que recibió dexametasona prenatal, comparadas con sus homólogos del grupo control, tenían mayor expresión (inmunotinción) del VEGF, con diferencias estadísticamente significativas en las situaciones de “hipoxia + aire” e “hipoxia + hiperoxia” ($p < 0,001$) (Tabla 21)(Fig 35).

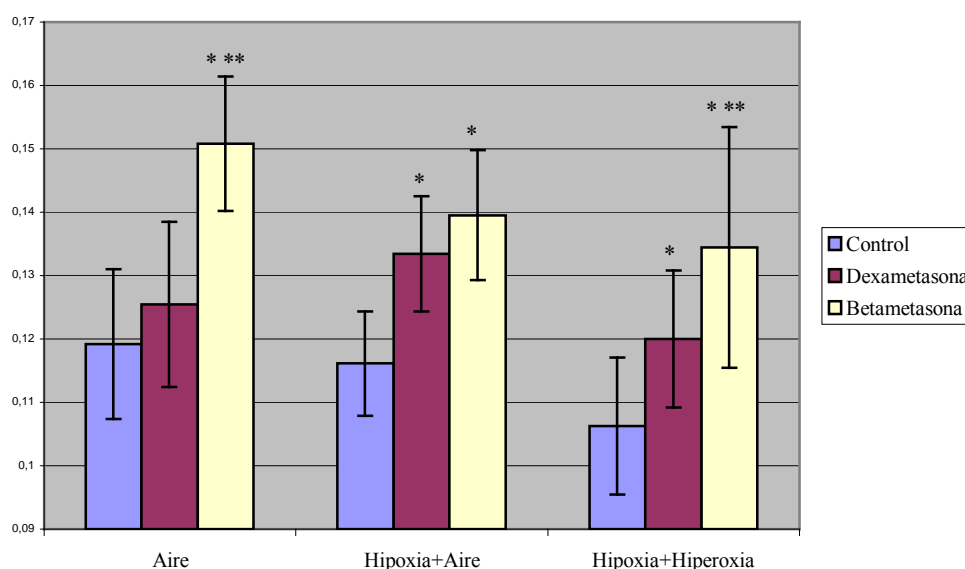


Figura 35. Representación gráfica de los valores de la expresión del VEGF por inmunotinción (densidad óptica). Día 14. * $p < 0,001$ vs grupo control. ** $p < 0,05$ betametasona vs dexametasona.

Cuando comparamos, dentro de un mismo grupo, las distintas situaciones experimentales, observamos que la inmunotinción del VEGF fue menor en la situación experimental “hipoxia + aire” comparada con la situación experimental de “aire” en el grupo betametasona, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,005$), no obtuvimos diferencias

significativas entre estas situaciones experimentales en el grupo control (NS) ni en el grupo dexametasona (NS) (Tabla 21)(Fig. 36).

En el grupo control la inmunotinción del VEGF fue menor, con diferencias estadísticamente significativas, en la situación experimental de “hipoxia + hiperoxia” respecto a la situación “aire” ($p < 0,001$) y respecto a la situación de “hipoxia + aire” ($p < 0,005$) (Tabla 21) (Fig.36).

En el grupo que recibió dexametasona prenatal la inmunotinción del VEGF fue menor en la situación de “hipoxia + hiperoxia” comparada con las situación experimental “hipoxia + aire”, siendo estadísticamente significativo ($p < 0,001$) (Tabla 21) (Fig.36).

En el grupo que recibió betametasona prenatal la inmunotinción del VEGF fue menor en la situación experimental de “hipoxia + hiperoxia” comparada con las situación experimental “aire”, siendo estadísticamente significativo ($p < 0,005$) (Tabla 21)(Fig.36).

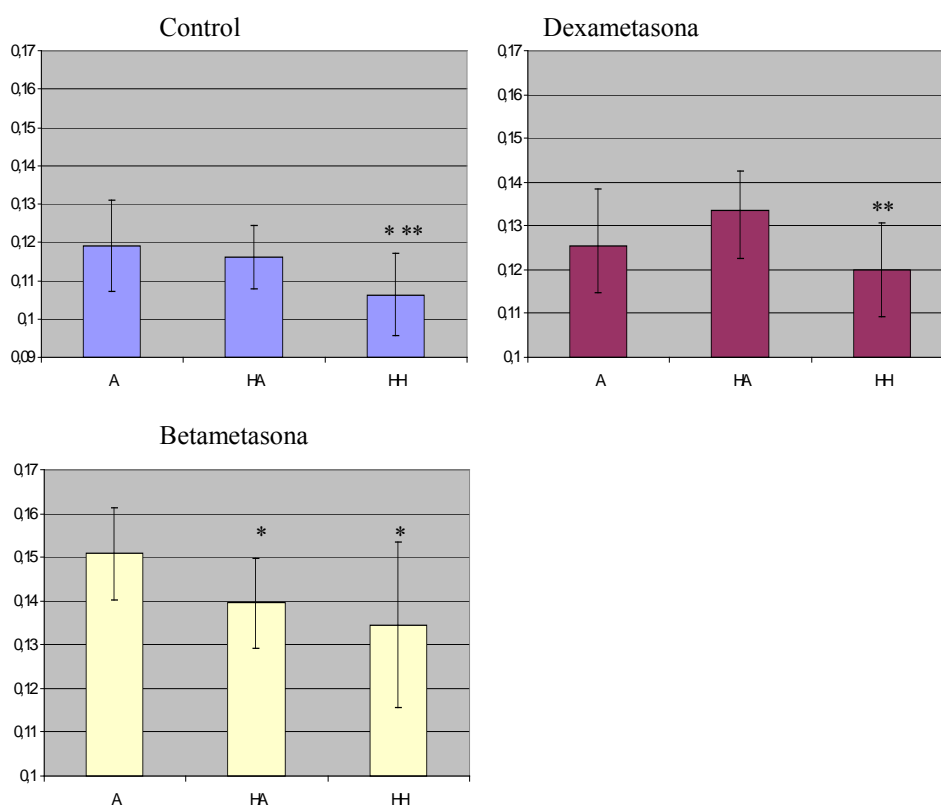


Figura 36. Representación gráfica de los valores de la expresión del VEGF por inmunotinción (densidad óptica), en cada grupo experimental con sus diferentes situaciones experimentales. Día 14.* $p < 0,005$ respecto a aire. ** $p < 0,05$ respecto hipoxia más aire.

4.3.4. EVOLUCIÓN CRONOLÓGICA DE LA EXPRESIÓN DEL VEGF

4.3.4.1. ARNm del VEGF en los distintos días de estudio.

Grupo control.

En el grupo control se observó un aumento de la expresión del ARNm del VEGF el día 4 respecto a día 0 en las situaciones de “aire” e “hipoxia + hiperoxia”, a día 14 los valores disminuyeron siendo menores que los del día 4 y similares a día 0. En la situación experimental de “hipoxia + aire” la expresión de ARNm del VEGF fue similar en los tres días estudiados. Estadísticamente no se obtuvieron diferencias significativas entre los valores obtenidos, en ninguna situación experimental (NS) (Fig. 37).

Grupo de dexametasona prenatal.

En el grupo que recibió dexametasona prenatal, en la situación experimental de “aire” los valores de ARNm de VEGF aumentaron del día 0 al día 4, y disminuyeron el día 14. En las situaciones experimentales de “hipoxia + aire” e “hipoxia + hiperoxia” los valores eran similares en los tres días del estudio (Fig.). Estadísticamente no se obtuvieron diferencias significativas entre los valores obtenidos, en ninguna situación experimental (NS) (Fig. 37).

Grupo de betametasona prenatal.

En el grupo que recibió betametasona prenatal en la situación “aire” la expresión del ARNm del VEGF aumentó desde el día 0 a los días 4 y 14. En la situación “hipoxia + aire” obtuvimos una mayor expresión del ARNm del VEGF el día 4 respecto a los días 0 y 14 donde se observó una expresión similar. En la situación experimental de “hipoxia + hiperoxia” se observó una mayor expresión del ARNm del VEGF el día 0, respecto a la expresión media del día 4 sin diferencias significativas (NS), sin embargo obtuvimos diferencias con significación estadística ($p = 0,01$) entre los valores medios obtenidos el día 0 respecto a los del día 14 (Fig. 37).

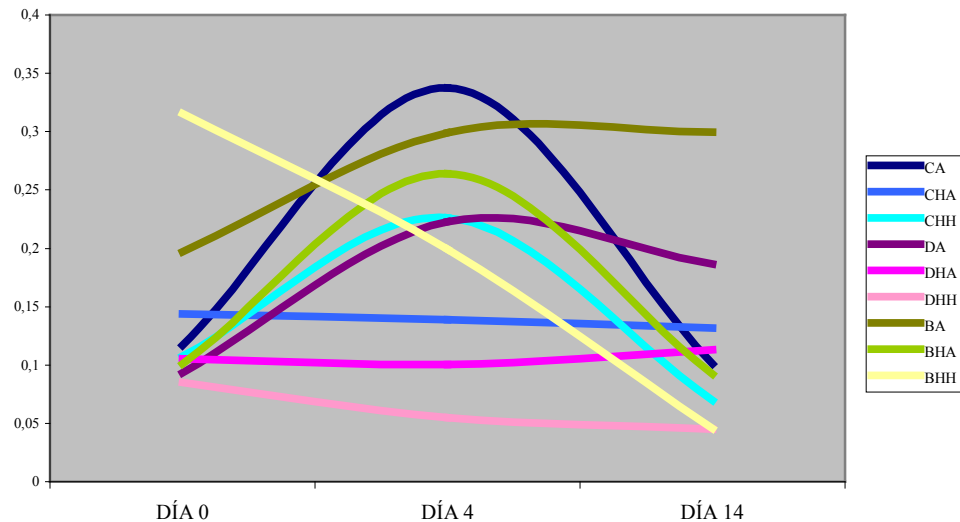


Figura 37. Valores medios de ARNmVEGF/ARNm GAPDH de todos los grupos y situaciones experimentales, obtenidos por densitometría, en los distintos días del estudio.

4.3.4.2. Inmunohistoquímica del VEGF en los distintos días de estudio.

Grupo control.

En los animales del grupo control, en la situación experimental de “aire” se observó mayor inmunotinción del VEGF a día 4 con diferencias significativas respecto a día 0 ($p < 0,001$) y respecto a día 14 ($p < 0,001$). En las situaciones de “hipoxia + aire” e “hipoxia + hiperoxia” la inmunotinción del VEGF fue menor el día 4 que el día 0 pero sin diferencias significativas (NS). En las tres situaciones experimentales (“aire”, “hipoxia + aire”, “hipoxia + hiperoxia”) la inmunotinción del VEGF fue menor a día 14 con diferencias estadísticamente significativas respecto a día 4 ($p < 0,001$) y respecto a día 0 ($p < 0,001$) (Fig. 38).

Grupo de dexametasona prenatal.

En el grupo que recibió dexametasona prenatal, los valores medios de la inmunotinción, obtenidos por densitometría en las situaciones de “aire” e “hipoxia + aire”, no mostraron diferencias significativas en la inmunotinción del VEGF entre los distintos días (NS). En la situación de “hipoxia + hiperoxia” la expresión media del VEGF a día 14 fue menor respecto a la

obtenida en los animales del día 0 siendo estadísticamente significativo ($p < 0,05$) (Fig. 38).

Grupo de betametasona prenatal.

En el grupo que recibió betametasona prenatal en la situación experimental de “aire” la inmunotinción del VEGF fue mayor el día 4 con diferencias significativas respecto al día 0 ($p < 0,05$) y no significativas respecto al día 14 (NS). No se observaron diferencias significativas en esta situación experimental, entre los valores del día 0 y 14. En la situación experimental de “hipoxia + aire” los valores de la inmunotinción del VEGF fueron menores el día 14 con diferencias estadísticamente significativas respecto a los valores del día 0 ($p < 0,001$) y del día 4 ($p < 0,001$). No se encontraron diferencias significativas entre los valores obtenidos por densitometría de la inmunotinción entre el día 4 y 14. En la situación experimental de “hipoxia + hiperoxia” los valores de la inmunotinción del VEGF fueron menores el día 14 con diferencias estadísticamente significativas respecto a los obtenidos el día 0 ($p < 0,001$) y respecto al día 4 ($p < 0,001$). No se encontraron diferencias significativas entre los valores de expresión del VEGF del día 4 y del día 14 (NS) (Fig. 38).

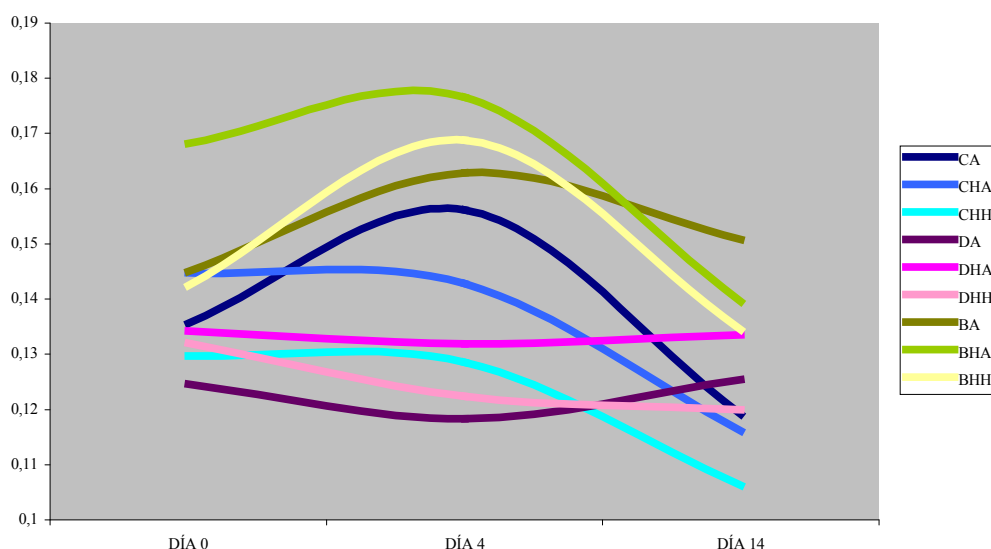


Figura. Valores medios de expresión del VEGF (inmunohistoquímica) de todos los grupos y situaciones experimentales, obtenidos por densitometría, en los distintos días del estudio.

5. DISCUSIÓN

Para una mejor comprensión de la discusión, la hemos dividido en los siguientes apartados: crecimiento, metabolismo y VEGF pulmonar.

Crecimiento

En nuestros resultados las ratas tratadas con corticoides prenatales tenían al nacimiento un menor peso, implicando a los corticoides administrados a la madre como negativos sobre el peso al nacimiento.

Este efecto fue observado muy pronto en la historia del desarrollo de los corticoesteroides, observándose que pequeñas dosis de corticoesteroides suprimían precozmente el crecimiento en la rata²²⁹.

Hemos encontrado muchos estudios en la literatura con resultados semejantes a los nuestros, donde se ha encontrado que los corticoides prenatales causaban una restricción del crecimiento en distintas especies animales^{233,317-322}.

Newnham y cols.³²⁰ administraron betametasona o solución salina a ovejas gestantes y encontraron que los corderos expuestos a betametasona pesaban una media de 550 gramos menos que los que no habían recibido el corticoide.

Se ha descrito que el mecanismo de actuación de los corticoides sobre el crecimiento era debido a una reducción la biosíntesis de ADN y ARN con inhibición de la mitosis y de la actividad sintética celular³²³. Estudios recientes han relacionado el daño en el crecimiento fetal con un descenso en la expresión de genes que promovían el crecimiento. Baisden y cols.³²⁴ a ratas gestantes dexametasona o solución salina y observaron que las placentas de los animales

que habían recibido dexametasona pesaban menos y el peso de los fetos también estaba disminuido después de la administración de dexametasona a la madre. Encontraron también que en el grupo que había sido tratado con dexametasona estaba aumentada la apoptosis de trofoblastos. En este estudio determinaron la expresión de genes en la placenta y observaron que la dexametasona causaba una disminución de genes implicados en la división celular como ciclinas A2, B1, D2, cdk2, cdk4 y de genes que promovían el crecimiento como el EGF-R, BMP4 e IGFBP3.

Hewitt y cols.²⁹⁶ observaron un menor crecimiento fetal tras haber realizado tratamiento con dexametasona a ratas gestantes, resultados concordantes con nuestro estudio, sugiriendo que el posible mecanismo era por un descenso en la expresión del VEGF que observaron disminuido en las placentas de las ratas que habían recibido dexametasona .

Aunque la inhibición del crecimiento somático fetal asociado con glucocorticoides ha sido ampliamente mostrado en estudios experimentales en diferentes animales, los efectos en el feto humano no estaban tan claros y en los primeros estudios con glucocorticoides prenatales no se ha identificado el daño en el crecimiento fetal^{225,325}. Wapner y cols.²⁴¹ no han observado diferencias significativas en el peso al nacimiento entre niños pretérmino que habían recibido varios ciclos de betametasona prenatal y niños que no habían recibido glucocorticoides prenatales. En cambio hay otros estudios en humanos, que sí han mostrado esta asociación entre el tratamiento con corticoides prenatales y la disminución del peso al nacimiento^{236,323,326,327}.

Respecto a la evolución, en nuestro estudio hemos encontrado que en el grupo control los parámetros de peso corporal y longitud aumentaron con la edad, lo que reflejaba un crecimiento normal de los animales.

En los grupos tratados con corticoides el perfil de crecimiento fue muy similar pero los valores de peso corporal y longitud a los 14 días fueron inferiores respecto al grupo control, lo que podría indicar una inhibición del crecimiento debido a la acción de los corticoides.

Resultados similares a los encontrados en nuestro estudio han sido mostrados en estudios experimentales en animales, donde se ha observado que la exposición a glucocorticoides prenatales restringía el crecimiento fetal por una posible acción en la programación del crecimiento postnatal^{286,309,328,329}

Schellenberg y cols.³²⁸ en un estudio realizado en ratas a las que se les había administrado dexametasona prenatal, encontraron diferencias significativas en los pesos corporales hasta el 15 día postnatal, resultado que coincide con nuestros hallazgos.

En humanos también se ha mostrado un deterioro en el crecimiento somático postnatal tras el tratamiento con esteroides prenatales^{309,327,330}. Kumar y Seshadri³³⁰ en un estudio realizado en niños pretérmino, observaron que el número de niños con un percentil de peso y perímetro cefálico inferior al percentil 10 en el momento del alta, era significativamente más elevado en el grupo de niños que había recibido varios ciclos de corticoides prenatales.

Verhaeghe y cols.³³¹ han realizado un estudio en 91 recién nacidos pretérmino que recibieron un ciclo de glucocorticoides prenatales y en 49 recién nacidos que no lo recibieron. Analizaron los valores de glucosa, aminoácidos, ácidos grasos libres, IGF-I e IGFBP-I en plasma obtenido de la vena umbilical al nacimiento y observaron que los glucocorticoides prenatales daban lugar a un catabolismo transitorio de todos los nutrientes y a una caída transitoria en las concentraciones de IGF-I lo que podía explicar los efectos de los glucocorticoides sobre la inhibición en el crecimiento.

Metabolismo

En este estudio, para el control del método, se ha considerado como repercusión sobre el metabolismo de los animales, los cambios de su temperatura corporal, el O₂ consumido y el CO₂ producido.

En el grupo control (sin glucocorticoides prenatales), se ha observado un descenso de la temperatura en las ratas sometidas a hipoxia.

En numerosos trabajos en diferentes modelos de animales ha sido constatado este descenso de la temperatura en situación de hipoxia^{160,161,312}.

El origen de esta respuesta no está aún aclarado. Hemingway y Birzis³³² propusieron que la hipoxia tenía efecto sobre los mecanismos cerebrales de la termorregulación que daba lugar a una disminución regulada de la temperatura corporal. La hipótesis de un reajuste central en la temperatura corporal ha sido apoyada por estudios sobre el comportamiento que han mostrado que los mamíferos expuestos a hipoxia eligen una temperatura ambiente fría. Otra posibilidad para explicar la hipotermia en la hipoxia era la limitación en la disponibilidad de oxígeno para los tejidos como se ha observado en los

mamíferos que hibernan donde existía una disminución de la pO₂ en los tejidos³³³. Esta hipótesis ha sido especialmente valorada en recién nacidos.

Esta respuesta de inhibición de la termogénesis en la hipoxia fue descrita como un mecanismo de defensa por Gautier³³⁴ y Frappell³³⁵, que observaron en ratas recién nacidas sometidas a hipoxia una caída en la temperatura corporal. Mortola¹⁶¹ describió también la caída en la actividad de los mecanismos de termorregulación, con un descenso en la temperatura corporal, como un mecanismo de seguridad, que favorecía la supervivencia en situaciones de hipoxia. Mortola^{336,337} también ha descrito que en situaciones de hipoxia se alteraban los ritmos circadianos de variables como la temperatura corporal y el metabolismo, ha descrito que en situaciones de hipoxia prolongada las oscilaciones diarias estarían disminuidas, incluso en algunos casos abolidas y que estas alteraciones del ritmo circadiano contribuían a los síntomas descritos durante la hipoxia como el malestar, la fragmentación del sueño y la pérdida de apetito.

En nuestro estudio hemos observado una tendencia al “no hacinamiento” ya constatada en otros estudios^{166,335}, que reflejaría la intención de mantener la temperatura corporal por debajo de los valores que se daban en situación de normoxia, como una posibilidad de reajustar el punto idóneo de la temperatura en situación de hipoxia¹⁶⁶. También en nuestro estudio hemos observado una importante disminución de la actividad de las ratas expuestas a hipoxia, que se podía interpretar como un intento de disminuir en lo posible el gasto energético.

Todo esto podía indicar que el calentamiento artificial del recién nacido hipóxico sería contraproducente como lo muestran también los estudios de Pedraz y Mortola³¹² sobre calentamiento durante la hipoxia en perros y gatos donde observaron un incremento de los mecanismos contrarreguladores, como la hiperpnea y la caída de las resistencias vasculares sistémicas, con una redistribución de la sangre hacia la circulación periférica, poniendo en peligro el mecanismo de defensa contra la hipoxia.

En nuestro estudio, tras la hipoxia se recuperaron las ratas con aire o hiperoxia. En el grupo control, en ambas situaciones experimentales (“hipoxia + aire” e “hipoxia + hiperoxia”) se vio una tendencia de la temperatura a normalizarse, aunque los valores siguieron siendo sensiblemente más bajos que

en situación basal. No hubo diferencias entre la recuperación con aire y la realizada con hiperoxia. Probablemente persistían los efectos de la hipoxia a pesar de la recuperación y por eso se observó que, tanto en la recuperación con aire como en la recuperación con hiperoxia, no se consiguió alcanzar, ni en ningún momento superar la temperatura de los animales expuestos exclusivamente a aire.

El patrón de respuesta en la temperatura ante la hipoxia y ante la hipoxia recuperada con hiperoxia o aire, presentado por los animales que habían recibido corticoides prenatales, fue diferente del de los animales del grupo control siendo la diferencia de temperatura corporal de los animales que habían recibido corticoides prenatales mucho menor. Por lo que los corticoides tenían un efecto en la regulación de la temperatura corporal.

Un estudio con resultados concordantes a los nuestros fue el realizado por Clarke y cols.³³⁸ en corderos pretérmino. Observaron un incremento de temperatura en los animales que la madre había recibido dexametasona, alcanzando valores prácticamente iguales a corderos a término; observaron además que las variaciones de la temperatura en el tiempo eran menores deduciendo que la estabilidad del centro termorregulador es mayor. También encontraron un incremento en los niveles de hormonas tiroideas (que se ha visto que estimulan el centro termorregulador) en plasma de los corderos pretérmino que habían recibido dexametasona prenatal.

Otros parámetros estudiados en nuestro estudio fueron el oxígeno consumido y el CO₂ producido. Al no estar referidos estos datos al volumen minuto de las ratas, no se puede asegurar que los valores de consumo de oxígeno y producción de CO₂ fueran los mismos. Sin embargo, hemos considerado que los resultados obtenidos para estos dos parámetros eran útiles para valorar los cambios producidos en las diferentes situaciones experimentales del estudio.

En todos los grupos se encontró una disminución del consumo de oxígeno y de la producción de CO₂ durante la hipoxia.

Estos hallazgos ya habían sido constatados en otros trabajos en diferentes modelos animales^{160,312,339-342}. Se ha descrito que la respuesta metabólica era además especialmente intensa en los mamíferos pequeños y en los recién nacidos³³⁹.

El origen de esta respuesta aun no ha sido aclarada. Matsuoka y Mortola³⁴³ estudiaron la intensidad del reflejo vagal de Hering- Breuer (reflejo inhibitorio de la inspiración cuando los pulmones se mantienen distendidos) en ratas recién nacidas, y observaron que en hipoxia no se alteraba, e incluso se incrementaba; al contrario de lo que ocurría en ratas adultas. Los autores señalaron que la posible menor quimiosensibilidad en animales jóvenes, junto con la reducción del impulso metabólico durante la hipoxia, podían aumentar la eficacia del reflejo vagal inhibitorio.

Cameron y cols.³⁴⁴ mostraron en ratas recién nacidas una menor variabilidad del patrón respiratorio en hipoxia.

La caída de la producción metabólica de CO₂ que se observó en la hipoxia podía inhibir la ventilación. Apoyando esta idea, Mortola y Matsuoka¹⁷¹ observaron, en gatos recién nacidos, que en situación de normocapnia durante la hipoxia no se producía un aumento de la ventilación pulmonar; sin embargo, en gatos hipercápnicos, el mismo grado de hipoxia promovía una polipnea tipo adulto.

En nuestro estudio, tras la hipoxia se recuperaron las ratas durante dos horas con aire o hiperoxia. En todos los grupos en ambas situaciones experimentales (“hipoxia + aire” e hipoxia + hiperoxia”) se observó un aumento del oxígeno consumido y del CO₂ producido respecto a la situación experimental de “hipoxia”.

En la hiperoxia aislada, está descrito un incremento del metabolismo, acompañado de un aumento del consumo de oxígeno, en animales recién nacidos³³⁵ y en recién nacidos humanos³⁴⁵.

En nuestro estudio, en el grupo control, no había diferencias en el aumento del oxígeno consumido en las situaciones experimentales de “hipoxia más hiperoxia” e “hipoxia + aire” e respecto a la situación experimental “aire”. Aunque las condiciones no eran comparables con las de los trabajos en los que se valoraba únicamente la hiperoxia aislada.

Existe poca documentación sobre la repercusión ventilatoria y metabólica de la hipoxia seguida de recuperación, bien con aire o con hiperoxia. Resultados similares a los nuestros fueron obtenidos por Frappell y cols.³³⁵ que estudiaron el metabolismo de gatos recién nacidos durante normoxia (10 minutos), hipoxia (30 minutos) y recuperación con aire (30

minutos) y hallaron un descenso del mismo durante la hipoxia. En la recuperación, no se produjo un incremento del metabolismo por encima de los valores en normoxia, lo cual, según interpretaron sus autores, indicaba que existía una “deuda metabólica” tras la hipoxia.

En nuestro estudio en los animales que han recibido corticoides prenatales hemos observado un incremento del oxígeno consumido en la situación de hipoxia más hiperoxia, mayor que en el grupo control. Ya se ha descrito que la hiperoxia producía un incremento del metabolismo^{335,346}. Además en estudio realizado por Ervin y cols.³⁴⁷ en corderos recién nacidos observaron que los animales que habían recibido glucocorticoides prenatales tras someterlos a 20 minutos de hipoxia tenían una respuesta neuroendocrina y endocrina incrementada con un aumento del cortisol y de las catecolaminas, lo que podía explicar el aumento del metabolismo y el mayor consumo de oxígeno que hemos encontrado en nuestro estudio.

VEGF pulmonar.

El desarrollo vascular se ha descrito como un proceso complejo con implicación de: diferenciación celular, migración, contactos célula a célula, formación de la vía aérea, interacciones con la membrana basal y reclutamiento de células de soporte. Aún se desconocen muchos de los mecanismos implicados en estos procesos pero se han publicado muchos artículos que han demostrado que las alteraciones del VEGF o sus receptores daban lugar a anomalías vasculares letales para el embrión y el feto^{30,51,58}.

Hemos investigado la expresión pulmonar del VEGF durante el desarrollo pulmonar en ratas recién nacidas, ya que parecía tener un papel crucial en el desarrollo pulmonar y en el desarrollo de displasia broncopulmonar²⁸⁸. Hemos diseñado un modelo experimental similar a la situación clínica del niño prematuro como es la situación de hipoxia aguda y su posterior recuperación en aire o hiperoxia en el momento del nacimiento. Hemos de tener en cuenta que la maduración postnatal de 2-15 días desde el nacimiento en ratas, corresponde a un intervalo de tiempo de varios meses en humanos²⁸⁵.

También se ha valorado la interferencia de los glucocorticoides sobre este factor de crecimiento, por la frecuencia, al menos prenatal, del uso de glucocorticoides.

Muchos estudios han demostrado que el VEGF tenía un papel importante en la vasculogénesis pulmonar y que sus alteraciones podían interrumpir el desarrollo pulmonar normal^{20,101,128,212}. Los mecanismos reguladores del VEGF en el pulmón en desarrollo aún no han sido aclarados.

En nuestro estudio, en ratas recién nacidas cuyos pulmones estaban en fase sacular (0-4 días) o en fase alveolar (4-14 días), hemos encontrado abundante expresión del VEGF en las células epiteliales de la vía aérea, en las células endoteliales y en las células intersticiales, lo que nos ha hecho pensar en la importancia del VEGF en el desarrollo pulmonar. Hemos observado un incremento de la expresión del VEGF en los animales estudiados a día 4. Este incremento del VEGF lo hemos interpretado como un fenómeno fisiológico relativo a este periodo de desarrollo.

De acuerdo con nuestros resultados Ng YS³⁷, ha descrito que las isoformas del VEGF: VEGF₁₂₀, VEGF₁₆₄ y VEGF₁₈₈ estaban presentes en las células alveolares tipo II en el pulmón en desarrollo del ratón, y su máxima expresión sucedía durante la fase canalicular, cuando ocurría el mayor crecimiento vascular en el pulmón, después descendían hasta el día 10 postnatal cuando alcanzaban niveles que se mantenían en la vida adulta. Lassus y cols.⁹⁵ encontraron una mayor concentración de VEGF en aspirado traqueal al nacimiento y en los primeros 10 días de vida en niños pretérmino, que en niños que nacen a término y D'Angio y cols.²⁹⁹ observaron que la expresión del VEGF se triplicó en el aspirado traqueal de niños pretérmino entre los días 1 y 3 después del nacimiento y además se correlacionaba con la menor edad de gestación. En este mismo sentido Levy y cols.⁹⁶ encontraron en pulmón fetal humano que la expresión de VEGF era mayor en las fases canalicular y sacular con un descenso en la fase alveolar.

Efecto de la hipoxia sobre el VEGF.

En nuestro estudio hemos encontrado un incremento de la expresión proteica del VEGF en la situación experimental de hipoxia respecto a la situación experimental aire en el grupo control. De acuerdo con este resultado existen muchos estudios donde se ha mostrado que la hipoxia era un inductor del VEGF^{20,2,4,18,25,71}.

Esta acción estaría mediada por el factor 1 inducible por la hipoxia (HIF-1)⁶⁹⁻⁷² y por el HLF (“hypoxia like factor”)⁸⁰. Los estudios de Lee YM y

cols.¹⁷⁹ y FA Groenman y cols.⁹⁸ han descrito que la expresión del VEGF y del HIF estaba incrementada en situaciones de hipoxia durante la embriogénesis apoyando la teoría de que la hipoxia en la embriogénesis actuaba como inductor de la angiogénesis y vasculogénesis.

En estudios in vitro también se ha observado un incremento en la producción de ARNm del VEGF tras la exposición a la hipoxia^{14,19,190,191}.

En nuestro estudio se ha encontrado incrementada la expresión proteica del VEGF en la situación de hipoxia respecto a la situación aire en el grupo control pero no se han encontrado diferencias significativas en la expresión del ARNm del VEGF. Este hecho concuerda con los resultados obtenidos por Abraham y cols.³⁴⁸ en biopsias de injertos de pulmón donde observaron un incremento en la expresión de proteína de VEGF-A pero no del ARNm sugiriendo que la expresión del VEGF durante la isquemia pulmonar sería regulada, al menos en parte, a nivel postranscripcional. Se ha descrito que la hipoxia puede promover la estabilización de ARNm^{18,196,197} aunque a un ritmo diferentes respecto a la estabilización proteica. Esta acción de la hipoxia también ha sido descrita por Waltenberger⁸³ y cols que observaron que la hipoxia producía un incremento de la estabilidad del ARNm del VEGFR-2.

Sin embargo los mecanismos de regulación del VEGF aun no han sido totalmente dilucidados, y posiblemente existan muchos más factores que actúen además de la hipoxia. Los resultados publicados sobre la regulación del VEGF en enfermedades con hipoxia crónica son controvertidos^{105 349,350}. El estudio realizado por Oltmanns y cols.³⁵¹ en adultos sanos sometidos a hipoxia aguda observaron un descenso en los niveles de VEGF en plasma comparados con los controles en condiciones de normoxia.

En el grupo que recibió dexametasona prenatal, en la situación experimental de hipoxia, la inmunotinción del VEGF también era mayor respecto a la situación aire del grupo que recibió dexametasona prenatal (Fig.29) (Tabla 13) hecho que hemos interpretado como efecto de la hipoxia sobre el VEGF.

En cambio hemos observado una menor expresión del VEGF en el grupo dexametasona con hipoxia respecto al grupo control hipoxia . Pensamos que si bien hay un efecto de inducción del VEGF por la hipoxia, la dexametasona prenatal podía inhibirlo parcialmente.

Existen pocos trabajos que determinen las interrelaciones moleculares y de señalización de estos dos importantes estímulos (hipoxia y dexametasona).

Klekamp y cols.³⁵² en cultivos celulares de células de músculo liso vascular pulmonar ovinas, expuestas a dexametasona concomitantemente con hipoxia, observaron que la dexametasona reducía el efecto inductor de la hipoxia sobre el ARNm del VEGF con un efecto dosis dependiente. Según estos autores se producía por un bloqueo de la transcripción, ya que la dexametasona bloqueaba la transcripción mediada por AP-1. Por otro lado se ha mostrado que el promotor de VEGF tiene potenciales sitios de unión para factores de transcripción AP-1³⁵³. En este sentido Acarregui y cols.¹⁹ han mostrado en estudios in vitro en pulmón fetal humano que la dexametasona reducía la inducción del VEGF por la hipoxia. Fischer y cols.³⁵⁴ en estudio in vitro en células endoteliales de cerebro también observaron que la dexametasona disminuía la expresión del VEGF inducida por al hipoxia. Leonard y cols.³⁵⁵ en un estudio in vitro de células epiteliales humanas de túbulo proximal, mostraron una inhibición mediada por los corticoides de la inducción de la expresión del VEGF realizada por la hipoxia, sin embargo no observaron diferencias en la regulación del dominio de unión al ADN HIF-1 por la dexametasona con la exposición a hipoxia previa, lo que indicaba que el mecanismo de inhibición de la expresión de VEGF mediado por corticoides en hipoxia no era debido a alteraciones en el HIF-1.

En el grupo que recibió betametasona prenatal la inmunotinción del VEGF era significativamente mayor en la situación experimental de hipoxia comparada con la situación experimental aire del grupo que recibió betametasona. No hubo diferencias significativas en la expresión del ARNm del VEGF entre esos mismos subgrupos.

No se observaron diferencias significativas en la expresión del VEGF entre el grupo betametasona sometido a hipoxia respecto a su homólogo del grupo control ni respecto a la situación aire del grupo control

Este resultado se puede interpretar como que la betametasona no tiene el efecto de inhibición de la inducción del VEGF por la hipoxia que se ha visto en la dexametasona, no existen trabajos publicados estudiando el efecto concomitante de la betametasona y la hipoxia sobre el VEGF.

Efecto de la hiperoxia sobre el VEGF.

En este estudio, en el grupo control, hemos encontrado una expresión menor del VEGF en los animales que se habían recuperado con hiperoxia tras haber sido expuestos a hipoxia, respecto a los animales que se habían recuperado en aire, este resultado se observó en los animales de los días 0, 4 y 14.

Investigaciones previas han descrito los efectos de la hiperoxia en la expresión pulmonar del VEGF. Muchos estudios son concordantes con nuestros resultados, Watkins y cols.²⁸ y Maniscalco y cols.²¹² observaron un descenso en la expresión del VEGF pulmonar en conejos recién nacidos tras exponerlos a hiperoxia. Maniscalco y cols. (Maniscalco 2001), en estudio realizado en monos pretérmino con ventilación mecánica, mostraron un mayor descenso del VEGF en los animales que habían recibido más FiO₂. Hosford y cols.⁷⁹ observaron la disminución del VEGF en el pulmón de ratas recién nacidas expuestas a hiperoxia desde el día 4 al día 14. Wagenaar y cols.²¹⁵ observaron un descenso en la expresión genética del VEGF, en pulmones de ratas pretérmino expuestas a hiperoxia durante la fase sacular del desarrollo pulmonar. Zimová y cols.²¹⁷ encontraron en un estudio realizado en ratones recién nacidos que la expresión del VEGF-A pulmonar era menor en los animales expuestos a FiO₂ de 0,8 respecto a los animales expuestos a FiO₂ de 0,21.

En sus experimentos, Maniscalco y cols.²¹² y Watkins y cols.²⁸, describieron que la producción de VEGF pulmonar regresaba a valores normales, en conejos de Nueva Zelanda expuestos a hiperoxia (FiO₂ de 1), después de haber sido recuperados durante 3 días reduciendo el nivel de FiO₂ a 0,6. A diferencia de nuestro estudio donde la expresión del VEGF ha permanecido disminuida tras la recuperación de los animales con FiO₂ de 0,21. Estos hallazgos discordantes se pueden explicar, porque se han empleado distintas especies, nuestro estudio se realizó en ratas recién nacidas cuyos pulmones al nacimiento están en fase sacular iniciando la alveolización el día 4 postnatal⁹ y los estudios de Watkins y Maniscalco fueron realizados en conejos en los que la alveolización se iniciaba previa al nacimiento, habiéndose descrito que el daño pulmonar estaba relacionado con el grado de maduración pulmonar alcanzado en el momento de la exposición al agente nocivo¹ y que el

efecto de la hiperoxia en el pulmón postnatal podía variar dependiendo de la especie utilizada²¹⁰. La regulación del VEGF en el pulmón sería diferente dependiendo de la fase de desarrollo pulmonar cuando se produce la exposición a hiperoxia.

Además, en nuestro estudio los animales habían sido expuestos a hipoxia previamente a la exposición a hiperoxia; se ha descrito que la exposición a la hipoxia precoz predisponía a una respuesta aumentada ante cualquier daño posterior lo que daría lugar a cambios patológicos a largo plazo¹. Saugstad²⁰⁴ y Wolkoff²⁰⁵ describieron que la reoxigenación tras la hipoxia generaría un aumento de radicales libres de oxígeno que no podían neutralizar las defensas antioxidantes y que darían lugar a lesiones en las estructuras celulares. Recientemente Yee y cols.²²⁰ han observado, en un modelo de ratón, que existía un 70% menos de células tipo II en el periodo de recuperación cuando la hiperoxia ocurría en el periodo postnatal, en este mismo estudio hallaron que las células tipo II estaban completamente recuperadas a los 7 días cuando el daño por hiperoxia sucedía en el ratón adulto. Los neumocitos tipo II se han considerado como la fuente principal de VEGF¹⁸ lo que apoyaría el hallazgo de un descenso permanente del VEGF.

Ekekezie y cols.³⁵⁶ en un estudio realizado en cerdos recién nacidos observaron una disminución en la expresión del ARNm del VEGF y de la proteína VEGF tras la exposición a hiperoxia con incremento de los niveles de ARNm del VEGF tras la recuperación, sin embargo la proteína permanecía disminuida. Esto indicaría un bloqueo en la translación del VEGF y por tanto en su producción. Bucher y Roberts³⁵⁷ mostraron que la exposición a hiperoxia absoluta a ratas recién nacidas detenía la septación y no se iniciaba cuando se recuperaba a los animales con FiO₂ de 0,21. Uno de los posibles factores implicados sería el daño del VEGF¹⁰⁰.

En nuestro estudio hemos observado la inhibición permanente del VEGF (hasta el día 14 de vida) con hiperoxia aguda (2 horas) en el momento del nacimiento, en otros estudios de nuestro grupo se ha encontrado disminuida la septación de forma permanente tras el mismo tiempo de hiperoxia aguda^{250,279-281}. También Perkett y Klekamp²¹³ han observado descenso del VEGF en ratas recién nacidas tras haber sido expuestas a hiperoxia aguda.

Estudios recientes^{2,3,12,100} también han mostrado que la exposición a hiperoxia era la causa de la detención del crecimiento pulmonar con una menor alveolización y densidad vascular y que estos cambios en la estructura pulmonar se mantenían a pesar de la recuperación en aire ambiente. Thébaud y cols.² realizaron un estudio en ratas recién nacidas, los animales de un grupo fueron expuestos a hiperoxia (FiO₂ 0,95) desde el día 0 al 14 postnatal y los del otro grupo expuestos a normoxia (FiO₂ 0,21), observaron un descenso en el número de vasos pulmonares y un daño en la alveolización, que fue permanente, en las ratas expuestas a hiperoxia; asociaron estos hechos con el descenso del VEGF que observaron en este grupo.

Yuh-Jyn y cols.¹⁰⁰ observaron que la hiperoxia regulaba negativamente la expresión del VEGF a pesar de la recuperación en aire, sugiriendo que las reducciones del VEGF podían limitar el crecimiento pulmonar durante el periodo de recuperación. También encontraron que la expresión pulmonar del VEGFR-2 y de la NO sintetasa estaban reducidas durante la hiperoxia neonatal pero sin embargo la expresión de estas moléculas regresaban a valores normales durante el periodo de recuperación después de la hiperoxia. En estos estudios observaron que el tratamiento con NO tras la hiperoxia mejoraba la alveolización, por lo que sugirieron que los efectos de la hiperoxia en el crecimiento pulmonar podían deberse en parte al daño en la vía de señalización VEGF-NO y que el tratamiento con NO podía mejorar el crecimiento pulmonar. Schreiber y cols.³⁵⁸ han descrito una reducción en la incidencia de displasia broncopulmonar en niños prematuros tratados con NO. Kunig y cols.³ observaron que la hiperoxia neonatal reducía el ARNm de VEGF en el pulmón y su expresión proteica. Además mostraron que el tratamiento con rhVEGF durante la recuperación de la hiperoxia mejoraba la arquitectura pulmonar con incremento en la septación, en la superficie aérea y en la densidad vascular, soportando la hipótesis que el VEGF regulaba la angiogénesis y el crecimiento pulmonar y que la inhibición de la alveolización secundaria a la hiperoxia neonatal sería debida a la detención en la señalización del VEGF, que persistía después de la recuperación en aire.

En cambio, como ya hemos descrito, Maniscalco y cols.^{212,221} y Watkins y cols.²⁸ encontraron que tras la exposición a hiperoxia se producía un descenso en el ARNm de VEGF y en la expresión proteica del VEGF, pero que

estos valores se incrementaban durante la recuperación de la hiperoxia sugiriendo que el VEGF jugaba un papel importante en la reparación de endotelio después del daño oxidativo. Además se ha sugerido que el VEGF era necesario para la supervivencia de las células endoteliales, sobre todo en condiciones de hiperoxia^{20,28,29}.

En nuestro estudio, a día 4 en el grupo control, hemos observado que la expresión del VEGF era significativamente menor en la situación experimental “hipoxia + aire” respecto a la situación experimental “aire”.

Se podía explicar este hallazgo por el hecho que el desarrollo pulmonar tiene lugar en el útero en hipoxia relativa^{13 98}, siendo la hipoxia el mayor inductor de la expresión del VEGF³⁵⁹ y una exposición de un pulmón en desarrollo a niveles de FiO₂ mayores como sería la FiO₂ de 0,21 podía reducir la expresión del VEGF². Se ha descrito que el nacimiento pretérmino en aire ambiente (FiO₂ 0,21), producía una hiperoxia relativa, podía interferir con el desarrollo vascular normal³⁶⁰ e interrumpiría la alveolización^{361,362}.

En cambio no hemos encontrado estos resultados a día 0 pudiéndose explicar porque los animales eran sacrificados inmediatamente tras la recuperación en aire y predominaría el efecto de la hipoxia a la que habían sido sometidos previamente. El antecedente de la exposición a la hipoxia previa, también se daba en el grupo de animales de la situación experimental “hipoxia + hiperoxia” y observamos un descenso del VEGF como hemos descrito anteriormente; se ha descrito que el efecto de la hiperoxia en el pulmón postnatal dependía del grado de hiperoxia^{19,210}. Esto también explicaría el porqué a día 14 no se han encontrado diferencias significativas en la expresión del VEGF en el grupo control, entre la situación experimental “aire” e “hipoxia + aire” y sí se han encontrado, como ya hemos descrito anteriormente, entre la situación experimental “aire” e “hipoxia + hiperoxia” donde la FiO₂ administrada fue de 1.

En el grupo que había recibido dexametasona prenatal, en los días 4 y 14 la expresión del VEGF era significativamente menor en el subgrupo que había sido recuperado en hiperoxia tras su exposición a hipoxia respecto al subgrupo que había sido recuperado en aire tras su exposición a hipoxia. También era menor la expresión del VEGF en la situación experimental “hipoxia + hiperoxia” respecto la situación experimental “aire” los días 4 y 14.

En el estudio realizado por Ozaki y cols.³⁶³ valoraron la respuesta del VEGF en retina de conejos recién nacidos tras tratamiento con dexametasona, exposición a hiperoxia con FiO₂ 0,8-1 durante 4 días y exposición a hiperoxia con posterior recuperación en aire durante 5 días. Observaron que el ARNm del VEGF estaba disminuido después de hiperoxia y recuperación en aire en los animales que habían recibido dexametasona, respecto a animales que habían recibido dexametasona y estaban en aire ambiente, en cambio no observaron diferencias en los animales que eran sacrificados inmediatamente después de la hiperoxia. En nuestro estudio también encontramos descenso en la expresión del VEGF en los animales que tras la hiperoxia se habían mantenido en aire, lo que sugiere que la respuesta a la hiperoxia puede ser tiempo dependiente. Pogach y cols.³⁶⁴ observaron que el VEGF en pulmón de ratón adulto estaba incrementado inmediatamente tras la hiperoxia pero descendía significativamente los días 1 a 5 después de la recuperación en aire.

Además, en el día 4 de nuestro estudio hemos encontrado una menor expresión del VEGF en las situaciones experimentales de “hipoxia + aire” e “hipoxia + hiperoxia” en el grupo que había recibido dexametasona prenatal respecto al grupo control en la situación experimental “aire”.

Ya se ha descrito previamente que la exposición a FiO₂ de 0,21 en el momento del nacimiento se podía considerar una situación de hiperoxia relativa. Nuestros resultados son concordantes con otros estudios donde se ha descrito que la hiperoxia y la dexametasona disminuyen la expresión del VEGF^{195,292,293,363,365}. Edelman y cols.³⁶⁵ utilizaron un modelo de neovascularización corneal inducida por cauterización en córnea de rata, observaron que tras la cauterización existía un incremento del ARNm del VEGF y de la proteína producido por los leucocitos y macrófagos adyacentes a la lesión, era un modelo donde se producían además zonas de hipóxicas alrededor de la lesión por cauterización y la hipoxia podía inducir la expresión del VEGF. Estos autores observaron que el tratamiento con dexametasona o con hiperoxia sistémica inhibía el incremento de VEGF y que el tratamiento combinado con ambos, dexametasona e hiperoxia, tenían un efecto aditivo.

Los resultados en la expresión del VEGF del grupo que había sido tratado con betametasona prenatal en la situación experimental de “hipoxia + hiperoxia” son diferentes en función del día de estudio. En el día 0 se encontró

una mayor inmunotinción del VEGF con diferencias significativas respecto a la situación experimental “aire”. Como se ha descrito anteriormente la betametasona no inhibiría la inducción del VEGF por la hipoxia, los animales antes de ser expuestos a hiperoxia habían sido expuestos a hipoxia y posteriormente sacrificados inmediatamente por lo que en este incremento podía influir la hipoxia que daría lugar a un ARNm más estable^{2,4,196,197,348}, esto lo apoyaría también el hecho de haber encontrado una inmunotinción del VEGF similar en las situaciones experimentales de “hipoxia” e “hipoxia + aire”.

En el día 0 hemos encontrado que la expresión del ARNm del VEGF era mayor en la situación experimental “hipoxia + hiperoxia” respecto a las situaciones experimentales de “hipoxia” e “hipoxia + aire”. En el estudio realizado por Pogach y cols.³⁶⁴ encontraron en pulmón de ratón adulto que el ARNm del VEGF se triplicó tras ser analizado inmediatamente a la exposición a la hiperoxia y Watkins y cols.²⁸ encontraron un incremento durante la hiperoxia de VEGF₁₆₅ y VEGF₁₂₁ que tras la recuperación en aire disminuían. En nuestro estudio, en los animales que habían recibido betametasona prenatal y habían sido expuestos a hipoxia y recuperados en hiperoxia aparecía amplificada una isoforma del VEGF, VEGF₂₀₆ (fig 19) que no se ha visto amplificada en este grupo (betametasona prenatal) en las otras situaciones experimentales de “hipoxia” e “hipoxia más aire”. Este hecho también podía explicar la diferencia encontrada en la expresión de ARNm del VEGF en estas situaciones experimentales y la expresión de la proteína (inmunotinción). El anticuerpo que hemos utilizado para realizar la inmunohistoquímica del VEGF (sc-152 Santa Cruz Biotech, Santa Cruz) no detectaría esta isoforma (VEGF₂₀₆) ya que está recomendado para la detección de las isoformas con 121, 165 y 189 aminoácidos, lo que explicaría el que no hayamos encontrado diferencias significativas en la expresión de la proteína. La isoforma 206 se ha visto que era expresada sólo en pocos tipos celulares y parece tener poca actividad^{68,366,367}, fue detectada en pulmón de rata por Burchardt T y cols.³⁶⁸. No hemos encontrado publicaciones sobre la acción de la betametasona ni sobre la acción de la hiperoxia sobre esta isoforma.

En el día 4 no hemos obtenido diferencias en la expresión del VEGF en el grupo que había recibido betametasona prenatal entre la situación

experimental “hipoxia + hiperoxia” respecto a las situaciones experimentales “aire” e “hipoxia + aire”. Chandrasekar y cols.³⁶⁹ han encontrado que la betametasona reducía el estrés oxidativo y mejoraba la respuesta de las arterias pulmonares a vasodilatadores, en corderos con hipertensión pulmonar, observaron que su acción incrementaba los niveles de eNOS y de MnSOD. De nuestros resultados se podría deducir que la acción negativa de la hiperoxia sobre el VEGF podría verse disminuida por la acción de la betametasona.

En el día 14 había una menor expresión del VEGF en el grupo que había recibido betametasona prenatal en las situaciones experimentales de “hipoxia + hiperoxia” e “hipoxia + aire” respecto a la situación experimental “aire”. La exposición a hiperoxia produciría un daño en la alveolización^{12,220,250,279-281} por múltiples alteraciones moleculares^{12,210,220} y este descenso en el número de alveolos daría lugar a un descenso en la expresión del VEGF.

Los mecanismos por los que la hiperoxia disminuía la expresión del VEGF se han relacionado con la disminución del HLF^{29,79,100}. Se ha descrito también que el p53, estaba incrementado en situaciones de hiperoxia por la acción de las especies reactivas de oxígeno en el ADN^{104,218}, y esta alteración inhibiría la expresión del VEGF¹⁰⁴.

El descenso permanente del VEGF que hemos observado tras la exposición a hiperoxia, de un pulmón inmaduro como es el de la rata recién nacida, podía estar implicado en el desarrollo de displasia broncopulmonar. En un estudio realizado por Balasubramaniam¹⁵⁸ observaron que la hiperoxia en el periodo neonatal producía un descenso en la expresión del VEGF que contribuía a su vez a un mayor daño producido por la hiperoxia en los vasos pulmonares y en la alveolización pudiendo dar lugar a displasia broncopulmonar.

Debido a la importancia que se ha visto que tiene el VEGF durante el desarrollo pulmonar se ha creado una teoría vascular de la displasia broncopulmonar y se han descrito que alteraciones en la expresión o señalización del VEGF durante la etapa fetal y perinatal daban lugar a displasia broncopulmonar^{13,100,128}.

En estudios experimentales en animales se ha observado que la inhibición del VEGF daría lugar a cambios histológicos similares a los de

displasia broncopulmonar^{2,3,100,151}. En estudios en humanos Bhatt y cols.¹⁴³ observaron un descenso del VEGF pulmonar en autopsias de niños con displasia broncopulmonar y Lassus y cols.^{23,95} en sus estudios en niños con displasia broncopulmonar encontraron un descenso del VEGF en el aspirado traqueal de estos niños respecto a los que no tenían displasia. Nos parece interesante comentar el estudio de Ambalavanam y Novak¹⁵² en el que determinaban el VEGF en el aspirado traqueal de niños pretérmino con ventilación mecánica las primeras 24 horas de vida y observaron que los niveles encontrados de VEGF eran menores en los niños que posteriormente desarrollaban displasia broncopulmonar respecto a los que no la desarrollaban.

Kunig y cols.^{3,151} y Thébaud y cols.² en sus estudios experimentales realizaron, tratamiento con VEGF recombinante humano en ratas recién nacidas expuestas a hiperoxia y observaron que con este tratamiento se producía un mayor crecimiento vascular y una mejor alveolización. Sin embargo en otros estudios experimentales se ha mostrado que el tratamiento con VEGF recombinante producía una red vascular y una vía aérea anómalas¹⁰².

Corticoides prenatales: Dexametasona. Betametasona

Expondremos primero la discusión de los resultados obtenidos con la administración prenatal de dexametasona, posteriormente la de la betametasona y por último compararemos ambos glucocorticoides.

Dexametasona.

En nuestro estudio la expresión del VEGF pulmonar era menor en los animales experimentales de los días 0 y 4 que habían recibido dexametasona prenatal comparada con la expresión del VEGF pulmonar obtenida en los animales del grupo control.

De acuerdo con los hallazgos que hemos encontrado en nuestro estudio, diferentes estudios in vitro han mostrado que la dexametasona inhibía la expresión del VEGF en distintas líneas celulares^{292,293 295,307,370}.

Nauck y cols.²⁹³ en cultivos de células de músculo liso de arterias pulmonares humanas, observaron que tras administrar dexametasona la expresión del VEGF estaba disminuida. En este mismo estudio observaron que el PDGF inducía la transcripción y la secreción del VEGF y que la

dexametasona inhibía la transcripción del gen VEGF inducida por el PDGF así como la secreción de la proteína VEGF dependiente de PDGF.

En otro de los estudios realizados por estos mismos autores^{292,293} realizado en fibroblastos de pulmón humano observaron resultados similares donde el VEGF estaba disminuido tras administrar dexametasona. También en estas células la inducción de la expresión del VEGF estaba mediada por el PDGF y por PAF y en la presencia de dexametasona estaba inhibida la inducción del VEGF por estos mediadores.

También Finkenzeller y cols.³⁷⁰ en cultivos de fibroblastos, mostraron que la dexametasona bloqueaba la activación transcripcional del gen del VEGF inhibiendo el activador transcripcional AP I. En la inhibición de la acción del VEGF estaría también implicada una reducida transcripción del gen del VEGF a través de la interacción del receptor de glucocorticoides activado con el promotor del VEGF²⁹⁶, y/o de forma indirecta a través de otros factores^{292,293,295,296,307}.

Gille y cols.³⁰⁷ observaron en cultivo de queratinocitos que la expresión del VEGF estaba disminuida cuando se administraba dexametasona, observaron que esta respuesta podía estar mediada por el descenso del TGF- α y HGF, que son factores inductores del VEGF; además observaron que la estabilidad del ARNm del VEGF estaba disminuida cuando se administraba dexametasona.

Li YH y cols.³⁷¹ en un estudio in vitro mostraron que el Ureaplasma urealyticum estimulaba la producción VEGF por parte de los macrófagos humanos y observaron que este efecto se atenuaba al añadir dexametasona.

En un estudio reciente, Tanabe y cols.²⁹⁵ también han mostrado que la expresión del VEGF estaba disminuida en células derivadas de músculo liso de aorta de ratas fetales tras la administración de dexametasona, en este estudio observaron que la acción podía ser en parte por la inhibición de la inducción del TGF- β sobre la expresión del gen VEGF.

Se han descrito discrepancias sobre los efectos de la dexametasona en la expresión del VEGF.

En concordancia con nuestros resultados existen varios estudios realizados in vivo donde se ha observado un descenso del VEGF tras la administración de dexametasona^{290,296}. Vento G y cols.²⁹⁰ realizaron un estudio

en niños pretérmino < 32 semanas de edad de gestación. Compararon la expresión del VEGF y de otros factores de crecimiento en aspirado traqueal de niños que habían recibido tratamiento con dexametasona y niños control sin tratamiento y observaron que la administración de dexametasona reducía los niveles de FGF, de TGF- β y de VEGF. Observaron que el descenso de TGF- β estaba relacionado con el descenso de VEGF pudiendo ser un posible mecanismo de acción, ya que el TGF- β tiene un efecto inductor de la expresión del VEGF. La reducción del VEGF que se ha observado en estos estudios se ha asociado al daño producido en la reparación microvascular pero también se ha demostrado que los neutrófilos activados humanos también expresan este mediador³⁷² y por tanto su producción podía ser central en la fase de respuesta aguda al daño pulmonar con efecto quimiotáctico sobre otros leucocitos. En este caso sería interpretado como positivo el efecto de la dexametasona²⁸⁹.

Otro de los estudios que han mostrado una reducción del VEGF tras administrar dexametasona, igual que los resultados obtenidos en nuestro estudio, ha sido el realizado por Hewitt y cols.²⁹⁶ en ratas, donde observaron que la expresión de ARNm del VEGF estaba disminuida en las placentas de ratas gestantes tratadas con dexametasona desde el día 13 al 22. Observaron además que el tratamiento con dexametasona suprimía el normal incremento en la densidad capilar fetal en el tercio final de la gestación, sugiriendo que la causa sería que el tratamiento con dexametasona impedía el incremento normal en el ARNm del VEGF que se debía dar al final de la gestación.

En cambio Lassus y cols.^{23,95,297} en varios de sus estudios no han encontrado diferencias significativas en la expresión del VEGF en el aspirado traqueal entre niños pretérmino que habían sido tratados con dexametasona prenatal o postnatal y niños pretérmino que no habían recibido tratamiento con dexametasona. Estos mismos autores²⁹⁷ en otra de sus investigaciones, sin embargo, si han encontrado que el tratamiento con dexametasona prenatal o postnatal precoz inhibía la expresión del HGF en el aspirado traqueal de niños pretérmino. Se ha descrito que el HGF como uno de los factores implicados en la inducción del gen del VEGF⁴⁹.

En sentido contrario a los resultados obtenidos en nuestro estudio, existen investigaciones donde se ha encontrado un incremento en la expresión del VEGF tras el tratamiento con dexametasona. Bhatt y cols.²⁰ observaron que

el ARNm del VEGF pulmonar estaba incrementado en ratones que habían recibido dexametasona de los días 6 a 9 postnatales, observaron que el HLF- α estaba incrementado y que podía ser el posible mecanismo de la disminución del VEGF, en cambio no encontraron diferencias en la expresión de la proteína entre el grupo tratado con dexametasona y el grupo control. También Acarregui y cols.¹⁹ encontraron un incremento del ARNm del VEGF en pulmón fetal humano cuando la dexametasona se administraba en el segundo trimestre de gestación y D'Angio y cols.²⁹⁹ realizaron un estudio en niños pretérmino menores de 34 semanas de edad de gestación a los que les administraron dexametasona a las 12 y 24 horas de vida y analizaron el VEGF en el lavado pulmonar los días 1, 3, 7 y 28 de vida, encontraron un incremento del VEGF el día 7 en los niños que habían recibido tratamiento con dexametasona aunque el día 28 ya no encontraron diferencias y tampoco encontraron asociación con los niveles del VEGF y el desarrollo de displasia broncopulmonar.

Las discrepancias en los efectos de la dexametasona sobre la expresión de VEGF podía ser debido a las diferencias en los sistemas estudiados (tejido total versus cultivos celulares) o a la posibilidad del efecto de la dexametasona en la diferenciación de células tipo II que daría lugar a un incremento relativo del ARNm del VEGF¹⁹. También el efecto de los glucocorticoides podía ser dosis dependiente²⁸⁸. Se han visto además diferencias en la maduración pulmonar entre las distintas especies, así se ha observado que la dexametasona inhibía la septación en ratas (con alveolización postnatal) recién nacidas^{12,250,276,279-281} y por otro lado estudios en conejos (alveolización prenatal) recién nacidos han descrito que no hay diferencia en la estructura pulmonar después de la administración de dexametasona³⁷³.

En el día 14 de nuestro estudio, hemos encontrado una mayor expresión del VEGF en el grupo que ha recibido dexametasona prenatal respecto al grupo control.

En un estudio experimental realizado en ratas que fueron tratadas con altas dosis de dexametasona precozmente al nacer describieron una maduración microvascular precoz y una inhibición de la alveolización. Al retirar la droga, se observó un retroceso en la maduración pulmonar y a la edad de 10 días los pulmones de los animales tratados mostraban más septos inmaduros que los controles. Todo esto ha sugerido una alta plasticidad del lecho vascular

pulmonar y su capacidad para regresar a un estado más inmaduro²⁸⁵. Nosotros pensamos que este hecho explicaría el incremento del VEGF observado en el grupo de dexametasona en los animales de 14 días de vida, respecto a su grupo control. Además se ha descrito que la expresión del VEGF sería mayor cuando ocurre el mayor desarrollo vascular en el pulmón^{2,4}.

Betametasona

En nuestro estudio hemos observado una mayor expresión del VEGF en el grupo que ha recibido betametasona prenatal respecto el grupo control en todos los días de estudio (0, 4 y 14 días postnatal).

Roubliova y cols.³⁰⁰ han realizado un estudio en el que se han incluido 112 fetos de conejo. Las madres recibieron 0,05 ó 0,1 mg/Kg/día de betametasona los días 25 y 26 de gestación, al grupo control se le administró salino, estudiaron la expresión del VEGF pulmonar y observaron que estaba incrementada en células endoteliales, células epiteliales y células de músculo liso; siendo resultados similares a los encontrados en nuestro estudio. Observaron además que este efecto era dosis dependiente existiendo un incremento mayor en el grupo que se había empleado mayor dosis de betametasona prenatal.

Aunque hemos encontrado pocos estudios en la literatura sobre el efecto de la betametasona y el VEGF, en un estudio realizado por Aida y cols.³⁷⁴ se ha mostrado que el VEGF estimularía la expresión del receptor de glucocorticoides, aunque posiblemente con una menor función.

De nuestros resultados se podría deducir que la betametasona tendría un efecto positivo en la expresión del VEGF, la relación entre la betametasona prenatal y el VEGF es importante por el papel que parece jugar el VEGF en el desarrollo pulmonar y por la posibilidad que la betametasona prenatal podría prevenir el desarrollo de displasia broncopulmonar.

Dexametasona vs betametasona.

En nuestro estudio hemos encontrado que la expresión del VEGF (tanto de la expresión proteica como del ARNm pulmonar) era mayor en el grupo que había recibido betametasona prenatal comparado con el grupo que ha recibido dexametasona prenatal en los tres días del estudio (0, 4 y 14 días).

Tanto la betametasona como la dexametasona han sido recomendadas para su uso en mujeres gestantes con riesgo de parto pretérmino (NIH 1995)²³¹ y aún no se ha dado una recomendación para la elección de una sobre otra.

Se ha descrito que ambos glucocorticoides, betametasona y dexametasona, atraviesaban la placenta y no se inactivaban por los enzimas placentarios²⁶⁰. Se ha descrito, como única diferencia estructural entre las dos moléculas la orientación del grupo metilo en posición 16 y parece ser que esa pequeña diferencia tendría importantes consecuencias y sería la responsable de las diferentes acciones.. Los efectos biológicos y clínicos de la fotoisomerización de la molécula de la bilirrubina podían servirnos para ilustrar de cómo un cambio en la orientación alteraría un efecto biológico³⁷⁵.

Existen estudios, sobre todo a nivel de desarrollo neurológico, que muestran distintos efectos biológicos de ambas moléculas.

Rayburn y cols.³⁷⁶ compararon el efecto de una dosis única de betametasona 0,1 mg/Kg, dexametasona 0,1 mg/Kg o placebo administrado a ratas gestantes. Cuando las crías fueron maduras, el grupo tratado con betametasona mostró una mejor memoria comparado con el grupo placebo, y el grupo tratado con dexametasona mostró un descenso de memoria.

En estudio in vitro en timocitos, Buttgereit y cols.^{377,378} observaron que los distintos glucocorticoides, entre ellos la betametasona y la dexametasona diferían en la potencia de sus efectos genómicos y no genómicos. Encontraron que la dexametasona era cinco veces más potente en inhibir la respiración celular.

Otros estudios han mostrado las diferencias en los efectos genómicos y no genómicos entre las dos moléculas y la expresión de los receptores de glutamato^{271,379} o en la expresión de los canales de sodio de las células epiteliales respiratorias²⁷². Aunque no hemos encontrado publicaciones donde comparen los efectos de betametasona o dexametasona sobre el VEGF pulmonar, nuestros resultados indicarían que tienen acciones diferentes.

Se han comunicado hallazgos diferentes con el empleo de una u otra molécula (dexametasona o betametasona) en estudios clínicos. Baud y cols.²³⁹ publicaron un estudio multicéntrico con una cohorte de 883 niños con edades gestacionales de 24 a 31 semanas durante un periodo de 4 años. Las madres de 361 niños habían recibido betametasona, las madres de 165 niños habían

recibido dexametasona y las madre de 357 niños no habían recibido glucocorticoides. Se comparó la frecuencia de leucomalacia periventricular quística entre los tres grupos empleando un análisis multivariante ajustado a factores de confusión como sexo, corioamnionitis, infección, gestación múltiple y otros factores relevantes. El 8,4% de los niños del grupo que no había recibido corticoides prenatales desarrolló leucomalacia periventricular quística frente al 4,4% del grupo tratado con betametasona y al 10,9% del grupo tratado con dexametasona prenatal.

En estudio realizado por Lee y cols.²³⁶ donde se incluyeron 3600 niños con peso al nacimiento menor de 1500 gramos, encontraron un descenso en la mortalidad en niños que habían recibido betametasona prenatal comparado con el grupo que no había recibido corticoides prenatales, con la dexametasona prenatal no encontraron este descenso, un resultado similar también ha sido publicado en metaanálisis de la Cochrane realizados por Crowley^{230,231}. Además en el estudio de Lee y cols.²³⁶ la dexametasona se asoció con un incremento en la mortalidad neonatal comparada con la betametasona. Encontraron una menor incidencia de retinopatía severa en niños que habían recibido betametasona prenatal que estaría relacionada con la inhibición del TNF- α . Este factor también estaba implicado en la angiogénesis, y también observaron una menor tendencia de hemorragia intraventricular en los niños que habían recibido betametasona prenatal.

Feldman y cols.²⁴⁷ realizaron un estudio en 334 niños pretérmino con peso menor de 1500 gramos al nacimiento, 186 niños habían recibido betametasona prenatal y 148 habían recibido dexametasona prenatal, el hallazgo más importante que han observado en este estudio era que los niños que habían recibido betametasona prenatal tenían una menor incidencia de síndrome de distrés respiratorio y displasia broncopulmonar.

En nuestro estudio hemos encontrado un incremento del VEGF en el grupo tratado con betametasona prenatal lo que podría influir en la menor incidencia de distrés respiratorio, aunque la función del VEGF en el distrés respiratorio resulta controvertida, hay bastantes estudios que han mostrado que una expresión baja del VEGF se asociaba con peor pronóstico del síndrome de distrés respiratorio¹¹⁷⁻¹¹⁹. Ya hemos mencionado el importante papel que parece tener el VEGF en el desarrollo de displasia broncopulmonar^{13,100,128,158} por lo

que el incremento del VEGF que observamos en el grupo que ha recibido betametasona prenatal nos indica que la betametasona podría ser importante en la prevención de displasia broncopulmonar. Nuestros resultados también apoyarían que la betametasona podría ser la mejor elección para tratar a mujeres gestantes con riesgo de parto pretérmino.

6. CONCLUSIONES

1. Respecto a los efectos de la hipoxia y su recuperación en hiperoxia o aire sobre el metabolismo.
 - 1.1 Coincidiendo con la mayoría de los estudios publicados, la exposición a la hipoxia produce disminución de la temperatura corporal. La recuperación con hiperoxia o aire aumenta la temperatura corporal pero sin alcanzar los valores basales de los animales controles en aire.
 - 1.2 La hipoxia produce una situación de hipometabolismo con disminución en el consumo de oxígeno y en la producción de anhídrido carbónico. La recuperación con hiperoxia aumenta el consumo de oxígeno y la producción de anhídrido carbónico pero sin alcanzar los valores basales de los animales controles en aire.

2. Respecto a la acción de la hipoxia y su recuperación en hiperoxia o aire sobre la expresión del VEGF.
 - 2.1 La exposición a hipoxia en el momento del nacimiento incrementa la expresión del VEGF en el pulmón.
 - 2.2 La recuperación con hiperoxia en el momento del nacimiento, produce un descenso en la expresión del VEGF pulmonar que se mantiene durante todo el estudio (hasta el día 14 de vida).
 - 2.3 La recuperación con aire produce una menor expresión del VEGF pulmonar respecto a los controles pero mayor que los recuperados con hiperoxia, en todos los días estudiados.

3. El mayor incremento en la expresión del VEGF pulmonar, en todos los grupos y situaciones experimentales estudiadas, se produce en el día 4 de vida, coincidiendo con el comienzo de la fase de mayor crecimiento vascular en el pulmón así como con el comienzo de la fase de alveolización.

4. Respecto a la acción de los corticoides (dexametasona y betametasona) prenatales sobre el crecimiento (longitud y peso corporal).
 - 4.1 La administración de corticoides prenatales produce una inhibición del crecimiento somático fetal y postnatal hasta el día 14 de vida

5. Respecto a la acción de los corticoides prenatales (dexametasona y betametasona) sobre la expresión el metabolismo.
 - 5.1 los corticoides prenatales modifican el patrón de respuesta de la temperatura ante la hipoxia y ante la recuperación con hiperoxia o aire manteniendo una estabilidad en la temperatura.
 - 5.2 Los corticoides prenatales potencian el efecto de la hiperoxia incrementando el consumo de oxígeno.

6. Respecto a la acción de los corticoides prenatales (dexametasona y betametasona) sobre el VEGF.
 - 6.1 La dexametasona disminuye la expresión del VEGF pulmonar al nacimiento y al día 4 postnatal.
 - 6.2 La dexametasona modifica (diminuyendo) el efecto de inducción del VEGF por la hipoxia.
 - 6.3 En el estudio realizado el día 4, fase de mayor crecimiento vascular y comienzo de la fase de alveolización postnatal en el pulmón, se suman los efectos de la dexametasona y de la hiperoxia en la inhibición de la expresión del VEGF pulmonar.
 - 6.4 La betametasona aumenta la expresión del VEGF pulmonar.
 - 6.5 La expresión del VEGF pulmonar, el día 14 postnatal, disminuye, en todas las situaciones experimentales del grupo control. Esta

disminución no se produce en los grupos tratados con corticoides prenatales (dexametasona o betametasona) posiblemente por un posible retroceso en la alveolización pulmonar producida por los corticoides.

7. Respecto al estudio comparativo de los corticoides estudiados:

La betametasona prenatal vs dexametasona prenatal aumenta la expresión del VEGF pulmonar en todos los grupos experimentales

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Haworth, S. G. & Hislop, A. A. Lung development-the effects of chronic hypoxia. *Semin. Neonatol.* **8**, 1-8 (2003).
2. Thebaud, B. *et al.* Vascular endothelial growth factor gene therapy increases survival, promotes lung angiogenesis, and prevents alveolar damage in hyperoxia-induced lung injury: evidence that angiogenesis participates in alveolarization. *Circulation.* **112**, 2477-2486 (2005).
3. Kunig, A. M. *et al.* Recombinant human VEGF treatment enhances alveolarization after hyperoxic lung injury in neonatal rats. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* **289**, L529-L535 (2005).
4. Thebaud, B. Angiogenesis in lung development, injury and repair: implications for chronic lung disease of prematurity. *Neonatology.* **91**, 291-297 (2007).
5. Bourbon, J., Boucherat, O., Chailley-Heu, B. & Delacourt, C. Control mechanisms of lung alveolar development and their disorders in bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr. Res.* **57**, 38R-46R (2005).
6. Roth-Kleiner, M. & Post, M. Genetic control of lung development. *Biol. Neonate.* **84**, 83-88 (2003).
7. Warburton, D. *et al.* The molecular basis of lung morphogenesis. *Mech. Dev.* **92**, 55-81 (2000).
8. Costa, R. H., Kalinichenko, V. V. & Lim, L. Transcription factors in mouse lung development and function. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* **280**, L823-L838 (2001).
9. Burri, P. H. Structural aspects of postnatal lung development - alveolar formation and growth. *Biol. Neonate.* **89**, 313-322 (2006).
10. Vicencio, A. G., Eickelberg, O., Stankewich, M. C., Kashgarian, M. & Haddad, G. G. Regulation of TGF-beta ligand and receptor expression in neonatal rat lungs exposed to chronic hypoxia. *J. Appl. Physiol.* **93**, 1123-1130 (2002).
11. Liu, M. & Post, M. Invited review: mechanochemical signal transduction in the fetal lung. *J. Appl. Physiol.* **89**, 2078-2084 (2000).
12. Massaro, D. & Massaro, G. D. Critical period for alveologenesi and early determinants of adult pulmonary disease. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* **287**, L715-L717 (2004).

13. Voelkel, N. F., Vandivier, R. W. & Tuder, R. M. Vascular endothelial growth factor in the lung. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* **290**, L209-L221 (2006).
14. van, T. M. *et al.* Role of oxygen and vascular development in epithelial branching morphogenesis of the developing mouse lung. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* **288**, L167-L178 (2005).
15. Jakkula, M. *et al.* Inhibition of angiogenesis decreases alveolarization in the developing rat lung. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* **279**, L600-L607 (2000).
16. Schwarz, M. A., Zhang, F., Gebb, S., Starnes, V. & Warburton, D. Endothelial monocyte activating polypeptide II inhibits lung neovascularization and airway epithelial morphogenesis. *Mech. Dev.* **95**, 123-132 (2000).
17. Gebb, S. A. & Shannon, J. M. Tissue interactions mediate early events in pulmonary vasculogenesis. *Dev. Dyn.* **217**, 159-169 (2000).
18. Papaioannou, A. I., Kostikas, K., Kollia, P. & Gourgoulianis, K. I. Clinical implications for vascular endothelial growth factor in the lung: friend or foe? *Respir. Res.* **7:128.**, 128 (2006).
19. Acarregui, M. J., Penisten, S. T., Goss, K. L., Ramirez, K. & Snyder, J. M. Vascular endothelial growth factor gene expression in human fetal lung in vitro. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **20**, 14-23 (1999).
20. Bhatt, A. J., Amin, S. B., Chess, P. R., Watkins, R. H. & Maniscalco, W. M. Expression of vascular endothelial growth factor and Flk-1 in developing and glucocorticoid-treated mouse lung. *Pediatr. Res.* **47**, 606-613 (2000).
21. Akesson, A. L. *et al.* Embryonic vasculogenesis by endothelial precursor cells derived from lung mesenchyme. *Dev. Dyn.* **217**, 11-23 (2000).
22. Ferrara, N. & vis-Smyth, T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* **18**, 4-25 (1997).
23. Lassus, P., Ristimaki, A., Ylikorkala, O., Viinikka, L. & Andersson, S. Vascular endothelial growth factor in human preterm lung. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **159**, 1429-1433 (1999).
24. Senger, D. R. *et al.* Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* **219**, 983-985 (1983).
25. Ferrara, N., Gerber, H. P. & LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* **9**, 669-676 (2003).
26. Dvorak, H. F., Brown, L. F., Detmar, M. & Dvorak, A. M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am. J. Pathol.* **146**, 1029-1039 (1995).
27. Roberts, W. G. & Palade, G. E. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J. Cell Sci.* **108**, 2369-2379 (1995).
28. Watkins, R. H., D'Angio, C. T., Ryan, R. M., Patel, A. & Maniscalco, W. M. Differential expression of VEGF mRNA splice variants in newborn and adult hyperoxic lung injury. *Am. J. Physiol.* **276**, L858-L867 (1999).
29. Maniscalco, W. M. *et al.* Angiogenic factors and alveolar vasculature: development and alterations by injury in very premature baboons. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* **282**, L811-L823 (2002).

30. Ferrara, N. *et al.* Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. **380**, 439-442 (1996).
31. Carmeliet, P. *et al.* Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. **380**, 435-439 (1996).
32. Takahashi, H. & Shibuya, M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin. Sci. (Lond)*. **109**, 227-241 (2005).
33. Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V. & Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. **246**, 1306-1309 (1989).
34. Keck, P. J. *et al.* Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science*. **246**, 1309-1312 (1989).
35. Mura, M., dos Santos, C. C., Stewart, D. & Liu, M. Vascular endothelial growth factor and related molecules in acute lung injury. *J. Appl. Physiol.* **97**, 1605-1617 (2004).
36. Stenmark, K. R. & Balasubramaniam, V. Angiogenic therapy for bronchopulmonary dysplasia: rationale and promise. *Circulation*. **112**, 2383-2385 (2005).
37. Ng, Y. S., Rohan, R., Sunday, M. E., Demello, D. E. & D'Amore, P. A. Differential expression of VEGF isoforms in mouse during development and in the adult. *Dev. Dyn.* **220**, 112-121 (2001).
38. Wanstall, J. C. *et al.* Vascular endothelial growth factor-B-deficient mice show impaired development of hypoxic pulmonary hypertension. *Cardiovasc. Res.* **55**, 361-368 (2002).
39. Jeltsch, M. *et al.* Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science*. **276**, 1423-1425 (1997).
40. Ogawa, S. *et al.* A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J. Biol. Chem.* **273**, 31273-31282 (1998).
41. Maglione, D., Guerriero, V., Viglietto, G., li-Bovi, P. & Persico, M. G. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 9267-9271 (1991).
42. Carmeliet, P. *et al.* Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat. Med.* **7**, 575-583 (2001).
43. Tsao, P. N. *et al.* Placenta growth factor elevation in the cord blood of premature neonates predicts poor pulmonary outcome. *Pediatrics*. **113**, 1348-1351 (2004).
44. Tsao, P. N. *et al.* Overexpression of placenta growth factor contributes to the pathogenesis of pulmonary emphysema. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **169**, 505-511 (2004).
45. Shibuya, M. *et al.* Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene*. **5**, 519-524 (1990).

46. Terman, B. I. *et al.* Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene*. **6**, 1677-1683 (1991).
47. Karkkainen, M. J., Makinen, T. & Alitalo, K. Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. *Nat. Cell Biol.* **4**, E2-E5 (2002).
48. Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M. & Heldin, C. H. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* **269**, 26988-26995 (1994).
49. Gille, H. *et al.* Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J. Biol. Chem.* **276**, 3222-3230 (2001).
50. Quinn, T. P., Peters, K. G., De, V. C., Ferrara, N. & Williams, L. T. Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 7533-7537 (1993).
51. Fong, G. H., Rossant, J., Gertsenstein, M. & Breitman, M. L. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*. **376**, 66-70 (1995).
52. Fong, G. H., Klingensmith, J., Wood, C. R., Rossant, J. & Breitman, M. L. Regulation of flt-1 expression during mouse embryogenesis suggests a role in the establishment of vascular endothelium. *Dev. Dyn.* **207**, 1-10 (1996).
53. Kanno, S. *et al.* Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells. *Oncogene*. **20**, 2138-2146 (2000).
54. Bussolati, B. *et al.* Vascular endothelial growth factor receptor-1 modulates vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis via nitric oxide. *Am. J. Pathol.* **159**, 993-1008 (2001).
55. Yamaguchi, T. P., Dumont, D. J., Conlon, R. A., Breitman, M. L. & Rossant, J. flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development*. **118**, 489-498 (1993).
56. Hirakawa, S. *et al.* VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *J. Exp. Med.* **201**, 1089-1099 (2005).
57. Shibuya, M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J. Biochem. Mol. Biol.* **39**, 469-478 (2006).
58. Shalaby, F. *et al.* Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. **376**, 62-66 (1995).
59. Takahashi, T., Yamaguchi, S., Chida, K. & Shibuya, M. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J.* **20**, 2768-2778 (2001).
60. Bhandari, V. *et al.* Developmental Regulation of NO-mediated VEGF-induced Effects in the Lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* ., (2008).
61. Shen, B. Q., Lee, D. Y., Cortopassi, K. M., Damico, L. A. & Zioncheck, T. F. Vascular endothelial growth factor KDR receptor signaling potentiates tumor necrosis factor-induced tissue factor expression in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 5281-5286 (2001).

62. Makinen, T. *et al.* Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nat. Med.* **7**, 199-205 (2001).
63. Veikkola, T. *et al.* Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *EMBO J.* **20**, 1223-1231 (2001).
64. Soker, S., Takashima, S., Miao, H. Q., Neufeld, G. & Klagsbrun, M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell.* **92**, 735-745 (1998).
65. Brown, K. R., England, K. M., Goss, K. L., Snyder, J. M. & Acarregui, M. J. VEGF induces airway epithelial cell proliferation in human fetal lung in vitro. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* **281**, L1001-L1010 (2001).
66. Whitaker, G. B., Limberg, B. J. & Rosenbaum, J. S. Vascular endothelial growth factor receptor-2 and neuropilin-1 form a receptor complex that is responsible for the differential signaling potency of VEGF(165) and VEGF(121). *J. Biol. Chem.* **276**, 25520-25531 (2001).
67. Soker, S., Miao, H. Q., Nomi, M., Takashima, S. & Klagsbrun, M. VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. *J. Cell Biochem.* **85**, 357-368 (2002).
68. Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S. & Poltorak, Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* **13**, 9-22 (1999).
69. Ema, M. *et al.* A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 4273-4278 (1997).
70. Gerber, H. P., Condorelli, F., Park, J. & Ferrara, N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J. Biol. Chem.* **272**, 23659-23667 (1997).
71. Zhang, Q., Moe, O. W., Garcia, J. A. & Hsia, C. C. Regulated expression of hypoxia-inducible factors during postnatal and postpneumectomy lung growth. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* **290**, L880-L889 (2006).
72. Manalo, D. J. *et al.* Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood.* **105**, 659-669 (2005).
73. Forsythe, J. A. *et al.* Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell Biol.* **16**, 4604-4613 (1996).
74. Kotch, L. E., Iyer, N. V., Laughner, E. & Semenza, G. L. Defective vascularization of HIF-1 α -null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. *Dev. Biol.* **209**, 254-267 (1999).
75. Levy, A. P., Levy, N. S. & Goldberg, M. A. Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. *J. Biol. Chem.* **271**, 2746-2753 (1996).
76. Claffey, K. P. *et al.* Identification of a human VPF/VEGF 3' untranslated region mediating hypoxia-induced mRNA stability. *Mol. Biol. Cell.* **9**, 469-481 (1998).
77. Yan, S. F. *et al.* Egr-1, a master switch coordinating upregulation of divergent gene families underlying ischemic stress. *Nat. Med.* **6**, 1355-1361 (2000).

78. Shi, Q. *et al.* Constitutive Sp1 activity is essential for differential constitutive expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* **61**, 4143-4154 (2001).
79. Hosford, G. E. & Olson, D. M. Effects of hyperoxia on VEGF, its receptors, and HIF-2alpha in the newborn rat lung. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* **285**, L161-L168 (2003).
80. Compennolle, V. *et al.* Loss of HIF-2alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat. Med.* **8**, 702-710 (2002).
81. Boussat, S. *et al.* Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in human pulmonary epithelial cells. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* **279**, L371-L378 (2000).
82. Shen, B. Q. *et al.* Homologous up-regulation of KDR/Flk-1 receptor expression by vascular endothelial growth factor in vitro. *J. Biol. Chem.* **273**, 29979-29985 (1998).
83. Waltenberger, J., Mayr, U., Pentz, S. & Hombach, V. Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia. *Circulation.* **94**, 1647-1654 (1996).
84. Chinoy, M. R., Graybill, M. M., Miller, S. A., Lang, C. M. & Kauffman, G. L. Angiopoietin-1 and VEGF in vascular development and angiogenesis in hypoplastic lungs. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* **283**, L60-L66 (2002).
85. Hanahan, D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science.* **277**, 48-50 (1997).
86. Suri, C. *et al.* Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell.* **87**, 1171-1180 (1996).
87. Papapetropoulos, A. *et al.* Direct actions of angiopoietin-1 on human endothelium: evidence for network stabilization, cell survival, and interaction with other angiogenic growth factors. *Lab Invest.* **79**, 213-223 (1999).
88. Thurston, G. *et al.* Angiopoietin 1 causes vessel enlargement, without angiogenic sprouting, during a critical developmental period. *Development.* **132**, 3317-3326 (2005).
89. Quintos-Alagheband, M. L., White, C. W. & Schwarz, M. A. Potential role for antiangiogenic proteins in the evolution of bronchopulmonary dysplasia. *Antioxid. Redox. Signal.* **6**, 137-145 (2004).
90. Jakeman, L. B., Armanini, M., Phillips, H. S. & Ferrara, N. Developmental expression of binding sites and messenger ribonucleic acid for vascular endothelial growth factor suggests a role for this protein in vasculogenesis and angiogenesis. *Endocrinology.* **133**, 848-859 (1993).
91. Breier, G., Albrecht, U., Sterrer, S. & Risau, W. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development.* **114**, 521-532 (1992).
92. Shifren, J. L., Doldi, N., Ferrara, N., Mesiano, S. & Jaffe, R. B. In the human fetus, vascular endothelial growth factor is expressed in epithelial cells and myocytes, but not vascular endothelium: implications for mode of action. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **79**, 316-322 (1994).

93. Millauer, B. *et al.* High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell.* **72**, 835-846 (1993).
94. Flamme, I., Breier, G. & Risau, W. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor 2 (flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embryo. *Dev. Biol.* **169**, 699-712 (1995).
95. Lassus, P. *et al.* Pulmonary vascular endothelial growth factor and Flt-1 in fetuses, in acute and chronic lung disease, and in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **164**, 1981-1987 (2001).
96. Levy, M. *et al.* Developmental changes in endothelial vasoactive and angiogenic growth factors in the human perinatal lung. *Pediatr. Res.* **57**, 248-253 (2005).
97. Del Moral, P. M. *et al.* VEGF-A signaling through Flk-1 is a critical facilitator of early embryonic lung epithelial to endothelial crosstalk and branching morphogenesis. *Dev. Biol.* **290**, 177-188 (2006).
98. Groenman, F., Rutter, M., Caniggia, I., Tibboel, D. & Post, M. Hypoxia-inducible factors in the first trimester human lung. *J. Histochem. Cytochem.* **55**, 355-363 (2007).
99. Zhao, L., Wang, K., Ferrara, N. & Vu, T. H. Vascular endothelial growth factor coordinates proper development of lung epithelium and vasculature. *Mech. Dev.* **122**, 877-886 (2005).
100. Lin, Y. J. *et al.* Inhaled nitric oxide enhances distal lung growth after exposure to hyperoxia in neonatal rats. *Pediatr. Res.* **58**, 22-29 (2005).
101. Zeng, X., Wert, S. E., Federici, R., Peters, K. G. & Whitsett, J. A. VEGF enhances pulmonary vasculogenesis and disrupts lung morphogenesis in vivo. *Dev. Dyn.* **211**, 215-227 (1998).
102. Akeson, A. L. *et al.* Temporal and spatial regulation of VEGF-A controls vascular patterning in the embryonic lung. *Dev. Biol.* **264**, 443-455 (2003).
103. Yamamoto, H. *et al.* Epithelial-vascular cross talk mediated by VEGF-A and HGF signaling directs primary septae formation during distal lung morphogenesis. *Dev. Biol.* **308**, 44-53 (2007).
104. Maniscalco, W. M., Watkins, R. H., Roper, J. M., Staversky, R. & O'Reilly, M. A. Hyperoxic ventilated premature baboons have increased p53, oxidant DNA damage and decreased VEGF expression. *Pediatr. Res.* **58**, 549-556 (2005).
105. Koyama, S. *et al.* Vascular endothelial growth factor mRNA and protein expression in airway epithelial cell lines in vitro. *Eur. Respir. J.* **20**, 1449-1456 (2002).
106. He, H. *et al.* Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through flk-1/KDR activation of c-Src. *J. Biol. Chem.* **274**, 25130-25135 (1999).
107. Ku, D. D., Zaleski, J. K., Liu, S. & Brock, T. A. Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *Am. J. Physiol.* **265**, H586-H592 (1993).
108. Dimmeler, S. & Zeiher, A. M. Nitric oxide-an endothelial cell survival factor. *Cell Death. Differ.* **6**, 964-968 (1999).

109. Fukumura, D. *et al.* Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 2604-2609 (2001).
110. Gerber, H. P., Dixit, V. & Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 13313-13316 (1998).
111. Farahani, M. *et al.* Autocrine VEGF mediates the antiapoptotic effect of CD154 on CLL cells. *Leukemia.* **19**, 524-530 (2005).
112. Kaneko, Y., Kitazato, K. & Basaki, Y. Integrin-linked kinase regulates vascular morphogenesis induced by vascular endothelial growth factor. *J. Cell Sci.* **117**, 407-415 (2004).
113. Chai, J., Jones, M. K. & Tarnawski, A. S. Serum response factor is a critical requirement for VEGF signaling in endothelial cells and VEGF-induced angiogenesis. *FASEB J.* **18**, 1264-1266 (2004).
114. Le Cras, T. D. *et al.* VEGF causes pulmonary hemorrhage, hemosiderosis, and air space enlargement in neonatal mice. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* **287**, L134-L142 (2004).
115. Kasahara, Y. *et al.* Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J. Clin. Invest.* **106**, 1311-1319 (2000).
116. Mura, M. *et al.* The early responses of VEGF and its receptors during acute lung injury: implication of VEGF in alveolar epithelial cell survival. *Crit Care.* **10**, R130 (2006).
117. Thickett, D. R., Armstrong, L. & Millar, A. B. A role for vascular endothelial growth factor in acute and resolving lung injury. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **166**, 1332-1337 (2002).
118. Maitre, B. *et al.* Vascular endothelial growth factor synthesis in the acute phase of experimental and clinical lung injury. *Eur. Respir. J.* **18**, 100-106 (2001).
119. Corne, J. *et al.* IL-13 stimulates vascular endothelial cell growth factor and protects against hyperoxic acute lung injury. *J. Clin. Invest.* **106**, 783-791 (2000).
120. Kaner, R. J. *et al.* Lung overexpression of the vascular endothelial growth factor gene induces pulmonary edema. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **22**, 657-664 (2000).
121. Karpaliotis, D. *et al.* Angiogenic growth factors in the pathophysiology of a murine model of acute lung injury. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* **283**, L585-L595 (2002).
122. Becker, P. M., Alcasabas, A., Yu, A. Y., Semenza, G. L. & Bunton, T. E. Oxygen-independent upregulation of vascular endothelial growth factor and vascular barrier dysfunction during ventilated pulmonary ischemia in isolated ferret lungs. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **22**, 272-279 (2000).
123. Fehrenbach, A. *et al.* Reduced vascular endothelial growth factor correlates with alveolar epithelial damage after experimental ischemia and reperfusion. *J. Heart Lung Transplant.* **22**, 967-978 (2003).
124. Grover, T. R., Asikainen, T. M., Kinsella, J. P., Abman, S. H. & White, C. W. Hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha are decreased in an experimental model of severe respiratory distress syndrome in preterm lambs. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* **292**, L1345-L1351 (2007).

125. Medford, A. R. & Millar, A. B. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS): paradox or paradigm? *Thorax*. **61**, 621-626 (2006).
126. Levy, M., Maurey, C., nh-Xuan, A. T., Vouhe, P. & Israel-Biet, D. Developmental expression of vasoactive and growth factors in human lung. Role in pulmonary vascular resistance adaptation at birth. *Pediatr. Res.* **57**, 21R-25R (2005).
127. Abman, S. H. Recent advances in the pathogenesis and treatment of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Neonatology*. **91**, 283-290 (2007).
128. Le Cras, T. D., Markham, N. E., Tuder, R. M., Voelkel, N. F. & Abman, S. H. Treatment of newborn rats with a VEGF receptor inhibitor causes pulmonary hypertension and abnormal lung structure. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* **283**, L555-L562 (2002).
129. Voelkel, N. F. *et al.* Janus face of vascular endothelial growth factor: the obligatory survival factor for lung vascular endothelium controls precapillary artery remodeling in severe pulmonary hypertension. *Crit Care Med.* **30**, S251-S256 (2002).
130. Grover, T. R., Zenge, J. P., Parker, T. A. & Abman, S. H. Vascular endothelial growth factor causes pulmonary vasodilation through activation of the phosphatidylinositol-3-kinase-nitric oxide pathway in the late-gestation ovine fetus. *Pediatr. Res.* **52**, 907-912 (2002).
131. Grover, T. R. *et al.* Intrauterine hypertension decreases lung VEGF expression and VEGF inhibition causes pulmonary hypertension in the ovine fetus. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* **284**, L508-L517 (2003).
132. Mata-Greenwood, E., Meyrick, B., Soifer, S. J., Fineman, J. R. & Black, S. M. Expression of VEGF and its receptors Flt-1 and Flk-1/KDR is altered in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* **285**, L222-L231 (2003).
133. Grover, T. R., Parker, T. A., Markham, N. E. & Abman, S. H. rhVEGF treatment preserves pulmonary vascular reactivity and structure in an experimental model of pulmonary hypertension in fetal sheep. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* **289**, L315-L321 (2005).
134. Fujita, M. *et al.* Pulmonary hypertension in TNF-alpha-overexpressing mice is associated with decreased VEGF gene expression. *J. Appl. Physiol.* **93**, 2162-2170 (2002).
135. Taraseviciene-Stewart, L. *et al.* Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *FASEB J.* **15**, 427-438 (2001).
136. Hirose, S., Hosoda, Y., Furuya, S., Otsuki, T. & Ikeda, E. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors correlates closely with formation of the plexiform lesion in human pulmonary hypertension. *Pathol. Int.* **50**, 472-479 (2000).
137. Tuder, R. M. *et al.* Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis. *J. Pathol.* **195**, 367-374 (2001).
138. Campbell, A. I., Zhao, Y., Sandhu, R. & Stewart, D. J. Cell-based gene transfer of vascular endothelial growth factor attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation.* **104**, 2242-2248 (2001).

139. Northway, W. H., Jr., Rosan, R. C. & Porter, D. Y. Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease. Bronchopulmonary dysplasia. *N. Engl. J. Med.* **276**, 357-368 (1967).
140. Jobe, A. J. The new BPD: an arrest of lung development. *Pediatr. Res.* **46**, 641-643 (1999).
141. Coalson, J. J., Kuehl, T. J., Prihoda, T. J. & deLemos, R. A. Diffuse alveolar damage in the evolution of bronchopulmonary dysplasia in the baboon. *Pediatr. Res.* **24**, 357-366 (1988).
142. Coalson, J. J., Winter, V. T., Siler-Khodr, T. & Yoder, B. A. Neonatal chronic lung disease in extremely immature baboons. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **160**, 1333-1346 (1999).
143. Bhatt, A. J. *et al.* Disrupted pulmonary vasculature and decreased vascular endothelial growth factor, Flt-1, and TIE-2 in human infants dying with bronchopulmonary dysplasia. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **164**, 1971-1980 (2001).
144. De Paepe, M. E. *et al.* Growth of pulmonary microvasculature in ventilated preterm infants. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **173**, 204-211 (2006).
145. Jobe, A. H. & Bancalari, E. Bronchopulmonary dysplasia. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **163**, 1723-1729 (2001).
146. Crapo, J. D. Oxidative stress as an initiator of cytokine release and cell damage. *Eur. Respir. J. Suppl.* **44:4s-6s**, 4s-6s (2003).
147. Crapo, J. D. Redox active agents in inflammatory lung injury. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **168**, 1027-1028 (2003).
148. Crapo, J. D. Morphologic changes in pulmonary oxygen toxicity. *Annu. Rev. Physiol.* **48:721-31**, 721-731 (1986).
149. Spyridopoulos, I. *et al.* Vascular endothelial growth factor inhibits endothelial cell apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha: balance between growth and death signals. *J. Mol. Cell Cardiol.* **29**, 1321-1330 (1997).
150. Abman, S. H. Bronchopulmonary dysplasia: "a vascular hypothesis". *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **164**, 1755-1756 (2001).
151. Kunig, A. M. *et al.* Recombinant human VEGF treatment transiently increases lung edema but enhances lung structure after neonatal hyperoxia. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* **291**, L1068-L1078 (2006).
152. Ambalavanan, N. & Novak, Z. E. Peptide growth factors in tracheal aspirates of mechanically ventilated preterm neonates. *Pediatr. Res.* **53**, 240-244 (2003).
153. Currie, A. E., Vyas, J. R., MacDonald, J., Field, D. & Kotecha, S. Epidermal growth factor in the lungs of infants developing chronic lung disease. *Eur. Respir. J.* **18**, 796-800 (2001).
154. Tang, J. R. *et al.* Inhaled nitric oxide attenuates pulmonary hypertension and improves lung growth in infant rats after neonatal treatment with a VEGF receptor inhibitor. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* **287**, L344-L351 (2004).
155. Balasubramaniam, V., Tang, J. R., Maxey, A., Plopper, C. G. & Abman, S. H. Mild hypoxia impairs alveolarization in the endothelial nitric oxide synthase-deficient mouse. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* **284**, L964-L971 (2003).

156. Balasubramaniam, V., Maxey, A. M., Fouty, B. W. & Abman, S. H. Nitric oxide augments fetal pulmonary artery endothelial cell angiogenesis in vitro. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* **290**, L1111-L1116 (2006).
157. Balasubramaniam, V., Maxey, A. M., Morgan, D. B., Markham, N. E. & Abman, S. H. Inhaled NO restores lung structure in eNOS-deficient mice recovering from neonatal hypoxia. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* **291**, L119-L127 (2006).
158. Balasubramaniam, V., Mervis, C. F., Maxey, A. M., Markham, N. E. & Abman, S. H. Hyperoxia reduces bone marrow, circulating, and lung endothelial progenitor cells in the developing lung: implications for the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* **292**, L1073-L1084 (2007).
159. Warburton, D. *et al.* Growth factor signaling in lung morphogenetic centers: automaticity, stereotypy and symmetry. *Respir. Res.* **4:5. Epub; %2003 Jun; %19.**, 5 (2003).
160. Mortola, J. P. How newborn mammals cope with hypoxia. *Respir. Physiol.* **116**, 95-103 (1999).
161. Mortola, J. P. Implications of hypoxic hypometabolism during mammalian ontogenesis. *Respir. Physiol Neurobiol.* **141**, 345-356 (2004).
162. CROSS, K. W., TIZARD, J. P. & TRYTHALL, D. A. The gaseous metabolism of the newborn infant breathing 15% oxygen. *Acta Paediatr.* **47**, 217-237 (1958).
163. HILL, J. R. The oxygen consumption of new-born and adult mammals. Its dependence on the oxygen tension in the inspired air and on the environmental temperature. *J. Physiol.* **149:346-73.**, 346-373 (1959).
164. Powell, F. L., Milsom, W. K. & Mitchell, G. S. Time domains of the hypoxic ventilatory response. *Respir. Physiol.* **112**, 123-134 (1998).
165. Boutilier, R. G. & St-Pierre, J. Surviving hypoxia without really dying. *Comp Biochem. Physiol A Mol. Integr. Physiol.* **126**, 481-490 (2000).
166. Gautier, H. Invited editorial on "Oxygen transport in conscious newborn dogs during hypoxic hypometabolism". *J. Appl. Physiol.* **84**, 761-762 (1998).
167. Fewell, J. E. Protective responses of the newborn to hypoxia. *Respir. Physiol Neurobiol.* **149**, 243-255 (2005).
168. Gauda, E. B., McLemore, G. L., Tolosa, J., Marston-Nelson, J. & Kwak, D. Maturation of peripheral arterial chemoreceptors in relation to neonatal apnoea. *Semin. Neonatol.* **9**, 181-194 (2004).
169. Peng, Y. J., Rennison, J. & Prabhakar, N. R. Intermittent hypoxia augments carotid body and ventilatory response to hypoxia in neonatal rat pups. *J. Appl. Physiol.* **97**, 2020-2025 (2004).
170. Martin, R. J. & bu-Shaweesh, J. M. Control of breathing and neonatal apnea. *Biol. Neonate.* **87**, 288-295 (2005).
171. Mortola, J. P. & Matsuoka, T. Interaction between CO₂ production and ventilation in the hypoxic kitten. *J. Appl. Physiol.* **74**, 905-910 (1993).
172. Saiki, C. & Mortola, J. P. Effect of CO₂ on the metabolic and ventilatory responses to ambient temperature in conscious adult and newborn rats. *J. Physiol.* **491**, 261-269 (1996).

173. Groenman, F. A. *et al.* Effect of chemical stabilizers of hypoxia-inducible factors on early lung development. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* **293**, L557-L567 (2007).
174. Chen, E. Y., Fujinaga, M. & Giaccia, A. J. Hypoxic microenvironment within an embryo induces apoptosis and is essential for proper morphological development. *Teratology.* **60**, 215-225 (1999).
175. Maltepe, E. & Simon, M. C. Oxygen, genes, and development: an analysis of the role of hypoxic gene regulation during murine vascular development. *J. Mol. Med.* **76**, 391-401 (1998).
176. Yue, X. & Tomanek, R. J. Stimulation of coronary vasculogenesis/angiogenesis by hypoxia in cultured embryonic hearts. *Dev. Dyn.* **216**, 28-36 (1999).
177. Loughna, S., Yuan, H. T. & Woolf, A. S. Effects of oxygen on vascular patterning in Tie1/LacZ metanephric kidneys in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**, 361-366 (1998).
178. Gebb, S. A. & Jones, P. L. Hypoxia and lung branching morphogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **543:117-25.**, 117-125 (2003).
179. Lee, Y. M. *et al.* Determination of hypoxic region by hypoxia marker in developing mouse embryos in vivo: a possible signal for vessel development. *Dev. Dyn.* **220**, 175-186 (2001).
180. Burton, G. J., Jauniaux, E. & Watson, A. L. Maternal arterial connections to the placental intervillous space during the first trimester of human pregnancy: the Boyd collection revisited. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **181**, 718-724 (1999).
181. Rodesch, F., Simon, P., Donner, C. & Jauniaux, E. Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet. Gynecol.* **80**, 283-285 (1992).
182. Ietta, F. *et al.* Dynamic HIF1A regulation during human placental development. *Biol. Reprod.* **75**, 112-121 (2006).
183. Hoo, A. F., Henschen, M., Dezateux, C., Costeloe, K. & Stocks, J. Respiratory function among preterm infants whose mothers smoked during pregnancy. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **158**, 700-705 (1998).
184. Sekhon, H. S. *et al.* Prenatal nicotine increases pulmonary alpha7 nicotinic receptor expression and alters fetal lung development in monkeys. *J. Clin. Invest.* **103**, 637-647 (1999).
185. Elliot, J., Vullermin, P. & Robinson, P. Maternal cigarette smoking is associated with increased inner airway wall thickness in children who die from sudden infant death syndrome. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **158**, 802-806 (1998).
186. Massaro, D. & Massaro, G. D. Invited Review: pulmonary alveoli: formation, the "call for oxygen," and other regulators. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* **282**, L345-L358 (2002).
187. Haworth SG. Pathobiology of pulmonary hypertension in infants and children. *Prog Pediatr Cardiol* 2001 112, 249-269. 2001.
Ref Type: Personal Communication
188. Stenmark, K. R. & Mecham, R. P. Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling. *Annu. Rev. Physiol.* **59:89-144.**, 89-144 (1997).

189. Tang, J. R., Le Cras, T. D., Morris, K. G., Jr. & Abman, S. H. Brief perinatal hypoxia increases severity of pulmonary hypertension after reexposure to hypoxia in infant rats. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* **278**, L356-L364 (2000).
190. Tuder, R. M., Flook, B. E. & Voelkel, N. F. Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide. *J. Clin. Invest.* **95**, 1798-1807 (1995).
191. Pham, I. *et al.* Hypoxia upregulates VEGF expression in alveolar epithelial cells in vitro and in vivo. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* **283**, L1133-L1142 (2002).
192. Christou, H., Yoshida, A., Arthur, V., Morita, T. & Kourembanas, S. Increased vascular endothelial growth factor production in the lungs of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **18**, 768-776 (1998).
193. Levy, A. P., Levy, N. S., Wegner, S. & Goldberg, M. A. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J. Biol. Chem.* **270**, 13333-13340 (1995).
194. Namiki, A. *et al.* Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 31189-31195 (1995).
195. Steinbrech, D. S. *et al.* VEGF expression in an osteoblast-like cell line is regulated by a hypoxia response mechanism. *Am. J. Physiol Cell Physiol.* **278**, C853-C860 (2000).
196. Ikeda, E., Achen, M. G., Breier, G. & Risau, W. Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 19761-19766 (1995).
197. Shima, D. T., Deutsch, U. & D'Amore, P. A. Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability. *FEBS Lett.* **370**, 203-208 (1995).
198. Chandel, N. S. *et al.* Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 11715-11720 (1998).
199. Katz-Salamon, M. & Lagercrantz, H. Hypoxic ventilatory defence in very preterm infants: attenuation after long term oxygen treatment. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed.* **70**, F90-F95 (1994).
200. Koo, H. C. *et al.* Effects of transgene expression of superoxide dismutase and glutathione peroxidase on pulmonary epithelial cell growth in hyperoxia. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* **288**, L718-L726 (2005).
201. Sastre, J. *et al.* Antioxidant administration to the mother prevents oxidative stress associated with birth in the neonatal rat. *Life Sci.* **54**, 2055-2059 (1994).
202. Vento, M. *et al.* Resuscitation with room air instead of 100% oxygen prevents oxidative stress in moderately asphyxiated term neonates. *Pediatrics.* **107**, 642-647 (2001).
203. Vento, M. *et al.* Oxidative stress in asphyxiated term infants resuscitated with 100% oxygen. *J. Pediatr.* **142**, 240-246 (2003).
204. Saugstad, O. D. Hypoxanthine as an indicator of hypoxia: its role in health and disease through free radical production. *Pediatr. Res.* **23**, 143-150 (1988).
205. Wolkoff, L. I. & Davis, J. M. Delivery room resuscitation of the newborn. *Clin. Perinatol.* **26**, 641-658 (1999).

206. Colavitti, R. *et al.* Reactive oxygen species as downstream mediators of angiogenic signaling by vascular endothelial growth factor receptor-2/KDR. *J. Biol. Chem.* **277**, 3101-3108 (2002).
207. Beckman, K. B. & Ames, B. N. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.* **78**, 547-581 (1998).
208. Coalson J. Pathology of chronic lung disease in early infancy. Marcel Dekker, New York , 85-124 . 2000. Bland R, **Coalson JJ**.
Ref Type: Personal Communication
209. Paine, R., III *et al.* Transgenic overexpression of granulocyte macrophage-colony stimulating factor in the lung prevents hyperoxic lung injury. *Am. J. Pathol.* **163**, 2397-2406 (2003).
210. Grath-Morrow, S. A. *et al.* Vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade disrupts postnatal lung development. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **32**, 420-427 (2005).
211. Roberts, R. J., Weesner, K. M. & Bucher, J. R. Oxygen-induced alterations in lung vascular development in the newborn rat. *Pediatr. Res.* **17**, 368-375 (1983).
212. Maniscalco, W. M., Watkins, R. H., D'Angio, C. T. & Ryan, R. M. Hyperoxic injury decreases alveolar epithelial cell expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in neonatal rabbit lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **16**, 557-567 (1997).
213. Perkett, E. A. & Klekamp, J. G. Vascular endothelial growth factor expression is decreased in rat lung following exposure to 24 or 48 hours of hyperoxia: implications for endothelial cell survival. *Chest.* **114**, 52S-53S (1998).
214. D'Angio, C. T. & Maniscalco, W. M. The role of vascular growth factors in hyperoxia-induced injury to the developing lung. *Front Biosci.* **7**:d1609-23., d1609-d1623 (2002).
215. Wagenaar, G. T. *et al.* Gene expression profile and histopathology of experimental bronchopulmonary dysplasia induced by prolonged oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **36**, 782-801 (2004).
216. Klekamp, J. G., Jarzecka, K. & Perkett, E. A. Exposure to hyperoxia decreases the expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in adult rat lungs. *Am. J. Pathol.* **154**, 823-831 (1999).
217. Zimova-Herknerova, M., Myslivecek, J. & Potmesil, P. Retinoic acid attenuates the mild hyperoxic lung injury in newborn mice. *Physiol Res.* **57**, 33-40 (2008).
218. Roper, J. M. *et al.* In vivo exposure to hyperoxia induces DNA damage in a population of alveolar type II epithelial cells. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* **286**, L1045-L1054 (2004).
219. Siner, J. M. *et al.* VEGF-induced heme oxygenase-1 confers cytoprotection from lethal hyperoxia in vivo. *FASEB J.* **21**, 1422-1432 (2007).
220. Yee, M. *et al.* Type II epithelial cells are critical target for hyperoxia-mediated impairment of postnatal lung development. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* **291**, L1101-L1111 (2006).
221. Maniscalco, W. M., Watkins, R. H., Finkelstein, J. N. & Campbell, M. H. Vascular endothelial growth factor mRNA increases in alveolar epithelial cells during recovery from oxygen injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **13**, 377-386 (1995).

222. Chua, C. C., Hamdy, R. C. & Chua, B. H. Upregulation of vascular endothelial growth factor by H₂O₂ in rat heart endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* **25**, 891-897 (1998).
223. Kuroki, M. *et al.* Reactive oxygen intermediates increase vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.* **98**, 1667-1675 (1996).
224. Kosmidou, I., Xagorari, A., Roussos, C. & Papapetropoulos, A. Reactive oxygen species stimulate VEGF production from C(2)C(12) skeletal myotubes through a PI3K/Akt pathway. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* **280**, L585-L592 (2001).
225. Liggins, G. C. & Howie, R. N. A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics.* **50**, 515-525 (1972).
226. Shankaran, S., Bauer, C. R., Bain, R., Wright, L. L. & Zachary, J. Relationship between antenatal steroid administration and grades III and IV intracranial hemorrhage in low birth weight infants. The NICHD Neonatal Research Network. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **173**, 305-312 (1995).
227. Wright, L. L. *et al.* Antenatal corticosteroid administration and neonatal outcome in very low birth weight infants: the NICHD Neonatal Research Network. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **173**, 269-274 (1995).
228. Effect of corticosteroids for fetal maturation on perinatal outcomes. NIH Consensus Development Panel on the Effect of Corticosteroids for Fetal Maturation on Perinatal Outcomes. *JAMA.* **273**, 413-418 (1995).
229. Wells, L. R., Papile, L. A., Gardner, M. O., Hartenberger, C. R. & Merker, L. Impact of antenatal corticosteroid therapy in very low birth weight infants on chronic lung disease and other morbidities of prematurity. *J. Perinatol.* **19**, 578-581 (1999).
230. Crowley, P. Prophylactic corticosteroids for preterm birth. *Cochrane. Database. Syst. Rev.* CD000065 (2000).
231. Crowley, P. WITHDRAWN: Prophylactic corticosteroids for preterm birth. *Cochrane. Database. Syst. Rev.* CD000065 (2007).
232. Polk, D. H. *et al.* Preterm lung function after retreatment with antenatal betamethasone in preterm lambs. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **176**, 308-315 (1997).
233. Ikegami, M. *et al.* Repetitive prenatal glucocorticoids improve lung function and decrease growth in preterm lambs. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **156**, 178-184 (1997).
234. Karna, P., Muttineni, J., Angell, L. & Karmaus, W. Retinopathy of prematurity and risk factors: a prospective cohort study. *BMC. Pediatr.* **5**, 18 (2005).
235. Higgins, R. D., Mendelsohn, A. L., DeFeo, M. J., Ucsel, R. & Hendricks-Munoz, K. D. Antenatal dexamethasone and decreased severity of retinopathy of prematurity. *Arch. Ophthalmol.* **116**, 601-605 (1998).
236. Lee, B. H., Stoll, B. J., McDonald, S. A. & Higgins, R. D. Adverse neonatal outcomes associated with antenatal dexamethasone versus antenatal betamethasone. *Pediatrics.* **117**, 1503-1510 (2006).
237. Qublan, H. S. *et al.* The effect of antenatal corticosteroid therapy on pregnancies complicated by premature rupture of membranes. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* **28**, 183-186 (2001).

238. Roberts, D. & Dalziel, S. Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *Cochrane. Database. Syst. Rev.* **%19;3:CD004454**, CD004454 (2006).
239. Baud, O. *et al.* Antenatal glucocorticoid treatment and cystic periventricular leukomalacia in very premature infants. *N. Engl. J. Med.* **341**, 1190-1196 (1999).
240. Baud, O. & Sola, A. Corticosteroids in perinatal medicine: how to improve outcomes without affecting the developing brain? *Semin. Fetal Neonatal Med.* **12**, 273-279 (2007).
241. Wapner, R. J. *et al.* Long-term outcomes after repeat doses of antenatal corticosteroids. *N. Engl. J. Med.* **%20;357**, 1190-1198 (2007).
242. Van Marter, L. J., Pagano, M., Allred, E. N., Leviton, A. & Kuban, K. C. Rate of bronchopulmonary dysplasia as a function of neonatal intensive care practices. *J. Pediatr.* **120**, 938-946 (1992).
243. Smith, L. M., Qureshi, N. & Chao, C. R. Effects of single and multiple courses of antenatal glucocorticoids in preterm newborns less than 30 weeks' gestation. *J. Matern. Fetal Med.* **9**, 131-135 (2000).
244. Soler, A., Paramo, A. S. & Fernandez-Ruanova, B. [Prenatal corticosteroid and early surfactant therapy in infants born at < or = 30 weeks gestation]. *An. Pediatr. (Barc.)* **61**, 118-123 (2004).
245. Figueras-Aloy, J. *et al.* Antenatal glucocorticoid treatment decreases mortality and chronic lung disease in survivors among 23- to 28-week gestational age preterm infants. *Am. J. Perinatol.* **22**, 441-448 (2005).
246. Figueras-Aloy, J., Krauel, X. & Carbonell, X. Antenatal glucocorticoid treatment increases the rate of "survival without chronic lung disease" among 25- to 29-week preterm infants. *J. Pediatr.* **140**, 486-487 (2002).
247. Feldman, D. M., Carbone, J., Belden, L., Borgida, A. F. & Herson, V. Betamethasone vs dexamethasone for the prevention of morbidity in very-low-birthweight neonates. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **197**, 284 (2007).
248. *Medimecum. Guía de terapia farmacológica. Adis Internacional Ltd. España.* (2004).
249. *Guía de Prescripción Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Madrid. España.* (1998).
250. San Feliciano L. Efecto de los corticoides prenatales en la maduración y el crecimiento pulmonar durante el periodo crítico de crecimiento de ratas recién nacidas. 53. 2007.
Ref Type: Thesis/Dissertation
251. Yang, K. Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: barrier to maternal glucocorticoids. *Rev. Reprod.* **2**, 129-132 (1997).
252. Liggins, G. C. Premature delivery of foetal lambs infused with glucocorticoids. *J. Endocrinol.* **45**, 515-523 (1969).
253. OSINSKI, P. A. Steroid 11beta-ol dehydrogenase in human placenta. *Nature.* **187:777**, 777 (1960).
254. Klemcke, H. G. Placental metabolism of cortisol at mid- and late gestation in swine. *Biol. Reprod.* **53**, 1293-1301 (1995).

255. Beitins, I. Z., Bayard, F., Ances, I. G., Kowarski, A. & Migeon, C. J. The metabolic clearance rate, blood production, interconversion and transplacental passage of cortisol and cortisone in pregnancy near term. *Pediatr. Res.* **7**, 509-519 (1973).
256. Seckl, J. R. Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur. J. Endocrinol.* **151 Suppl 3:U49-62.**, U49-U62 (2004).
257. Pasqualini, J. R. Enzymes involved in the formation and transformation of steroid hormones in the fetal and placental compartments. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **97**, 401-415 (2005).
258. Hirasawa, G. *et al.* 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II and mineralocorticoid receptor in human placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 1306-1309 (2000).
259. Seckl, J. R. & Holmes, M. C. Mechanisms of disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal 'programming' of adult pathophysiology. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* **3**, 479-488 (2007).
260. Brown, R. W. *et al.* Cloning and production of antisera to human placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *Biochem. J.* **313**, 1007-1017 (1996).
261. Benediktsson, R., Calder, A. A., Edwards, C. R. & Seckl, J. R. Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: a key regulator of fetal glucocorticoid exposure. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. **46**, 161-166 (1997).
262. Hardy, D. B. & Yang, K. The expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 is induced during trophoblast differentiation: effects of hypoxia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 3696-3701 (2002).
263. Alfaidy, N., Gupta, S., DeMarco, C., Caniggia, I. & Challis, J. R. Oxygen regulation of placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2: physiological and pathological implications. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 4797-4805 (2002).
264. Haas, D. M. *et al.* Neonatal outcomes with different betamethasone dosing regimens: a comparison. *J. Reprod. Med.* **50**, 915-922 (2005).
265. Barnes, P. J. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin. Sci. (Lond)*. **94**, 557-572 (1998).
266. Bolt, R. J., van Weissenbruch, M. M., Lafeber, H. N. & Delemarre-van de Waal HA. Glucocorticoids and lung development in the fetus and preterm infant. *Pediatr. Pulmonol.* **32**, 76-91 (2001).
267. Hollenberg, S. M. *et al.* Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature*. **19-1986 Jan 1;318**, 635-641 (1985).
268. Francke, U. & Foellmer, B. E. The glucocorticoid receptor gene is in 5q31-q32 [corrected]. *Genomics*. **4**, 610-612 (1989).
269. Speirs, H. J., Seckl, J. R. & Brown, R. W. Ontogeny of glucocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type-1 gene expression identifies potential critical periods of glucocorticoid susceptibility during development. *J. Endocrinol.* **181**, 105-116 (2004).
270. Condon, J. *et al.* Expression of type 2 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and corticosteroid hormone receptors in early human fetal life. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**, 4490-4497 (1998).

271. McGowan, J. E. *et al.* Effect of dexamethasone treatment on maturational changes in the NMDA receptor in sheep brain. *J. Neurosci.* **20**, 7424-7429 (2000).
272. Helve, O. *et al.* Low expression of human epithelial sodium channel in airway epithelium of preterm infants with respiratory distress. *Pediatrics.* **113**, 1267-1272 (2004).
273. Baud, O., Laudenbach, V., Evrard, P. & Gressens, P. Neurotoxic effects of fluorinated glucocorticoid preparations on the developing mouse brain: role of preservatives. *Pediatr. Res.* **50**, 706-711 (2001).
274. Jobe, A. H. *et al.* Betamethasone for lung maturation: testing dose and formulation in fetal sheep. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **197**, 523-526 (2007).
275. Bunton, T. E. & Plopper, C. G. Triamcinolone-induced structural alterations in the development of the lung of the fetal rhesus macaque. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **148**, 203-215 (1984).
276. Massaro, D. & Massaro, G. D. Dexamethasone accelerates postnatal alveolar wall thinning and alters wall composition. *Am. J. Physiol.* **251**, R218-R224 (1986).
277. Willet, K. E. *et al.* Lung morphometry and collagen and elastin content: changes during normal development and after prenatal hormone exposure in sheep. *Pediatr. Res.* **45**, 615-625 (1999).
278. Willet, K. E., Jobe, A. H., Ikegami, M., Kovar, J. & Sly, P. D. Lung morphometry after repetitive antenatal glucocorticoid treatment in preterm sheep. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **163**, 1437-1443 (2001).
279. Pedraz C *et al.* Effect of prenatal dexamethasone on lung in neonatal rats exposed to hypoxia and recovered in oxygen or air. *Pediatr Res* 54, 582. 2003. Ref Type: Abstract
280. San Feliciano L *et al.* Prenatal glucocorticoids :effects on lung of newborn rats exposed to hypoxia and recovered in hyperoxia or air. *Pediatr Res* 58, 410. 2005. Ref Type: Abstract
281. San Feliciano L, Remesal A, Ludena MD, Hernandez MJ & C Pedraz. Prenatal glucocorticoids impair postnatal alveolization in rats. *Acta Paediatr.* 96(Suppl. 456), 96. 2007. Ref Type: Abstract
282. Oshika, E. *et al.* Glucocorticoid-induced effects on pattern formation and epithelial cell differentiation in early embryonic rat lungs. *Pediatr. Res.* **43**, 305-314 (1998).
283. Revestido R, Ludena MD, Sanchez A, Lecuona P & Bullon A Efecto de la dexametasona sobre la alveolarización pulmonar en ratas recién nacidas. Estudio morfométrico. *Revista Española de Patología* **30(1)**, 96 (1997).
284. Tschanz, S. A., Damke, B. M. & Burri, P. H. Influence of postnatally administered glucocorticoids on rat lung growth. *Biol. Neonate.* **68**, 229-245 (1995).
285. Tschanz, S. A., Makanya, A. N., Haenni, B. & Burri, P. H. Effects of neonatal high-dose short-term glucocorticoid treatment on the lung: a morphologic and morphometric study in the rat. *Pediatr. Res.* **53**, 72-80 (2003).
286. Schellenberg, J. C. & Liggins, G. C. Elastin and collagen in the fetal sheep lung. I. Ontogenesis. *Pediatr. Res.* **22**, 335-338 (1987).

287. Brenner, R. E. *et al.* Effects of dexamethasone on proliferation, chemotaxis, collagen I, and fibronectin-metabolism of human fetal lung fibroblasts. *Pediatr. Pulmonol.* **32**, 1-7 (2001).
288. Lassus, P., Heikkila, P., Andersson, L. C., von, B. K. & Andersson, S. Lower concentration of pulmonary hepatocyte growth factor is associated with more severe lung disease in preterm infants. *J. Pediatr.* **143**, 199-202 (2003).
289. Vento, G. *et al.* Glucocorticoids in preterm infants and discrepancies of vascular endothelial growth factor. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **168**, 501-502 (2003).
290. Vento, G. *et al.* Effects of early dexamethasone therapy on pulmonary fibrogenic mediators and respiratory mechanics in preterm infants. *Eur. Cytokine Netw.* **13**, 207-214 (2002).
291. Vyas, J. & Kotecha, S. Effects of antenatal and postnatal corticosteroids on the preterm lung. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed.* **77**, F147-F150 (1997).
292. Nauck, M. *et al.* Induction of vascular endothelial growth factor by platelet-activating factor and platelet-derived growth factor is downregulated by corticosteroids. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **16**, 398-406 (1997).
293. Nauck, M., Karakiulakis, G., Perruchoud, A. P., Papakonstantinou, E. & Roth, M. Corticosteroids inhibit the expression of the vascular endothelial growth factor gene in human vascular smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* **341**, 309-315 (1998).
294. Harada, S. *et al.* Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E2 and E1 in osteoblasts. *J. Clin. Invest.* **93**, 2490-2496 (1994).
295. Tanabe, K. *et al.* Modulation by the steroid/thyroid hormone superfamily of TGF-beta-stimulated VEGF release from vascular smooth muscle cells. *J. Cell Biochem.* **99**, 187-195 (2006).
296. Hewitt, D. P., Mark, P. J. & Waddell, B. J. Glucocorticoids prevent the normal increase in placental vascular endothelial growth factor expression and placental vascularity during late pregnancy in the rat. *Endocrinology.* **147**, 5568-5574 (2006).
297. Lassus, P., Nupponen, I., Kari, A., Pohjavuori, M. & Andersson, S. Early postnatal dexamethasone decreases hepatocyte growth factor in tracheal aspirate fluid from premature infants. *Pediatrics.* **110**, 768-771 (2002).
298. Suzuki, K., Hooper, S. B., Wallace, M. J., Probyn, M. E. & Harding, R. Effects of antenatal corticosteroid treatment on pulmonary ventilation and circulation in neonatal lambs with hypoplastic lungs. *Pediatr. Pulmonol.* **41**, 844-854 (2006).
299. D'Angio, C. T. *et al.* Vascular endothelial growth factor in pulmonary lavage fluid from premature infants: effects of age and postnatal dexamethasone. *Biol. Neonate.* **76**, 266-273 (1999).
300. Roubliova, X. I. *et al.* Effect of maternal administration of betamethasone on peripheral arterial development in fetal rabbit lungs. *Neonatology.* **93**, 64-72 (2008).
301. Tamura, M., Arakaki, N., Tsubouchi, H., Takada, H. & Daikuhara, Y. Enhancement of human hepatocyte growth factor production by interleukin-1 alpha and -1 beta and tumor necrosis factor-alpha by fibroblasts in culture. *J. Biol. Chem.* **268**, 8140-8145 (1993).
302. Zarnegar, R. Regulation of HGF and HGFR gene expression. *EXS.* **74:33-49.**, 33-49 (1995).

303. Liu, H. *et al.* Association of insulin-like growth factors with lung development in neonatal rats. *J. Huazhong. Univ. Sci. Technol. Med. Sci.* **24**, 162-165 (2004).
304. Jobe, A. H. Antenatal factors and the development of bronchopulmonary dysplasia. *Semin. Neonatol.* **8**, 9-17 (2003).
305. Veness-Meehan, K. A., Bottone, F. G., Jr. & Stiles, A. D. Effects of retinoic acid on airspace development and lung collagen in hyperoxia-exposed newborn rats. *Pediatr. Res.* **48**, 434-444 (2000).
306. Shenai, J. P., Mellen, B. G. & Chytil, F. Vitamin A status and postnatal dexamethasone treatment in bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics.* **106**, 547-553 (2000).
307. Gille, J., Reisinger, K., Westphal-Varghese, B. & Kaufmann, R. Decreased mRNA stability as a mechanism of glucocorticoid-mediated inhibition of vascular endothelial growth factor gene expression by cultured keratinocytes. *J. Invest Dermatol.* **117**, 1581-1587 (2001).
308. Clerch, L. B., Baras, A. S., Massaro, G. D., Hoffman, E. P. & Massaro, D. DNA microarray analysis of neonatal mouse lung connects regulation of KDR with dexamethasone-induced inhibition of alveolar formation. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* **286**, L411-L419 (2004).
309. Newnham, J. P. & Moss, T. J. Antenatal glucocorticoids and growth: single versus multiple doses in animal and human studies. *Semin. Neonatol.* **6**, 285-292 (2001).
310. Frank, L. Prenatal dexamethasone treatment improves survival of newborn rats during prolonged high O₂ exposure. *Pediatr. Res.* **32**, 215-221 (1992).
311. Okajima, S. *et al.* Antenatal dexamethasone administration impairs normal postnatal lung growth in rats. *Pediatr. Res.* **49**, 777-781 (2001).
312. Pedraz, C. & Mortola, J. P. CO₂ production, body temperature, and ventilation in hypoxic newborn cats and dogs before and after body warming. *Pediatr. Res.* **30**, 165-169 (1991).
313. Frank, L. & Groseclose, E. E. Preparation for birth into an O₂-rich environment: the antioxidant enzymes in the developing rabbit lung. *Pediatr. Res.* **18**, 240-244 (1984).
314. Frank, L. & Groseclose, E. Oxygen toxicity in newborn rats: the adverse effects of undernutrition. *J. Appl. Physiol.* **53**, 1248-1255 (1982).
315. Kononen, J. *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat. Med.* **4**, 844-847 (1998).
316. Conn, G. *et al.* Amino acid and cDNA sequences of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet-derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 2628-2632 (1990).
317. Tabor, B. L., Rider, E. D., Ikegami, M., Jobe, A. H. & Lewis, J. F. Dose effects of antenatal corticosteroids for induction of lung maturation in preterm rabbits. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **164**, 675-681 (1991).
318. Sun, B., Jobe, A., Rider, E. & Ikegami, M. Single dose versus two doses of betamethasone for lung maturation in preterm rabbits. *Pediatr. Res.* **33**, 256-260 (1993).

319. Pratt, L., Waschbusch, L., Ladd, W., Gangnon, R. & Hendricks, S. K. Multiple vs. single betamethasone therapy. Neonatal and maternal effects. *J. Reprod. Med.* **44**, 257-264 (1999).
320. Newnham, J. P. *et al.* Maternal, but not fetal, administration of corticosteroids restricts fetal growth. *J. Matern. Fetal Med.* **8**, 81-87 (1999).
321. Johnson, J. W. *et al.* Long-term effects of betamethasone on fetal development. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **141**, 1053-1064 (1981).
322. Stewart, J. D., Gonzalez, C. L., Christensen, H. D. & Rayburn, W. F. Impact of multiple antenatal doses of betamethasone on growth and development of mice offspring. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **177**, 1138-1144 (1997).
323. Bloom, S. L., Sheffield, J. S., McIntire, D. D. & Leveno, K. J. Antenatal dexamethasone and decreased birth weight. *Obstet. Gynecol.* **97**, 485-490 (2001).
324. Baisden, B., Sonne, S., Joshi, R. M., Ganapathy, V. & Shekhawat, P. S. Antenatal dexamethasone treatment leads to changes in gene expression in a murine late placenta. *Placenta.* **28**, 1082-1090 (2007).
325. Collaborative Group on Prenatal Steroid Therapy. Effects of prenatal administration in the infant: Long-term follow-up. *J. Pediatr* **104**, 259-267 (1984).
326. Banks, B. A. *et al.* Multiple courses of antenatal corticosteroids and outcome of premature neonates. North American Thyrotropin-Releasing Hormone Study Group. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **181**, 709-717 (1999).
327. French, N. P., Hagan, R., Evans, S. F., Godfrey, M. & Newnham, J. P. Repeated antenatal corticosteroids: size at birth and subsequent development. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **180**, 114-121 (1999).
328. Schellenberg, J. C., Liggins, G. C. & Stewart, A. W. Growth, elastin concentration, and collagen concentration of perinatal rat lung: effects of dexamethasone. *Pediatr. Res.* **21**, 603-607 (1987).
329. Moss, T. J. *et al.* Effects into adulthood of single or repeated antenatal corticosteroids in sheep. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **192**, 146-152 (2005).
330. Kumar, P. & Seshadri, R. Neonatal morbidity and growth in very low birth-weight infants after multiple courses of antenatal steroids. *J. Perinatol.* **25**, 698-702 (2005).
331. Verhaeghe, J., Vanstapel, F., Van, B. R., Van, H. E. & Coopmans, W. Transient catabolic state with reduced IGF-I after antenatal glucocorticoids. *Pediatr. Res.* **62**, 295-300 (2007).
332. HEMINGWAY, A. & BIRZIS, L. Effect of hypoxia on shivering. *J. Appl. Physiol.* **8**, 577-579 (1956).
333. Singer, D. & Muhlfield, C. Perinatal adaptation in mammals: the impact of metabolic rate. *Comp Biochem. Physiol A Mol. Integr. Physiol.* **148**, 780-784 (2007).
334. Gautier, H. Interactions among metabolic rate, hypoxia, and control of breathing. *J. Appl. Physiol.* **81**, 521-527 (1996).
335. Frappell, P., Lanthier, C., Baudinette, R. V. & Mortola, J. P. Metabolism and ventilation in acute hypoxia: a comparative analysis in small mammalian species. *Am. J. Physiol.* **262**, R1040-R1046 (1992).

336. Mortola, J. P. Hypoxia and circadian patterns. *Respir. Physiol Neurobiol.* **158**, 274-279 (2007).
337. Mortola, J. P. Correlations between the circadian patterns of body temperature, metabolism and breathing in rats. *Respir. Physiol Neurobiol.* **155**, 137-146 (2007).
338. Clarke, I., Heasman, L. & Symonds, M. E. Influence of maternal dexamethasone administration on thermoregulation in lambs delivered by caesarean section. *J. Endocrinol.* **156**, 307-314 (1998).
339. Mortola, J. P., Matsuoka, T., Saiki, C. & Naso, L. Metabolism and ventilation in hypoxic rats: effect of body mass. *Respir. Physiol.* **97**, 225-234 (1994).
340. Mortola, J. P. Hamsters versus rats: ventilatory responses in adults and newborns. *Respir. Physiol.* **85**, 305-317 (1991).
341. Mortola, J. P. & Rezzonico, R. Metabolic and ventilatory rates in newborn kittens during acute hypoxia. *Respir. Physiol.* **73**, 55-67 (1988).
342. Sant'Anna, G. M. & Mortola, J. P. Thermal and respiratory control in young rats exposed to cold during postnatal development. *Comp Biochem. Physiol A Mol. Integr. Physiol.* **134**, 449-459 (2003).
343. Matsuoka, T. & Mortola, J. P. Effects of hypoxia and hypercapnia on the Hering-Breuer reflex of the conscious newborn rat. *J Appl. Physiol.* **78**, 5-11 (1995).
344. Cameron, Y. L., Merazzi, D. & Mortola, J. P. Variability of the breathing pattern in newborn rats: effects of ambient temperature in normoxia or hypoxia. *Pediatr. Res.* **47**, 813-818 (2000).
345. Mortola, J. P. *et al.* Ventilatory and metabolic responses to acute hyperoxia in newborns. *Am. Rev. Respir. Dis.* **146**, 11-15 (1992).
346. Johnston, C. J., Wright, T. W., Reed, C. K. & Finkelstein, J. N. Comparison of adult and newborn pulmonary cytokine mRNA expression after hyperoxia. *Exp. Lung Res.* **23**, 537-552 (1997).
347. Ervin, M. G. *et al.* Antenatal glucocorticoids alter premature newborn lamb neuroendocrine and endocrine responses to hypoxia. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol.* **279**, R830-R838 (2000).
348. Abraham, D. *et al.* VEGF-A and -C but not -B mediate increased vascular permeability in preserved lung grafts. *Transplantation.* **73**, 1703-1706 (2002).
349. Meyer, K. C., Cardoni, A. & Xiang, Z. Z. Vascular endothelial growth factor in bronchoalveolar lavage from normal subjects and patients with diffuse parenchymal lung disease. *J. Lab Clin. Med.* **135**, 332-338 (2000).
350. Santos, S. *et al.* Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in pulmonary arteries of smokers and patients with moderate chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **167**, 1250-1256 (2003).
351. Oltmanns, K. M. *et al.* Acute hypoxia decreases plasma VEGF concentration in healthy humans. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab.* **290**, E434-E439 (2006).
352. Klekamp, J. G. *et al.* Vascular endothelial growth factor is expressed in ovine pulmonary vascular smooth muscle cells in vitro and regulated by hypoxia and dexamethasone. *Pediatr. Res.* **42**, 744-749 (1997).

353. Tischer, E. *et al.* The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J. Biol. Chem.* **266**, 11947-11954 (1991).
354. Fischer, S., Renz, D., Schaper, W. & Karliczek, G. F. In vitro effects of dexamethasone on hypoxia-induced hyperpermeability and expression of vascular endothelial growth factor. *Eur. J. Pharmacol.* **411**, 231-243 (2001).
355. Leonard, M. O., Godson, C., Brady, H. R. & Taylor, C. T. Potentiation of glucocorticoid activity in hypoxia through induction of the glucocorticoid receptor. *J. Immunol.* **174**, 2250-2257 (2005).
356. Ekekezie, I. I. *et al.* Endostatin and vascular endothelial cell growth factor (VEGF) in piglet lungs: effect of inhaled nitric oxide and hyperoxia. *Pediatr. Res.* **53**, 440-446 (2003).
357. Bucher, J. R. & Roberts, R. J. The development of the newborn rat lung in hyperoxia: a dose-response study of lung growth, maturation, and changes in antioxidant enzyme activities. *Pediatr. Res.* **15**, 999-1008 (1981).
358. Schreiber, M. D. *et al.* Inhaled nitric oxide in premature infants with the respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.* **349**, 2099-2107 (2003).
359. Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D. & Keshet, E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* **359**, 843-845 (1992).
360. Hjalmarson, O. & Sandberg, K. Abnormal lung function in healthy preterm infants. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **165**, 83-87 (2002).
361. Margraf, L. R., Tomashefski, J. F., Jr., Bruce, M. C. & Dahms, B. B. Morphometric analysis of the lung in bronchopulmonary dysplasia. *Am. Rev. Respir. Dis.* **143**, 391-400 (1991).
362. Sobonya, R. E., Logvinoff, M. M., Taussig, L. M. & Theriault, A. Morphometric analysis of the lung in prolonged bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr. Res.* **16**, 969-972 (1982).
363. Ozaki, N. *et al.* Differential regulation of prostacyclin and thromboxane by dexamethasone and celecoxib during oxidative stress in newborn rabbits. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **70**, 61-78 (2002).
364. Pogach, M. S., Cao, Y., Millien, G., Ramirez, M. I. & Williams, M. C. Key developmental regulators change during hyperoxia-induced injury and recovery in adult mouse lung. *J. Cell Biochem.* **100**, 1415-1429 (2007).
365. Edelman, J. L., Castro, M. R. & Wen, Y. Correlation of VEGF expression by leukocytes with the growth and regression of blood vessels in the rat cornea. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**, 1112-1123 (1999).
366. Wellmann, S. *et al.* Specific reverse transcription-PCR quantification of vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants by LightCycler technology. *Clin. Chem.* **47**, 654-660 (2001).
367. Krussel, J. S. *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA splice variants are differentially expressed in human blastocysts. *Mol. Hum. Reprod.* **7**, 57-63 (2001).
368. Burchardt, T. *et al.* Expression of VEGF splice variants 144/145 and 205/206 in adult male tissues. *IUBMB. Life.* **48**, 405-408 (1999).

369. Chandrasekar, I., Eis, A. & Konduri, G. G. Betamethasone attenuates oxidant stress in endothelial cells from fetal lambs with persistent pulmonary hypertension. *Pediatr. Res.* **63**, 67-72 (2008).
370. Finkenzeller, G., Technau, A. & Marme, D. Hypoxia-induced transcription of the vascular endothelial growth factor gene is independent of functional AP-1 transcription factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208**, 432-439 (1995).
371. Li, Y. H., Brauner, A., Jensen, J. S. & Tullus, K. Induction of human macrophage vascular endothelial growth factor and intercellular adhesion molecule-1 by *Ureaplasma urealyticum* and downregulation by steroids. *Biol. Neonate.* **82**, 22-28 (2002).
372. Webb, N. J., Myers, C. R., Watson, C. J., Bottomley, M. J. & Brenchley, P. E. Activated human neutrophils express vascular endothelial growth factor (VEGF). *Cytokine.* **10**, 254-257 (1998).
373. Kovar, J., Sly, P. D. & Willet, K. E. Postnatal alveolar development of the rabbit. *J. Appl. Physiol.* **93**, 629-635 (2002).
374. Aida, K. *et al.* The effects of betamethasone (BM) on endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in adult baboon femoral arterial endothelial cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **91**, 219-224 (2004).
375. Whitelaw, A. & Thoresen, M. Antenatal steroids and the developing brain. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed.* **83**, F154-F157 (2000).
376. Rayburn, W. F., Christensen, H. D. & Gonzalez, C. L. A placebo-controlled comparison between betamethasone and dexamethasone for fetal maturation: differences in neurobehavioral development of mice offspring. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **176**, 842-850 (1997).
377. Buttgereit, F., Brand, M. D. & Burmester, G. R. Equivalent doses and relative drug potencies for non-genomic glucocorticoid effects: a novel glucocorticoid hierarchy. *Biochem. Pharmacol.* **58**, 363-368 (1999).
378. Buttgereit, F. [Corticoid research: in non-genomic effects there are still some questions]. *MMW. Fortschr. Med.* **141**, 81 (1999).
379. Setiawan, E., Jackson, M. F., MacDonald, J. F. & Matthews, S. G. Effects of repeated prenatal glucocorticoid exposure on long-term potentiation in the juvenile guinea-pig hippocampus. *J. Physiol.* **581**, 1033-1042 (2007).

8.ABREVIATURAS

11 β -HSD : siglas en inglés de 11 β hidroxido esteroide deshidrogenasa
ACTH: siglas en inglés de hormona adrenocorticotropa
ADN: Acido desoxiribinucleico
ARN: Acido ribonucleico
ARNm: Acido ribonucleico mensajero
BMP – 4: siglas en inglés de factor morfogénico óseo 4
EGF: siglas en inglés de factor de crecimiento epidérmico
EMAP II: siglas en inglés de polipéptido II activador de monocitos endoteliales
ERK: siglas en inglés de molécula estimuladora y reguladora de la vía tirosin quinasa
FGF: factor de crecimiento de fibroblastos
Flk: siglas en inglés de fetal liver quinasa
GR: siglas en inglés de receptor glucocorticoide
HGF : siglas en inglés de factor de crecimiento del hepatocito
HIF : siglas en inglés de factor inducido por la hipoxia
IGF: siglas en inglés de factor de crecimiento similar a la insulina
KDR: siglas en inglés de receptor de dominio quinasa
NO: siglas en inglés de óxido nítrico
NOS: siglas en inglés de óxido nítrico sintetasa
PDGF: siglas en inglés de factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PECAM: siglas en inglés de molécula de adhesión plaquetaria
PGI₂: prostaciclina I₂
PIGF: siglas en inglés de factor de crecimiento de la placenta
Shh: siglas en inglés de Sonic Hedgehog
TF: siglas en inglés de factor tisular
TGF- β : siglas en inglés de factor de crecimiento de transformación β
TIE-2: siglas en inglés de receptor tirosina quinasa
TNF α : siglas en inglés de factor de necrosis tumoral α
TSH: siglas en inglés de hormona estimulante del tiroides
VEGF: siglas en inglés de Factor de crecimiento vascular endotelial
VEGFR: receptor del VEGF