



Universidad de Valencia
Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología
Programa de Doctorado 3139 Medicina
Línea de Investigación: Pediatría

**Efecto de la hipoxia moderada en la adaptación
pulmonar, estado oxidativo y respuesta
inflamatoria en ratones nacidos en hipoxia con
transición a aire ambiente y/o sometidos a 100%
de oxígeno extra-útero**

TESIS DOCTORAL
presentada por:
Elena Cubells García

Dirigida por:
Dr. Máximo Vento Torres
Dra. Isabel Torres Cuevas

Tutora:
Dra. Pilar Codoñer Franch

VALENCIA, NOVIEMBRE 2022

INFORME DIRECTORES/AS Y TUTOR/A PARA DEPÓSITO DE TESIS

Director (es) / Codirector (es):

1.- Apellidos y nombre: Vento Torres, Máximo; N.I.F. 19818218S,

Departamento/Instituto: Instituto de Investigación Sanitaria La Fe Centro:

2.- Apellidos y nombre: Torres Cuevas, María Isabel; N.I.F. 48590580K,

Departamento/Instituto: Departamento de Fisiología Centro: Universidad de Valencia

Tutor o tutora (si procede)

Apellidos y nombre: Codoñer Franch, Pilar; N.I.F. 19871311R,

Departamento/Instituto: Pediatría, Obstetricia y Ginecología Centro: Universidad de Valencia

Directores/as y tutor/a, respectivamente, de la tesis doctoral: **"Efecto de la hipoxia moderada en la adaptación pulmonar, estado oxidativo y respuesta inflamatoria en ratones nacidos en hipoxia con transición a aire ambiente y/o sometidos a 100% de oxígeno extraútero"**

de D/Dña. Elena Cubells García,

estudiante del Programa de Doctorado 3139 **MEDICINA** de la Universitat de València, emiten informe **Favorable** para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

Fecha: 02/11/2022

Fdo.: **Máximo Vento**

MAXIMO
|VENTO|
TORRES

Firmado digitalmente por
MAXIMO|VENTO|
TORRES
Fecha: 2022.11.02
14:25:52 +01'00'

Director/a

Fdo.: **Isabel Torres**

MARIA
ISABEL|
TORRES|
CUEVAS

Firmado digitalmente por
MARIA ISABEL|
TORRES|CUEVAS
Fecha: 2022.11.02
16:14:21 +01'00'

Director/a

Fdo.: **Pilar Codoñer**

MARIA PILAR
CODOÑER FRANCH
- NIF:19871311R

Firmado digitalmente por
MARIA PILAR CODOÑER
FRANCH - NIF:19871311R
Fecha: 2022.11.03
15:31:31 +01'00'

Tutor/a

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por haber dado prioridad siempre a mi formación y haber celebrado y disfrutado cada pequeño logro. A mi madre por todos esos ratos de dedicación y apoyo, por toda la ayuda logística y emocional a lo largo de todo el proceso de mi formación. Y en especial a mi padre porque sé que estaría muy orgulloso de mí por haber conseguido este nuevo paso. Gracias por, como siempre me han dicho, dejarme la mejor herencia que se puede dejar que es la educación. A mi hermana por estar ahí siempre que la he necesitado, animando, alegrando, con sus pequeños grandes gestos.

A Jesús por darme siempre su apoyo a todos los niveles, logístico, informático, emocional y saber animarme sea cual sea el problema, y por compartir conmigo a las dos personas más importantes de mi vida. A mis hijos Bruno y Bastian, por ser el motivo de todo mi trabajo y de cada paso que doy, gracias por ceder vuestro tiempo para que haya sido posible esta tesis.

Agradecer a los directores de la presente tesis su apoyo, dedicación y esfuerzo. A Max Vento por cogerme de la mano desde que empecé mi formación como pediatra y llevarme hacia el mundo de la investigación y por contagiarme su entusiasmo por el descubrimiento. A Isabel porque sin ella no hubiese sido posible este trabajo, por las horas compartidas y dedicadas a él, ratos en el animalario, laboratorio y despacho, por estar siempre disponible y ofrecer su ayuda para todo lo que he necesitado.

Al Instituto de Investigación Sanitaria La Fe y el Instituto de Salud Carlos III por permitir que pudiera dedicar varios años a investigar. A mis compañeros de despacho de becarios del H.U.y P. La Fe, gracias por compartir esos años de trabajo y risas conmigo. Al Dr. Jaques Belik y a Javier Escobar por lo que me enseñaron y por ayudarme a iniciar este trabajo hace ya unos años.

A papá

INDICE

1 RESUMEN	3
1.1 ABSTRACT	7
1.2 RESUM	10
2 INTRODUCCIÓN	14
2.1 OXÍGENO Y ESTRÉS OXIDATIVO	14
2.1.1 METABOLISMO AERÓBICO Y FISIOLÓGÍA DEL OXÍGENO	14
2.1.2 RADICALES LIBRES.....	17
2.1.3 DEFENSA ANTIOXIDANTE	19
2.1.4 ESTRÉS OXIDATIVO.....	25
2.1.5 BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	26
2.2 EL OXIGENO EN LA VIDA FETAL	29
2.2.1 LA MADURACIÓN DEL SISTEMA ANTIOXIDANTE	32
2.2.2 FASES DESARROLLO PULMONAR.....	34
2.3 LA TRANSICIÓN FETAL NEONATAL	36
2.3.1 REANIMACIÓN CON OXÍGENO EN SALA DE PARTOS.....	38
2.3.2 HIPOXIA PRECONDICIONANTE.....	41
2.4 ESTRÉS OXIDATIVO Y ENFERMEDAD EN EL PERIODO PERINATAL	44
2.4.1 ESTRÉS OXIDATIVO A NIVEL DE LA PLACENTA.....	44
2.4.2 ESTRÉS OXIDATIVO ASOCIADO A HIPOXIA FETAL CRÓNICA.....	44
2.4.3 ESTRÉS OXIDATIVO EN EL RECIÉN NACIDO.....	47
2.4.4 ESTRÉS OXIDATIVO Y DAÑO PULMONAR.....	49
2.4.5 ESTRÉS OXIDATIVO Y SÍNDROME DE DISTRÉS RESPIRATORIO NEONATAL (SDR)	50
2.4.6 ESTRÉS OXIDATIVO Y DISPLASIA BRONCOPULMONAR.....	52
3 OBJETIVOS	57
4 METODOLOGÍA	58
4.1 Animales de experimentación	58
4.2 Modelo experimental	59
4.3 Determinaciones Experimentales	62
4.3.1 Determinación de biomarcadores por UPLC-MS/MS	62
4.3.2 Análisis de la expresión de ARNm de genes involucrados en la respuesta antioxidante e inflamación	66
4.3.3 Estudio histológico en secciones de tejido pulmonar	68
4.3.4 Determinación de niveles proteicos por Western blot	70
4.3.5 Determinación de los peróxidos	74
4.4 Análisis estadístico	75

5	RESULTADOS	76
5.1	Estudio del estrés oxidativo en pulmón de crías de ratón a P1 durante la transición fetal neonatal bajo diferentes FiO₂ y posterior insulto hiperóxico.	76
5.1.1	Determinación de aminotioles (vía de la transulfuración).....	76
5.1.2	Niveles de expresión génica y proteica de la enzima cistationina β-sintasa (Cbs) perteneciente a la vía de la transulfuración	78
5.2	Determinación de biomarcadores de daño proteico por estrés oxidativo en pulmón de crías de ratón a P1 durante la transición fetal neonatal bajo diferentes FiO₂ y posterior insulto hiperóxico: oxidación, nitración y cloración proteica	79
5.3	Determinación de biomarcadores de daño a lípidos por estrés oxidativo en pulmón de crías de ratón a P1 durante la transición fetal neonatal bajo diferentes FiO₂ y posterior insulto hiperóxico.	81
5.4	Análisis de la expresión de genes implicados en la defensa antioxidante y niveles de peróxidos en pulmón de crías de ratón a P1 durante la transición fetal neonatal bajo diferentes FiO₂ y posterior insulto hiperóxico.	84
5.5	Análisis de genes relacionados con la inflamación en tejido pulmonar de crías de ratón a P1 durante la transición fetal neonatal bajo diferentes FiO₂ y posterior insulto hiperóxico.	86
5.6	Análisis histológico e inmuno-histoquímico de tejido pulmonar de crías de ratón a P1 durante la transición fetal neonatal bajo diferentes FiO₂ y posterior insulto hiperóxico.	88
5.7	Determinación de biomarcadores de daño a lípidos por estrés oxidativo en tejido pulmonar de crías de ratón a P7 durante la transición fetal neonatal bajo diferentes FiO₂ y posterior insulto hiperóxico.	91
5.8	Análisis histológico e inmuno-histoquímico de tejido pulmonar de crías de ratón a P7 durante la transición fetal neonatal bajo diferentes FiO₂ y posterior insulto hiperóxico.	94
6	DISCUSIÓN	97
7	CONCLUSIONES	111
8	BIBLIOGRAFÍA	112
9	ANEXOS	130
9.1	AUTORIZACIÓN PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	130

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Esquema de la combustión de los nutrientes para la obtención de energía.</i>	16
<i>Figura 2. Esquema de formación de los EROs a partir del oxígeno y enzimas que participan en su detoxificación.</i>	20
<i>Figura 3. A. Ciclo del gamma-glutamilo de formación del glutatión y B. Ciclo de oxido-reducción del GSH a GSSG por el que se neutralizan los radicales libres.</i>	21
<i>Figura 4. Vía de la transulfuración de síntesis de GSH</i>	23
<i>Figura 5. Daño a proteínas por estrés oxidativo. Derivados del daño a la fenilalanina.</i>	27
<i>Figura 6. Cronología de las cinco fases del desarrollo pulmonar en ratones y humanos.</i>	35
<i>Figura 7. Tabla resumen de los estudios realizados con la administración de antioxidantes en la prevención de patologías en la época neonatal.</i>	48
<i>Figura 8. Esquema del modelo experimental.</i>	60
<i>Figura 9. Esquema del funcionamiento de la espectrometría de masas triple cuadrupolo.</i>	63
<i>Figura 10. Determinación de los niveles de metabolitos de la vía de la transulfuración en pulmones de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO_2</i>	77
<i>Figura 11. Determinación de los niveles de expresión génica y proteicos de CBS en pulmón de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO_2</i>	78
<i>Figura 12. Determinación de daño proteico mediante los niveles de m-tyr/Phe, o-Tyr/Phe, 3NO₂-Tyr/p-Tyr y 3Cl-tyr/p-tyr en pulmón de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO_2</i>	80
<i>Figura 13. Determinación de daño oxidativo a lípidos en pulmón de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO_2</i>	83
<i>Figura 14. Expresión de ARNm de Sod1 y Cat y niveles de peróxidos en pulmón de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO_2</i>	85
<i>Figura 15. Expresión de ARNm de IL-1b, TNF-a e IL-6 en pulmón de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO_2</i>	87
<i>Figura 16. Histología cortes pulmón a día P1. Imágenes representativas del parénquima pulmonar y muerte celular en ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO_2</i>	89
<i>Figura 17. Representación gráfica del estudio morfométrico y el contaje de muerte celular en pulmón de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO_2</i>	90
<i>Figura 18. Determinación de daño oxidativo a lípidos en pulmón de ratones P7 nacidos bajo diferentes FiO_2</i>	93
<i>Figura 19. Imágenes histología cortes pulmón a P7. Imágenes representativas del parénquima pulmonar y muerte celular en ratones P7 nacidos bajo diferentes FiO_2</i>	95

Figura 20. Representación gráfica del estudio morfométrico y el conteo de muerte celular en pulmones de ratones P7 nacidos bajo diferentes FiO_2 _____ 96

Figura 21. Línea de tiempo de las variables que modulan el desarrollo pulmonar desde la preconcepción hasta después de que se produce el parto prematuro. _____ 97

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sondas Taqman para la cuantificación de ARNm por RT-PCR _____ 67

Tabla 2. Anticuerpos primarios _____ 72

Tabla 3. Anticuerpos secundarios _____ 72

ABREVIATURAS

3Cl-Tyr	3-clorotirosina
3NO₂-Tyr	3-nitrotirosina
8-OHdG	8-hidroxi-2-desoxiguanosina
Acetil-CoA	Acetil-coenzima A
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADP	Adenosina 5'-difosfato
AMP	Adenosina 5'-monofosfato
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido desoxirribonucleico mensajero
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico
CAT	Catalasa
Cbs	Cistationina beta sintasa
COX	Ciclo-oxigenasa
DBP	Displasia broncopulmonar
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
EPO	Eritropoyetina
ERN	Especies reactivas del nitrógeno
ERO	Especies reactivas del oxígeno
ESI	Ionización por electro-spray
FAD	Flavin-adenin-dinucleótido
FiO₂	Fracción inspiratoria de oxígeno
G19	19º día de gestación
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
GCL	Glutamil cisteína ligasa
GPX	Glutación peroxidasa
GS	Suero de cabra
GSH	Glutación reducido
GSR	Glutación reductasa
GSSG	Glutación oxidado
H⁺	Protón
H₂O	Agua
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
H₂S	Sulfuro de hidrógeno
HIF-1α	Factor inducible por Hipoxia
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IL-1β	Interleuquina 1 β
IL-6	Interleuquina 6

LC-MS/MS	Cromatografía líquida tandem espectrometría de Masas
LPO	Peroxidación lipídica
m-Tyr	meta-tirosina
MLI	Mean Linear Intercept
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NEM	N-etilmaleimida
NFκB	Factor nuclear kappa B
nNOS	Óxido nítrico sintasa
NO·	Óxido nítrico
O₂	Oxígeno molecular
O₂^{·-}	Anión superóxido
OH·	Radical hidroxilo
ONOO·	peroxinitrito
o-Tyr	orto-tirosina
P0	recién nacidos
P1	24 horas después de nacer
P7	7 días después de nacer
P_aO₂	Presión parcial de oxígeno
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimersa
PFA	Paraformaldehído
PGF	Factor de crecimiento placentario
Phe	Fenilalanina
PI	Patrón interno
prxs	Peroxirredoxinas
p-Tyr	para-tirosina
SDR	Síndrome distrés respiratorio
SOD	Superóxido dismutasa
SpO₂	Saturación de oxígeno
TGF-α	Factor de crecimiento transformante alfa
TFN	Transición fetal neonatal
TNF-α	Factor necrosis tumoral α
trx	Tiorredoxina
Tyr	Tirosina
UPLC	Cromatografía líquida de ultra rendimiento
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
g-GC	Gamma-glutamil cisteína

1 RESUMEN

El oxígeno, necesario para la vida y los procesos metabólicos del organismo, puede causar daño celular y tisular por el incremento de especies reactivas del oxígeno, llegando a producir un estrés oxidativo. De hecho, la propia transición fetal neonatal (TFN) supone un estrés oxidativo fisiológico para el feto que pasa de un ambiente de relativa hipoxemia, de 3,5-4,4 kPa, a 10.5 kPa en el momento del nacimiento, en pocos minutos. Pero este estrés oxidativo, en condiciones normales, es necesario para el desarrollo y funcionamiento del organismo. Es en otras situaciones como el nacimiento prematuro, en el que el sistema antioxidante no está completamente maduro, cuando se produce un desequilibrio y puede tener un efecto perjudicial. Además, en estos casos, es más probable que el recién nacido necesite un aporte suplementario de oxígeno para alcanzar la adaptación postnatal.

Sabemos que la suplementación con altas concentraciones de oxígeno provoca un estrés oxidativo que puede dar lugar posteriormente a patologías que son muy frecuentes en el prematuro, habiéndose acuñado el término de “Enfermedad por radicales de oxígeno en el recién nacido”, que incluye entre otras el síndrome de distrés respiratorio y la displasia broncopulmonar, la cual sigue siendo la morbilidad más frecuente en el prematuro que sobrevive.

Existen estudios en los cuales el uso de una hipoxia preconditionante minimiza el daño posterior producido por estrés oxidativo, favoreciendo un estado celular más reductor y por tanto más preparado para afrontar un desequilibrio posterior. Se ha visto que protege, por ejemplo, frente a una hipoxia aguda mejorando la función pulmonar en ratones, atenúa el daño pulmonar secundario a intervenciones quirúrgicas o mejora la capacidad de reparación de las células del estroma mesenquimal del pulmón.

El objetivo principal de este trabajo es evaluar el efecto protector a nivel pulmonar de un nacimiento en condiciones de hipoxia preconditionante frente a un insulto hiperóxico posterior con 100% de oxígeno utilizando crías de ratón

recién nacidas. Para ello se utilizó un modelo experimental de TFN con ratones gestantes en una cámara de oxigenación controlada y se dividieron en 3 grupos de estudio: el grupo control, Nx21/21, en el cual se produjo el nacimiento en aire ambiente ($FiO_2=0.21$) y las crías se dejaron en esa concentración de oxígeno hasta su sacrificio a día 1 (P1) y 7 (P7); el grupo experimental Nx21/100, en el cual el nacimiento se produce en aire ambiente y a las 8 horas del nacimiento las crías fueron sometidas a un insulto hiperóxico ($FiO_2=1.0$) durante 1 hora y fueron sacrificadas a día P1 y P7; y por último el grupo experimental Hx14/100, en el que el nacimiento se produce bajo condiciones hipóxicas ($FiO_2=0.14$) y posteriormente se someten las crías a un insulto hiperóxico (1 hora, $FiO_2=1,0$) para su posterior sacrificio a día P1 y P7.

En el pulmón se evaluó el estrés oxidativo a través de la vía de la transulfuración y de los biomarcadores de daño a proteínas y lípidos en tejido pulmonar, así como el estado de la defensa antioxidante, inflamación y por último histología y niveles de apoptosis en pulmones de crías de ratón.

Los resultados mostraron un aumento de la síntesis de GSH a través de la activación de la vía de la transulfuración por el aumento de la Cbs en el grupo nacido bajo condiciones hipóxicas. Además este mismo grupo mostró una disminución de biomarcadores de daño proteico (m-Tyr/Phe, 3Cl-Tyr/p-Tyr y 3-Tyr/p-Tyr) y de biomarcadores de daño a lípidos (PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, 8-iso- PGE_2 , 8-iso- PGF_2 , 8-iso-15-Keto PGE_2 , 8-iso-15-Keto PGF_2 , isoprostanos totales e isofuranos totales). Respecto a la defensa antioxidante, la hipoxia preconditionante aumenta la expresión génica de la catalasa y se obtienen niveles bajos de peróxidos. En el grupo nacido en condiciones de hipoxia preconditionante no sólo observamos una mejora a nivel de estrés oxidativo, sino también a nivel inflamatorio ya que se obtiene la disminución de la expresión génica de TNF- α e interleucina 1- β (IL-1 β) y un aumento de la expresión génica de la citoquina antiinflamatoria IL-6.

Por último se analizó la histología de cortes de pulmón mediante parámetros morfométricos como el grosor de los septos alveolares y el MLI, y el estudio de muerte celular a través del análisis de la caspasa-3 observando en general

que el nacimiento en condiciones de hipoxia preconditionante conservaba la estructura de los alveolos y producía una menor muerte celular frente el nacimiento en aire ambiente con posterior hiperoxia.

Por tanto, podemos concluir que el nacimiento en condiciones de hipoxia preconditionante, podría proteger frente a un insulto hiperóxico posterior, causando un menor estrés oxidativo, menor inflamación y un menor daño tisular pulmonar. Estos resultados podrían abrir la puerta a nuevos estudios sobre la hipoxia preconditionante y su aplicación a nivel clínico, dada la importancia de mejorar la morbilidad respiratoria de los recién nacidos prematuros.

1.1 ABSTRACT

Oxygen, necessary for life and the metabolic processes, may produce cellular and tissue injury due to the increase of reactive oxygen species, leading to oxidative stress. Indeed, the fetal to neonatal transition itself involves physiological oxidative stress for the fetus, which goes from an environment of relative hypoxemia of 3.5-4.4 kPa to 10.5 kPa at birth in a few minutes. However oxidative stress, under normal conditions, is necessary for the development and functioning of the organism. It is in other situations such as premature birth, where the antioxidant system is not fully mature, that an imbalance occurs and can have a detrimental effect. Moreover, in these cases, the newborn is more likely to need supplemental oxygen to achieve postnatal adaptation.

We know that supplementation with high concentrations of oxygen causes oxidative stress that can subsequently lead to pathologies that are very frequent in the premature infant, the term "Oxygen radical disease in the newborn" having been coined, which includes among others, respiratory distress syndrome of the newborn and bronchopulmonary dysplasia, which remains the most frequent morbidity in the surviving premature infant.

Studies have shown that the use of preconditioning hypoxia minimizes the subsequent damage produced by oxidative stress, favoring a more reductive cellular state and therefore more prepared to face a subsequent imbalance. It has been shown, for example, to protect against acute hypoxia by improving lung function in mice, attenuate lung injury secondary to surgical interventions or improve the repair capacity of lung mesenchymal stromal cells.

The main objective of this work is to evaluate the protective effect at the lungs of a birth under preconditioning hypoxia conditions versus a subsequent hyperoxic insult with 100% oxygen using newborn mouse pups. For this purpose, an experimental model of fetal to neonatal transition was used with pregnant mice in a controlled oxygenation chamber and divided into 3 study

groups: the control group, Nx21/21, in which birth occurred in room air ($FiO_2=0.21$) and the pups were left in that oxygen concentration until sacrifice at day 1 (P1) and 7 (P7); the experimental group Nx21/100, in which birth occurred in room air and 8 hours after birth the pups were subjected to a hyperoxic insult ($FiO_2=1.0$) for 1 hour and were sacrificed at day P1 and P7; and finally the experimental group Hx14/100, in which birth occurred under hypoxic conditions ($FiO_2=0.14$) and the pups were subsequently subjected to a hyperoxic insult (1 hour, $FiO_2=1.0$) for subsequent sacrifice at day P1 and P7.

In the lung, oxidative stress was evaluated through the trans-sulfuration pathway and biomarkers of protein and lipid damage in lung tissue, as well as the status of antioxidant defense, inflammation and finally histology and apoptosis levels in mouse pup lungs.

The results showed an increase in GSH synthesis through activation of the trans-sulfuration pathway by increasing Cbs in the group born under hypoxic conditions. In addition this same group showed a decrease of protein damage biomarkers (m-Tyr/Phe, 3Cl-Tyr/p-Tyr and 3-Tyr/p-Tyr) and lipid damage biomarkers (PGE_2 , $PGF_2\alpha$, 8-iso- PGE_2 , 8-iso- PGF_2 , 8-iso-15-Keto PGE_2 , 8-iso-15-Keto PGF_2 , total isoprostanes and total isofurans). Regarding antioxidant defense, preconditioning hypoxia increases catalase gene expression and low levels of peroxides are obtained. In the hypoxia-born group we not only observed an improvement at the oxidative stress level, but also at the inflammatory level since we obtained a decrease in the gene expression of TNF- α and interleukin 1- β (IL-1 β) and an increase in the gene expression of the anti-inflammatory cytokine IL-6.

Finally, the histology of lung sections was analyzed using morphometric parameters such as the thickness of alveolar septa and MLI, and the study of cell death through caspase-3 analysis observing in general that birth under preconditioning hypoxia conditions preserved the structure of the alveoli and produced less cell death compared to birth in room air with subsequent hyperoxia.

Therefore, we can conclude that birth under preconditioning hypoxia conditions could protect against a subsequent hyperoxic insult, causing less oxidative stress, less inflammation and less lung tissue injury. These results could open up doors to new studies on preconditioning hypoxia and its application at the clinical level, given the importance of improving respiratory morbidity in preterm infants.

1.2 RESUM

L'oxigen, necessari per a la vida i els processos metabòlics de l'organisme, pot causar lesió cel·lular i tissular per l'increment d'espècies reactives de l'oxigen, arribant a produir un estrés oxidatiu. De fet, la pròpia transició fetal neonatal (TFN) suposa un estrés oxidatiu fisiològic per al fetus que passa d'un ambient de relativa hipoxèmia, de 3,5-4,4 kPa, a 10.5 kPa en el moment del naixement, en pocs minuts. Però aquest estrés oxidatiu, en condicions normals, és necessari per al desenvolupament i funcionament de l'organisme. És en altres situacions com el naixement prematur, en el qual el sistema antioxidant no està completament madur, quan es produeix un desequilibri i pot tindre un efecte perjudicial. A més, en aquests casos, és més probable que el nou-nat necessite una aportació suplementària d'oxigen per a aconseguir l'adaptació postnatal.

Sabem que la suplementació amb altes concentracions d'oxigen provoca un estrés oxidatiu que pot donar lloc posteriorment a patologies que són molt freqüents en el prematur, havent-se encunyat el terme de “Malaltia per radicals d'oxigen en el nou-nat”, que inclou entre altres la síndrome de distrés respiratori i la displàsia broncopulmonar, la qual continua sent la morbiditat més freqüent en el prematur que sobreviu.

Existeixen estudis en els quals l'ús d'una hipòxia preconditionant minimitza el mal posterior produït per estrés oxidatiu, afavorint un estat cel·lular més reductor i per tant més preparat per a afrontar un desequilibri posterior. S'ha vist que protegeix, per exemple, enfront d'una hipòxia aguda millorant la funció pulmonar en ratolins, atenua la lesió pulmonar secundària a intervencions quirúrgiques o millora la capacitat de reparació de les cèl·lules de l'estroma mesenquimal del pulmó.

L'objectiu principal d'aquest treball és avaluar l'efecte protector a nivell pulmonar d'un naixement en condicions d'hipòxia preconditionant enfront d'un insult hiperòxic posterior amb 100% d'oxigen utilitzant cries de ratolí nou-nades. Per a això es va utilitzar un model experimental de TFN amb ratolins gestants

en una cambra d'oxigenació controlada i es van dividir en 3 grups d'estudi: el grup control, Nx21/21, en el qual es va produir el naixement en aire ambient ($FiO_2=0.21$) i les cries es van deixar en aqueixa concentració d'oxigen fins al seu sacrifici a dia 1 (P1) i 7 (P7); el grup experimental Nx21/100, en el qual el naixement es produeix en aire ambient i a les 8 hores del naixement les cries van ser sotmeses a un insult hiperòxic ($FiO_2=1.0$) durant 1 hora i van ser sacrificades a dia P1 i P7; i finalment el grup experimental Hx14/100, en el qual el naixement es produeix baix condicions hipòxiques ($FiO_2=0.14$) i posteriorment se sotmeten les cries a un insult hiperòxic (1 hora, $FiO_2=1,0$) per al seu posterior sacrifici a dia P1 i P7.

En el pulmó es va avaluar l'estrés oxidatiu a través de la via de la transulfuració i dels biomarcadors de lesió a proteïnes i lípids en teixit pulmonar, així com l'estat de la defensa antioxidant, inflamació i finalment histologia i nivells d'apoptosis en pulmons de cries de ratolí.

Els resultats van mostrar un augment de la síntesi de GSH a través de l'activació de la via de la transulfuració per l'augment de la Cbs en el grup nascut baix condicions hipòxiques. A més aquest mateix grup va mostrar una disminució de biomarcadors de lesió proteica (m-Tyr/Phe, 3Cl-Tyr/p-Tyr i 3-Tyr/p-Tyr) i de biomarcadors de lesió a lípids (PGE₂, PGF₂ α , 8-iso-PGE₂, 8-iso-PGF₂, 8-iso-15-KetoPGE₂, 8-iso-15-KetoPGF₂, isoprostans totals i isofurans totals). Respecte a la defensa antioxidant, la hipòxia preconditionant augmenta l'expressió gènica de la catalasa i s'obtenen nivells baixos de peròxids. En el grup nascut en condicions d'hipòxia preconditionant no sols observem una millora a nivell d'estrés oxidatiu, sinó també a nivell inflamatori ja que s'obté la disminució de l'expressió gènica de TNF- α i interleucina 1- β (IL-1 β) i un augment de l'expressió gènica de la citocina antiinflamatòria IL-6.

Finalment es va analitzar la histologia de corts de pulmó mitjançant paràmetres morfomètrics com el gruix dels septes alveolars i el MLI, i l'estudi de mort cel·lular a través de l'anàlisi de la caspasa-3 observant en general que el naixement en condicions d'hipòxia preconditionant conservava l'estructura dels

alvèols i produïa una menor mort cel·lular front el naixement en aire ambient amb posterior hiperòxia.

Per tant, podem concloure que el naixement en condicions d'hipòxia preconditionant, podria protegir enfront d'un insult hiperòxic posterior, causant un menor estrés oxidatiu, menor inflamació i una menor lesió tissular pulmonar. Aquests resultats podrien obrir la porta a nous estudis sobre la hipòxia preconditionant i la seua aplicació a nivell clínic, donada la importància de millorar la morbiditat respiratòria dels nounats prematurs.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 OXÍGENO Y ESTRÉS OXIDATIVO

2.1.1 METABOLISMO AERÓBICO Y FISIOLOGÍA DEL OXÍGENO

El oxígeno se descubrió como elemento en la década de 1790, poniendo en conocimiento su dicotomía como elemento indispensable para la vida y a la vez como sustancia tóxica (1).

Su toxicidad es debida a la naturaleza química ya que cada átomo de oxígeno posee un electrón desapareado en su orbital externo y, por tanto, el átomo de oxígeno es considerado un radical libre (2). El ambiente reducido del medio intracelular proporciona las características para que el oxígeno sufra la reducción univalente que es la causante de la generación de los intermediarios reactivos como es el radical superóxido (O^{2-}), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^-). Estos son los subproductos de esta reducción univalente, denominados especies reactivas de oxígeno (ERO) y responsables de la toxicidad del oxígeno (3).

Los organismos multicelulares, requieren gran cantidad de energía para llevar a cabo sus funciones biológicas. Éstos obtienen la energía gracias a una eficiente combustión de los compuestos orgánicos como son la glucosa, aminoácidos y ácidos grasos, los cuales son degradados por oxidación mediante un conjunto de reacciones químicas en el proceso denominado respiración celular que tiene lugar en las mitocondrias (4). Por tanto, la obtención de energía requiere la presencia de oxígeno.

Una vez producida la oxidación de las diferentes biomoléculas mediante la glucólisis, β -oxidación o desaminación oxidativa se obtiene piruvato que dará lugar a el acetil-CoA. Este entra en el ciclo de Krebs y durante este ciclo se

generan precursores para ciertas biomoléculas y se produce fosforilación a nivel de sustrato dando lugar a ATP, NADH y FADH₂.

A continuación, tendrá lugar la fosforilación oxidativa, en este proceso se oxidan los equivalentes reductores transfiriendo sus electrones al oxígeno y la energía resultante se emplea para bombear protones desde la matriz mitocondrial hasta el interior de las crestas mitocondriales, para dar lugar a la fuerza protón-motriz. Cuando este se disipa a través del retorno a la matriz de los protones a través de la ATP sintasa, la energía almacenada se emplea para fosforilar el ADP con un grupo fosfato para formar ATP.(5)

La cadena respiratoria está formada por tres complejos de proteínas principales (complejo I, III, IV), y varios complejos auxiliares, utilizando una variedad de donantes y aceptores de electrones. Los tres complejos se asocian en supercomplejos para canalizar las moléculas transportadoras de electrones, la coenzima Q y el citocromo c, haciendo más eficiente el proceso.(6) La citocromo c oxidasa, también conocida como *complejo IV*, es el complejo final de proteínas en la cadena de transporte de electrones (7). Esta enzima media la reacción final en la cadena de transporte de electrones y los transfiere al oxígeno, mientras bombea protones a través de la membrana.

Por tanto, estos equivalentes reductores en la cadena respiratoria se transportan hacia su reacción final con el oxígeno, que funciona como aceptor de electrones, para formar agua; en ella tendrá lugar la fosforilación oxidativa mediante el cual la energía libre liberada se atrapa como fosfato de alta energía para formar ATP.

En condiciones normales el 98% del oxígeno, se reduce de manera completa hasta formar agua. Un pequeño porcentaje de los electrones se escapan, produciéndose una reducción parcial y liberando radicales libres y se forman las EROs anteriormente nombradas como son el anión superóxido (O²⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y radical hidroxilo (OH⁻) (8)(9).

Durante este proceso la eficiencia del metabolismo aeróbico es significativamente mayor que el metabolismo anaeróbico, así, 1 molécula de glucosa producirá 32-36 moléculas de adenosina 5'-trifosfato (ATP) en presencia de oxígeno, pero solo 2-4 moléculas sin la presencia del mismo. Así, la eficiencia energética del metabolismo aeróbico es 16-18 veces mayor (8).

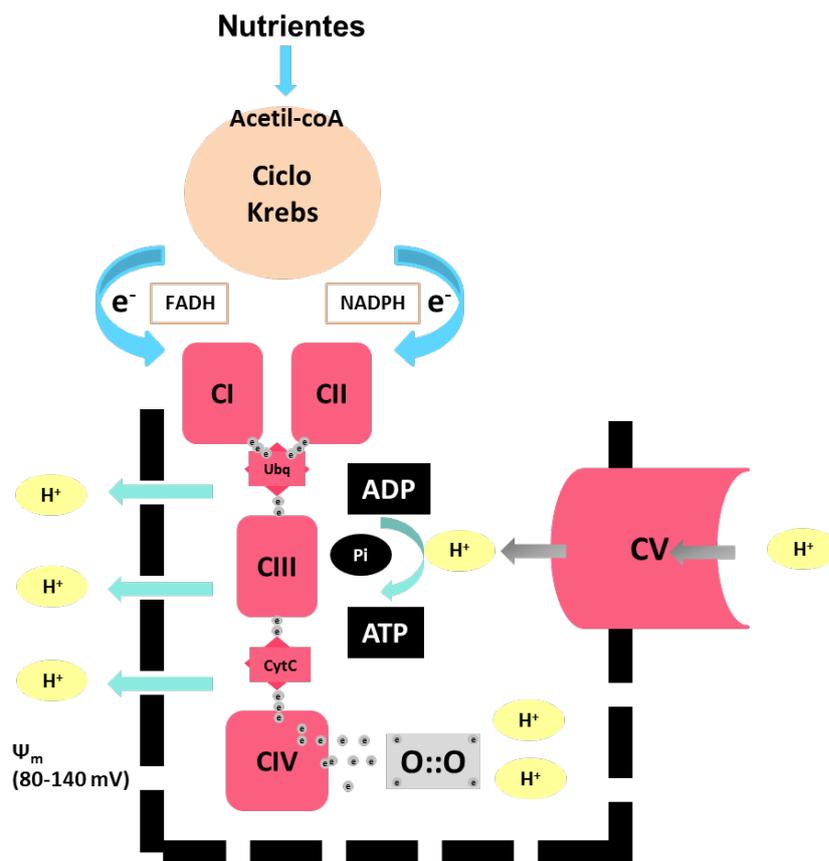


Figura 1. Esquema de la combustión de los nutrientes para la obtención de energía. Los nutrientes captados por la célula convertidos a Acetil-CoA para ser metabolizado en el ciclo de Krebs. Los electrones liberados son transportados a la cadena de transporte electrónico mediante el NAD y el FAD, para la posterior producción de ATP, siendo el O_2 el último receptor de electrones (10).

2.1.2 RADICALES LIBRES

Los radicales libres son especies atómicas o moleculares capaces de existir de manera independiente y que contienen uno o más electrones desaparejados en sus órbitas moleculares. Son capaces de oxidar membranas celulares, estructuras y funciones proteicas y ácidos nucleicos(9). Como se ha dicho anteriormente, aunque el oxígeno también tiene 2 electrones desapareados, no es un radical libre, sin embargo, reacciona rápidamente con otros radicales, formando nuevos radicales libres mucho más reactivos. (11)

El rango de daño molecular producido a las principales biomoléculas por los radicales libres es bastante amplio desde la nitración y peroxidación lipídica, nitración y oxidación proteica, depleción de grupos tioles en proteínas, nitración e hidroxilación a nucleótidos, rotura de la hebra de ADN y formación de puentes de ADN. Además, en situaciones de mayor estrés como son la hipoxia-reperfusión, la inflamación o la hiperoxia prolongada, los radicales libres pueden inducir la apoptosis y necrosis celular. (12)

En referencia a las EROs, el H_2O_2 no es un radical libre, ya que no tiene ningún electrón desaparejado en su órbita, actúa como molécula esencial en la comunicación intercelular y como regulador de procesos celulares redox.(13) Aun así, el H_2O_2 es un precursor de radicales libres. Iones metálicos como el Fe^{2+} , el Fe^{3+} o el Cu^{++} , reaccionan con el H_2O_2 generando OH^{\cdot} (reacción de Fenton). (11)

En presencia de óxido nítrico (ON), los radicales libres derivados del oxígeno, reaccionan formando especies reactivas de nitrógeno (ERNs) como el peroxinitrito ($ONOO^-$). $ONOO^-$ oxida proteínas formando proteínas nitradas, lo cual puede hacer que pierdan o aumenten actividad. También puede interferir en mecanismos de señalización (14). $ONOO^-$ también oxida ácidos grasos insaturados de las membranas biológicas, confiriéndoles potentes actividades biológicas (15). Y, por último, también puede atacar al ADN, dando lugar a productos oxidados de las bases del ADN, como la 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OHdG) o la 8-nitroguanina (16).

Tanto los EROs como los ERNs son potentes agentes oxidantes y reductores que sustraen electrones de las moléculas de su alrededor, alterando su estructura y función y convirtiéndolas a su vez en radicales libres. (11) Además, son capaces de poner en marcha respuestas proinflamatorias en las células (17), promoviendo la activación de factores como el factor nuclear kappa B (NF- κ B), TNF- α , IL1 β , IL-6, IL-8, TGF β o el VEGF (18), lo cual incrementa el daño a tejidos derivado de la inflamación, la alteración de la permeabilidad vascular y el edema.

Sin embargo, los EROs también tienen importantes propiedades en la defensa contra los microorganismos, pueden actuar como sustancias señalizadoras y en los procesos redox controlando el crecimiento y el desarrollo (3). Por ejemplo, O²⁻ y sus derivados son utilizados por los fagocitos para destruir bacterias. También el H₂O₂, al reaccionar con el Fe²⁺ (reacción de Fenton) o con O²⁻ (por el mecanismo Haber-Weiss) puede formar el OH⁻ que es un potente oxidante antibacteriano. (11)

En general los radicales libres tienen una vida media muy corta, a veces menor a un segundo. El OH⁻ es el más reactivo, pero de vida media muy corta y no es selectivo con los compuestos con los que reacciona. Por otro lado, el O²⁻ es menos reactivo y más selectivo, puede reaccionar con otro O²⁻ formando H₂O₂, o reaccionar con óxido nítrico ON para formar ONOO⁻, un oxidante muy potente. En cambio, H₂O₂ es destruido rápidamente por enzimas antioxidantes (catalasa, glutatión peroxidasa), como explicaremos en el siguiente apartado. (11)

2.1.3 DEFENSA ANTIOXIDANTE

Los organismos multicelulares han desarrollado mecanismos defensas para poder seguir evolucionando. Concretamente, hay 2 tipos de defensa antioxidante, enzimática y no enzimática. Éstas, pueden estar presentes en el interior de las células o en el espacio intersticial, y son capaces, en condiciones normales, de equilibrar la formación de ERO y mantener el equilibrio redox. (9)

En cuanto a la defensa enzimática, las principales enzimas antioxidantes que encontramos son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) (19) La actividad de estas enzimas, SOD, CAT y GPx, tiene lugar en las últimas semanas de gestación, son las que preparan al feto para la respiración pulmonar y para hacer frente a los cambios de oxígeno (20). La SOD, pertenece al grupo de las ubiquitinas, es la encargada de catalizar la dismutación de O_2^- a H_2O_2 y es degradada por las peroxidases como podemos ver en la figura 2 Podemos encontrar tres tipos de SOD, SOD1 citoplasmática, SOD2 mitocondrial y SOD3 extracelular.(8)

Por otro lado, CAT es una enzima antioxidante citosólica localizada principalmente en los peroxisomas que cataliza la dismutación de H_2O_2 en O_2 (Figura 2) (21). CAT actúa cuando los niveles de H_2O_2 son bajos. Con mayores concentraciones de la misma, la GPx es la responsable de detoxificar H_2O_2 . En este proceso el glutatión reducido (GSH) se oxida a glutatión oxidado (GSSG), el cual vuelve a ser reducido por la glutatión reductasa usando NADPH como cofactor. (11)

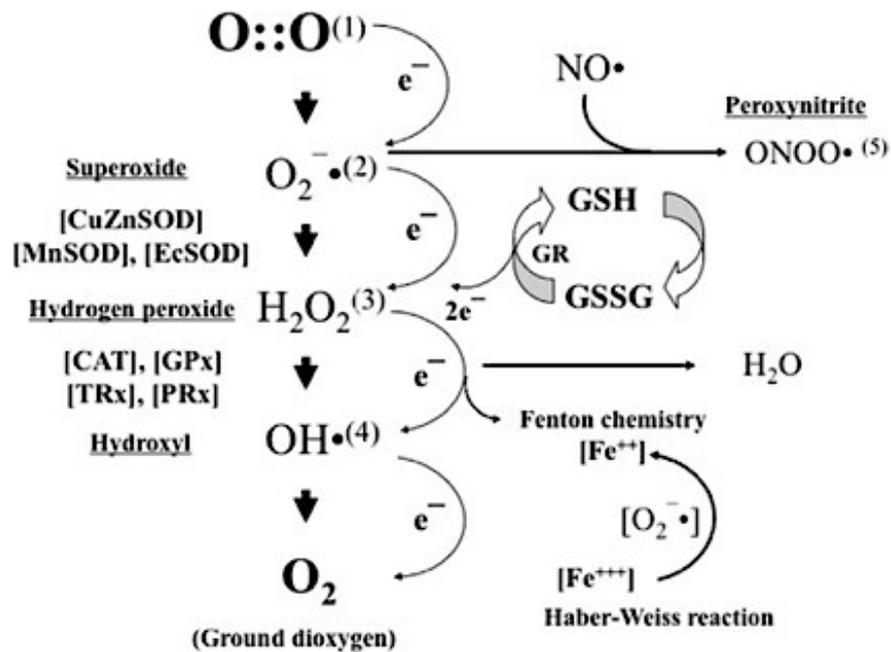


Figura 2. Esquema de formación de los EROs a partir del oxígeno y enzimas que participan en su detoxificación. O₂^{•-}: Oxígeno, H₂O₂: peróxido de hidrógeno, OH[•]: radical hidroxilo, O₂^{•-}: anión superóxido, NO: óxido nítrico, ONOO[•]: peroxinitrito, SOD: superóxido dismutasa, TRx: tiorredoxinas, PRx: peroxirredoxinas, CAT: catalasa, GPx: glutatión peroxidasa, GSH : glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado(9).

Como podemos observar en la Figura 2 un incremento de las enzimas SOD y CAT reflejan una reacción antioxidante para neutralizar una situación prooxidante (22). Además de estas, hay otras enzimas antioxidantes, las peroxirredoxinas (Prxs) que forman parte de la familia de peroxidasa, en las cuales la cisteína se oxida durante la reducción de peróxidos. Podemos encontrar diversos tipos de peroxirredoxinas en el organismo distribuidas en distintas localizaciones, como por ejemplo en los eritrocitos, en las células β del páncreas, macrófagos o neumocitos. Miembros de la subfamilia de las peroxirredoxinas pueden ser inactivadas en condiciones de hiperoxidación en ácido sulfínico durante la catálisis y son reactivadas vía ATP en una reacción catalizada por la sulfirredoxina (Srx), que es la enzima que regula la reversión de la hiperoxidación. Ésta, también para revertir la glutatiónilación por la catalización de la reacción de la deglutatiónilación. Actúa solo en miembros específicos de la subfamilia de las peroxirredoxina, llamadas comúnmente como 2-Cys peroxirredoxinas (23).

Además, de todas las enzimas nombradas, también tenemos compuestos capaces de neutralizar ERO y radicales libres. El antioxidante más abundante en el citoplasma de las células es el glutatión (GSH), un tripéptido compuesto de γ -glutamina, L-cisteína y glicina. Esta molécula de GSH se combina con otro GSH dando lugar a glutatión oxidado (GSSG), que contiene 2 electrones que son capaces de neutralizar a los radicales libres. GSSG se reduce otra vez a GSH por la glutatión reductasa (GSH-reductasa) utilizando electrones del ciclo de Krebs provenientes de la NADPH (forma reducida de NADP).

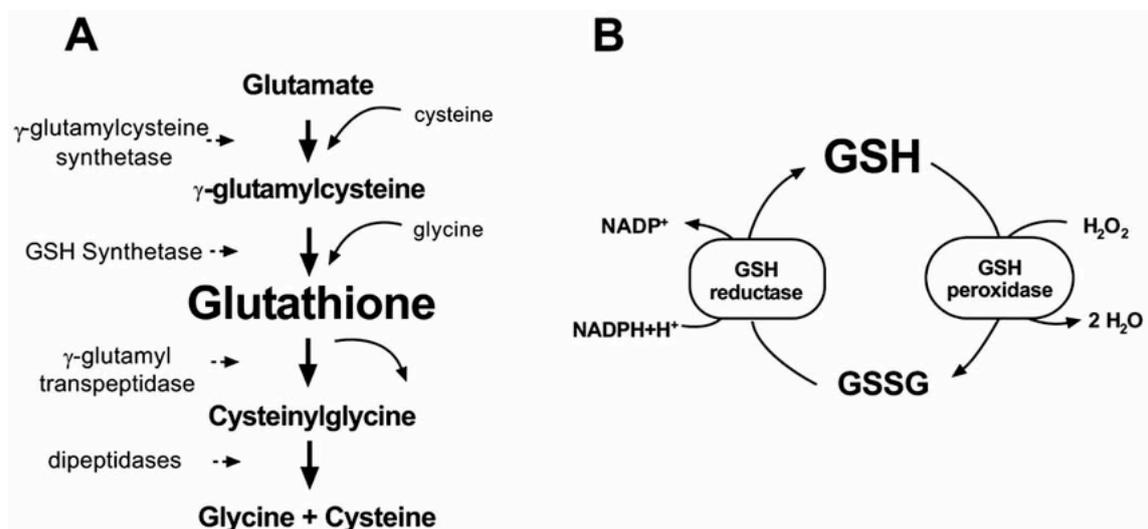


Figura 3. A. Ciclo del gamma-glutamilo de formación del glutatión y B. Ciclo de oxidación-reducción del GSH a GSSG por el que se neutralizan los radicales libres. GSH: glutatión reducido. GSSG. Glutatión oxidado.(24)

La cantidad de GSH disponible, puede verse afectada o bien por la síntesis *novo* del GSH, por la falta de precursores o bien por la alta oxidación del GSH. La síntesis de GSH se produce en el citosol de todas las células a partir de sus aminoácidos precursores: glicina, cisteína y ácido glutámico. La síntesis se produce por la acción consecutiva de dos enzimas: *glutamato cisteína ligasa* (GCL) y *glutatión sintetasa* (GS). En una primera reacción, la enzima glutamato cisteína ligasa usa como sustratos a los aminoácidos glutamato y cisteína y

forma el dipéptido γ -L-glutamilcisteína que en una segunda reacción es combinado con glicina en la reacción catalizada por la enzima glutatión sintetasa formando GSH. El ATP actúa como co-sustrato para ambas enzimas.(25)

En condiciones fisiológicas normales, la tasa de síntesis de GSH se encuentra determinada en gran parte por dos factores: Uno de ellos es la actividad de Glutamato cisteína ligasa (GCL) y el otro es la disponibilidad del sustrato cisteína (26).

La síntesis, el transporte y el catabolismo del GSH se producen en una serie de pasos enzimáticos y transportes de membrana que colectivamente se denominan ciclo γ -glutamil (27). (FIGURA 3A)

Otra vía que da lugar al GSH y relevante en la regulación del equilibrio redox en las células es la vía de la transulfuración (Figura 4). En los mamíferos, es la única vía de síntesis de cisteína. A partir de la cisteína, y como hemos comentado previamente, se forma el GSH(28) . Además en esta vía tiene lugar la formación del ácido sulfídrico (H_2S), molécula gaseosa de señalización, que juega un papel importante en la señalización de diferentes procesos del organismo (29).

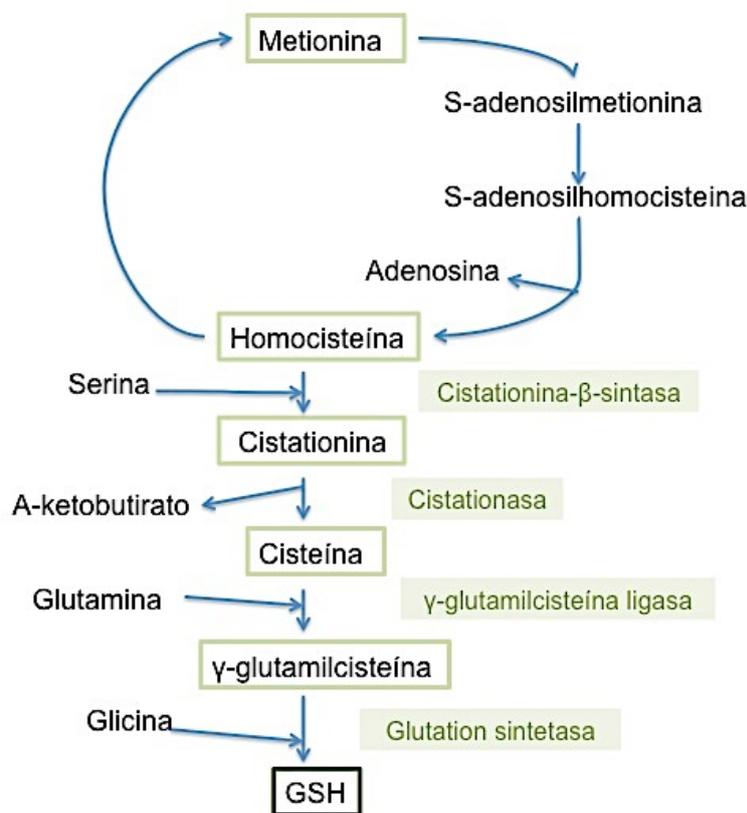


Figura 4. Vía de la transulfuración de síntesis de GSH

Otros antioxidantes no enzimáticos son proteínas que se unen a metales de transición como la transferrina o la ceruloplasmina; o moléculas que bloquean radicales libres como el ácido úrico y la bilirrubina y algunas vitaminas como la A, la E y la C.(9)

La vitamina E que es lipofílica, se localiza en la membrana celular, y reacciona con el lipoperóxido producido en la peroxidación lipídica. Sin embargo, la vitamina C, que es hidrosoluble, reacciona rápidamente con una gran variedad de EROs, incluido el O_2^- y el OH^\cdot , formando el radical ascorbato, que reacciona con otro radical ascorbato y forma dihidroascorbato y ascorbato. El ascorbato es por tanto un antioxidante citosólico. (11)

En el recién nacido prematuro, cuando se produce un daño tisular a nivel pulmonar suele ser causado principalmente por los radicales libres tanto por ERO como ERN debido a la falta de maduración del propio sistema antioxidante y al estrés oxidativo al que son sometidos para alcanzar la adaptación postnatal. (8)

2.1.4 ESTRÉS OXIDATIVO

Cuando hablamos de estrés oxidativo, nos referimos al desequilibrio que se produce en un organismo cuando la formación de radicales libres sobrepasa su capacidad de neutralizarlos (30). También puede definirse como el resultado de un desequilibrio a nivel celular y/o en tejidos, entre sustancias prooxidantes y sustancias antioxidantes, a favor de las prooxidantes. (11)

El estrés oxidativo puede ser fisiológico, como ocurre en la propia transición fetal-neonatal (TFN) e incluso necesario para la activación y maduración de algunas vías metabólicas. Pero también, en exceso y bajo determinadas circunstancias como puede ser la prematuridad puede ser patológico, causando daño a estructuras y alterando la función de sistemas biológicos (31)

El estrés oxidativo puede deberse a una disminuida defensa antioxidante o bien por niveles bajos de antioxidantes o a una capacidad disminuida de respuesta de las enzimas antioxidantes, incluso puede ser debido a defectos en los genes que regulan a los mismos. Pero también, el estrés oxidativo puede ser causado por un incremento en la concentración de oxígeno, por sustancias tóxicas, por radiación, entre otras (32). Situaciones como la hiperoxia, la reperfusión, o la inflamación también pueden aumentar la generación de ERO causando un gran daño al recién nacido y en especial al prematuro. Los procesos de hipoxia-reperfusión (como ocurre en las situaciones de asfixia perinatal (AP) con posterior reanimación) causan daño tisular, llamado daño por reperfusión, siendo responsables de este daño los radicales libres que se generan en esa reperfusión (33).

2.1.5 BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

Los biomarcadores son metabolitos que se pueden medir de manera objetiva en el laboratorio en diferentes fluidos biológicos como plasma, orina o líquido cefalorraquídeo, los cuales ayudan a entender e interpretar el estado del organismo frente a ciertas patologías (34). En el caso de la prematuridad el análisis de estos biomarcadores permite entender el grado de oxidación y si hay posible activación de la defensa antioxidante. Por tanto, son de gran importancia el estudio y conocer sus valores de referencia para la prevención de enfermedades causadas en la prematuridad por el daño oxidativo que se produce (13).

Los biomarcadores más extendidos en neonatología nos proporcionan información sobre daños a las principales biomoléculas como son los lípidos, ácidos nucleicos, o proteínas (35) En el recién nacido, y aún más el recién nacido prematuro, la accesibilidad a toma de muestras de sangre, así como el volumen sanguíneo son limitados. Además, éticamente, es preciso minimizar los procesos dolorosos a los que son sometidos. Es por ello que se han buscado biomarcadores como los medibles en orina que son de gran ayuda para evaluar su estado oxidativo, (13) (36) así como procedimientos en los que sea necesaria una muy pequeña cantidad de sangre, como los que analizan biomarcadores a través de cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas (UPLC)-MS/MS (37) (38).

2.1.5.1 Marcadores de daño a proteínas

Uno de los biomarcadores más estudiado es el del daño a proteínas. La oxidación y nitración de las proteínas puede alterar el sistema enzimático redox y por tanto la detoxificación de los ERO/ERN. Además la nitración de las proteínas participa en la funciones celulares como la respuesta inflamatoria y la apoptosis (39). En condiciones fisiológicas la L-fenilalanina (Phe) es oxidada a L-paratirosina (p-Tyr) mediante la acción de la fenilalanina hidroxilasa (40). Sin embargo, en condiciones patológicas, la oxidación espontánea de la

fenilalanina a paratirosina en presencia de OH puede llevar a la producción de L-ortotirosina (o-Tyr) y L-metatirosina (m-Tyr) (Figura 5). Además, el ataque de EROs como el ONOO⁻ o el ácido hipocloroso (HClO) puede atacar directamente a la p-Tyr produciendo la oxidación de ésta y dando derivados como la 3-nitrotirosina (3NO₂-Tyr) o la 3-clorotirosina (3Cl-Tyr) respectivamente (Figura 5) (41).

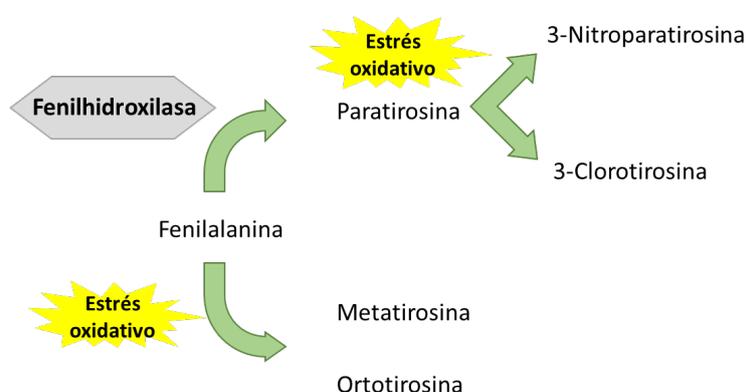


Figura 5. Daño a proteínas por estrés oxidativo. Derivados del daño a la fenilalanina.

2.1.5.2 Marcadores de daño al ADN

En cuanto al daño oxidativo al ADN, las bases nitrogenadas de los nucleótidos, purinas (adenina y guanina) y las pirimidinas (citosina y timina), reaccionan con el radical hidroxilo dando lugar a compuestos específicos. Además otros radicales libres, NO⁻ y O²⁻, reaccionan también con las bases nitrogenadas del ADN. Concretamente, El OH⁻ se añade a la posición C-8 de la guanina y forma la 8-OH-guanina (8-hidroxiguanina). El daño al ADN puede causar mutaciones que, si no son reparadas, pueden cambiar la expresión génica proteica (16).

2.1.5.3 Marcadores de daño a lípidos

Otros de los biomarcadores que son muy relevantes en el campo de la neonatología son los isoprostanos y isofuranos. Estos, han sido estudiados como marcadores de lesión de sustancia blanca cerebral en prematuros y también en la evaluación del ductus arterioso persistente (42)(43). Son marcadores de estrés oxidativo, concretamente de daño a lípidos, evaluando la peroxidación de los ácidos grasos insaturados (PUFA) (44). El daño oxidativo a lípidos se conoce como peroxidación o lipoperoxidación (LPO). La LPO no enzimática ocurre en tres pasos. En primer lugar, ERO como el OH^- ataca a los PUFA generando radical lipídico, este reacciona con el O_2 y forma un peroxil radical que puede reaccionar con otro PUFA y generar otro radical lipídico y un hidroperóxido lipídico. Finalmente, tras una serie de reacciones con radicales libres, se finaliza con la generación de productos no radicales (NRPs) (38).

2.1.5.4 Otros marcadores de estrés oxidativo

Además de estos biomarcadores, existen factores de transcripción que se activan según nos encontremos en condiciones de hipoxia o de hiperoxia. Uno de los factores más conocidos es el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) que es el máximo regulador para que las células se adapten a la respuesta frente a la hipoxia (45). Además de CREB, NF κ B, AP-1 y P53. Estos factores regulan la expresión de los genes en respuesta a cambios en la concentración de oxígeno y derivados de EROs (46). También, la hipoxia estimulará el desarrollo vascular (angiogénesis), no sólo por la activación de HIF, si no por el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) responsable del crecimiento vascular y tisular.

Se conocen además otros biomarcadores, como son los marcadores de inflamación, TNF- α y IL-1 β que son indicadores de un proceso proinflamatorio. Se trata de pirógenos endógenos los cuales, contribuyen a la leucocitosis por liberación de neutrófilos de la medula ósea e inducen a la producción de otras citoquinas (47).

2.2 EL OXIGENO EN LA VIDA FETAL.

La vida fetal se desarrolla en un ambiente de relativa hipoxia, cuando lo comparamos con la vida extrauterina. La presión parcial de oxígeno (PaO_2) intraútero es de 3,5-4,4 kPa (25-35 mmHg), mientras que en los adultos es 11,5-13.0 kPa (80-90 mmHg) (48).

La oxigenación en el feto depende de los gradientes de presión entre sangre materna, placenta, sangre fetal y sus tejidos. Además, se ha demostrado que la concentración de oxígeno en la placenta varía a lo largo de las semanas de gestación, de manera que en las primeras semanas (antes de la semana 12), cuando el feto es muy sensible a el estrés oxidativo, la PaO_2 es de 18-20 mmHg, y luego aumenta hasta un pico máximo de 60 mmHg en las semanas 14-16, volviendo luego a descender hasta valores en torno a 40 mmHg en la semana 36. (13) (49)

Esta baja concentración de oxígeno en la placenta y el feto es necesaria para el desarrollo de los mismos, ya que gracias a ello se estimula la angiogénesis, a través de la regulación transcripcional y post transcripcional de factores de crecimiento como los factores de crecimiento endotelial (VEGFs), la eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento placentario (PGF) y angiopoyetinas 1 y 2. (9)

El más importante regulador de la respuesta celular a la hipoxia es el HIF-1 como he nombrado anteriormente. Se trata de una proteína heterodimérica compuesta por una subunidad (1β) que esta expresada constitutivamente y otra subunidad (1α) cuya expresión está regulada por el oxígeno. En condiciones de normoxia, la subunidad 1α es sintetizada e hidroxilada, pero en condiciones de hipoxia se pierde dicha hidroxilación permitiendo que HIF-1 se una a su secuencia de reconocimiento del ADN, aumentando la transcripción de genes. En situaciones de hipoxia intermitente, la actividad de HIF-1 también

se induce, pero a través de diferentes mecanismos que el comentado para la hipoxia continua (50).

La actividad de HIF-1, estimula la eritropoyesis regulando la expresión de múltiples genes, entre ellos los de la transferrina, ceruoplasmina y además activa la transcripción de los receptores de la EPO. (4)

Por tanto, el aumento de la PaO₂ en el feto y la placenta es coincidente con la fase de desarrollo fetal más lento, con una menor tasa de división celular, proliferación y vascularización, en comparación con las primeras 12 semanas. Sin embargo, a pesar de la diferencia entre PaO₂ en el feto y en el adulto, los tejidos fetales reciben una carga de oxígeno similar a los tejidos adultos. Ello es debido a la presencia de la hemoglobina fetal con una mayor afinidad por el oxígeno. Además, el gasto cardiaco fetal es mucho más elevado, alcanzando valores de 250-300 ml/kg/min, permitiendo la llegada de un mayor flujo a los tejidos. Y, gracias a shunts intra y extracardiacos, la sangre que proviene de la placenta, se dirige sobretodo a los órganos con más demanda, como son el corazón y el cerebro. (51)

Según las células crecen y proliferan, su consumo de oxígeno aumenta y la actividad de HIF-1 se induce y coordinadamente activa la transcripción de múltiples genes que codifican factores de crecimiento angiogénicos y citoquinas, incluyendo VEGF, SDF-1, PLGF, angiopoyetina 1 y 2 , y factor de crecimiento plaquetar B. Siendo por tanto HIF-1 el principal regulador de la angiogénesis a múltiples niveles. Además, a nivel de metabolismo energético, la principal tarea de HIF-1 es establecer, con cualquier concentración de oxígeno, el balance óptimo entre metabolismo oxidativo y glicólisis para maximizar la producción de ATP sin aumentar los niveles de EROs. (4)

Algunas patologías maternas pueden causar hipoxia fetal como son la preeclampsia, obesidad y diabetes gestacional, las cuales puede causar hipoxia crónica en el feto, tanto de causa vascular como metabólica. A pesar de que, en condiciones fisiológicas, el feto está sometido a estrés oxidativo y nitrosativo, necesario como hemos dicho para la activación de vías

metabólicas, estos fetos tienen mayor riesgo de tener estrés oxidativo y nitrosativo causándoles complicaciones. (51)

Por tanto, La hipoxia, como venimos comentando, es esencial para el desarrollo durante la vida fetal. Es por este motivo que, el nacimiento prematuro altera este delicado mecanismo regulatorio, el desarrollo y la diferenciación en general de los tejidos, pero especialmente aquellos como el pulmón, el intestino, la retina o el sistema nervioso central (13).

2.2.1 LA MADURACIÓN DEL SISTEMA ANTIOXIDANTE

La TFN que se produce en el nacimiento a un ambiente relativamente hiperóxico, hace necesario que el pulmón fetal se desarrolle y se prepare para afrontar este cambio con suficientes defensas antioxidantes para prepararlo para la citotoxicidad inducida por el oxígeno cuando se inicien las primeras respiraciones.

En estudios realizados en animales, ponen de manifiesto esta “preparación para el nacimiento” que se produce en el pulmón fetal (52)(53). En ellos se pudo observar cómo hay una rápida elevación de los niveles de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPX) en el 10-15% final de la gestación, y, paralelamente, un rápido aumento de la síntesis de surfactante durante ese final de la gestación. El aumento de la actividad enzimática pudo medirse como un +150% para la SOD, un +200% para la CAT, y un 175% para la GPX. El contenido en surfactante se incrementa al final de la gestación un 250%. (53) Este aumento de la actividad del sistema antioxidante al final de la gestación forma parte de la normal maduración pulmonar.

Además, durante esta etapa, se produce el paso de antioxidantes no enzimáticos a través de la placenta. Se ha visto demostrado que el surfactante pulmonar contiene cantidades significativas de SOD y CAT, previniendo de esa manera la peroxidación lipídica y la inactivación del surfactante a causa de los EROs. (31)

Cuando se produce el parto prematuro, los niveles de antioxidantes tanto enzimáticos como no enzimáticos, estarán reducidos y, por tanto, su capacidad de defensa contra el daño inducido por ERO será menor. Además, su capacidad para aumentar la síntesis de antioxidantes en respuesta a la hiperoxia u otros elementos oxidantes es deficiente debido a su inmadurez. (31)

A ello se suma a que con mayor probabilidad van a necesitar reanimación en el momento del nacimiento, con concentraciones de oxígeno por encima de 21%, y esto hace que tengan con mayor riesgo de daño asociado al estrés oxidativo. (31)

En un estudio (54) realizado en recién nacidos a término y pretérmino, se vió que la 8-OHdG era significativamente mayor en prematuros, además de encontrar una reducción significativa de la actividad de SOD y GPx.

La actividad de SOD que esta aumentada en los neumocitos tipo II durante el desarrollo fetal, como una manera de proteger del daño oxidativo y favorecer su desarrollo, pero estudios han demostrado que no aumenta su expresión en los recién nacidos prematuros en respuesta a la exposición a EROs, haciendo más susceptible a ese pulmón del daño oxidativo. (55) (56)

En este sentido, a nivel clínico los corticoides antenatales son administrados a las gestantes ante la posibilidad de un parto prematuro, ya que está demostrado que aceleran el desarrollo pulmonar. Estudios han demostrado que los prematuros de madres tratadas con corticoides tienen una mayor actividad de SOD, CAT, GPx, glutatión reductasa y glutatión-S-transferasa. (57)

2.2.2 FASES DESARROLLO PULMONAR

Las fases del desarrollo pulmonar que son comunes en las diferentes especies animales son 5: embrionaria (formación de brotes de pulmón), pseudoglandular (ramificación), canalicular (formación de sacos epiteliales y aparición de capilares), sacular (formación de alveolos e inicio de la producción de surfactante) y alveolar (maduración de los alveolos); aunque la duración de cada fase y su relación con la edad gestacional difiere entre las diferentes especies (58).

Los recién nacidos prematuros en la especie humana nacen durante la fase canalicular-sacular, por lo que la ramificación y la diferenciación alveolar no está completa (59).

La mayoría de los modelos de daño pulmonar por hiperoxia en recién nacidos (en especial los modelos de displasia broncopulmonar) usan ratones o ratas, puesto que ambas especies nacen en la fase sacular, caracterizada por el inicio de la producción de surfactante y el final de la dilatación de las vías aéreas y su vascularización (60).

En ratones en concreto esta fase sacular se completa el día 5 tras el nacimiento. A pesar de que nacen en esta fase, los ratones no desarrollan distrés respiratorio al nacimiento puesto que tienen suficiente surfactante; esto podría compararse con un prematuro humano en el que la madre haya recibido corticoides antenatales, que han demostrado que aumentan la producción de surfactante en el feto (61).

Como podemos ver en la figura 6 un ratón a G 17,5 días correspondería con un recién nacido prematuro de 26 semanas de edad gestacional, P0-1 podría corresponder con un prematuro tardío de 30-35 semanas de edad gestacional y P7 correspondería con el recién nacido a término.

Como podemos ver en la imagen también, el nacimiento prematuro, interrumpe el “reloj” molecular de desarrollo del pulmón, dando lugar a diversas patologías que se mantienen hasta la edad adulta (58)

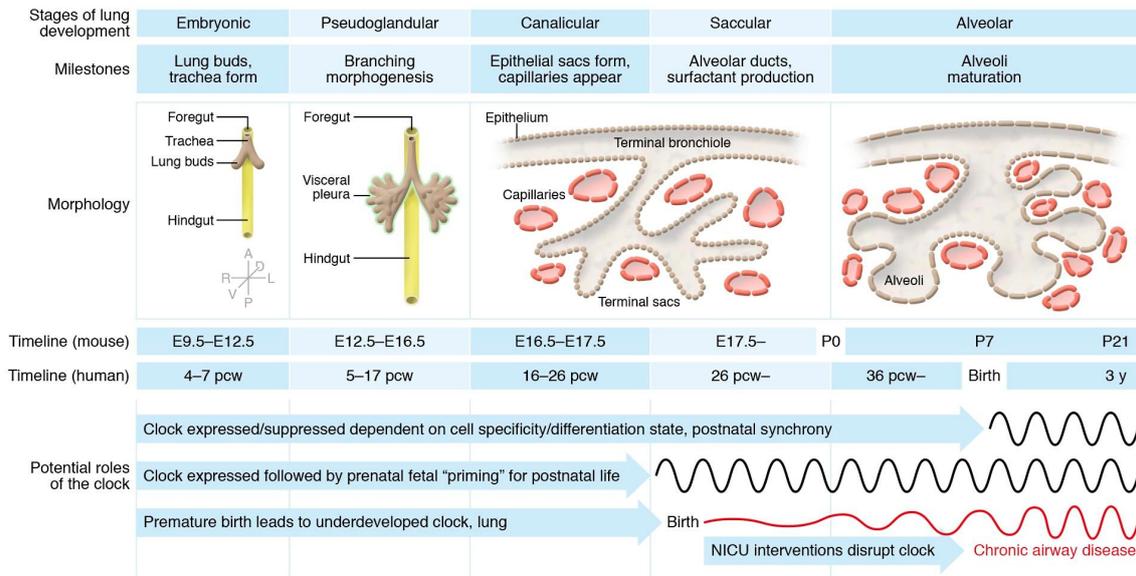


Figura 6. Cronología de las cinco fases del desarrollo pulmonar en ratones y humanos (58).

2.3 LA TRANSICIÓN FETAL NEONATAL

En el momento del nacimiento y con el inicio de la primera respiración, se producen cambios muy importantes tanto a nivel cardiopulmonar como a nivel metabólico. Las resistencias vasculares pulmonares caen, los shunts intra y extracardiacos se cierran. Por tanto, el gasto cardiaco ventricular derecho se redirige a los pulmones para obtener el oxígeno. A nivel fetal, la PaO₂ aumenta de manera súbita de los 40-50 mmHg intraútero a 70-80 mmHg en los primeros 5-10 minutos de vida, cuando el feto pasa a respirar aire ambiente con una concentración de oxígeno del 21%. Este incremento en la PaO₂, va a causar un estrés oxidativo que es fisiológico. (13) (62)

Como se ha explicado previamente, la expresión de enzimas antioxidantes y la disponibilidad de antioxidantes no enzimáticos, aumentan hacia el final de la gestación, preparando al feto para este momento.

Diversos estudios animales han puesto de manifiesto este estrés oxidativo que se produce en el momento del nacimiento, demostrando, además, si se realiza una reanimación con una mayor concentración de oxígeno, este estrés oxidativo es mucho mayor. Por ejemplo, en un estudio experimental en el que se midió el ratio GSH/GSSG en hepatocitos, se vio que estaba 15-20 veces aumentado en el neonato en comparación con el feto, debido a un aumento exponencial de GSSG, indicando un estado pro-oxidante. (63)

A nivel clínico, el color ha sido usado tradicionalmente para evaluar el estado de oxigenación durante la transición fetal-neonatal, a través del test de Apgar. Sin embargo, los estudios realizados en recién nacidos a término sanos, demuestran que no alcanzan una saturación de oxígeno mayor del 90% hasta varios minutos después de clampar el cordón umbilical. Algunos bebés solo necesitan 2-3 minutos, pero otros tardan más de 10 minutos en alcanzar saturaciones de oxígeno por encima de 90%, por lo que hay una gran variabilidad interindividual. (64)

Basándose en 3 bases de datos de registro de saturación de oxígeno en los primeros 10 minutos de vida de recién nacidos a término y pretérmino que no precisaron reanimación, se elaboró un nomograma que publicó la Academia Americana de Pediatría en su guía para la reanimación, en la que se estableció una saturación de oxígeno objetivo de 60-65% en el primer minuto, de 65-70% en el minuto 2, 70-75% en el minuto 3, 75-80% en el minuto 4, 80-85% a los 5 minutos y 85-95% a los 10 minutos. (65)(66) Con estos datos, el pediatra se guía durante la estabilización en el paritorio en la toma de decisiones sobretodo en cuanto a la administración de oxígeno suplementario.

Aun así, es necesario saber que los niños que reciben estabilización durante la TFN neonatal con presión positiva continua en la vía aérea, alcanzan antes niveles mayores de saturación de oxígeno que los niños del nomograma. (67) Además, en ese trabajo, se vio que las niñas tardaban menos en alcanzar saturaciones de oxígeno estables por encima de 90%.

2.3.1 REANIMACIÓN CON OXÍGENO EN SALA DE PARTOS

Tradicionalmente, se recomendaba la utilización de altas concentraciones de oxígeno para ayudar a los recién nacidos en la adaptación postnatal, especialmente aquellos que padeciesen una asfixia e incluso en los recién nacidos prematuros.

Sin embargo, los estudios tanto experimentales como clínicos, han demostrado que la suplementación con oxígeno en la transición fetal neonatal, provoca un aumento en la producción de radicales libres, especialmente se anión superóxido. (8)

Concentraciones suprafisiológicas de oxígeno generan un aumento excesivo de ERO. Se ha visto que incluso una exposición breve a la hiperoxia en este periodo, aumenta la oxidación a nivel de la mitocondria en células musculares de vasos pulmonares. (68)

Los ERO, como se ha comentado anteriormente dañan macromoléculas, y pueden provocar muerte celular y apoptosis en tejido cerebral y pulmonar. (69) (70) Además, pueden alterar la expresión de genes a través de la activación de factores de transcripción y vías de señalización. (71)

En un estudio realizado en cerdos, se demostró que la producción de radicales libres se correlacionó con la cantidad de oxígeno administrado en la reanimación tras un episodio asfíctico. (72) En el mismo, se estudiaron biomarcadores de daño a ADN y proteínas en muestras de orina.

En otro estudio experimental, se midieron isoprostanos, isofuranos, neuroprostanos y neurofuranos, en tejido cerebral de cerdos asfícticos, correlacionándose claramente los niveles de los mismos con la cantidad de oxígeno administrado en la reanimación. (73)

Basado en estudios experimentales, hace 2 décadas, se hipotetizó que podría ser adecuado, el inicio de la reanimación de recién nacidos asfícticos con una

FiO₂ 0,21 o aire ambiente, y así reducir el daño producido por la reoxigenación con una FiO₂ de 1. Saugstad et al, realizaron 2 estudios en humanos en los que demostraron que esta reanimación con aire ambiente era factible y además, iniciaban la respiración espontánea antes y había una tendencia en la reducción de la mortalidad. (74) (75)

En nuestro grupo de investigación, se realizaron estudios en los que se comparó la reanimación con FiO₂ =0,21 y FiO₂=1, demostrando que el ratio GSH/GSSG a las 4 semanas de vida estaba disminuido en los que recibieron una FiO₂=1. (22).

El uso de 100% de oxígeno, provoca un incremento en la actividad de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx) y en las enzimas del ciclo del glutatión. (76)

En 2008, se publicó un metanálisis, incluyendo un total de 1082 recién nacidos reanimados con aire ambiente y 1051 recién nacidos reanimados con 100% de oxígeno. (77) La mortalidad neonatal era significativamente menor en el grupo reanimado con aire ambiente.

Es por todo esto, que en el 2010, las guías internacionales de reanimación del recién nacido, recomendaron el inicio de la reanimación del recién nacido a término con aire ambiente. (78)

El parto prematuro, interrumpe la maduración del pulmón y también del sistema antioxidante. También es más probable que requieran reanimación en el momento del nacimiento y que requieran algo más de una FiO₂ de 0,21 para realizar la transición fetal-neonatal.

En otro estudio que realizamos en nuestro grupo, en el que se asignaron los recién nacidos prematuros a un grupo de reanimación con baja concentración de oxígeno (FiO₂=0,3) y a otro de alta concentración (FiO₂=0,9), pudimos ver que los del grupo de alta concentración de oxígeno, tuvieron un ratio GSH/GSSG mayor en los días 1 y 3 de vida y también biomarcadores en orina de daño a lípidos, proteínas y ADN más elevados . Además, los pacientes con

mayores niveles de estrés oxidativo, tuvieron una incidencia mayor de displasia broncopulmonar. (79)

Sin embargo, cuando comparamos el inicio de la reanimación del prematuro con FiO_2 de 0,3 o con FiO_2 de 0,6, no encontramos diferencias significativas a nivel de daño oxidativo. (80)

2.3.2 HIPOXIA PRECONDICIONANTE

Tanto al hipoxia como la hiperoxia generan radicales libres y pueden causar estrés oxidativo por una respuesta insuficiente del sistema antioxidante (81).

Tal y como ocurre en el hecho de la protección que confiere la aclimatación previa para la resistencia a grandes altitudes, la hipoxia moderada está siendo estudiada en los últimos años como protección frente a diferentes insultos incluidos la hipoxia aguda (82), reoxigenación (83) y reperfusión (84).

La hipoxia preconditionante se define como el fenómeno o respuesta a una exposición a una leve o moderada hipoxia induciendo protección celular, y mejorando la tolerancia de los tejidos a la variabilidad en las concentraciones de oxígeno (81).

El fenómeno del preconditionamiento hipóxico se ha estudiado en diferentes órganos, como el cerebro, el riñón, el hígado y también en pulmón. En estudios recientes por ejemplo, se ha visto que protege frente a una hipoxia aguda mejorando la función pulmonar en ratones (82), atenúa el daño pulmonar secundario a intervenciones quirúrgicas (85) o mejora la capacidad de reparación de las células del estroma mesenquimal del pulmón (86).

Como venimos explicando, en el momento del nacimiento se produce un estrés oxidativo fisiológico, y en condiciones normales, el recién nacido está preparado para afrontarlo. Pero en determinadas situaciones, como en la asfixia perinatal, en la que se produce una hipoxia con una posterior reperfusión, o en el parto prematuro, en el que hay unos menores niveles de antioxidantes y una mayor probabilidad de utilización de oxígeno suplementario durante la TFN, existe mayor probabilidad de que se produzca un daño provocado por una mayor producción de EROs.

También se ha demostrado que el recién nacido prematuro tarda más en alcanzar niveles de saturación de oxígeno normales durante la adaptación postnatal, sin que ello suponga ningún problema a corto o largo plazo. (65)

Partiendo de la idea de que una transición más gradual entre la PaO₂ intraútero a la PaO₂ extraútero, podría ser protector frente al daño por estrés oxidativo en este tipo de situaciones, se han realizado estudios experimentales en los que se ha mantenido una concentración de oxígeno menor del 21% tras el nacimiento o en situaciones de reperfusión.

Así, por ejemplo, en un modelo murino (84) en el que se estudiaron diferentes concentraciones de oxígeno tras una isquemia aguda, se vio que la reperfusión con una concentración de oxígeno del 18% disminuía los niveles de infarto cerebral, encontrándose además un menor daño oxidativo a nivel de la mitocondria y el tejido cerebral.

Otros estudios realizados también en ratones, la hipoxia preconditionante mostró un efecto protector a nivel del músculo diafragmático y músculos respiratorios, atenuando el aumento de ERO, regulando canales mitocondriales y cascadas de señalización redox, en una hipoxia-reoxigenación posterior. (87)(88)(83)

En un estudio experimental murino previo que realicé con el grupo de investigación en Perinatología en el Lung Biology Research (University of Toronto; Canadá), pudimos observar que manteniendo una concentración de oxígeno del 14% tras el nacimiento, se producía un ambiente protector frente a una reanimación posterior con una concentración de oxígeno del 100%. El ratio GSH/GSSG en pulmón estaba aumentado en los grupos mantenidos en hipoxia moderada, además de presentar mayores niveles de actividad de las enzimas NOQ1, SRNX1 y GPx, propiciando todo ello un ambiente reductor protector frente a una hiperoxia posterior (20).

Por tanto, más estudios experimentales sobre la hipoxia preconditionante en la TFN son necesarios para obtener respuestas a la adaptación postnatal frente la reanimación.

2.4 ESTRÉS OXIDATIVO Y ENFERMEDAD EN EL PERIODO PERINATAL

2.4.1 ESTRÉS OXIDATIVO A NIVEL DE LA PLACENTA

La formación de radicales libres está presente en la placenta y en el feto desde el inicio de la gestación y contribuye al desarrollo fetal normal.

Al final del primer trimestre, este estrés oxidativo fisiológico, contribuye al normal desarrollo de la placenta. Además, la placenta, con su actividad detoxificadora, protege al embrión de la teratogénesis asociada a los ERO. Con la maduración placentaria, se produce un aumento de la concentración de oxígeno, y un subsecuente aumento de la formación de EROs. Si existen condiciones estresantes, este estrés oxidativo generado puede dar lugar a complicaciones como aborto, preeclampsia, crecimiento intrauterino retardado, o una rotura prematura de membranas, riesgo de parto prematuro e infección en el recién nacido. (13)

2.4.2 ESTRÉS OXIDATIVO ASOCIADO A HIPOXIA FETAL CRÓNICA

La pre eclampsia o la diabetes mellitus tipo 1 son las causas más frecuentes de hipoxia fetal y morbilidad neonatal.

La pre eclampsia se caracteriza por un flujo placentario intermitente enlentecido debido a alteraciones en las arterias espirales. Esta perfusión fluctuante causa una pequeña isquemia-reperfusión que provoca estrés oxidativo. A su vez, los ERO pueden causar pre eclampsia a través de diferentes mecanismos como la activación de vías pro apoptóticas en el sincitiotrofoblasto que alteran la normal remodelación de las arteriolas, consolidando la respuesta inflamatoria y/o alterando la respuesta endotelial. (13)

En un estudio realizado analizando biomarcadores de estrés oxidativo e inflamación a lo largo de la gestación, se puso de manifiesto que ratios que se asocian al desarrollo de pre eclampsia, se correlacionaban significativamente con concentraciones elevadas de 8-isoprostanos en orina y niveles aumentados de proteína C reactiva, IL-1 β , IL-6 e IL-10 en plasma, a partir de la semana 18 de gestación. Sin embargo, los niveles de 8-OHdG no se correlacionaban. (89) También se han encontrado hallazgos similares en líquido amniótico, correlacionando los niveles de F2-isoprostanos con pre eclampsia y retraso de crecimiento intrauterino. (90)

En cuanto a la diabetes mellitus, no están claros los mecanismos por los cuales se produce la hipoxia fetal, pero sí que está bien establecido que la morbimortalidad esta aumentada en este tipo de gestaciones. Tanto la hiperinsulinemia como la hiperglucemia influyen negativamente en el desarrollo del feto causando macrosomía e hipoxia. (13) Los niveles altos de glucosa se asocian una alteración en los niveles de enzimas antioxidantes, un metabolismo del glutatión alterado y unos niveles de ácido ascórbico disminuidos. Los radicales libres, además, oxidan las membranas lipídicas de las células, alterando su adaptabilidad a los capilares, aumentando la agregación plaquetar y disminuyendo la vida media de las células, en especial los eritrocitos. Esto contribuye a la hipoperfusión fetal y el retraso de crecimiento. (91)

La hipoxia fetal suele medirse determinando los niveles de eritropoyetina (EPO) en plasma y en líquido amniótico, ya que no se almacena ni atraviesa la placenta. Por tanto, los niveles de EPO en plasma fetal y en líquido amniótico corresponden a la síntesis fetal y se correlacionan significativamente con la intensidad y duración de la hipoxia. (92)

Además, la alteración en los niveles de EPO, pueden ser utilizados como biomarcadores de la necesidad de una cesárea, ya que se correlacionan con complicaciones neonatales inmediatas. (93)

En un estudio observacional, realizado con mujeres embarazadas con diabetes mellitus tipo 1 y diabetes gestacional tratadas con insulina, al medir los niveles de EPO en líquido amniótico, se vio una correlación estadísticamente significativa entre los marcadores de estrés oxidativo (tales como los ratios 8-OH-dG/2dG y met-tyr/phe) y los niveles de EPO, poniendo de manifiesto que la hipoxia intrauterina en este tipo de gestaciones causan estrés oxidativo en el feto y un incremento en las morbilidades en el periodo neonatal. (93)

2.4.3 ESTRÉS OXIDATIVO EN EL RECIÉN NACIDO

Desde los años 80 se viene estudiando la importancia del estrés oxidativo en el periodo neonatal, especialmente en recién nacidos prematuros (94). En 1988, Saugstad introdujo el término “Enfermedad por radicales de oxígeno en el recién nacido” en las que engloba en una sola entidad a las patologías más prevalentes de los recién nacidos prematuros como son la displasia broncopulmonar, la enterocolitis necrosante o la retinopatía de la prematuridad, ya que tienen un mecanismo patogénico común. La manifestación clínica de esta entidad va a depender del órgano que este mayormente afectado (95).

Desde entonces el oxígeno y en concreto la hiperoxia ha tomado un protagonismo creciente en el manejo de estos recién nacidos, desde la sala de partos hasta el alta del hospital.

En numerosos modelos animales de hipertensión pulmonar persistente del recién nacido (96) (97), de displasia broncopulmonar (98) (99), daño cerebral (100) y enterocolitis necrosante (ECN) (101) se ha descrito una gran cantidad de estrés oxidativo a nivel mitocondrial.

La relación de la retinopatía de la prematuridad (ROP) y la hiperoxia es una de las más estudiadas. El oxígeno juega un papel muy importante en su patogénesis a través del VEGF, produciéndose una neovascularización descontrolada en la retina del prematuro (102).

Un importante mecanismo de daño por estrés oxidativo es la inflamación. Como veremos más adelante, la inflamación juega un papel muy importante en la patogénesis de la displasia broncopulmonar, y diversos modelos animales han demostrado que la hiperoxia desencadena una respuesta inflamatoria en el pulmón (103).

La inflamación y el estrés oxidativo también se ha estudiado en modelos animales de enterocolitis necrosante. Existe un daño epitelial por esa respuesta

inflamatoria en el intestino prematuro (104). Además, se han descrito niveles elevados de citoquinas proinflamatorias en prematuros con ECN (105).

Varios estudios han demostrado un aumento del estrés oxidativo en la hemorragia intraventricular (106) y la encefalopatía hipóxico isquémica (107) (108), dos de las entidades más relevantes de daño cerebral en el recién nacido.

Toda la evidencia existente de la relación del estrés oxidativo y la enfermedad en el recién nacido, ha hecho que se realicen estudios en los que se administran antioxidantes tales como vitaminas A y E, SOD, GSH, y cofactores enzimáticos como el selenio o la L-arginina. Aunque parezca una estrategia lógica los estudios en humanos no han demostrado una fuerte evidencia para recomendar su uso (109).

Summary of trials evaluating antioxidant therapy for prevention of neonatal disorders.

Therapy	Mechanism/ROS Target	Trial Outcome	Reference
<i>BPD</i>			
Inhaled NO	NO	No disease effect	Hasan et al.[171]; Askie et al. [172]; Askie et al. [28]
N-acetylcystine	GSH	No disease effect; no long term effect on lung function	Ahola et al.[167]; Sandberg et al.[166]
rhSOD	CuZnSOD	No decrease in death or BPD; survivors with less pulmonary disease burden in infancy	Davis et al.[165]
Selenium	Enzyme co-factor supplementation	No disease effect	Darlow et al.[162]
Vitamin A	Supplementation	Decreased incidence of BPD No pulmonary effect at 18–22 months	Ambalavanan et al. [163]; Tyson et al. [164]
Vitamin E	Supplementation	No disease effect	Watts et al. [161]
<i>NEC</i>			
L-arginine	Enzyme co-factor Supplementation		Mitchell et al.[175]
<i>Neurodevelopment</i>			
Inhaled NO	NO	No effect for preventing IVH	Askie et al.[172]
Melatonin	GSH, MnSOD, ecSOD		Aly et al. [176]
Vitamin A	Supplementation	No developmental effects at 18–22 months	Tyson et al. [164]

Figura 7. Tabla resumen de los estudios realizados con la administración de antioxidantes en la prevención de patologías en la época neonatal (1).

2.4.4 ESTRÉS OXIDATIVO Y DAÑO PULMONAR

Al hablar de daño tisular secundario al estrés oxidativo, los pulmones cobran un especial protagonismo. Los pulmones están directamente expuestos a altos niveles de oxígeno. En modelos experimentales, se ha visto que el exceso de oxígeno causa toxicidad pulmonar, viéndose a nivel experimental estadios típicos del daño pulmonar agudo. (3) (110)

El daño pulmonar inducido por hiperoxia (18), se caracteriza por una respuesta inflamatoria con destrucción de la barrera alveolo-capilar, seguida de muerte celular. Tras una breve exposición al oxígeno, las células endoteliales mueren rápidamente, dejando áreas desnudas en la membrana basal de los capilares. Esta disrupción de la membrana alveolo capilar, lleva a un edema de los alveolos, causando alteraciones de la mecánica pulmonar y el intercambio gaseoso (111). Tras este edema pulmonar y el proceso inflamatorio acompañante, se produce una inflamación pulmonar crónica. Tras ello se producirá la muerte celular (112).

Sin embargo, existe una diferencia importante entre la respuesta a la hiperoxia en el recién nacido y en el adulto. Animales recién nacidos, sobreviven el doble que los adultos en hiperoxia y tienen un inicio más tardío de la inflamación secundaria. Sin embargo, el daño inducido por hipoxia en el periodo neonatal, se produce en un pulmón en pleno desarrollo. Los estudios animales de daño pulmonar crónico inducido por la hiperoxia, muestran cambios morfológicos similares a los que se producen en la DBP. (113)

Se han estudiado varios mediadores asociados al daño pulmonar por hiperoxia, que se han visto alterados en recién nacidos prematuros con patología pulmonar, como son IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TGF β , TNF- α y VEGF (18). IL-1 β , IL-6 están particularmente activos en la fase aguda de respuesta al daño, viéndose elevados en fases tempranas de los recién nacidos prematuros que posteriormente desarrollan DBP (114).

2.4.5 ESTRÉS OXIDATIVO Y SINDROME DE DISTRÉS RESPIRATORIO NEONATAL (SDR)

El SDR neonatal (antes llamado enfermedad de membrana hialina) es la enfermedad respiratoria más frecuente en los recién nacidos prematuros. Éste es debido a un nacimiento en fase de desarrollo pulmonar canalicular tardía o sacular precoz con una escasa producción de surfactante a nivel de los neumocitos tipo II. Además, el nacimiento por cesárea y la infección también tienen un papel importante en su desarrollo, sobretodo en los recién nacidos prematuros tardíos.

Existe una creciente evidencia de que el estrés oxidativo a través de cambios inflamatorios agudos (alteración de la membrana alveolo capilar, edema pulmonar, incluso muerte celular) puede ser un componente importante en el daño que se produce en el SDR neonatal. (115) Por un lado los recién nacidos prematuros, es más frecuente que precisen una concentración de O₂ por encima de 21% en la reanimación en sala de partos. Incluso un periodo corto (2 horas) de exposición a hiperoxia lleva a una inflamación pulmonar (116). Además, el hecho de que los recién nacidos prematuros tengan unos niveles más bajos de defensas antioxidantes, los hace más vulnerables a este daño, con una mayor predisposición a este síndrome de distrés respiratorio.

La coriomionitis también está asociada al desarrollo SDR. En esta situación de inflamación, se produce entre otros una activación de los neutrófilos, los cuales general ERO y liberan enzimas proteolíticas, produciendo daño a nivel de la permeabilidad vascular pulmonar. Los episodios de hipoxia y reoxigenación, muy frecuentes en recién nacidos prematuros, causan a su vez activación de neutrófilos.

TNF- α y otros mediadores inflamatorios, han sido identificados en el lavado broncoalveolar de niños con SDR neonatal y BDP. (117) (118)

Otro factor de riesgo asociado al desarrollo de SDR es la diabetes materna, que como hemos explicado anteriormente, es una situación que se asocia a un aumento de la generación de ERO.

A nivel clínico, la administración de surfactante intratraqueal, es uno de los principales tratamientos utilizados en el SDR neonatal. El surfactante, por todos es sabido que mejora la mecánica pulmonar, reduciendo la tensión superficial a nivel alveolar, pero también juega un papel importante como antiinflamatorio y antioxidante. En modelos animales, se ha visto que la administración de surfactante reduce el daño inducido por hiperoxia (119) y produce un aumento significativo del contenido de SOD en los neumocitos tipo II. (120). Además, de ver en los aspirados traqueales de recién nacidos con SDR una reducción de los marcadores de estrés oxidativo tras el tratamiento con surfactante. (121) Al analizar los surfactantes naturales utilizados en el tratamiento del SDR se ha comprobado que existe actividad de SOD y CAT. (122). Por tanto, el surfactante estaría actuando como defensa frente al estrés oxidativo.

2.4.6 ESTRÉS OXIDATIVO Y DISPLASIA BRONCOPULMONAR

La DBP es una de las morbilidades más importantes en los prematuros. Es además la causa más frecuente de enfermedad pulmonar en la infancia. La incidencia está en un 43% de los recién nacidos prematuros de menos de 28 semanas. (123) Se caracteriza por la detección del desarrollo pulmonar, la simplificación alveolar, unos vasos sanguíneos dañados, y un desarrollo y función pulmonar dañados (124).

Dicha patología es el resultado del daño pulmonar causado por múltiples factores en un pulmón en desarrollo. Entre dichos factores se encuentran factores genéticos, hemodinámicos, metabólicos, nutricionales, mecánicos e infecciosos, que actúan de manera sinérgica (125). No sólo influyen factores postnatales si no también estresores intraútero como la inflamación en la placenta o la corioamnionitis (126). La formación de radicales libres es ampliamente reconocida como la principal causa de daño pulmonar en prematuros (127).

En los recién nacidos prematuros confluyen muchos factores que predisponen al daño pulmonar y el consecuente desarrollo de DBP, la inmadurez del sistema antioxidante, la desnutrición, la inflamación, la ventilación mecánica y la exposición a altas concentraciones de oxígeno durante largo tiempo (128). Pero, también una breve exposición a altas concentraciones de oxígeno puede iniciar el daño pulmonar que deriva en displasia broncopulmonar (79).

La inflamación juega un papel importante en el desarrollo de DBP, tal y como se ha visto en diversos estudios. Tanto la infección como la inflamación derivada de la ventilación mecánica provocan la liberación de citoquinas pro inflamatorias tales como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 (125). Pero la asociación entre inflamación y estrés oxidativo se debe sobretodo a la activación de células inflamatorias en especial los granulocitos, los cuales liberan radicales libres y proteasas para eliminar las bacterias pero que provocan también peroxidación del endotelio capilar, aumentando su permeabilidad, con el consiguiente edema. Los granulocitos producen en una primera instancia O_2^- y

posteriormente otros radicales libres como H_2O_2 , OH^- o $HClO$. Estas sustancias luchan contra los gérmenes pero favorecen el daño tisular. Estas células inflamatorias además dañan el surfactante (129). También se ha visto que estas citoquinas pro inflamatorias contribuyen a la formación de $ONOO^-$, el cual contribuye al daño y al consiguiente desarrollo de displasia (130).

Como se ha comentado previamente, la exposición del pulmón a altas concentraciones de oxígeno provoca cambios a nivel vascular, alveolar e incluso de su mecánica. Los cambios producidos se ha visto que se mantienen en el tiempo y son aún mayores cuanto más tiempo de exposición haya.

Los cambios iniciales de edema e inflamación aguda van decreciendo, aunque persista la exposición al oxígeno, pero si que existe una inflamación crónica que perdura. (18)

El papel del estrés oxidativo en el desarrollo de DBP está apoyado por muchos datos de trabajos previos realizados. Las fuentes de radicales libres que contribuyen a este daño en los prematuros son la inflamación, episodios de hipoxia-hiperoxia, la isquemia, la hiperoxia mantenida, la ventilación mecánica, que se suman a que estos niños tienen reducidos sus niveles de antioxidantes.

Se ha visto que los prematuros con DBP tienen mayores niveles de oxidación a lípidos y carbonilación de proteínas que los que no desarrollan DBP (131).

Se ha encontrado una correlación positiva entre la duración de la suplementación con oxígeno y la ventilación mecánica y los niveles de peroxidación lipídica (132), así como los niveles de 3-nitrotirosina que se correlacionaron con la FiO_2 que requerían los niños (133). La carbonilación de las proteínas se ha visto también aumentada en los niños que requirieron más de 40% de concentración de oxígeno y que los niños que desarrollan DBP presentan mayores niveles de carbonilación (134)(135).

También hay mayores niveles de 8-isoprostano exhalado en adolescentes ex prematuros con antecedentes de DBP, poniendo en evidencia la persistencia

del estrés oxidativo años después, y sugiriendo que la patología respiratoria residual que padecen no es solo debida a un daño estructural estable. (136)

El estrés oxidativo también daña el surfactante, como hemos dicho, inactivándolo a través de la oxidación de sus proteínas, y a través de la inflamación y el edema de los alveolos (137).

En cuanto a la remodelación y fibrosis del tejido pulmonar que se produce en esta patología, juegan un papel importante las metaloproteínas, las cuales están aumentadas por el estrés oxidativo (137).

El estrés oxidativo, además, se ha visto que provoca cambios de expresión de genes y cambios a nivel epigenético. En estudios realizados en ratones, se estudiaron genes relacionados con la patología vascular pulmonar y el daño pulmonar por hiperoxia, mostrando diferencias a nivel de su regulación. El daño oxidativo puede ser el responsable de la mayor susceptibilidad de los niños prematuros con DBP a virus respiratorios a través de la alteración de vías genéticas relacionadas con la inflamación y la inmunidad. (138)

Los cambios epigenéticos que se producen por el estrés oxidativo son debidos sobretudo a la metilación del ADN y la modificación de histonas. El OH^- puede dañar directamente las bases de ADN, provocando cambios en la transcripción de genes (139). En pacientes con DBP se ha visto diferente metilación en 32 genes cuando se comparan con controles, incluyendo genes implicados en la detoxificación mediada por GSH (140). En modelos de DBP (hiperoxia) en ratones se vio una hipermetilación global en los homogenados de pulmón (141).

Un estudio realizado por nuestro grupo en recién nacidos, mostro cambios en la metilación del ADN según la cantidad de oxígeno que recibieron en la reanimación. Estos cambios se observaron en vías implicadas en reparación de ADN, estrés oxidativo y progresión del ciclo celular. (142)

Con la idea de disminuir el daño pulmonar que se produce en prematuros, se han realizado estudios administrando antioxidantes como la vitamina A, la vitamina E y SOD humana recombinante (rh-SOD). En un meta análisis se sugiere que la vitamina A reduce la DBP pero no hay diferencias en el desarrollo neurológico y la patología pulmonar a los 18-22 meses de edad corregida. (109) (143) Aunque la administración de rh-SOD no disminuyó la incidencia de muerte o DBP, al año si que se vio una disminución de la patología pulmonar. (144) Otras terapias estudiadas como la n-acetilcisteína, oxido nítrico inhalado, L-arginina, no han mostrado ser beneficiosos. Un tratamiento prometedor en la melatonina, que es un antioxidante, antiapoptótico y antiinflamatorio. Como se ha comentado en apartados previos, la falta de sólida evidencia en humanos hace que no pueda ser recomendado el uso de ningún antioxidante en los cuidados rutinarios de los recién nacidos prematuros. (1)

3 OBJETIVOS

El objetivo general de la presente tesis doctoral es evaluar el efecto protector a nivel pulmonar de un nacimiento en hipoxia preconditionante frente a un insulto hiperóxico con 100% de oxígeno en crías de ratón recién nacidas.

Los objetivos específicos son:

1. Determinar biomarcadores de estrés oxidativo para evaluar el efecto de la hipoxia preconditionante frente a un insulto hiperóxico con 100% de oxígeno en crías de ratón recién nacidas.
2. Analizar el estado redox, defensa antioxidante e inflamación a nivel pulmonar de ratones sometidos a una hipoxia preconditionante frente a un insulto hiperóxico con 100% de oxígeno en crías de ratón recién nacidas.
3. Estudiar a nivel histológico el estado del parénquima pulmonar y de muerte celular de ratones sometidos a una hipoxia preconditionante frente a un insulto hiperóxico con 100% de oxígeno en crías de ratón recién nacidas.

4 METODOLOGÍA

4.1 Animales de experimentación

Para el modelo experimental se utilizaron hembras gestantes de la cepa de ratón C57BL/6, en el día de gestación 19 (G19) y, tras realizar la intervención que se describe en el siguiente apartado, ratones recién nacidos a día 1 (P1) y día 7 (P7) postnatal.

Los animales se mantuvieron en todo momento en el animalario de la Facultad de Farmacia del *Servei Central de Suport a la Investigació Experimental* (SCSIE; Universitat de València) bajo condiciones de temperatura ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$), humedad relativa (60%) y ciclos de luz/oscuridad (12/12h) constantes. Se alimentaron con una dieta de laboratorio estándar y agua corriente *ad libitum*.

El protocolo de experimentación y el manejo de los animales han sido realizados de acuerdo con las normas de experimentación animal de la Universitat de València y Consellería de Presidencia y de Agricultura, Pesca, Alimentación y Agua (Comunitat Valenciana, España) bajo el procedimiento de experimentación animal aceptado con código 2015/VSC/PEA/00106 tipo 2.

4.2 Modelo experimental

El modelo experimental del trabajo realizado tiene como objetivo simular la transición fetal neonatal (TFN), en condiciones controladas a una determinada concentración de oxígeno.

En el mismo, una vez se produce el nacimiento de las crías de ratón, se simula un insulto hiperóxico con un aumento de la concentración de oxígeno a 100% o $FiO_2 = 1.0$ y posterior paso a aire ambiente (21% / $FiO_2 = 0.21$).

Para poder llevar a cabo el modelo experimental fue necesaria una cámara de “oxigenación controlada”. Este ha sido un elemento imprescindible para el desarrollo del modelo murino de TFN con variación de la FiO_2 . En estudios experimentales preliminares realizados en colaboración con el Prof. J Belik (Respiratory Research Laboratory; University of Toronto, Canadá), se utilizaron cámaras de hipoxia comerciales (Oxycycler Salas; Biospherix®; Lacona, NY, EE.UU) para realizar los experimentos con el modelo de TFN (145), pero dadas las limitaciones para desarrollar este trabajo, el IP del Grupo de Investigación en Perinatología (Instituto de Investigación Sanitaria La Fe; Valencia), Dr. Máximo Vento decidió diseñar una cámara que cubriera todas las necesidades experimentales del proyecto y además mejorar las ya existentes en el mercado. En ella es posible programar tanto la concentración de oxígeno durante un periodo de tiempo determinado, controlando la humedad y temperatura. Además, incluye una cámara infrarroja, con la que se puede controlar el momento exacto del nacimiento de las crías de ratón para después realizar la intervención a la misma hora en todos los grupos, así como revisar cualquier incidencia, puesto que el nacimiento se produce en condiciones normales por la noche.

A modo de resumen, en la figura 8 se describen los grupos control y experimentales, describiendo esquemáticamente la intervención realizada, explicada con más detalle a continuación.

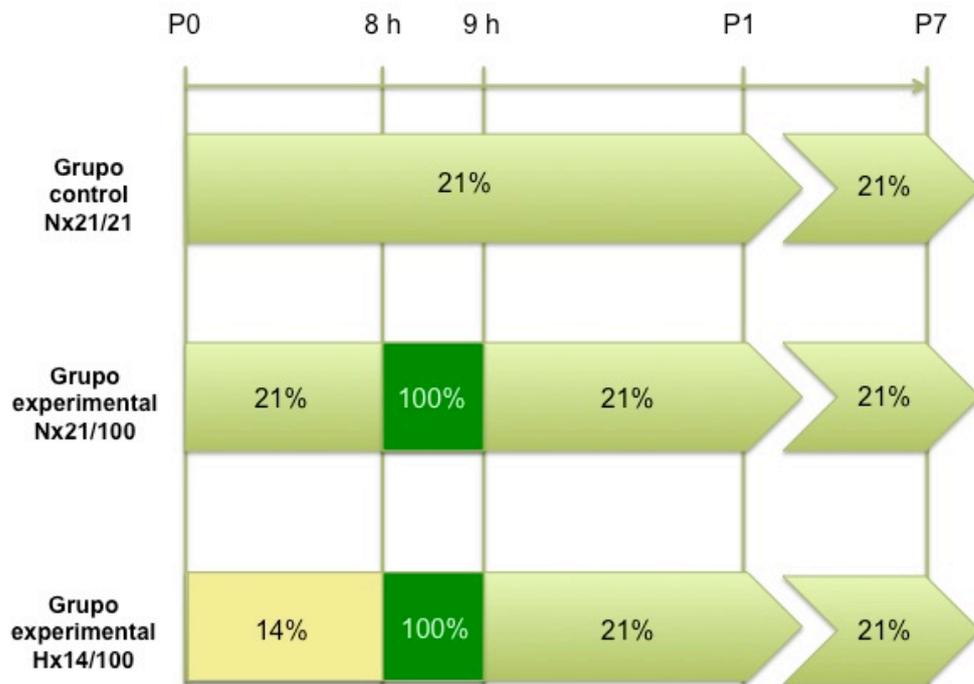


Figura 8. Esquema del modelo experimental. Esquema que representa el grupo control y los grupos experimentales del modelo experimental murino de TFN bajo diferentes concentraciones de oxígeno y reanimación posterior.

El modelo experimental de TFN consta de un grupo control y dos grupos experimentales. En el G19, las hembras son colocados en la cámara de oxigenación controlada, de manera que el parto se produce en las diferentes concentraciones de oxígeno según el grupo al que pertenezcan. En función del grupo al que pertenezcan el nacimiento y la TFN será a una concentración de oxígeno del 21% o bajo condiciones hipóxicas $FiO_2=0.14$.

A continuación, se detalla la intervención realizada en cada uno de los grupos:

- i. El grupo control se denomina **Nx21/21**. En este grupo la TFN se produce en una atmósfera con una $FiO_2=0.21$ (21% de oxígeno). Unas crías se mantienen en estas condiciones hasta P1 y otras hasta P7, momento en el que se sacrifican para obtener los pulmones.

- ii. El primer grupo experimental se denomina **Nx21/100**. El nacimiento se produce con una $FiO_2=0.21$ también, pero a las ocho horas del nacimiento se incrementa la $FiO_2=1.0$ (100% de oxígeno) durante una hora. A continuación, se vuelve a una $FiO_2=0.21$ 23 horas, momento en el que se sacrifican (P1) o se dejan hasta P7, sacrificándose entonces para la obtención de los pulmones.
- iii. El segundo grupo experimental se denomina **Hx14/100**. En este grupo el nacimiento tiene lugar bajo una atmósfera hipóxica con una $FiO_2=0.14$, a las 8 horas del nacimiento, las crías de este grupo sufrirán un insulto hiperóxico durante una hora de una $FiO_2=1.0$. Luego volverán a una $FiO_2=0.21$ y serán sacrificadas a P1 y a P7, como en los otros 2 grupos.

En los 3 grupos, los ratones recién nacidos son sacrificados, a las 32 horas del nacimiento (24 horas después del insulto hiperóxico) a P1 y otros se sacrifican a P7 (figura 8). La técnica de sacrificio fue a través de decapitación, para la obtención posterior de los pulmones, los cuales se ultracongelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, para posteriormente ser almacenados para su posterior análisis en un ultracongelador a $-80^{\circ}C$. Para el estudio histológico a nivel pulmonar, tanto los ratones a P1 como a P7 se les realizó una perfusión intracardiaca. Las crías se anestesiaron con Ketamina/xilacina (10 mg/Kg) mediante punción intraperitoneal y posteriormente se les perfundió con solución salina al 0.9% seguido de fijador, paraformaldehído (PFA) al 4%.

Los pulmones obtenidos se emplearon para estudios moleculares e histológicos que se detallarán a continuación.

4.3 Determinaciones Experimentales

4.3.1 Determinación de biomarcadores por UPLC-MS/MS

4.3.1.1 Fundamento

Una gran parte de las determinaciones de biomarcadores realizadas con los pulmones obtenidos en este modelo experimental fueron analizadas por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de espectrometría de masas (UPLC-MS/MS). El equipo consta de un espectrómetro de masas triple cuadrupolo, Waters Acquity UPLC-XevoTQsystem (Milford, MA, EEUU) con una fuente de ionización Z-spray operando en modo positivo (ESI+). Para el manejo del equipo y el procesado de datos utilizamos el programa informático MassLynx 4.1 (Waters corporation, Manchester, UK).

Esta técnica se basa en la combinación de la capacidad de separación física de la cromatografía líquida con la capacidad del análisis de masa de la espectrometría de masas. Es una técnica que tiene una elevada sensibilidad y selectividad. Además es muy utilizada en diversas aplicaciones tanto experimentales como clínicas.

Su principio básico es la generación de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa que son separadas en base a su relación masa-carga (m/z) y posteriormente detectados por medio de un dispositivo adecuado.

EL equipo de UPLC-MS/MS está constituido por seis componentes básicos: el Sistema de introducción de muestras (UPLC), la fuente de ionización, el primer cuadrupolo (Q1), la cámara o celda de colisión (Q2), el tercer cuadrupolo (Q3) y el detector

El primero de los componentes, el sistema de introducción de muestra es la UPLC. La muestra se introduce por medio de una varilla metálica, en cuya punta tiene un capilar que contiene la muestra (figura 2). Una vez introducida, sufre una ionización por electro-spray (ESI) para adquirir carga. Tal ionización

puede tener lugar en modo positivo (se generan de cationes) o negativo (se generan de aniones).

Posteriormente pasa al Q1, el cual mantiene fija la relación m/z del ión padre. Luego pasa a Q2, y gracias a la energía de colisión se fragmenta el ión padre y los diferentes fragmentos obtenidos (iones hijos) entran en el Q3, que está fijo a la relación m/z del fragmento mayoritario y, por tanto, solo atraviesa este cuadrupolo el fragmento mayoritario. Para finalizar, el detector registra la cuenta total de iones (TIC) (figura 9).

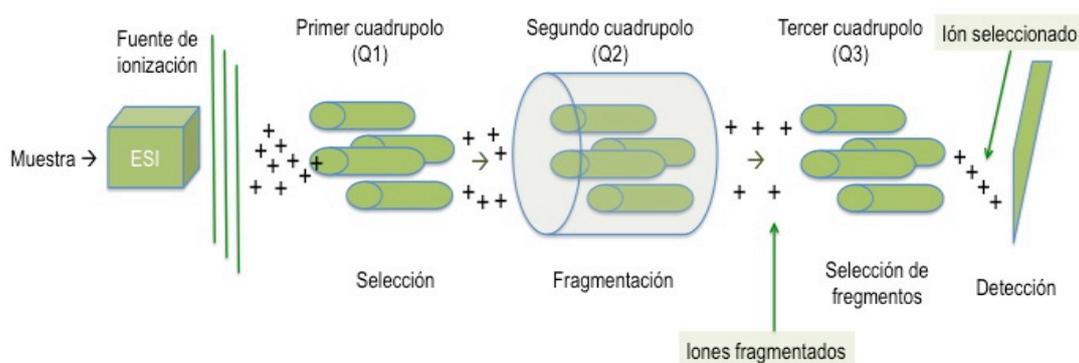


Figura 9. Esquema del funcionamiento de la espectrometría de masas triple cuadrupolo.

4.3.1.2 Determinación de metabolitos de la vía de la transulfuración

El glutatión (GSH), la L-cisteína, cistationina, homocisteína y γ -glutamyl-cisteína fueron determinados mediante HPLC-MS/MS en el tejido pulmonar a P1, usando un método validado previamente por nuestro grupo. (28)

El tejido pulmonar congelado es inicialmente homogenado en 10mM PBS-NEM (N-ethylmaleimide) siguiendo una proporción de 100 mg de tejido en 400 μ l. Después, se precipitan las proteínas de la muestra con una solución de ácido

perclórico (8% v/v). A continuación, se centrifugan las muestras a 10000 g durante 10 minutos a 4°C.

El sobrenadante es separado y diluido (1:10) en H₂O (0.1% v/v HCOOH). Después se añaden 5 µL de una solución de patrón interno (PI) (cisteína-D4 200 µmol L⁻¹, fenilalanina-D5 12.5 µmol L⁻¹ y GSH-C13N15 100 µmol L⁻¹ a 95 µL del sobrenadante diluido. La solución final resultante es la que se inyecta en la HPLC-MS/MS. (28)

4.3.1.3 *Biomarcadores de oxidación lipídica*

El daño oxidativo en pulmón se evaluó determinando los siguientes biomarcadores de peroxidación de lípidos 8-iso-15-keto-PGE₂, 8-iso-15-keto-PGF_{2α}, PGE₂, 8-iso-PGE₂, 8-iso-PGF_{2α}, PGF_{2α} y los valores totales de Isoprostanos e Isofuranos.

Para su determinación se utilizó el sistema Waters Acquity UPLC-Xevo TQD system (Milford, MA, USA), siguiendo los protocolos descritos previamente y validados por nuestro grupo. (146).

El tratamiento de la muestra se basó en homogeneizar (Fisherbrand model 125, FSH-G 5/085, Fisher Scientific, Waltham, USA) los pulmones congelados en 1 mL de hidróxido sódico metanólico (NaOH-Met) durante 30 minutos a 42°C. A continuación, se cogieron 400µL del homogenado, 800 µL de H₂O y 400 µL of NaOH-Met y se calentaron durante 45 minutos a 42°C, posteriormente se enfriaron 10 minutos en hielo. Después, la solución se ajustó a un pH=3 con 3M HCl y se centrifugó a 3500 rpm. Una vez obtenido el sobrenadante, se realizaron las extracciones L/L en las cuales se añadió 3 mL de hexano y se centrifuga otra vez durante 5 minutos a 3500 rpm. Se retiró el sobrenadante y se añadió 3 mL de acetato de etilo. El sobrenadante se recogió y se evaporó con nitrógeno gaseoso en una campana extractor. La muestra resultante se resuspendió en 200µl de una mezcla de 15 mL de etanol, 85 mL de H₂O y 10µl de ácido acético y se analiza mediante UPLC-MS/MS.

4.3.1.4 *Biomarcadores de oxidación proteica*

La oxidación a proteínas se midió calculando los ratios meta-tirosina/fenilalanina (m-Tyr/Phe), orto-tirosina/fenilalanina (o-Tyr/Phe), 3-nitro-tirosina/para-tirosina (3NO₂-Tyr/p-Tyr), y 3-cloro-tirosina/para-tirosina (3Cl-Tyr/p-Tyr).

Los pulmones congelados se homogenaron con un tampón de lisis (100 mg/ml). Después, las proteínas se precipitaron con TCA (10%, v/v), y los pellet se resuspendieron en acetato de sodio (50 mmol/L, pH7.2) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A continuación, la digestión de las proteínas de los extractos de pulmón se llevo a cabo según el método Hensley (147) y la actividad de la pronasa se inhibió mediante TCA. Para finalizar, las muestras se centrifugaron a 5000 rpm, a 4°C, durante 5 minutos y el sobrenadante de cada muestra se inyectó en el HPLC-MS/MS, según Torres-Cuevas et al (148).

4.3.2 Análisis de la expresión de ARNm de genes involucrados en la respuesta antioxidante e inflamación

4.3.2.1 Aislamiento de ARN

Para el análisis de expresión génica se extrajo ARNm del tejido pulmonar. Se utilizó un kit de extracción de ARN, RNeasy Mini kit 50, (Qiagen, Heidelberg, Alemania), siguiendo el protocolo del fabricante.

4.3.2.2 Retrotranscripción-amplificación del ARN

El siguiente paso para obtener la expresión de los genes de interés para el trabajo, una vez se extrae el ARN mensajero (ARNm) total, es realizar una retrotranscripción, que consiste en obtener ADN complementario (ADNc) a partir ARNm. A continuación, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se amplifica el ADN utilizando sondas Taqman para cada uno de los genes a estudiar.

La PCR es una técnica que consta de varias etapas. Al principio se utilizan altas temperaturas para activación de ADN polimerasas y desnaturalización del ADN (95°C durante 30 segundos). A continuación, se realiza la hibridación de *primers* a temperatura de *melting* alrededor de los 60°C, durante 30 segundos. Por último, se realiza la elongación, en dirección 5'→3' a velocidad de 1000 pb/minuto (72°C).

El siguiente paso es realizar la retrotranscripción del ARN a ADNc mediante retrotranscriptasas. El kit utilizado es el *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit*® de Thermo Scientific (Waltham, USA) durante 50 minutos a 42°C, utilizando como cebador hexámeros aleatorios. Para inactivar la enzima se incubó la muestra durante 15 minutos a 70°C.

4.3.2.2.1 Análisis del ADN complementario por PCR cuantitativa

Utilizando la técnica PCR se amplificó el ADNc utilizando sondas Taqman para cada uno de los genes. La expresión de cada uno de los genes se cuantificó mediante el análisis por PCR en tiempo real utilizando un termo-ciclador con un sistema de detección de fluorescencia *iQTM5 Multicolor Real-Time PCR*

Detection System (Bio-Rad, California, EEUU), las curvas de fusión se construyeron con el programa *iQ Real Time Detection System Software* (Bio-Rad, California, USA), para asegurar que sólo se amplifica un único producto de PCR y el sistema de sondas fluorescentes con especificidad génica TaqMan® (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) (Tabla 1). Como gen de referencia se utilizó el Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*gapdh*).

Las condiciones de amplificación fueron 1 ciclo de desnaturalización de 10 minutos a 95°C y después 40 ciclos de 15 segundos de desnaturalización a 95°C, 30 segundos a 60-64°C como temperatura de anillamiento, y 30 segundos de elongación a 72°C.

Gen	Sonda
<i>cat</i>	Mm00443258_m1
<i>cbs</i>	Mm00443258_m1
<i>gapdh</i>	Mm99999915_g1
<i>il-1β</i>	Mm00434228_m1
<i>il-6</i>	Mm00446190_m1
<i>sod</i>	Mm00443258_m1
<i>tnf-α</i>	Mm00443258_m1

Tabla 1. Sondas Taqman para la cuantificación de ARNm por RT-PCR

4.3.2.3 Procesado de los datos

La expresión relativa de ARNm se calculó utilizando el umbral de amplificación (CT) de cada gen empleando las siguientes fórmulas:

- $\Delta CT = CT \text{ gen problema} - CT \text{ gen control}$
- $\Delta(\Delta CT) = \Delta CT \text{ gen problema} - \Delta CT \text{ promedio de grupo control}$
- Expresión relativa = $2^{-\Delta(\Delta CT)}$

4.3.3 Estudio histológico en secciones de tejido pulmonar

4.3.3.1 Fundamento inmuno-histoquímica

La inmunohistoquímica es una técnica que permiten detectar moléculas en los tejidos empleando anticuerpos. Debido a la gran especificidad y a alta afinidad que tienen los anticuerpos para reconocer moléculas y unirse a ellas, podemos detectar cantidades ínfimas de moléculas presentes en el tejido.

4.3.3.2 Procedimiento

Para el estudio histológico a nivel pulmonar, tanto los ratones a P1 como a P7 se les realizó una perfusión intracardiaca tal y como se indica en el apartado del modelo experimental. Una vez perfundido el animal se decapitó y se extrajo el pulmón, el cual se postfijó por inmersión durante 24 h en el fijador, realizándose lavados con PBS. Después, se deshidrataron utilizando baños de etanol en concentraciones crecientes (50%, 70%, 80%, 96% y 100%) y finalmente se embebieron en parafina. Las muestras se cortaron a 10 micras con un microtomo (Leica, RM2125RT) y se colocaron en portaobjetos supergelatinizados.

Posteriormente, una vez obtenidos los cortes de tejido estos se desparafinizaron con xileno, se rehidrataron con diluciones de etanol de diferentes grados (100%, 90% y 70%). El sitio de unión al antígeno se desenmascaró con tampón de citrato (0,1 M, pH 6,0) durante 40 minutos a 94 °C. Después de enfriar en hielo, se bloquearon las peroxidasas endógenas (metanol 10 %, H₂O₂ 3 % en PBS). La permeabilización se realizó con una solución de GS-PBS-T (suero de cabra 1 %, tritón 0,4 %).

Después las muestras fueron bloqueadas con suero de cabra al 5% durante 45 minutos. Las incubaciones con el anticuerpo primario caspasa-3 cleavada (anti-CASP3 1:200, Cell Signaling, Danvers, EE. UU.) fueron de 24 horas a 4°C. Previo lavado con PBS y la solución GS-PBS-T, se pasó a la incubación con el anticuerpo secundario biotinilado (IgG anti-ratón de cabra, Vector, BA-9200) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Para anticuerpos biotinilados se hizo una amplificación de la señal con el complejo Avidina/Biotina (ABC,

Vector, Burlingame, CA, EEUU) y se reveló con 3,3'-Diaminobenzidina 0.05% (DAB, fast D4293, Sigma Aldrich) (Figura 25). A continuación, los cortes fueron contrateñidos con violeta de cresilo y deshidratados con concentraciones crecientes de alcohol etílico y aclarados en xileno, para finalmente ser montadas con EuKitt (PanReac AppliChem, Castellar del Vallès, España).

Para el análisis de datos, se tomaron imágenes de 5 campos separados entre sí en un microscopio óptico (Nikon eclipse E800, Tokio, Japón) con un objetivo de 40x y se analizaron con ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>), un programa de análisis de imágenes. Los datos se expresaron por número de células positivas/área de tejido (mm²).

4.3.3.3 *Estudio morfométrico en pulmón*

El estudio de la morfología alveolar se realizó midiendo el parámetro cuantitativo Mean Linear Intercept (MLI), como estimación del diámetro alveolar, y el otro parámetro fue el porcentaje tejido/espacio aéreo, siguiendo el método descrito por Dunnill (149). Para evaluar el daño hiperóxico potencial a la estructura pulmonar en ratones recién nacidos, se analizaron 5 campos aleatorios de cada animal con un aumento de 20x en secciones semifinas de 1,5 mm. Se tomaron cinco fotografías de campos aleatorios sobre cada pulmón. Utilizando el software ImageJ, se dibujaron 5 líneas de prueba en cada una de las imágenes y las intersecciones en estas líneas de las paredes alveolares necesarias para determinar el MLI. Además, el grosor de los tabiques alveolares expresado como porcentaje del grupo control se midió directamente sobre estas líneas.

4.3.3.4 *Tinción: Violeta de cresilo*

Para realizar la tinción, las muestras fueron desparafinadas y rehidratadas (Xilol I, Xilol II, Etanol 100°, Etanol 96°, Etanol 70°, Etanol 50° y H₂O). Los cortes se tiñeron con violeta de cresilo durante 2 min y después se deshidrataron de nuevo (H₂O, Etanol 70°, Etanol 96°, Etanol 100° y Xilol) y se montaron con Eukit. Las muestras se analizaron bajo un microscopio óptico modelo ECLIPSE E200 (NIKON, Tokyo, Japón).

4.3.4 Determinación de niveles proteicos por Western blot

4.3.4.1 Fundamento

El Western Blot es una técnica utilizada para la identificación y evaluación semicuantitativa de proteínas específicas en una determinada muestra. Para llevar a cabo esta técnica se realizan los siguientes procedimientos:

- Electroforesis. Es la migración de proteínas por aplicación de campo eléctrico a través de un gel. Se realiza en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS PAGE) en presencia de un agente reductor. Las proteínas se desnaturalizan permitiendo su separación en función de su peso molecular al aplicar el campo eléctrico.
- Electrotransferencia, que se realiza para que las proteínas sean accesibles a la detección por anticuerpos. Consiste en poner en contacto el gel de migración con la membrana de nitrocelulosa aplicando después una corriente eléctrica que llevará las proteínas desde el gel a la membrana de nitrocelulosa quedando así susceptibles para su detección por anticuerpos.
- Quimioluminiscencia. A través de ella se detecta la luz liberada por un producto excitado transitorio hacia el estado fundamental producida por la oxidación del luminol por parte del peróxido catalizado por la enzima peroxidasa, que está anclada al anticuerpo. La luz que emite a 425 nm es captada por cámaras de dispositivos de carga acoplada (CCD).

4.3.4.2 Procedimiento

Las muestras de tejido pulmonar son almacenadas a -80°C hasta la homogenización en el tampón de lisis (100 mg / ml) en hielo. La composición del tampón de lisis es la siguiente: Tris – HCl 20 mm (pH 7.5), EDTA 1 mm,

NaCl 150 mM, SDS al 0.1%, Igepal® CA al 1%, pirofosfato de sodio de 30 mM, fluoruro de sodio de 50 mM, ortovanadato de sodio de 50 mM (todos de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) y un cóctel inhibidor de la proteasa.

A continuación, las muestras fueron centrifugadas a 15.000 g durante 15 minutos, se descartó el sedimento y se determinó la concentración de proteína mediante ensayo de ácido bicinconínico (BCA) en el sobrenadante con el kit de ensayo de proteínas BCA Pierce™ (Thermo Fisher Scientific, IL, EEUU).

Determinadas las concentraciones de proteínas, se añadieron cantidades iguales de proteína al tampón de muestra con una proporción de muestra:tampón de 3:1 y después, la mezcla se calentó 5 minutos a 95°C.

Para llevar a cabo la electroforesis, se utilizó el siguiente tampón de carga: Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, glicerol al 10%, azul de bromofenol al 0,005%, SDS al 1% y DTT 50 mM y las proteínas se separaron en gel SDS-PAGE bajo voltaje constante. Después, las proteínas se transfirieron a la membrana de nitrocelulosa usando el sistema de transferencia Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.) 7 minutos, 180 V. La transferencia de proteínas se confirmó tiñendo la membrana de nitrocelulosa con tinción Ponceau S durante 30 s. A continuación, la tinción se lavó tres veces con TBS-T (Tris 20 mM, NaCl 137 mM, Tween-20 al 0,05%, pH 7,6) y la membrana se bloqueó en BSA al 5% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) diluida en TBS-T a temperatura ambiente durante 1 hora.

Después del bloqueo, la membrana se incubó durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario CBS and b-Tubulina. En la Tabla 1 resume los anticuerpos primarios utilizados en el trabajo.

Tras la incubación con el anticuerpo primario, la membrana se lavó tres veces con TBS-T y luego, se incubó con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) 1 a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios fueron usados de acuerdo con la especie de anticuerpo primario huésped y se reflejan en la Tabla 2.

Antígeno	Referencia	Especie	Dilución
CBS	Cell Signalling Technology (#9441)	Conejo	1:1000 in 5% BSA/TBS-T*
β -tubulina	Abcam (ab6046)	Conejo	1:1000 in 5% BSA/TBS-T*

Tabla 2. Anticuerpos primarios

Anticuerpo secundario	Referencia	Especie	Dilución
Anti-mouse	Cell Signalling Technology (#7076)	Caballo	1:10000 in 5% BSA/TBS-T*

Tabla 3. Anticuerpos secundarios

Para finalizar, la membrana se lavó de nuevo tres veces con TBS-T y se incubó con sustrato de transferencia Western ECL Pierce TM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.) 5 minutos a temperatura ambiente. La quimioluminiscencia se detectó con una cámara de dispositivo acoplado a carga Biorad ChemiDoc TM XRS + Molecular Imager (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.) Y LAS-3000 (Fujifilm, Minato-ku, Tokio, Japón).

4.3.4.3 Cuantificación de proteínas

Para la cuantificar las proteínas en las muestras de pulmón se empleó el Kit *Pierce BCA Protein Assay Kit*® (Thermo Scientific, Waltham, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.3.4.3.1 Fundamento

Se trata de un método colorimétrico basado en la reducción del Cu^{+2} a Cu^{+1} , en presencia de proteínas y medio alcalino (reacción de Biuret), y posterior reacción del ión Cu^{+1} con dos moléculas de ácido bicinónico (BCA), dando lugar al complejo coloreado y cuya absorbancia se mide mediante un espectrofotómetro.

4.3.4.3.2 Procedimiento

Se prepara la solución formada por el reactivo A y el reactivo B del kit. La proporción de volumen utilizada entre reactivos A:B es 50:1. Se pipetea en la placa de 96 pocillos un volumen de muestra de 3 μ L por triplicado.

Para la determinación de proteínas, se prepara previamente una recta patrón realizada con seroalbúmina bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) en concentraciones comprendidas entre 20 y 0,3125 mg/ml. El volumen de los patrones que se añade en la placa es de 3 μ L, por triplicado. Se prepara un blanco con 3 μ L agua.

Para terminar, se añaden 260 μ L de la mezcla de reactivos a la recta patrón, al blanco y a las muestras. Se incuban durante 30 minutos a 37°C, en leve agitación y oscuridad. La lectura espectrofotométrica se realiza a 562 nm de longitud de onda.

4.3.4.3.3 Cálculos

Para calcular la cantidad de proteína, se resta a cada muestra la absorbancia del blanco. Las absorbancias obtenidas se interpolan en la recta construida con los patrones y el valor obtenido se expresa como miligramos de proteína por mililitro de muestra.

4.3.5 Determinación de los peróxidos

Para la determinación de los peróxidos en este trabajo, se utilizó la espectrometría de fluorescencia. Se trata de una técnica que va a utilizar los distintos estados de energía de las moléculas para poder cuantificar la cantidad de peróxidos existentes en una determinada muestra. Un haz de luz, que excita los electrones y provoca que emitan una luz de longitud de onda diferente a la anterior.

4.3.5.1 Preparación de las muestras

Primero se homogeniza el tejido de pulmón almacenado a -80°C . Para la realización de los homogenados se utilizó una proporción de 1 mL de tampón de lisis por cada 100 mg de tejido. El tampón de lisis estaba compuesto por Tris-HCl (20 mmol/L, pH 7.5), EDTA (1 mmol/L), NaCl (150 mmol/L), SDS (0.1%, w/v), Igepal (1%, v/v), pirofosfato sodico (30 mmol/L), fluoruro sódico (50 mmol/L), ortovan sodico (50 mmol/L) e inhibidor de proteasas (4 $\mu\text{l}/\text{mL}$).

4.3.5.2 Procesamiento de la muestra.

El procesamiento se realizó según el protocolo del kit Amplex™ Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (Thermofisher, Reino Unido). Se trata de un método fluorométrico para la cuantificación de los peróxidos en el que, en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el AR que es un compuesto no fluorescente es convertido en resorufina, un producto fluorescente mediante la acción de la peroxidasa de rábano (HRP).

También se preparó una recta de calibrado de 7 puntos en dilución 1/2 donde el punto más concentrado era de 20 milimolar de H_2O_2 . Se estableció además el blanco que fue restado a las muestras.

Se deja a temperatura ambiente durante 30 minutos para que se diera lugar la reacción y a continuación, se introdujo la placa en el fluorímetro. La lectura de la misma se realizó a una longitud de onda de excitación de 530 nm y a una longitud de onda de emisión de 590 nm.

4.3.5.3 Tratamiento de los datos

Los datos obtenidos a través de esta técnica, fueron exportados al programa Excel. Se calculó la ecuación de la recta mediante el uso de la recta de calibrado, donde fueron calculadas las concentraciones de peróxido obtenidas del tejido mediante la extrapolación de las absorbancias.

Tras la medida de peróxidos, estos fueron expresados finalmente frente a la concentración de proteínas del tejido de pulmón para ello se utilizó el kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo scientific, Rockford, USA).

4.4 Análisis estadístico

Todos los resultados del trabajo se expresan como media y desviación estándar. Para el análisis de significación de las variables cuantitativas se utilizó el tratamiento estadístico ANOVA (*one-way analysis of variance*) seguido por Tukey's *post-hoc* test. Una *P* de 0,05 fue utilizado como límite para la aceptación de diferencias estadísticamente significativas.

El manejo de los resultados se realizó con la herramienta estadística del programa informático GnapPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., California, EEUU).

5 RESULTADOS

5.1 Estudio del estrés oxidativo en pulmón de crías de ratón a P1 durante la transición fetal neonatal bajo diferentes FiO_2 y posterior insulto hiperóxico.

5.1.1 Determinación de aminotioles (vía de la transulfuración)

Para la evaluación del estado oxidativo del tejido se midieron mediante UPLC-MS/MS los metabolitos de la vía de la transulfuración: homocisteína, cistationina, cisteína, γ -glutamilcisteína y glutatión reducido (GSH).

Como podemos ver en la figura 10, en los pulmones de crías a P1 hay un aumento significativo de los niveles de GSH, así como de cistationina, L-cisteína y γ -glutamil-cisteína en el grupo nacido bajo condiciones hipóxicas (Hx14/100) en comparación con los ratones nacidos en aire ambiente ($FiO_2=0.21$) (Nx21/100). Sin embargo, los niveles de homocisteína, se encontraron disminuidos en este grupo (Hx14/100) con una diferencia estadísticamente significativa restos al resto de grupos.

A la vista de estos resultados podemos indicar que el nacimiento bajo condiciones hipóxicas favorece la síntesis de GSH.

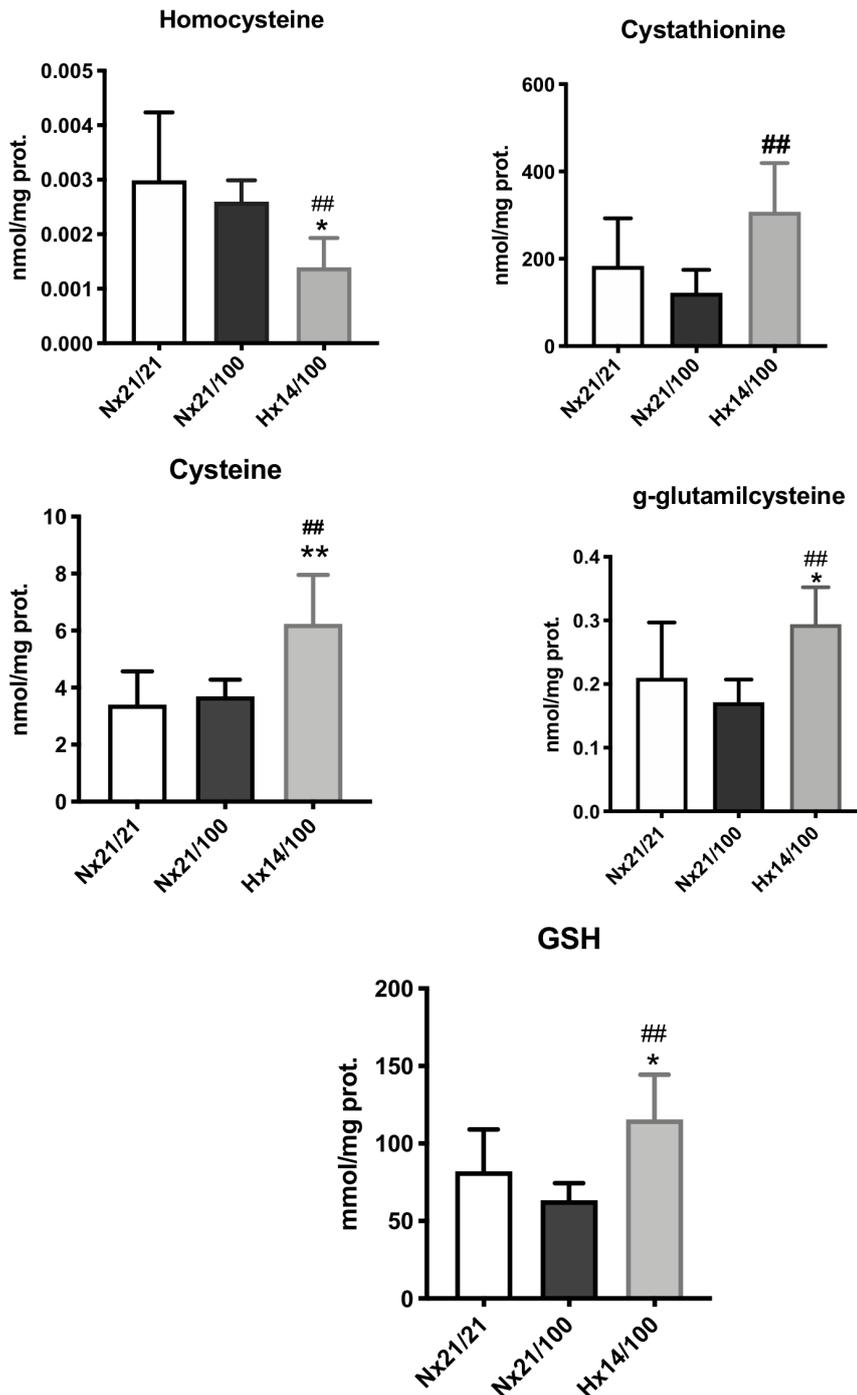


Figura 10. Determinación de los niveles de metabolitos de la vía de la transulfuración en pulmones de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO_2 : Nx21/21 grupo control en aire ambiente ($FiO_2=0.21$); Nx21/100 grupo normóxico sometido a hiperoxia ($FiO_2=1.0$); Hx14/100: grupo hipóxico ($FiO_2=0.14$) sometido a hiperoxia ($FiO_2=1.0$): Homocisteína, Cistationina, Cistina, γ -glutamil-cisteína y glutatión. Los grupos de estudio n=6. La diferencia estadística se indica como sigue: * <0.05 vs. Nx21/21, ** <0.01 vs. Nx21/21, # <0.05 vs. Nx21/100 y ## <0.01 vs. Nx21/100.

5.1.2 Niveles de expresión génica y proteica de la enzima cistationina β -sintasa (Cbs) perteneciente a la vía de la transulfuración

Al encontrar los niveles de homocisteína disminuidos en el grupo Hx14/100, al contrario que el resto de metabolitos, se determinó el grado de expresión a nivel génico de la *Cbs* a través de su ARNm y los niveles de su proteína. Esta enzima es la enzima limitante de la conversión de homocisteína en cistationina (150). Como vemos en la figura 11A, el grupo nacido bajo condiciones hipóxicas presenta un aumento significativo frente al grupo control y al grupo NX21/100. Los resultados obtenidos del análisis western blot (Figura 11B) revelan un aumento de los niveles proteicos en el grupo Hx14/100 frente al resto de grupos del estudio. Por tanto, podría explicarse el un aumento de los metabolitos de la vía de la transulfuración a partir de la cistationina visto en la figura anterior (figura 10).

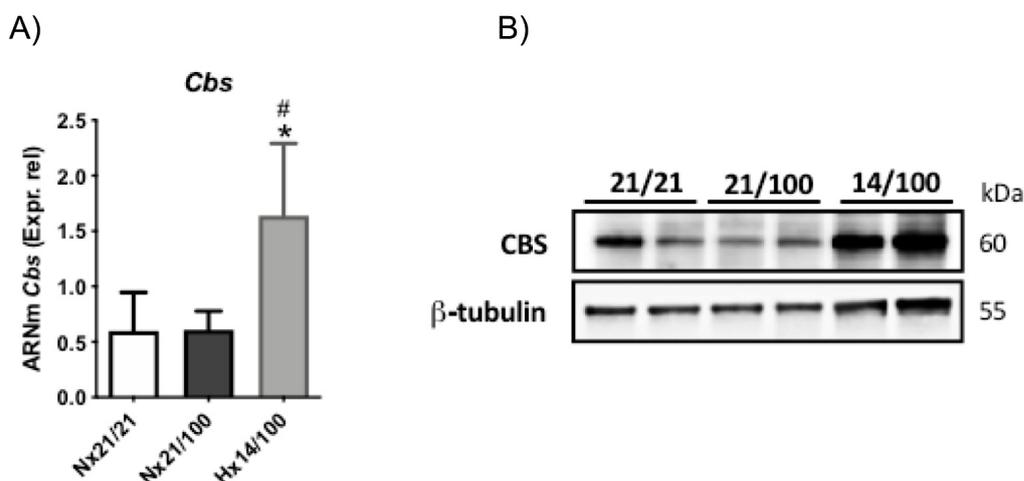


Figura 11. Determinación de los niveles de expresión génica y proteicos de CBS en pulmón de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO_2 : Nx21/21 grupo control en aire ambiente ($FiO_2=0.21$); Nx21/100 grupo normóxico sometido a hiperoxia ($FiO_2=1.0$); Hx14/100: grupo hipóxico ($FiO_2=0.14$) sometido a hiperoxia ($FiO_2=1.0$): A) Niveles relativos de ARN de *Cbs* utilizando *gapdh* como gen control (n = 4). B) Representación de western blots de la proteína CBS utilizando β -tubulina como control (n=4). La diferencia estadística se indica como sigue: * <0.05 vs. Nx21/21, ** <0.01 vs. Nx21/21, # <0.05 vs. Nx21/100 y ## <0.01 vs. Nx21/100.

5.2 Determinación de biomarcadores de daño proteico por estrés oxidativo en pulmón de crías de ratón a P1 durante la transición fetal neonatal bajo diferentes FiO_2 y posterior insulto hiperóxico: oxidación, nitración y cloración proteica

Para cuantificar el daño a proteínas en las muestras de pulmón P1, se determinaron mediante HPLC-MS/MS los ratios metil-tirosina/fenilalanina (m-Tyr/Phe), orto-tirosina/fenilalanina (o-Tyr/Phe), 3-cloro-tirosina/para-tirosina (3Cl-Tyr/p-Tyr) y 3-nitroparatirosina/paratirosina (3NO₂-Tyr/p-Tyr).

Como podemos observar en la figura 12, hay un aumento significativo de los ratios m-Tyr/Phe, 3Cl-Tyr/p-Tyr y 3NO₂-Tyr/p-Tyr en el grupo nacido bajo condiciones hipóxicas (Hx14/100) frente al Nx21/100. Excepto para el ratio o-Tyr/Phe (figura 12.B) que no se encontraron diferencias entre los grupos de estudio. Por tanto, el nacimiento bajo una $FiO_2=0.14$ parece protector a nivel proteico frente al insulto hiperóxico.

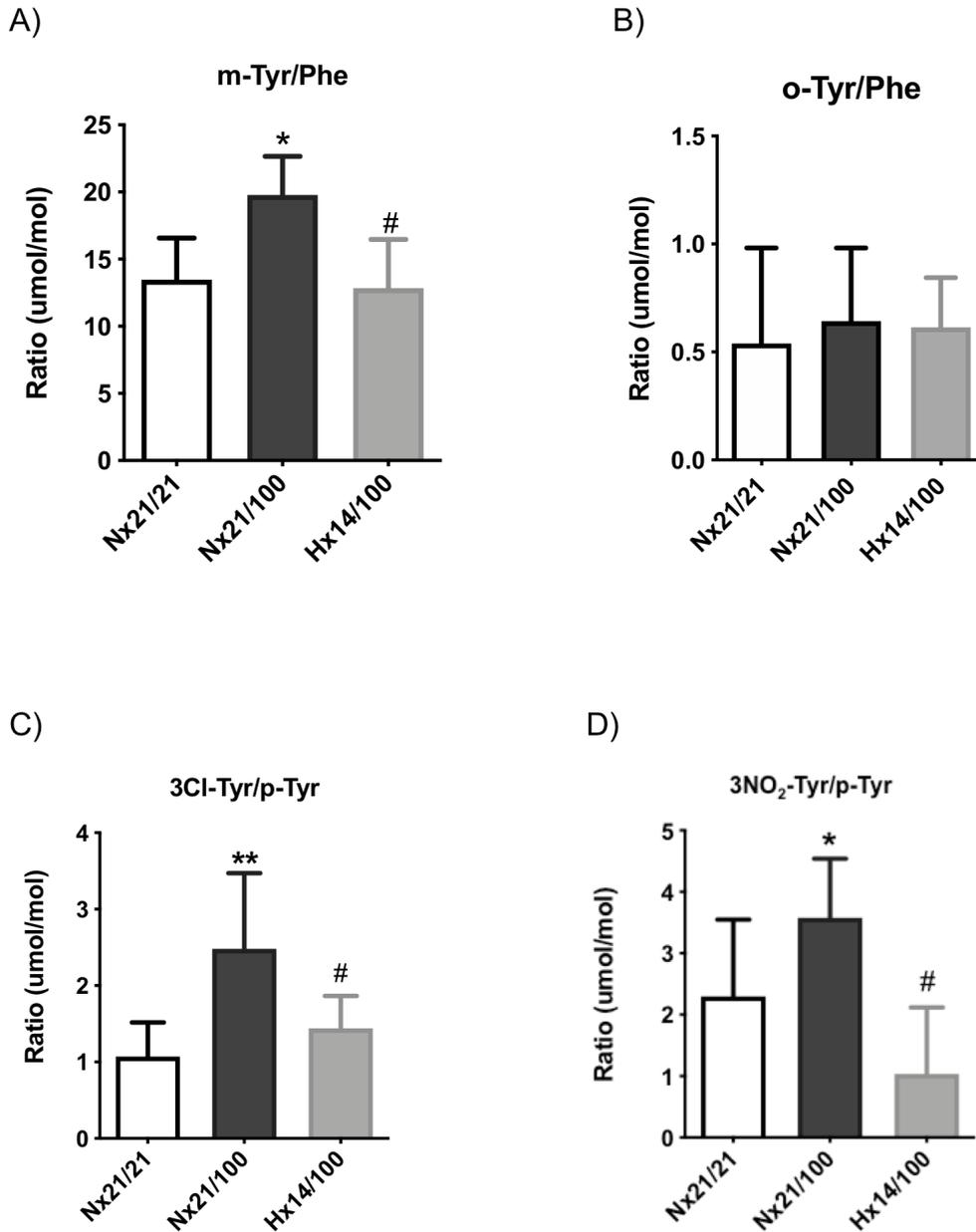


Figura 12. Determinación de daño proteico mediante los niveles de m-tyr/Phe, o-Tyr/Phe, 3NO₂-Tyr/p-Tyr y 3Cl-tyr/p-tyr en pulmón de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO₂: Nx21/21 grupo control en aire ambiente (FiO₂=0.21); Nx21/100 grupo normóxico sometido a hiperoxia (FiO₂=1.0); Hx14/100: grupo hipóxico (FiO₂=0.14) sometido a hiperoxia (FiO₂=1.0). A) Cociente m-Tyr/Phe, B) cociente o-Tyr/Phe, C) cociente 3Cl-Tyr/p-Tyr y D) cociente 3NO₂-Tyr/p-Tyr en pulmón de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO₂. La diferencia estadística se indica como sigue: *<0.05 vs. Nx21/21, **<0.01 vs. Nx21/21 y #< 0.05 vs. Nx21/100. Todos los grupos tienen n=6.

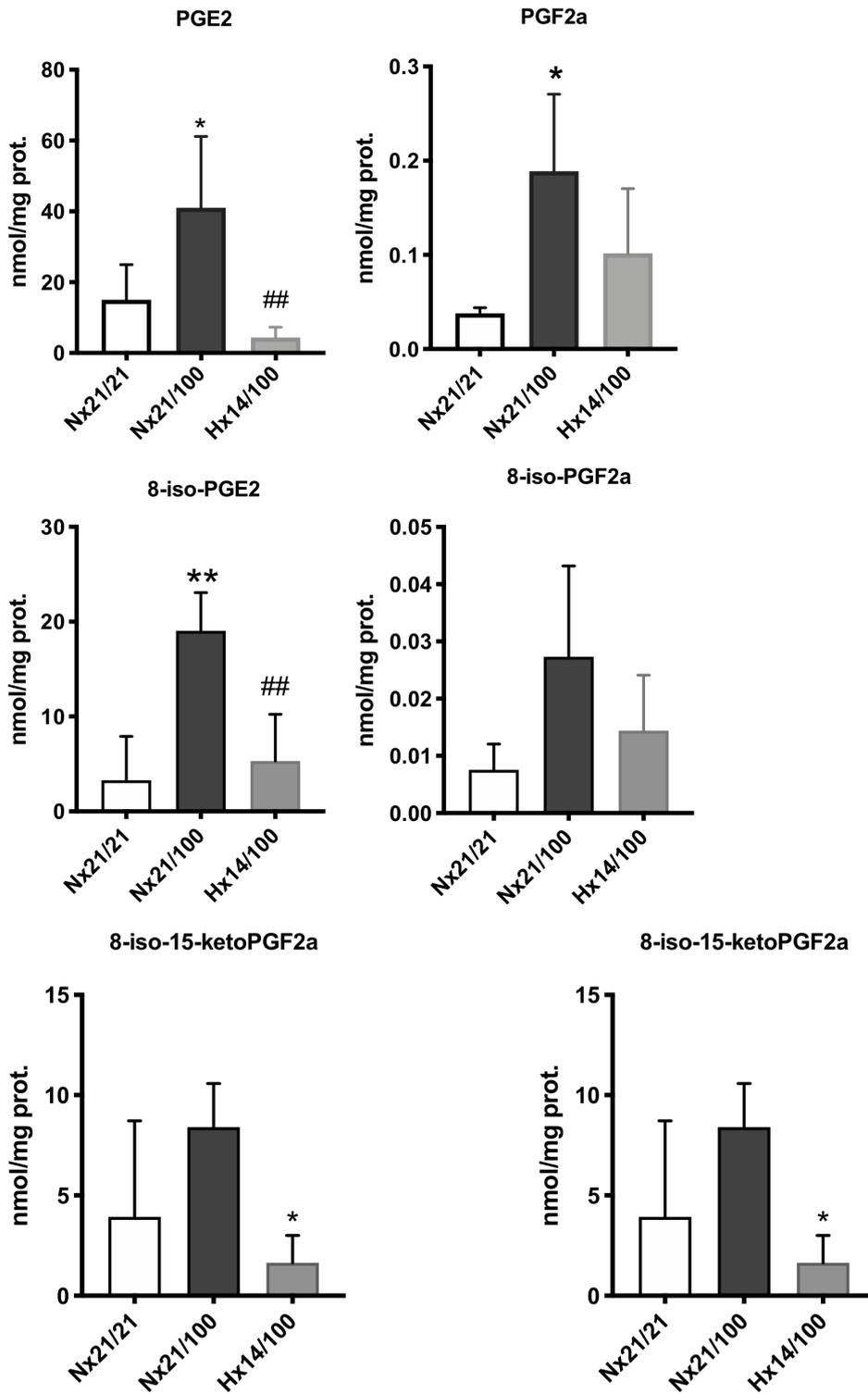
5.3 Determinación de biomarcadores de daño a lípidos por estrés oxidativo en pulmón de crías de ratón a P1 durante la transición fetal neonatal bajo diferentes FiO_2 y posterior insulto hiperóxico.

Para determinar el daño a lípidos derivado del estrés oxidativo se midieron mediante UPLC-MS/MS los niveles de los siguientes biomarcadores de peroxidación lipídica: PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, 8-iso- PGE_2 , 8-iso- PGF_2 , 8-iso-15-Keto PGE_2 , 8-iso-15-Keto PGF_2 , isoprostanos totales e isofuranos totales.

Los niveles de PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, 8-iso-15-Keto PGE_2 , isoprostanos e isofuranos totales en el grupo Nx21/100 muestran un aumento significativo con respecto al grupo Hx14/100, nacido bajo condiciones hipóxicas y al grupo control (Nx21/21) con una $p < 0,05$ y para el 8-iso- PGE_2 , la diferencia fue $p < 0,01$ (figura 13.A y 13.B).

Por tanto, el grupo que mostró mayores niveles a P1 de tales biomarcadores fue el nacido en aire ambiente con insulto hiperóxico posterior (Nx21/100), en comparación con el resto de grupos del estudio.

A)



B)

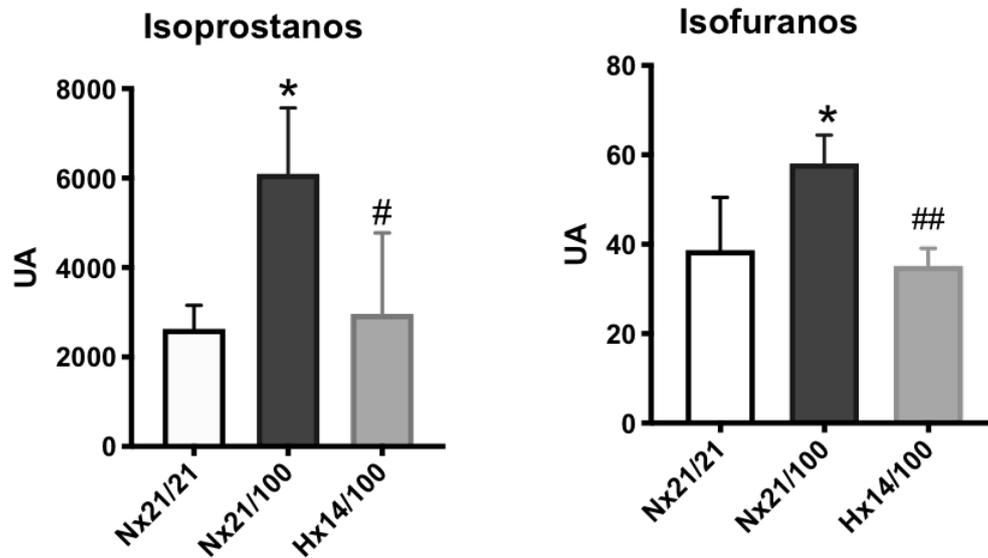


Figura 13. Determinación de daño oxidativo a lípidos en pulmón de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO_2 : Nx21/21 grupo control en aire ambiente ($FiO_2=0.21$); Nx21/100 grupo normóxico sometido a hiperoxia ($FiO_2=1.0$); Hx14/100: grupo hipóxico ($FiO_2=0.14$) sometido a hiperoxia ($FiO_2=1.0$). A) Niveles de PGE2, PGF2a, 8iso-PGE, 8iso-15-KetoPGE y B) Niveles totales de isoprostanos e isofuranos. La diferencia estadística se indica como sigue: * <0.05 vs. Nx21/21, ** <0.01 vs. Nx21/21, # <0.05 vs. Nx21/100 y ## <0.01 vs. Nx21/100. Todos los grupos tienen $n=5$.

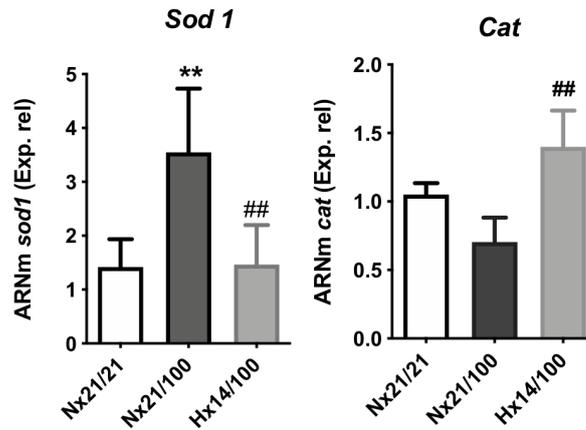
5.4 Análisis de la expresión de genes implicados en la **defensa antioxidante** y niveles de peróxidos en pulmón de crías de ratón a P1 durante la transición fetal neonatal bajo diferentes FiO_2 y posterior insulto hiperóxico.

Se midieron los niveles de expresión para las enzimas antioxidantes *Sod1* y *Cat* en las muestras de pulmón de ratones a día P1. Como vemos en las figura 14.A), los niveles de ARNm de la enzima *Sod1* muestran un aumento significativo del grupo Nx21/100, respecto al grupo Nx21/21 y al grupo nacido en hipoxia, Hx14/100.

En cuanto a la expresión relativa del ARNm de la enzima *Cat*, se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo Hx14/100 y el grupo Nx21/100, de tal manera que, en este último grupo, los niveles de expresión están disminuidos.

Respecto a los niveles de peróxidos como podemos ver en la figura 14.B), se vio una disminución estadísticamente significativa de la cantidad de peróxidos en el grupo nacido en hipoxia (Hx14/100) frente a los otros 2 grupos Nx21/100 y Nx21/21.

A)



B)

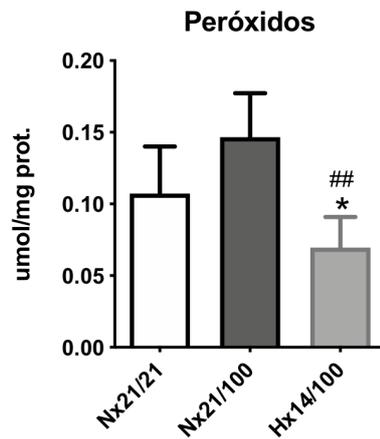


Figura 14. Expresión de ARNm de Sod1 y Cat y niveles de peróxidos en pulmón de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO_2 : Nx21/21 grupo control en aire ambiente ($FiO_2=0.21$); Nx21/100 grupo normóxico sometido a hiperoxia ($FiO_2=1.0$); Hx14/100: grupo hipóxico ($FiO_2=0.14$) sometido a hiperoxia ($FiO_2=1.0$). A) Niveles relativos de Sod1 y Cat utilizando gapdh como gen control. B) Niveles totales de Peróxidos. La diferencia estadística se indica como sigue: * <0.05 vs. Nx21/21, ** <0.01 vs. Nx21/21 y ## <0.01 vs. Nx21/100. Todos los grupos tienen $n=5$.

5.5 Análisis de genes relacionados con la **inflamación** en tejido pulmonar de crías de ratón a P1 durante la transición fetal neonatal bajo diferentes FiO_2 y posterior insulto hiperóxico.

Como parte importante del daño pulmonar por hiperoxia, se midió la expresión relativa del ARNm de genes implicados en la inflamación: el factor de necrosis tumoral ($\text{TNF-}\alpha$), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1- β (IL-1 β). En la figura 15 podemos ver los resultados obtenidos.

Los niveles de expresión de la *Il1- β* (Figura 15.A) muestran una disminución significativa en el grupo nacido en hipoxia respecto al grupo Nx21/100. Se encontraron valores más elevados en el grupo Nx21/100 aunque no con una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control.

Como vemos en la figura 15.B, la expresión relativa del ARNm de *TNF- α* presenta una disminución estadísticamente significativa en el grupo Hx14/100, en comparación con el grupo Nx21/100. Entre los grupos Nx21/21 y Nx21/100 no hay diferencias estadísticamente significativas.

Finalmente, los niveles de expresión del ARNm de la *Il-6* (Figura 15.C), muestran un incremento estadísticamente significativo en el grupo nacido en hipoxia (Hx14/100) con respecto al Nx21/100.

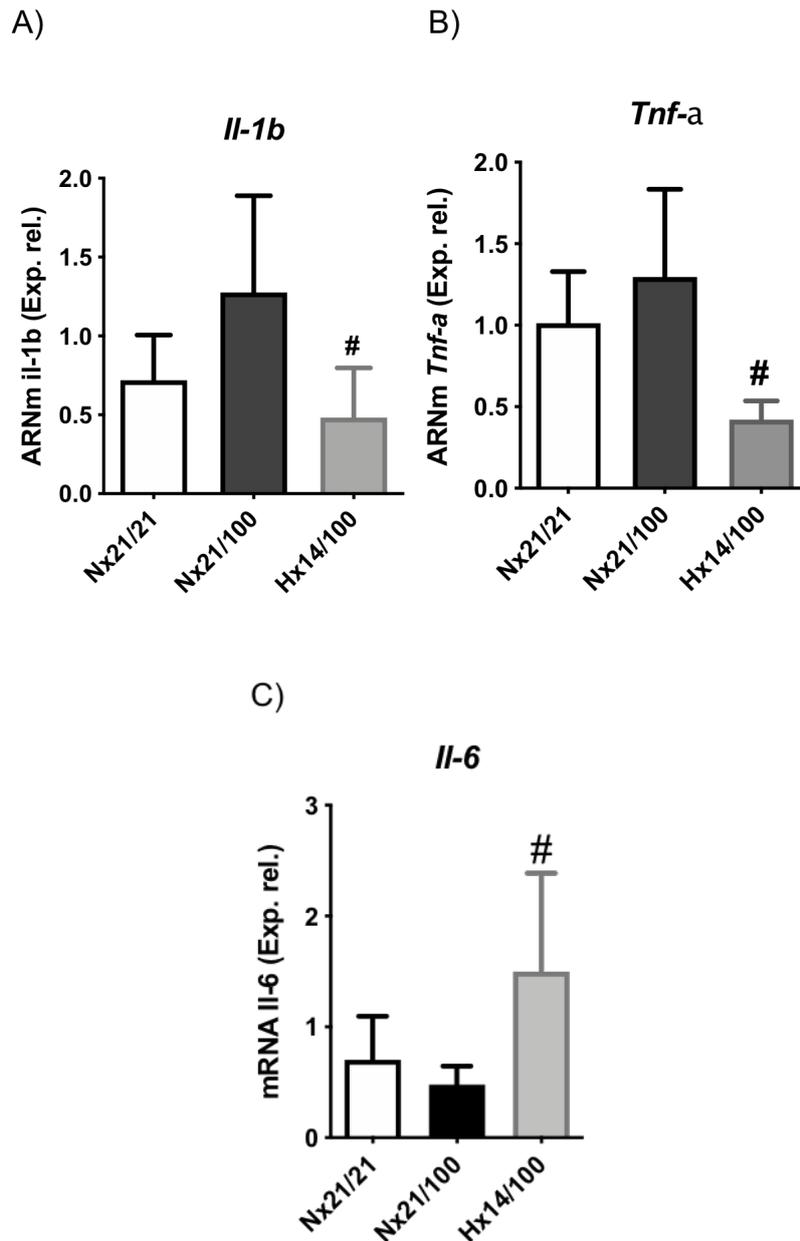


Figura 15. Expresión de ARNm de IL-1b, TNF-a e IL-6 en pulmón de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO_2 : Nx21/21 grupo control en aire ambiente ($FiO_2=0.21$); Nx21/100 grupo normóxico sometido a hiperoxia ($FiO_2=1.0$); Hx14/100: grupo hipóxico ($FiO_2=0.14$) sometido a hiperoxia ($FiO_2=1.0$). A) Niveles relativos de ARN de *IL-1 β* , B) *Tnf- α* y C) *Il-6*. En todos se utilizó la utilizando gapdh como gen control. La diferencia estadística se indica como sigue: #<0.05 vs. Nx21/100. Todos los grupos tienen n=5.

5.6 Análisis **histológico e inmuno-histoquímico** de tejido pulmonar de crías de ratón a P1 durante la transición fetal neonatal bajo diferentes FiO_2 y posterior insulto hiperóxico.

Como podemos observar en las imágenes de cortes histológicos (Figura 16.A), de los pulmones de los ratones nacidos bajo condiciones hipóxicas y su posterior insulto hiperóxico (Hx14/100) y el grupo control, Nx21/21, muestran morfología similar (Figura 16.A panel 1). En ambos podemos ver similar estructura de los septos alveolares y de la densidad celular (Figura 16.A. panel 2 y 3).

Sin embargo, el grupo nacido en aire ambiente y sometido a un insulto hiperóxico posterior (Nx21/100), presenta una morfología heterogénea y desestructurada del tejido (Figura 16.A). Los cortes histológicos de este grupo examinados con mayor aumento (100X), muestran un adelgazamiento de los septos alveolares, los cuales además presentan una morfología irregular, existiendo además un claro descenso de la densidad de células y un espacio más ancho entre los alveolos (Figura 16.A. panel 2 y 3).

El estudio morfométrico pone de manifiesto un aumento del grosor de los septos en el grupo Hx14/100 con respecto al grupo Nx21/100 y un adelgazamiento de los mismos en este mismo grupo con respecto al control (Figura 17.A). En cuanto al parámetro MLI (Figura 17.A), como estimación del diámetro alveolar, se encontraron niveles aumentados en el grupo Nx21/100 con respecto al grupo control como reflejo de la desestructuración de los mismos. En el grupo Hx14/100 estos niveles MLI se encontraron disminuidos con respecto al grupo Nx21/100.

Además de se estudió la cantidad de núcleos apoptóticos de las muestras de tejido pulmonar mediante inmuno-histoquímica midiendo los niveles de caspasa-3 en cada uno de los cortes (Figura 17.B).

El grupo Nx21/100 muestra un aumento de células positivas de caspasa-3 en comparación con el grupo Nx21/21 y grupo Hx14/100 (Figura 17.B), mostrando unos niveles de caspasa-3 disminuidos con respecto a los otros 2 grupos, con una diferencia estadísticamente significativa, con una $p < 0,05$ con respecto al grupo control y una $p < 0,01$ con respecto al grupo Nx21/100 (Figura17.B).

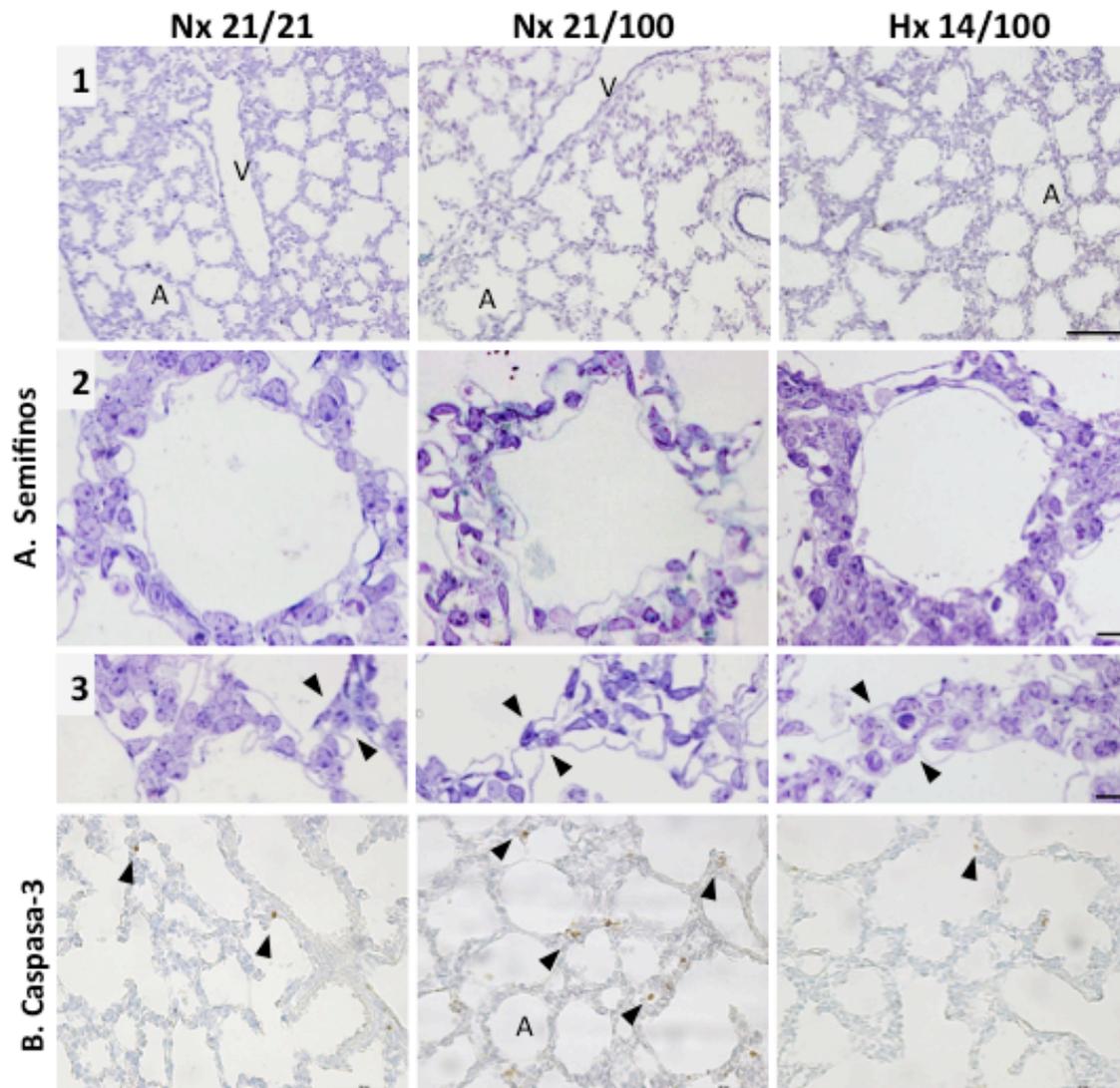


Figura 16. Histología cortes pulmón a día P1. Imágenes representativas del parénquima pulmonar y muerte celular en ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO_2 . Nx21/21 grupo control en aire ambiente ($FiO_2=0.21$); Nx21/100 grupo normóxico sometido a hiperoxia ($FiO_2=1.0$); Hx14/100: grupo hipóxico ($FiO_2=0.14$) sometido a hiperoxia ($FiO_2=1.0$). A) Secciones semifinas de pulmón a P1, las imágenes fueron tomadas a diferentes aumentos (barra de escala=50 μm ; barra de escala=10 μm) (n=3). B) Imágenes de marcaje positivo (color marrón) con caspasa-3 a P1 para cada grupo experimental, Nx21/21, Nx21/100 y Hx14/100 para caspasa-3. Las flechas negras indican caspasa-3 positiva. Barra de escala = 50 μm (n=3).

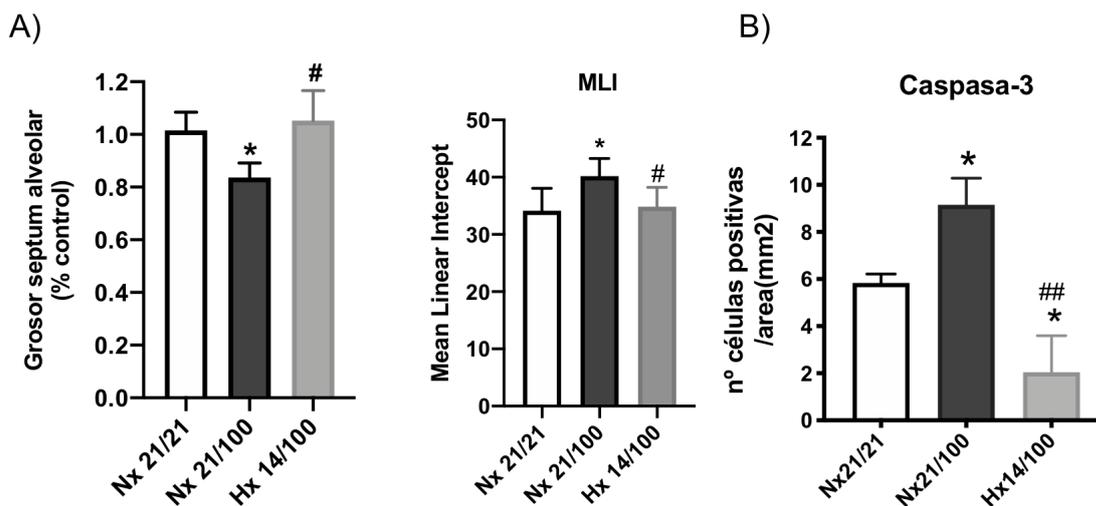


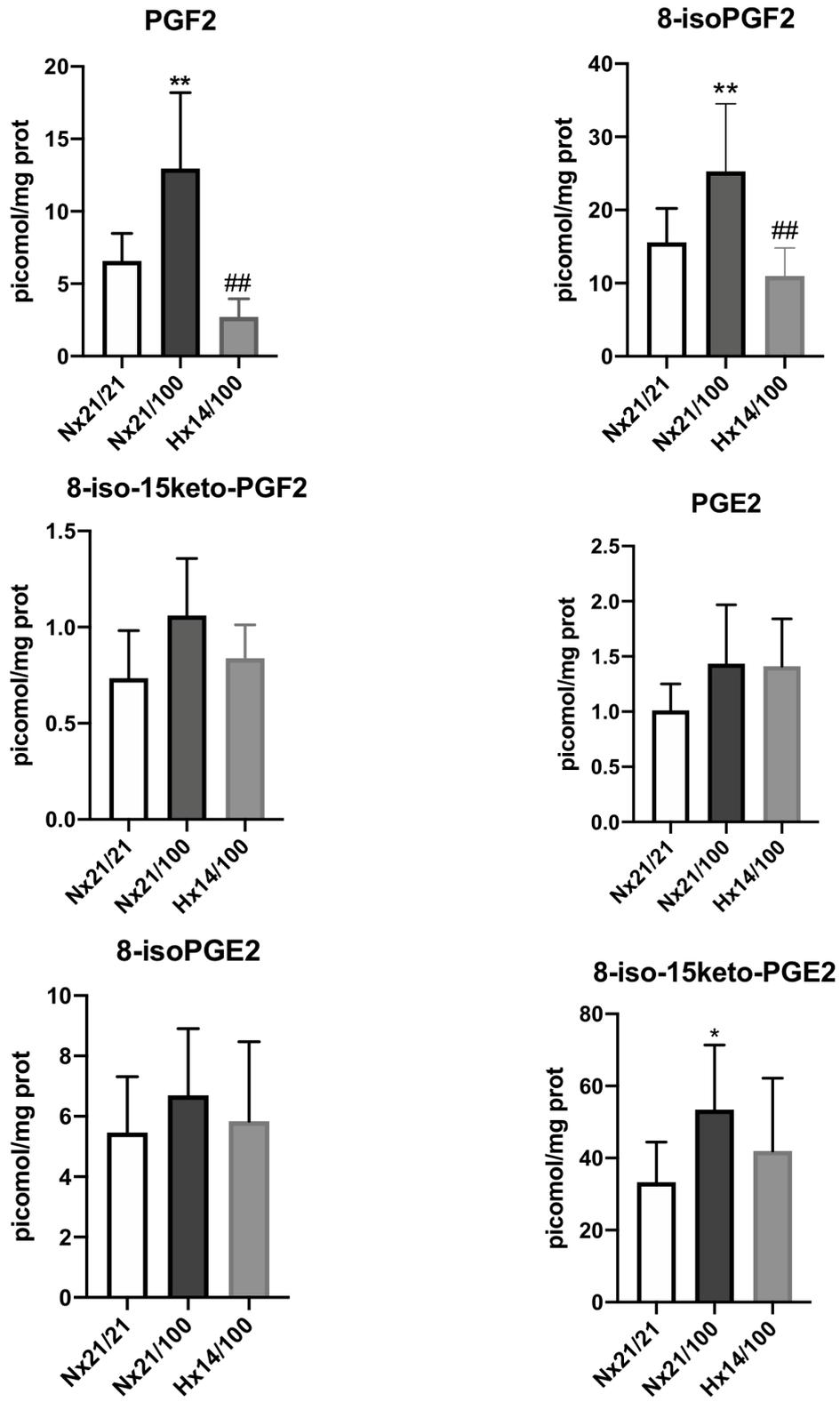
Figura 17. Representación gráfica del estudio morfométrico y el conteo de muerte celular en pulmón de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO_2 . Nx21/21 grupo control en aire ambiente ($FiO_2=0.21$); Nx21/100 grupo normóxico sometido a hiperoxia ($FiO_2=1.0$); Hx14/100: grupo hipóxico ($FiO_2=0.14$) sometido a hiperoxia ($FiO_2=1.0$). A) Los gráficos representan el grosor del tabique alveolar y el MLI para cada grupo experimental, Nx21/21, Nx21/100 y Hx14/100 (n=4). B) Representación gráfica de la proteína caspasa-3, en relación del área pulmonar. La diferencia estadística se indica como sigue: * <0.05 vs. Nx21/21, ** <0.01 vs. Nx21/21, # <0.05 vs. Nx21/100 y ## <0.01 vs. Nx21/100. Todos los grupos tienen n=3.

5.7 Determinación de biomarcadores de **daño a lípidos** por estrés oxidativo en tejido pulmonar de crías de ratón a P7 durante la transición fetal neonatal bajo diferentes FiO_2 y posterior insulto hiperóxico.

Se midió el daño oxidativo en ratones a día P7 a través de los biomarcadores de peroxidación lipídica. Los resultados mostraron un aumento significativo de PGF2a, 8-isoPGF2a, 8-iso-15keto-PGE en el grupo experimental Nx21/100 respecto al grupo Hx14/100 y al control, al igual que el valor total de los isofuranos. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas para los grupos de estudio para 8-iso-15ketoPGF2a, PGE, 8-isoPGE (Figura 18.A) y para los isoprostanos totales (Figura 18.B).

Por tanto, a la semana de producirse el insulto hiperóxico, el grupo nacido bajo condiciones hipóxicas protege frente al estrés oxidativo.

A)



B)

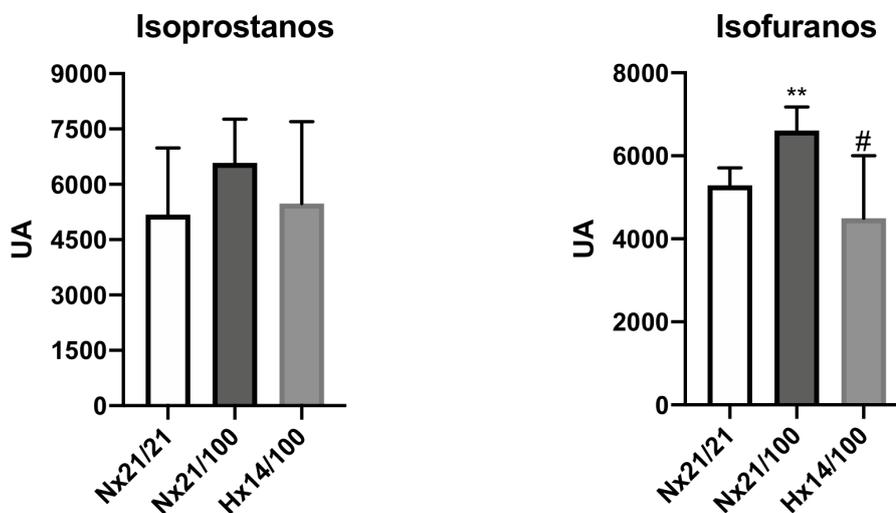


Figura 18. Determinación de daño oxidativo a lípidos en pulmón de ratones P7 nacidos bajo diferentes FiO_2 : Nx21/21 grupo control en aire ambiente ($FiO_2=0.21$); Nx21/100 grupo normóxico sometido a hiperoxia ($FiO_2=1.0$); Hx14/100: grupo hipóxico ($FiO_2=0.14$) sometido a hiperoxia ($FiO_2=1.0$). A) Niveles de PGE2, PGF2a, 8iso-PGF2, 8iso-PGE2, 8iso-15-KetoPGF2, 8iso-15-KetoPGE2 y B) Niveles totales de isoprostanos e isofuranos. La diferencia estadística se indica como sigue: * <0.05 vs. Nx21/21, ** <0.01 vs. Nx21/21, # <0.05 vs. Nx21/100 y ## <0.01 vs. Nx21/100. Todos los grupos tienen $n=5$.

5.8 Análisis **histológico e inmuno-histoquímico** de tejido pulmonar de crías de ratón a P7 durante la transición fetal neonatal bajo diferentes FiO_2 y posterior insulto hiperóxico.

A la semana del nacimiento el estudio histológico como se muestra en la figura 19. A panel 1, a nivel macroscópico no se encuentran grandes diferencias el entre el grupo Nx21/100 respecto al grupo control y el grupo nacido en hipoxia (Hx14/100) como se observó a P1. Sin embargo, si observamos la sección de semifinos a mayores aumentos (figura 19.A panel 2 y 3) se observan algunas diferencias. Mientras que entre el grupo Nx21/21 y Hx14/100 no hay diferencias en el grosor del tabique en superficie de intercambio gaseoso o en el diámetro de alveolos determinado por MLI (figura20.A).

En el grupo Nx21/100 el grosor del septum de los alveolos es más fino y más irregular que en el grupo nacido bajo condiciones hipóxicas (Figura 20.A). Además, los valores de MLI determinados indican una mayor longitud de los alveolos en este grupo respecto al Hx14/100 (figura 20.A).

Si observamos el marcaje de caspasa-3 positivo a P7 observamos que hay una cantidad similar de célula marcadas (Figura19.B). Al hacer el contaje no se obtuvieron diferencias entre los diferentes grupos de estudio (Figura 20.B).

Por tanto, a la semana del insulto hiperóxico sigue habiendo un daño causado por el estrés oxidativo que aún perdura. Sin embargo el nacimiento bajo condiciones hipóxicas parece que protege al pulmón de este daño.

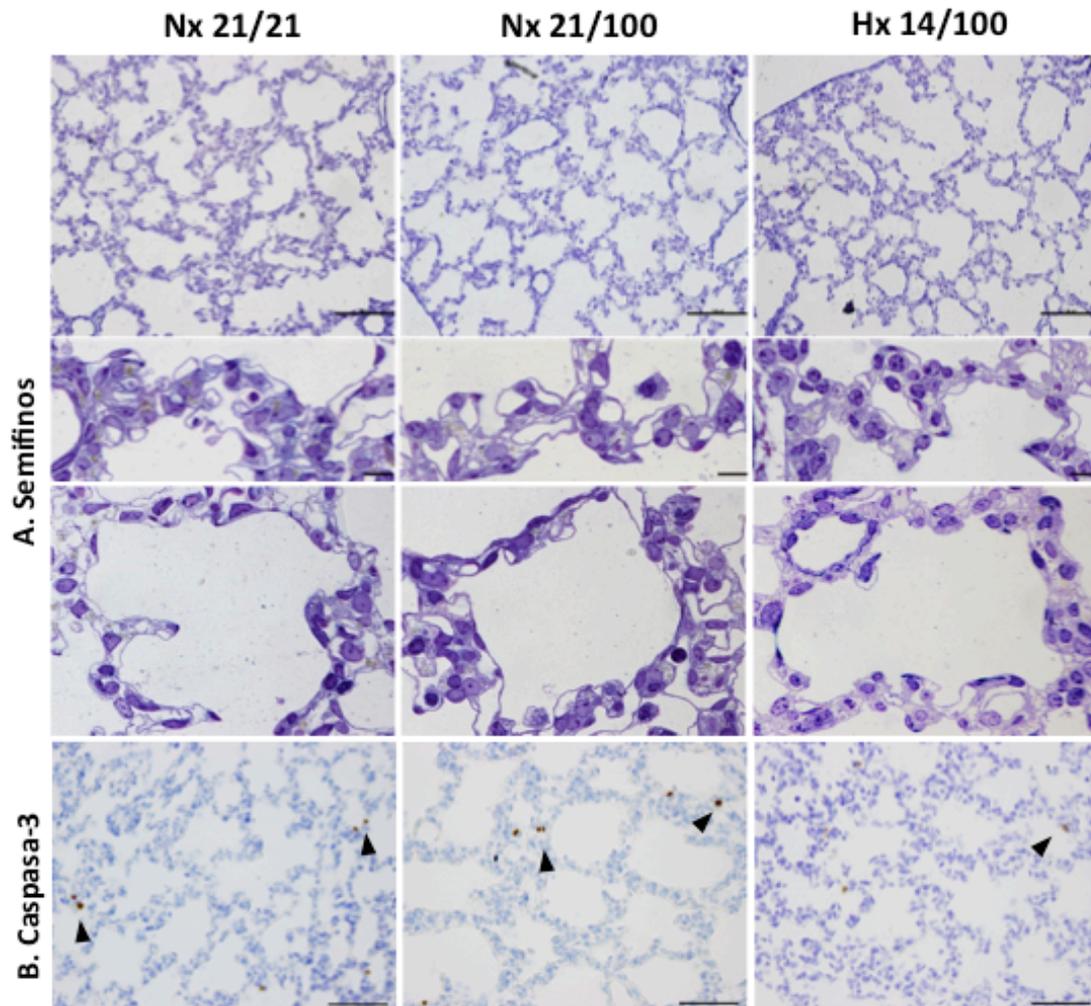
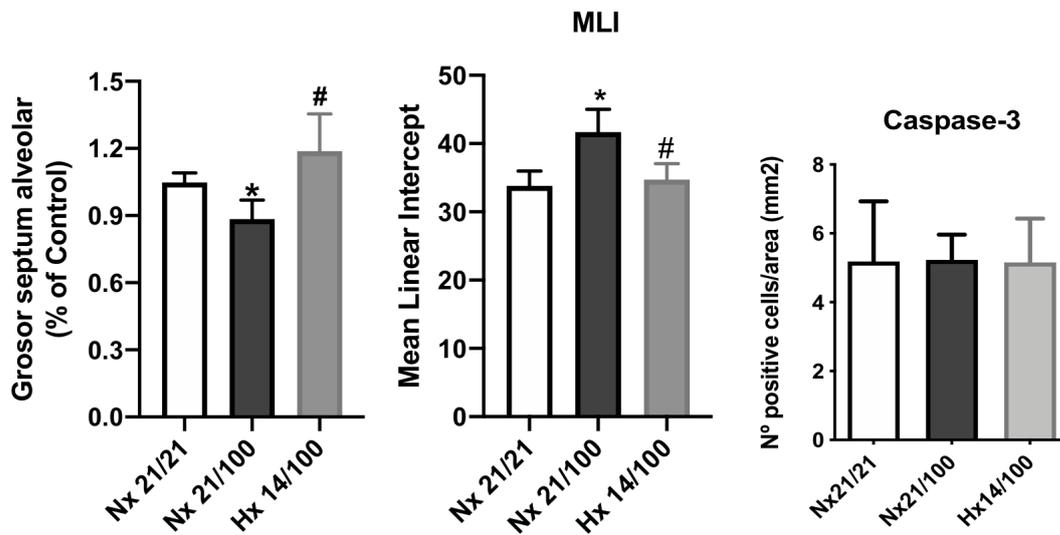


Figura 19. Imágenes histología cortes pulmón a P7. Imágenes representativas del parénquima pulmonar y muerte celular en ratones P7 nacidos bajo diferentes FiO_2 . Nx21/21 grupo control en aire ambiente ($\text{FiO}_2=0.21$); Nx21/100 grupo normóxico sometido a hiperoxia ($\text{FiO}_2=1.0$); Hx14/100: grupo hipóxico ($\text{FiO}_2=0.14$) sometido a hiperoxia ($\text{FiO}_2=1.0$). A) Secciones semifinas de pulmón, las imágenes fueron tomadas a diferentes aumentos (barra de escala=50 μm ; barra de escala=10 μm) (n=3). B) Imágenes de marcaje positivo (color marrón) con caspasa-3 para cada grupo experimental, Nx21/21, Nx21/100 y Hx14/100 para caspasa-3. Las flechas negras indican caspasa-3 positiva. Barra de escala = 50 μm (n=3).

A)



B)

Figura 20. Representación gráfica del estudio morfométrico y el conteaje de muerte celular en pulmones de ratones P7 nacidos bajo diferentes FiO_2 . Nx21/21 grupo control en aire ambiente ($FiO_2=0.21$); Nx21/100 grupo normóxico sometido a hiperoxia ($FiO_2=1.0$); Hx14/100: grupo hipóxico ($FiO_2=0.14$) sometido a hiperoxia ($FiO_2=1.0$). A) Los gráficos representan el grosor del tabique alveolar y el MLI para cada grupo experimental, Nx21/21, Nx21/100 y Hx14/100 (n=4). B) Representación gráfica de la proteína caspasa-3, en relación del área pulmonar. La diferencia estadística se indica como sigue: * <0.05 vs. Nx21/21, ** <0.01 vs. Nx21/21, # <0.05 vs. Nx21/100 y ## <0.01 vs. Nx21/100. Todos los grupos tienen n=3.

6 DISCUSIÓN

En ausencia de intervenciones efectivas para prevenir los partos prematuros, la mejora de la supervivencia de los bebés que nacen en los límites biológicos de viabilidad, se ha basado en los avances en la atención perinatal que se ha producido en los últimos 50 años. La mayoría de los bebés extremadamente prematuros ahora sobreviven, pero a menudo desarrollan una disfunción pulmonar crónica (59). No solo en forma de DBP, que sería la forma más grave, si no que también, en pacientes prematuros no diagnosticados de DBP, presentan morbilidades respiratorias (151), como mayor riesgo de broncorreactividad, broncoobstrucción, y un riesgo aumentado de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en la edad adulta (152)(153).

A pesar de los grandes esfuerzos para minimizar los daños que se producen por intervenciones posnatales como la oxigenación, ventilación mecánica y corticosteroides, la DBP sigue siendo la complicación más frecuente del parto prematuro (154). Ésta, es el resultado de una respuesta reparadora aberrante a la lesión prenatal y postnatal repetitiva durante el desarrollo pulmonar. En consecuencia, este daño desemboca en una alteración vascular y de las vías aéreas permanente que puede afectar a la función pulmonar del adulto (155).

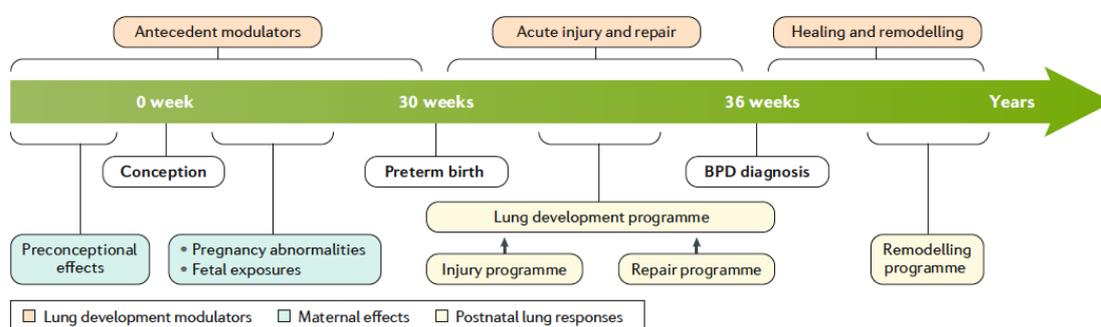


Figura 21. Línea de tiempo de las variables que modulan el desarrollo pulmonar desde la preconcepción hasta después de que se produce el parto prematuro(59).

Como vemos en la figura 21, existen momentos claves en el desarrollo pulmonar y su alteración puede acabar produciendo daño pulmonar y

finalmente DBP. Aun así, sigue siendo la edad gestacional al nacimiento el factor predictor más importante para el desarrollo de DBP. Por tanto, el daño al pulmón que se produce en el prematuro, ocurre en pleno desarrollo del mismo y la reparación de ese daño se realiza a la vez que el pulmón sigue madurando. Esa remodelación del pulmón puede seguir a lo largo de los años(156).

Las estrategias de prevención en la actualidad se basan en minimizar el daño derivado del uso de la ventilación mecánica, evitando la intubación y utilizando ventilación no invasiva preferentemente (157). También realizando un uso racional de oxígeno, con unos objetivos de saturación de oxígeno tanto en sala de partos (158)(78) como durante la estancia hospitalaria dentro del rango adecuado (91-95%) (159), y medidas farmacológicas como como el uso de cafeína y los corticoides sistémicos.

Por tanto, es de vital importancia el estudio de otras estrategias preventivas de este daño, desde el momento que se produce el parto pretérmino. El momento de la TFN es un momento decisivo, en el que además existe un aumento del estrés oxidativo en recién nacidos prematuros, que debido a la inmadurez pulmonar puede desencadenar una serie de alteraciones que pueden llegar a modificar el normal desarrollo pulmonar (160).

Mucho de lo que sabemos sobre la patogenia del daño pulmonar en el prematuro se debe a estudios con modelos animales (110). Uno de los primeros estudios, en los años 50, se centró en estudiar el SDR del recién nacido, exponiendo a conejos a altas concentraciones de oxígeno (161). Otro de los primeros estudios, publicado en el año 1965, se centró en los cambios histológicos en pulmones de ratón, encontrando en los pulmones que se expusieron a altas concentraciones de oxígeno un peor desarrollo, enfisematosos y con menos vasos sanguíneos, además de que se encontraron hemorragias dispersas. En aquellos que se expusieron durante menos tiempo y posteriormente fueron expuestos a aire ambiente, mostraron una histología aparentemente normal, haciendo suponer que podía haber cierta recuperación del daño (162).

Actualmente, existen numerosos estudios de daño pulmonar/DBP en ratones. En ellos, se desarrolla el daño por hiperoxia, ventilación mecánica, hipoxia/hiperoxia, hipoxia sola, inflamación/corioamnionitis o modelos con ratones transgénicos (61). Normalmente en los modelos de hiperoxia, los animales son sometidos a altas concentraciones de oxígeno durante mínimo 12-24 horas. Sin embargo, se ha visto que una breve exposición a altas concentraciones de oxígeno, por ejemplo durante en la estabilización inicial, se correlaciona significativamente con el desarrollo de DBP (163). Y es en este punto, con el presente trabajo, donde queremos dilucidar si modificando la exposición al oxígeno en el momento de la TFN podemos mejorar la adaptación y posterior desarrollo de los pulmones de los recién nacidos prematuros.

Debido a la escasa existencia de estudios experimentales de TFN, muchos de los estudios de hiperoxia en ratones analizan pulmones de ratones de varios días de vida, incluso de hasta 8 semanas (19). Cuando se exponen a altas concentraciones de oxígeno ratones recién nacidos, es normalmente durante varios días y sacrificados por ejemplo, a día P1, P3, P7, P10 y P14(164); P28 (165) o P56 (166), en los que ya se puede observar un daño.

En nuestro modelo, además de ser un modelo de TFN, tiene la ventaja de que el pulmón del ratón recién nacido se encuentra en la misma fase evolutiva que el pulmón de un recién nacido prematuro (58), y por lo tanto nos ofrece la posibilidad de estudiar el efecto de diferentes concentraciones de oxígeno en ese momento tan crucial del desarrollo pulmonar, ofreciéndonos además una ventana de posibilidades de actuación a los clínicos para intentar minimizar el daño que ya de por sí supone para estos niños enfrentarse a la TFN sin estar preparados para ello.

Además, se propone un campo de estudio innovador, como es el preconditionamiento hipóxico. En estudios realizados en otros campos de la medicina, el preconditionamiento ha mejorado resultados en reperfusión y cirugías posteriores(167),(84). Por tanto, podría ser un buen enfoque estudiar

si en la TFN mejora o prepara a un recién nacido prematuro frente a un insulto hiperóxico, al que es bastante probable que sea sometido. En nuestro caso, este acondicionamiento hipóxico podría interpretarse también como una prolongación de la oxigenación intraútero y un retraso en el estrés oxidativo que se produce al nacimiento al pasar a una concentración de oxígeno del 21%. Por lo tanto, nos planteamos si el mantenimiento del recién nacido prematuro al nacer en una concentración de oxígeno similar a la que tenía intraútero, podría inducir cambios a nivel del pulmón que lo protegiera frente a un insulto hiperóxico posterior o por el contrario esa hipoxia moderada es perjudicial a nivel de su adaptación. De esta manera, podemos establecer si esta hipoxemia podría actuar como acondicionante, prolongando los niveles de oxigenación prenatales, favoreciendo una mejor adaptación de los recién nacidos al medio extrauterino, protegiendo de un posible daño posterior por altas concentraciones de oxígeno y disminuyendo el estrés oxidativo que se produce, así como la inflamación y los cambios en la estructura del pulmón que podrían derivar en la enfermedad pulmonar crónica del prematuro o DBP. Este estudio además puede arrojar nuevas maneras de abordar la estabilización en sala de partos del prematuro.

En este modelo experimental de TFN, los ratones nacen bajo diferentes concentraciones de oxígeno, unos en aire ambiente ($FiO_2=0.21$) y otros en hipoxia moderada ($FiO_2=0.14$; simulando la hipoxia intrauterina), pasando posteriormente a aire ambiente.

En la evaluación del daño oxidativo en nuestro modelo, encontramos una disminución del estrés oxidativo en el grupo del acondicionamiento hipóxico frente a la reanimación con 100% de oxígeno en el pulmón frente a los controles mantenidos en aire ambiente (FiO_2 0.21). Concretamente encontramos un aumento de los niveles de GSH por la activación de la vía de la transulfuración a través de la enzima limitante Cbs. Este hallazgo es de gran importancia ya que por un lado, el GSH es el antioxidante no enzimático más relevante y uno de los nodos reguladores del estado redox celular. GSH es muy relevante a nivel pulmonar, en el que además ejerce un papel protector a nivel de los alveolos y en las células epiteliales (168). Por lo tanto, cuanto

mayores sean sus niveles, más preparado estará ese tejido contra el estrés oxidativo. En estudios de hipoxia preconditionante ya se vio que el aumento del GSH producía una disminución del estrés oxidativo (81).

Además, en estudios realizados en humanos recién nacidos asfixiados y re-oxigenados con 100% de oxígeno tenían una disminución significativa del cociente GSH/GSSG en las primeras horas después del nacimiento en comparación con neonatos que fueron reanimados con aire ambiente. Es decir, había una concentración mayor de GSSG que de GSH. Las células por tanto, mantenían un estado pro oxidativo. Se veía además que 4 semanas después de la reanimación al nacimiento, el grupo reanimado con 100% de oxígeno seguía con valores del cociente GSH/GSSG significativamente inferiores a los controles o a los reanimados con aire (22). Aparentemente, por tanto, el estrés oxidativo de la TFN causado por la hiperoxia tras una hipoxia-isquemia era capaz de disparar mecanismos pro-oxidantes a largo plazo. Es por todo ello que al existir una mayor síntesis de GSH en el nacimiento bajo condiciones de hipoxia preconditionante, el pulmón va a estar más preparado para afrontar un aumento del estrés oxidativo posterior. Podemos decir que el nacimiento en hipoxia, favorece un estado celular más reducido.

Por otro lado, en este punto es interesante destacar el papel de la Cbs. En nuestro estudio, vemos como esta enzima que forma parte de la síntesis de GSH en la vía de la transulfuración tiene un aumento de la actividad. En estudios experimentales con crías de ratón Cbs -/- presentaban una reducción del 50% en el número total de alvéolos (169) lo que sugiere un papel protector pulmonar de Cbs, cuya ausencia se vio que es perjudicial para el desarrollo del parénquima. Cabe destacar que la hiperoxia regula a la baja la expresión de Cbs (170). Además, esta enzima está involucrada en la síntesis del H₂S. En estudios en los que administraba el H₂S exógeno disminuyeron las alteraciones de la estructura pulmonar en modelos animales de DBP, restableciendo parcialmente la alveolarización, limitando la hipertensión pulmonar, limitando la inflamación y promoviendo la reparación del epitelio (171). Otro estudio también demostró la restauración del crecimiento alveolar, reparación de daño epitelial, disminución del reclutamiento de macrófagos, neutrófilos y eosinófilos

al pulmón, a través de la normalización de los niveles de IL-10, todo ello tras la administración de H₂S (172).

En nuestro modelo, el grupo en el que se evidenció mayor daño oxidativo a nivel proteico producido por el estrés oxidativo fue el Nx21/100. Niveles más bajos fueron hallados en el grupo control y en el grupo nacido en condiciones de hipoxia y sometido a hiperoxia posterior. Lo mismo ocurre con el daño a lípidos a día P1 y también posteriormente a día P7 se mantuvieron elevados muchos de los biomarcadores de peroxidación lipídica en ese mismo grupo (Nx21/100) reforzando el papel protector de la hipoxia preconditionante frente a un insulto hiperóxico posterior.

Estudios experimentales ponen de manifiesto que incluso una leve hiperoxia (FiO₂=0.4) produce un aumento de nitro-tirosina en cortes de pulmón que se mantiene a hasta P56 (166). Este aumento de nitro-tirosina medida en cortes de pulmón ya se había visto en pulmón expuesto a una concentración mayor de oxígeno (85-90%)(173). También se había ya demostrado que una hiperoxia de 1 hora de duración aumenta los niveles de carbonilación a proteínas(174). En nuestro estudio el daño a macromoléculas también se mantiene en los pulmones de ratón que se estudiaron a día P7.

A nivel clínico, estudios realizados en humanos han demostrado un mayor nivel de daño a lípidos y proteínas en recién nacidos que desarrollan DBP. Por ejemplo se ha correlacionado un aumento de la 3-nitrotirosina en plasma durante el primer mes de vida en prematuros que posteriormente desarrollaron DBP(133). En estudios realizado por nuestro grupo también se evidenció un mayor nivel de isofuranos, orto-tirosina y 8-OHdG en el día 7 tras una reanimación al nacimiento con FiO₂=0.9 en comparación con los reanimados con FiO₂=0.3, correlacionándose además con el desarrollo posterior de patología pulmonar crónica(163). Otros estudios realizados, ponen también de manifiesto un aumento de la oxidación de lípidos y proteínas en prematuros que desarrollan DBP en comparación con los que no la desarrollan (131). Por tanto, es importante recalcar que estas diferencias de estado oxidativo se observan en los primeros días de vida, poniendo de manifiesto la importancia

del daño producido en las horas/días posteriores al parto y su contribución a un proceso patológico a más largo plazo (125).

En nuestro modelo la hipoxia preconditionante disminuye los niveles de biomarcadores de daño a macromoléculas tras un insulto hiperóxico y por tanto podría proteger al pulmón de un daño a más largo plazo.

Como estamos viendo, en los pulmones expuestos a altas concentraciones de oxígeno hay un aumento del daño a biomoléculas en comparación con el grupo control, y la hipoxia preconditionante disminuye esos biomarcadores de daño tras la exposición a los mismos niveles de oxígeno.

A continuación, medimos la expresión de enzimas antioxidantes a nivel pulmonar, en concreto, la Sod1 y la Cat, la cual es considerada la enzima antioxidante más importante detoxificando H_2O_2 exógeno en los neumocitos tipo 2 (175). En primer lugar, la Sod1 se encontró aumentada en el grupo Nx21/100, posiblemente porque hay una mayor cantidad de O^{2-} , en comparación con los otros grupos, que ha convertirse en H_2O_2 . De la misma manera, se pudo ver en este estudio realizado en ratas (176), la exposición a la hiperoxia indujo la expresión del ARNm de Sod aumentando su expresión del tercer al quinto día de exposición.

Además, en nuestro estudio la expresión de Cat se estaba disminuida en el grupo Nx21/100 y significativamente aumentada en el grupo nacido en hipoxia con hiperoxia posterior (Hx14/100). La enzima Cat, contiene un grupo hemo capaz de eliminar altos niveles de H_2O_2 , proveniente de la dismutación de O^{2-} por la Sod. Para explicar estos hallazgos se midió la cantidad de peróxidos en el tejido, encontrando un aumento significativo en el grupo Nx21/100. Por tanto, podríamos decir que en nuestro modelo la Cat está en el grupo nacido bajo condiciones hipóxicas detoxificando el H_2O_2 y sin embargo en el grupo Nx21/100 no, debido a la baja expresión que se observa y por ello hay una acumulación de peróxidos en el tejido, produciendo daño tisular. Aunque el H_2O_2 es una molécula importante en se la señalización y regulación de procesos redox, esto sólo ocurre cuando existen en el tejido cantidades

fisiológicas del mismo, sin embargo actúa dañando a biomoléculas cuando existen cantidades suprafisiológicas del mismo (177).

En la mayoría de estudios experimentales la expresión y actividad de las enzimas antioxidantes son diversos. Normalmente se suele ver la actividad de las mismas disminuida en situaciones de hiperoxia prolongada y estrés oxidativo. En un estudio realizado en ratones, la actividad de la Sod disminuyó progresivamente a partir de las 12 horas de hiperoxia, y la actividad de la Cat aumentó a partir de las 48 horas de exposición al oxígeno (19). La diferencia con nuestro estudio es la duración de la hiperoxia. Puede que en un momento agudo aumenten los radicales libres y se incremente la expresión de Sod, pero que por otro lado, la actividad de la Cat, en condiciones de hipoxia preconditionante aumente su expresión y por tanto tenemos menos niveles de peróxidos en tejido en ese grupo. Existen otros estudios en los que se ha observado un aumento de la Cat en situaciones de hipoxia (21)(178), en este último, se concluye que la hipoxia crónica materna en las fases tardías de la gestación, a través de la inducción de esa enzima, favorece la reabsorción de líquido pulmonar y la maduración del surfactante, siendo esto una respuesta adaptativa para una TFN exitosa.

Estos cambios producidos por la hipoxia preconditionante a nivel del sistema antioxidante podrían ser beneficiosos en el caso de los recién nacidos prematuros, puesto que diversos estudios ponen de manifiesto que la inducción de la actividad antioxidante en estos niños está disminuida en situaciones de estrés oxidativo (179). De hecho en este mismo estudio, realizado en conejos prematuros, observaron que existía un aumento del mRNA de Sod1, pero que luego no se correspondía con un aumento de la actividad antioxidante posterior, sugiriendo una inhibición post-traslacional. La misma situación se observó en el estudio realizado con ratas (176), en el que el aumento de la actividad de Sod2, no fue paralelo al incremento de la cantidad de su proteína a día 5, 7 y 14 de exposición. Concluyendo que además de la activación transcripcional, la regulación traslacional y post-traslacional juega un papel decisivo en el control de la actividad de dicha enzima en la exposición a la hiperoxia. También se ha demostrado que la administración exógena de Cat en

ratones infectados con virus respiratorio sincitial, reduce la inflamación y obstrucción de las vías aéreas, con una reducción de citoquinas proinflamatorias en el lavado broncoalveolar, poniendo de manifiesto una vez más la importancia de esta enzima en la protección del daño pulmonar (180).

Por otro lado, uno de los mecanismos de daño pulmonar más importantes es la inflamación. Durante la exposición al oxígeno, se produce un reclutamiento de células inflamatorias en el pulmón y una activación de citoquinas pro inflamatorias. En nuestro modelo, podemos ver un aumento significativo de la expresión de IL-1 β y de TNF- α en el grupo Nx21/100. En otros modelos animales, TNF- α se encontró aumentado también en pulmones de ratas (181) y ratones (182) expuestos a hiperoxia y a nivel clínico también se observó en aspirados traqueales de neonatos que posteriormente desarrollaron DBP (114) y en niños con SDR (117). Por tanto, TNF- α puede inducir la apoptosis de las células mediante la señalización del receptor de muerte celular (183). Un nivel elevado del mismo, puede promover la inflamación crónica que conduce al desarrollo de DBP. Esta inflamación crónica se puede ver en otros estudios realizados en ratones incluso con exposición a niveles de oxígeno de 40%(166).

En nuestro modelo también se observa un aumento de la expresión de IL-1 β en el grupo Nx21/100. Esto se vio también en ratones expuestos a concentraciones superiores al 95% de oxígeno, en los que hubo un aumento de cinco veces más en los niveles de expresión de IL-1 β incluso a los 7 días de exposición (182). En el mismo, se pudo observar inflamación a nivel de los alveolos y un leve edema y tras 10 días de exposición hubo un aumento de la letalidad. En otro estudio en conejos (184), la expresión de IL-1 β aumentó tras 2-4 días de hiperoxia, con unos niveles máximos en los días 6-10 de exposición, para posteriormente disminuir. Este patrón de elevación de la expresión de dicha citoquina, se correlacionó con un aumento y posterior disminución de inflamación a nivel histológico.

Sin embargo, los niveles de expresión relativa de IL-6 están significativamente aumentados en el grupo Hx14/100 y no en el grupo Nx21/100 como el resto de citoquinas estudiadas. Aunque existen estudios en los que la hiperoxia eleva

los niveles de expresión de esta citoquina, como este modelo animal de DBP en el que se vio un incremento después de 7 días de exposición al oxígeno (182), hay evidencia de que la IL-6 actúa como una hormona autocrina, paracrina y exocrina y además ha mostrado tener un efecto antiinflamatorio inhibiendo la afluencia de neutrófilos e induciendo IL-1RA (receptor soluble de TNF), en un modelo de inflamación pulmonar aguda por hiperoxia (185). La IL-6 ya ha sido estudiada como protectora frente al daño pulmonar por hiperoxia. En un modelo con ratones knock-out sometidos a 100% de oxígeno, se pudo demostrar que IL-6 disminuía marcadamente el daño pulmonar por hiperoxia y esta protección se asoció a una marcada disminución en la muerte celular por hiperoxia y de la fragmentación de ADN (186). En otro estudio realizado con ratones knock-out para IL-6, éstos mostraron una mayor inflamación broncoalveolar en un modelo de SDR agudo (187), y también un mayor deterioro de las propiedades elásticas del pulmón y además estos ratones con deficiencia de IL-6, mostraron mayor hipertensión pulmonar aguda. Existen estudios que han relacionado la IL-6 con la activación de la respuesta inmunitaria, concretamente se encontró que este déficit podría estar relacionado con una disminución de respuesta de los anticuerpos y por tanto, una mayor susceptibilidad a infecciones. También se objetivó la habilidad de IL-6 para promover la inmunidad humoral (188).

Se sabe que IL-1 β e IL-6 son particularmente activas en fase aguda de la respuesta al daño y se han encontrado en muestras de lavado broncoalveolar elevadas en fases muy tempranas en recién nacidos pretérmino que finalmente desarrollan DBP(18). Sin embargo, en nuestro modelo, el hecho de que la expresión de IL-6 esté elevada en el grupo nacido en hipoxia preconditionante, y sabiendo su papel en la regulación de la inflamación y la respuesta inmunitaria, hace pensar una vez más en el papel protector de la hipoxia preconditionante en la TFN. Además, se ha visto que la IL-6 se expresa en el epitelio pulmonar durante toda la gestación. Esto sugiere que tiene un papel fisiológico en los mecanismos de ramificación y desarrollo pulmonar (189). Estos hallazgos van en consonancia con otros estudios y la observación clínica en los que vemos que la corioamnionitis, que asocia un incremento de la IL-6,

promueve la maduración pulmonar, disminuyendo la incidencia de SDR en el recién nacido (190) (191).

A nivel morfológico los estudios experimentales muestran daños en el parénquima pulmonar tras la hiperoxia. Entre estas alteraciones morfológicas las más frecuentes son la simplificación alveolar o la fibrosis que se producen tras varias horas y/o días de exposición al oxígeno como en los estudios realizados entre los días P1 y P14 en ratas y ratones cuando se enfrentaron a condiciones experimentales similares a la exposición a altos niveles de O₂ (60-95%) durante un período de tiempo determinado (limitado o prolongado) (192) (193) (194) (195).

Normalmente los modelos animales cuantifican el daño al pulmón a través del número de alveolos, el área de intercambio gaseoso, la vascularización del pulmón y el grosor de los septos alveolares (196). En muchos estudios, se mide el MLI que se usa como medida indirecta del aumento de espacio aéreo, incluyendo alveolos y conductos alveolares (193). En estudios experimentales, los pulmones de ratón sometidos a condiciones hiperóxicas, muestran una simplificación alveolar (197)(198), medida como un aumento de la MLI, tras 14 días de hiperoxia. Este aumento de MLI se observa en otros modelos de daño pulmonar por hiperoxia (166) tras 7 días de exposición a 65% de oxígeno, y esta desestructuración, además se mantiene en los ratones adultos (199). En otro estudio realizado en ratones (165), en el día P28 las crías de ratón expuestas a 85% de oxígeno, mostraron un MLI que era el doble de las crías mantenidas en aire ambiente, indicando una reducción importante en la superficie alveolar de las crías sometidas a oxígeno. En nuestro estudio, a pesar de ser una breve exposición a altas concentraciones de oxígeno (1 hora FiO₂=1.0), el grupo Nx21/100 mostro un MLI aumentado, pudiendo ver en los cortes histológicos que los alveolos en este grupo mostraban mayor desestructuración y unos septos alveolares más delgados, existiendo además un claro descenso de la densidad de células y un espacio más ancho entre los alveolos. El grupo Nx21/21 y el nacido bajo condiciones de hipoxia preconditionante mostraron morfología similar, a pesar de exponer a hiperoxia posteriormente al grupo Hx14/100, poniendo de manifiesto los efectos

protectores de esta hipoxia preconditionante. Estos ratones a P1 además corresponden con una fase de maduración pulmonar similar al prematuro de entre 23-32 semanas, por lo que estos hallazgos son muy importantes, ya que son pacientes sometidos a muchas agresiones hiperóxicas a lo largo de sus primeras semanas. A día P7 seguimos encontrando las mismas diferencias a nivel histológico, tal y como muestran los estudios en los que el daño por hiperoxia se mantenía hasta incluso la edad adulta. Y seguimos observando como en el grupo nacido en condiciones hipoxia estas diferencias estructurales y la protección frente a la hiperoxia persisten. Este efecto protector de la hipoxia preconditionante se puso de manifiesto también en este estudio realizado en ratones, en el que se vio que protegía al pulmón de una hipoxia severa posterior, atenuando el edema pulmonar y preservando el intercambio gaseoso (200).

En referencia al análisis de muerte celular, los resultados obtenidos en el presente estudio, mediante el marcaje con caspasa-3 como indicador de apoptosis, se observa un aumento de la misma en el grupo Nx21/100. En estudios realizados en ratones, se vio que la exposición a ventilación mecánica con 40% de oxígeno durante 8 horas en ratones a P4, había un aumento de la caspasa-3 así como de células TUNEL positivas, otro indicador de apoptosis celular (201). En otro estudio en ratones también se pudo observar que tras la exposición a 85% de oxígeno, los neumocitos tipo II eran más susceptibles a la apoptosis (165). Existen más estudios en los que se ha encontrado un aumento de la muerte celular tras la exposición a altas concentraciones de oxígeno. Por ejemplo, en ratas sometidas a 90% de oxígeno durante varios días, midiendo la muerte celular mediante TUNEL, se vio un aumento de la apoptosis de los neumocitos tipo II, viendo un aumento gradual de los índices de apoptosis, no siendo significativa la diferencia en el primer día, pero si en el día 3,7,10 y 14 de exposición a oxígeno (164). En estudios *in vitro* (202), se ha podido observar que la hipoxia preconditionante en células madre mesenquimales, reduce la apoptosis, la expresión de caspasa-3 e *in vivo*, una vez trasplantadas en tráquea de rata con DBP, se restableció la estructura alveolar y la función pulmonar y se disminuyó la hipertensión pulmonar. Demostrando que estas

células con acondicionamiento hipóxico podrían tener un marcado beneficio terapéutico en DBP.

Estos hallazgos están en sintonía con nuestros resultados *in vivo* en los que ratones nacidos bajo condiciones de hipoxia y sometidos a un insulto hiperóxico posterior mostraron una reducción significativa de muerte celular en comparación con los ratones nacidos en aire ambiente sometidos a la misma hiperoxia posteriormente. Este efecto protector contra la muerte celular, además, persistía a día P7.

Resumiendo, podemos afirmar que nuestros resultados reflejan que un periodo de hipoxia acondicionante en la transición fetal-neonatal promueve un ambiente reductor en el tejido pulmonar, con un menor estrés oxidativo y un menor daño molecular y tisular tras a un insulto hiperóxico.

Podríamos pensar que un retraso en la oxigenación en el momento de la TFN, podría preparar el pulmón del recién nacido prematuro, en pleno desarrollo, para el estrés oxidativo posterior, ya sea el producido por hiperoxia, por ventilación mecánica o por infecciones.

La traslación a la clínica de estos hallazgos requiere una adaptación conceptual en cuanto a qué significa un período de hipoxia postnatal en cuanto a intensidad y duración que no afecte a constantes vitales del prematuro. Pero, no hay duda de que estos resultados podrían abrir la puerta a nuevos estudios sobre la hipoxia acondicionante y su aplicación a nivel clínico, dada la importancia de mejorar la morbilidad respiratoria de los recién nacidos prematuros.

7 CONCLUSIONES

1. El nacimiento bajo una hipoxia preconditionante ($FiO_2=0.14$) disminuye el daño oxidativo a proteínas y lípidos en tejido pulmonar frente a un insulto hiperóxico ($FiO_2=1.0$) en crías de ratón a día P1 y se mantiene hasta P7.
2. La hipoxia preconditionante mejora el estado redox frente a un insulto hiperóxico ($FiO_2=1.0$) a nivel pulmonar en crías recién nacidas (P1) mediante el aumento de la síntesis de GSH, activación de la defensa antioxidante y disminución de la inflamación.
3. El daño oxidativo producido por el insulto hiperóxico es revertido en condiciones de hipoxia preconditionante sobre el parénquima pulmonar en crías de ratón a P1 y P7, mejorando la estructuración alveolar, los tabiques alveolares y con una reducción de la muerte celular.
4. La hipoxia preconditionante podría abrir un nuevo campo de estudio en la transición fetal neonatal, partiendo de la idea de que podría inducir una serie de modificaciones en la regulación redox que podría ser protector a nivel pulmonar frente a un insulto hiperóxico posterior.

8 BIBLIOGRAFÍA

1. Perez M, Robbins ME, Revhaug C, Saugstad OD. Oxygen radical disease in the newborn, revisited: Oxidative stress and disease in the newborn period. *Free Radical Biology and Medicine*. octubre de 2019;142:61-72.
2. Zhu H, Traore K, Santo A, Trush MA, Li YR. Oxygen and Oxygen Toxicity: The Birth of Concepts. *React Oxyg Species (Apex)*. enero de 2016;1(1):1-8.
3. Saugstad OD, Sejersted Y, Solberg R, Wollen EJ, Bjørås M. Oxygenation of the Newborn: A Molecular Approach. *Neonatology*. 2012;101(4):315-25.
4. Semenza GL. Regulation of Oxygen Homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Physiology*. abril de 2009;24(2):97-106.
5. Slater EC. Mechanism of Phosphorylation in the Respiratory Chain. *Nature*. noviembre de 1953;172(4387):975-8.
6. Lenaz G, Genova ML. Structure and Organization of Mitochondrial Respiratory Complexes: A New Understanding of an Old Subject. *Antioxidants & Redox Signaling*. 15 de abril de 2010;12(8):961-1008.
7. Calhoun MW, Thomas JW, Gennis RB. The cytochrome oxidase superfamily of redox-driven proton pumps. *Trends in Biochemical Sciences*. 1 de agosto de 1994;19(8):325-30.
8. Vento M. Oxygen Supplementation in the Neonatal Period: Changing the Paradigm. *Neonatology*. 2014;105(4):323-31.
9. Torres-Cuevas I, Cernada M, Nuñez A, Escobar J, Kuligowski J, Chafer-Pericas C, et al. Oxygen Supplementation to Stabilize Preterm Infants in the Fetal to Neonatal Transition: No Satisfactory Answer. *Front Pediatr [Internet]*. 2016 [citado 15 de febrero de 2021];4. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fped.2016.00029/full>
10. Torres-Cuevas I, Cernada M, Nuñez A, Escobar J, Kuligowski J, Chafer-Pericas C, et al. Oxygen Supplementation to Stabilize Preterm Infants in the Fetal to Neonatal Transition: No Satisfactory Answer. *Front Pediatr*. 2016;4:29.
11. Kalyanaraman B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biology*. 1 de enero de 2013;1(1):244-57.
12. Auten RL, Davis JM. Oxygen Toxicity and Reactive Oxygen Species: The Devil Is in the Details. *Pediatr Res*. agosto de 2009;66(2):121-7.

13. Torres-Cuevas I, Parra-Llorca A, Sánchez-Illana A, Nuñez-Ramiro A, Kuligowski J, Cháfer-Pericás C, et al. Oxygen and oxidative stress in the perinatal period. *Redox Biology*. 1 de agosto de 2017;12:674-81.
14. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*. enero de 2007;87(1):315-424.
15. Trostchansky A, Bonilla L, González-Perilli L, Rubbo H. Nitro-fatty acids: formation, redox signaling, and therapeutic potential. *Antioxid Redox Signal*. 10 de octubre de 2013;19(11):1257-65.
16. Ohshima H, Sawa T, Akaike T. 8-nitroguanine, a product of nitrative DNA damage caused by reactive nitrogen species: formation, occurrence, and implications in inflammation and carcinogenesis. *Antioxid Redox Signal*. junio de 2006;8(5-6):1033-45.
17. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal*. 1 de marzo de 2014;20(7):1126-67.
18. Bhandari V. Hyperoxia-derived lung damage in preterm infants. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. agosto de 2010;15(4):223-9.
19. Nagato AC, Bezerra FS, Lanzetti M, Lopes AA, Silva MAS, Porto LC, et al. Time course of inflammation, oxidative stress and tissue damage induced by hyperoxia in mouse lungs: Hyperoxia-induced lung oxidative response. *Int J Exp Path*. agosto de 2012;93(4):269-78.
20. Escobar J, Cubells E, Enomoto M, Quintás G, Kuligowski J, Fernández CM, et al. Prolonging in utero-like oxygenation after birth diminishes oxidative stress in the lung and brain of mice pups. *Redox Biology*. 2013;1(1):297-303.
21. Awad H, Nolette N, Hinton M, Dakshinamurti S. AMPK and FoxO1 regulate catalase expression in hypoxic pulmonary arterial smooth muscle. *Pediatr Pulmonol*. septiembre de 2014;49(9):885-97.
22. Vento M, Asensi M, Sastre J, García-Sala F, Pallardó FV, Viña J. Resuscitation with room air instead of 100% oxygen prevents oxidative stress in moderately asphyxiated term neonates. *Pediatrics*. abril de 2001;107(4):642-7.
23. Jeong W, Bae S, Toledano M, Rhee SG. Role of sulfiredoxin as a regulator of peroxiredoxin function and regulation of its expression. *Free radical biology & medicine*. 23 de mayo de 2012;53:447-56.
24. Muragundla A, Berent-Spillson A, Russell J. Metabotropic Glutamate Receptors (mGluRs) and Diabetic Neuropathy. *Current drug targets*. 1 de febrero de 2008;9:85-93.

25. Lu SC. REGULATION OF GLUTATHIONE SYNTHESIS. *Mol Aspects Med.* 2009;30(1-2):42-59.
26. Meister A. On the discovery of glutathione. *Trends Biochem Sci.* mayo de 1988;13(5):185-8.
27. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annual Review of Biochemistry.* 1983;52(1):711-60.
28. Escobar J, Sánchez-Illana Á, Kuligowski J, Torres-Cuevas I, Solberg R, Garberg HT, et al. Development of a reliable method based on ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry to measure thiol-associated oxidative stress in whole blood samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 10 de mayo de 2016;123:104-12.
29. Sbodio JI, Snyder SH, Paul BD. Regulators of the transsulfuration pathway. *Br J Pharmacol.* febrero de 2019;176(4):583-93.
30. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:8416763.
31. Davis JM, Auten RL. Maturation of the antioxidant system and the effects on preterm birth. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine.* 1 de agosto de 2010;15(4):191-5.
32. Maltepe E, Saugstad OD. Oxygen in Health and Disease: Regulation of Oxygen Homeostasis-Clinical Implications. *Pediatr Res.* marzo de 2009;65(3):261-8.
33. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med.* 17 de enero de 1985;312(3):159-63.
34. Mussap M, Noto A, Cibecchini F, Fanos V. The importance of biomarkers in neonatology. *Semin Fetal Neonatal Med.* febrero de 2013;18(1):56-64.
35. Millán I, Piñero-Ramos JD, Lara I, Parra-Llorca A, Torres-Cuevas I, Vento M. Oxidative Stress in the Newborn Period: Useful Biomarkers in the Clinical Setting. *Antioxidants.* diciembre de 2018;7(12):193.
36. Kuligowski J, Aguar M, Rook D, Lliso I, Torres-Cuevas I, Escobar J, et al. Urinary Lipid Peroxidation Byproducts: Are They Relevant for Predicting Neonatal Morbidity in Preterm Infants? *Antioxid Redox Signal.* 10 de julio de 2015;23(2):178-84.
37. Tataranno ML, Perrone S, Buonocore G. Plasma Biomarkers of Oxidative Stress in Neonatal Brain Injury. *Clinics in Perinatology.* 1 de septiembre de 2015;42(3):529-39.

38. Kuligowski J, Escobar J, Quintás G, Lliso I, Torres-Cuevas I, Nuñez A, et al. Analysis of lipid peroxidation biomarkers in extremely low gestational age neonate urines by UPLC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem.* julio de 2014;406(18):4345-56.
39. Torres-Cuevas I, Kuligowski J, Cárcel M, Cháfer-Pericás C, Asensi M, Solberg R, et al. Protein-bound tyrosine oxidation, nitration and chlorination by-products assessed by ultraperformance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta.* 24 de marzo de 2016;913:104-10.
40. Zhang W, Ames BD, Walsh CT. Identification of Phenylalanine-3-Hydroxylase for meta-Tyrosine Biosynthesis. *Biochemistry.* 21 de junio de 2011;50(24):5401-3.
41. Matayatsuk C, Poljak A, Bustamante S, Smythe GA, Kalpravidh RW, Sirankapracha P, et al. Quantitative determination of ortho- and meta-tyrosine as biomarkers of protein oxidative damage in beta-thalassemia. *Redox Rep.* 2007;12(5):219-28.
42. Coviello C, Perrone S, Buonocore G, Negro S, Longini M, Dani C, et al. Isoprostanes as Biomarker for White Matter Injury in Extremely Preterm Infants. *Front Pediatr.* 2020;8:618622.
43. Coviello C, Tataranno ML, Corsini I, Leonardi V, Longini M, Bazzini F, et al. Isoprostanes as Biomarker for Patent Ductus Arteriosus in Preterm Infants. *Frontiers in Pediatrics [Internet].* 2020 [citado 18 de octubre de 2022];8. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fped.2020.00555>
44. Milne GL, Dai Q, Roberts LJ. The isoprostanes--25 years later. *Biochim Biophys Acta.* abril de 2015;1851(4):433-45.
45. Hubbi ME, Semenza GL. Regulation of cell proliferation by hypoxia-inducible factors. *Am J Physiol Cell Physiol.* 15 de diciembre de 2015;309(12):C775-82.
46. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell.* 3 de febrero de 2012;148(3):399-408.
47. Chung HY, Kim HJ, Kim JW, Yu BP. The inflammation hypothesis of aging: molecular modulation by calorie restriction. *Ann N Y Acad Sci.* abril de 2001;928:327-35.
48. Mouradian GC, Lakshminrusimha S, Konduri GG. Perinatal Hypoxemia and Oxygen Sensing. *Compr Physiol.* 1 de abril de 2021;11(2):1653-77.
49. Schneider H. Oxygenation of the placental-fetal unit in humans. *Respiratory Physiology & Neurobiology.* 31 de agosto de 2011;178(1):51-8.

50. Semenza GL. Regulation of physiological responses to continuous and intermittent hypoxia by hypoxia-inducible factor 1. *Exp Physiol.* septiembre de 2006;91(5):803-6.
51. Vento M, Teramo K. Evaluating the fetus at risk for cardiopulmonary compromise. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine.* diciembre de 2013;18(6):324-9.
52. Frank L, Groseclose EE. Preparation for Birth into an O₂-Rich Environment: the Antioxidant Enzymes in the Developing Rabbit Lung. *Pediatr Res.* marzo de 1984;18(3):240-4.
53. Frank L, Ilene Sosenko RS. Prenatal development of lung antioxidant enzymes in four species. *The Journal of Pediatrics.* enero de 1987;110(1):106-10.
54. Nassi N, Ponziani V, Becatti M, Galvan P, Donzelli G. Anti-oxidant enzymes and related elements in term and preterm newborns. *Pediatrics International.* 2009;51(2):183-7.
55. Asikainen TM, Heikkilä P, Kaarteenaho-Wiik R, Kinnula VL, Raivio KO. Cell-specific expression of manganese superoxide dismutase protein in the lungs of patients with respiratory distress syndrome, chronic lung disease, or persistent pulmonary hypertension*. *Pediatric Pulmonology.* 2001;32(3):193-200.
56. Morton RL, Das KC, Guo XL, Iklé DN, White CW. Effect of oxygen on lung superoxide dismutase activities in premature baboons with bronchopulmonary dysplasia. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.* 1 de enero de 1999;276(1):L64-74.
57. Vento M, Aguar M, Escobar J, Arduini A, Escrig R, Brugada M, et al. Antenatal steroids and antioxidant enzyme activity in preterm infants: influence of gender and timing. *Antioxid Redox Signal.* diciembre de 2009;11(12):2945-55.
58. Bartman CM, Matveyenko A, Prakash YS. It's about time: clocks in the developing lung. *J Clin Invest.* 2 de enero de 2020;130(1):39-50.
59. Thébaud B, Goss KN, Laughon M, Whitsett JA, Abman SH, Steinhorn RH, et al. Bronchopulmonary dysplasia. *Nat Rev Dis Primers.* 14 de noviembre de 2019;5(1):78.
60. Kotecha S. Lung growth: implications for the newborn infant. *Archives of Disease in Childhood Fetal and Neonatal Edition.* enero de 2000;82(1):F69.
61. Berger J, Bhandari V. Animal models of bronchopulmonary dysplasia. The term mouse models. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 15 de diciembre de 2014;307(12):L936-947.

62. Gao Y, Raj JU. Regulation of the pulmonary circulation in the fetus and newborn. *Physiol Rev.* octubre de 2010;90(4):1291-335.
63. Pallardo FV, Sastre J, Asensi M, Rodrigo F, Estrela JM, Viña J. Physiological changes in glutathione metabolism in foetal and newborn rat liver. *Biochem J.* 15 de marzo de 1991;274 (Pt 3):891-3.
64. Dawson JA, Morley CJ. Monitoring oxygen saturation and heart rate in the early neonatal period. *Semin Fetal Neonatal Med.* agosto de 2010;15(4):203-7.
65. Dawson JA, Kamlin COF, Vento M, Wong C, Cole TJ, Donath SM, et al. Defining the Reference Range for Oxygen Saturation for Infants After Birth. *Pediatrics.* 1 de junio de 2010;125(6):e1340-7.
66. Kattwinkel, et al. Special Report: Neonatal Resuscitation: 2010 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Pediatrics.* 2010;126(5):e1400-e1413. *PEDIATRICS.* 1 de julio de 2011;128(1):176-176.
67. Vento M, Cubells E, Escobar JJ, Escrig R, Aguar M, Brugada M, et al. Oxygen saturation after birth in preterm infants treated with continuous positive airway pressure and air: assessment of gender differences and comparison with a published nomogram. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* mayo de 2013;98(3):F228-232.
68. Farrow KN, Lee KJ, Perez M, Schriewer JM, Wedgwood S, Lakshminrusimha S, et al. Brief Hyperoxia Increases Mitochondrial Oxidation and Increases Phosphodiesterase 5 Activity in Fetal Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. *Antioxid Redox Signal.* 1 de agosto de 2012;17(3):460-70.
69. Gerstner B, DeSilva TM, Genz K, Armstrong A, Brehmer F, Neve RL, et al. Hyperoxia Causes Maturation-Dependent Cell Death in the Developing White Matter. *J Neurosci.* 30 de enero de 2008;28(5):1236-45.
70. Xu D, Guthrie JR, Mabry S, Sack TM, Truog WE. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase attenuates hyperoxia-induced cell death through activation of ERK/MAPK and PI3K-Akt pathways in lung epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.* noviembre de 2006;291(5):L966-75.
71. Wright CJ, Dennery PA. Manipulation of Gene Expression by Oxygen: A Primer From Bedside to Bench. *Pediatr Res.* julio de 2009;66(1):3-10.
72. Solberg R, Andresen JH, Escrig R, Vento M, Saugstad OD. Resuscitation of Hypoxic Newborn Piglets With Oxygen Induces a Dose-Dependent Increase in Markers of Oxidation. *Pediatr Res.* noviembre de 2007;62(5):559-63.

73. Solberg R, Longini M, Proietti F, Vezzosi P, Saugstad OD, Buonocore G. Resuscitation with supplementary oxygen induces oxidative injury in the cerebral cortex. *Free Radical Biology and Medicine* [Internet]. 2012 [citado 3 de octubre de 2022]; Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.07.022>
74. Ramji S, Ahuja S, Thirupuram S, Rootwelt T, Rooth G, Saugstad OD. Resuscitation of Asphyxic Newborn Infants with Room Air or 100% Oxygen. *Pediatr Res.* diciembre de 1993;34(6):809-12.
75. Saugstad OD, Rootwelt T, Aalen O. Resuscitation of Asphyxiated Newborn Infants With Room Air or Oxygen: An International Controlled Trial: The Resair 2 Study. *Pediatrics.* 1 de julio de 1998;102(1):e1.
76. Vento M, Asensi M, Sastre J, Lloret A, García-Sala F, Miñana JB, et al. Hyperoxemia caused by resuscitation with pure oxygen may alter intracellular redox status by increasing oxidized glutathione in asphyxiated newly born infants. *Semin Perinatol.* diciembre de 2002;26(6):406-10.
77. Saugstad OD, Ramji S, Soll RF, Vento M. Resuscitation of newborn infants with 21% or 100% oxygen: an updated systematic review and meta-analysis. *Neonatology.* 2008;94(3):176-82.
78. Perlman JM, Wyllie J, Kattwinkel J, Atkins DL, Chameides L, Goldsmith JP, et al. Part 11: Neonatal Resuscitation. *Circulation.* 19 de octubre de 2010;122(16_suppl_2):S516-38.
79. Vento M, Moro M, Escrig R, Arruza L, Villar G, Izquierdo I, et al. Preterm Resuscitation With Low Oxygen Causes Less Oxidative Stress, Inflammation, and Chronic Lung Disease. *Pediatrics.* 1 de septiembre de 2009;124(3):e439-49.
80. Aguar M, Cubells E, Escobar J, Kuligowski J, Iriondo M, Izquierdo I, et al. Preterm babies randomly assigned to be blindly resuscitated with higher (60%) vs. Lower (30%) initial FiO₂: Effects on oxidative stress and mortality. *EPAS;* 2014.
81. Millán I, Corral-Debrisky M, Vento M, Torres-Cuevas I. Hypoxic preconditioning induces neuroprotection against oxidative stress. *Redox Experimental Medicine.* 1 de septiembre de 2022;2022(1):R159-67.
82. Zhang SXL, Miller JJ, Gozal D, Wang Y. Whole-body hypoxic preconditioning protects mice against acute hypoxia by improving lung function. *J Appl Physiol (1985).* enero de 2004;96(1):392-7.
83. Chuang CC, Zhou T, Olfert IM, Zuo L. Hypoxic Preconditioning Attenuates Reoxygenation-Induced Skeletal Muscle Dysfunction in Aged Pulmonary TNF- α Overexpressing Mice. *Front Physiol.* 2018;9:1720.

84. Niatsetskaya ZV, Charlagorla P, Matsukevich DA, Sosunov SA, Mayurasakorn K, Ratner VI, et al. Mild Hypoxemia during Initial Reperfusion Alleviates the Severity of Secondary Energy Failure and Protects Brain in Neonatal Mice with Hypoxic-Ischemic Injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* febrero de 2012;32(2):232-41.
85. Zhang W, Chen M, Li H, Yuan J, Li J, Wu F, et al. Hypoxia preconditioning attenuates lung injury after thoracoscopic lobectomy in patients with lung cancer: a prospective randomized controlled trial. *BMC Anesthesiology* [Internet]. 11 de noviembre de 2019 [citado 23 de junio de 2022];19(1):209. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12871-019-0854-z>
86. Cruz FF, Rocco PRM. Hypoxic preconditioning enhances mesenchymal stromal cell lung repair capacity. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 14 de julio de 2015 [citado 23 de junio de 2022];6(1):130. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4501085/>
87. Zuo L, Pannell BK, Re AT, Best TM, Wagner PD. Po₂ cycling protects diaphragm function during reoxygenation via ROS, Akt, ERK, and mitochondrial channels. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1 de diciembre de 2015;309(11):C759-766.
88. Zuo L, Re A, Roberts W, Zhou T, Hemmelgarn B, Pannell B. Hypoxic Preconditioning Mitigates Diaphragmatic Skeletal Muscle Fatigue during Reoxygenation via ROS and ERK Signaling: 1264 Board #57 May 28, 9. *Medicine & Science in Sports & Exercise.* 1 de mayo de 2015;47:330.
89. Ferguson KK, Meeker JD, McElrath TF, Mukherjee B, Cantonwine DE. Repeated measures of inflammation and oxidative stress biomarkers in preeclamptic and normotensive pregnancies. *Am J Obstet Gynecol.* mayo de 2017;216(5):527.e1-527.e9.
90. Longini M, Perrone S, Kenanidis A, Vezzosi P, Marzocchi B, Petraglia F, et al. Isoprostanes in amniotic fluid: a predictive marker for fetal growth restriction in pregnancy. *Free Radical Biology and Medicine.* 1 de junio de 2005;38(11):1537-41.
91. Yessoufou A, Moutairou K. Maternal Diabetes in Pregnancy: Early and Long-Term Outcomes on the Offspring and the Concept of “Metabolic Memory”. *Exp Diabetes Res.* 2011;2011:218598.
92. Teramo KA. Obstetric problems in diabetic pregnancy – The role of fetal hypoxia. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism.* 1 de agosto de 2010;24(4):663-71.
93. Escobar J, Teramo K, Stefanovic V, Andersson S, Asensi MA, Arduini A, et al. Amniotic fluid oxidative and nitrosative stress biomarkers correlate with fetal chronic hypoxia in diabetic pregnancies. *Neonatology.* 2013;103(3):193-8.

94. Frank L, Groseclose EE. Preparation for Birth into an O₂-Rich Environment: the Antioxidant Enzymes in the Developing Rabbit Lung. *Pediatr Res.* marzo de 1984;18(3):240-4.
95. Saugstad OD. Hypoxanthine as an indicator of hypoxia: its role in health and disease through free radical production. *Pediatr Res.* febrero de 1988;23(2):143-50.
96. Farrow KN, Wedgwood S, Lee KJ, Czech L, Gugino SF, Lakshminrusimha S, et al. Mitochondrial oxidant stress increases PDE5 activity in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Respir Physiol Neurobiol.* 31 de diciembre de 2010;174(3):272-81.
97. Afolayan AJ, Eis A, Alexander M, Michalkiewicz T, Teng RJ, Lakshminrusimha S, et al. Decreased endothelial nitric oxide synthase expression and function contribute to impaired mitochondrial biogenesis and oxidative stress in fetal lambs with persistent pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 1 de enero de 2016;310(1):L40-49.
98. Berkelhamer SK, Kim GA, Radder JE, Wedgwood S, Czech L, Steinhorn RH, et al. Developmental differences in hyperoxia-induced oxidative stress and cellular responses in the murine lung. *Free Radic Biol Med.* agosto de 2013;61:51-60.
99. Kandasamy J, Olave N, Ballinger SW, Ambalavanan N. Vascular Endothelial Mitochondrial Function Predicts Death or Pulmonary Outcomes in Preterm Infants. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 de octubre de 2017;196(8):1040-9.
100. Niatsetskaya ZV, Sosunov SA, Matsiukevich D, Utkina-Sosunova IV, Ratner VI, Starkov AA, et al. The oxygen free radicals originating from mitochondrial complex I contribute to oxidative brain injury following hypoxia-ischemia in neonatal mice. *J Neurosci.* 29 de febrero de 2012;32(9):3235-44.
101. Baregamian N, Song J, Papaconstantinou J, Hawkins HK, Evers BM, Chung DH. Intestinal mitochondrial apoptotic signaling is activated during oxidative stress. *Pediatr Surg Int.* agosto de 2011;27(8):871-7.
102. Saugstad OD. Oxygen and retinopathy of prematurity. *J Perinatol.* mayo de 2006;26(1):S46-50.
103. Buczynski BW, Maduekwe ET, O'Reilly MA. The Role of Hyperoxia in the Pathogenesis of Experimental BPD. *Semin Perinatol.* abril de 2013;37(2):69-78.
104. Halpern MD, Holubec H, Dominguez JA, Williams CS, Meza YG, McWilliam DL, et al. Up-regulation of IL-18 and IL-12 in the ileum of neonatal rats with necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res.* junio de 2002;51(6):733-9.

105. Ford H, Watkins S, Reblock K, Rowe M. The role of inflammatory cytokines and nitric oxide in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg.* febrero de 1997;32(2):275-82.
106. Esiaba I, Angeles DM, Holden MS, Tan JBC, Asmerom Y, Gollin G, et al. Urinary allantoin is elevated in severe intraventricular hemorrhage in the preterm newborn. *Transl Stroke Res.* abril de 2016;7(2):97-102.
107. Markus T, Hansson S, Amer-Wählin I, Hellström-Westas L, Saugstad OD, Ley D. Cerebral inflammatory response after fetal asphyxia and hyperoxic resuscitation in newborn sheep. *Pediatr Res.* julio de 2007;62(1):71-7.
108. Ten VS, Starkov A. Hypoxic-Ischemic Injury in the Developing Brain: The Role of Reactive Oxygen Species Originating in Mitochondria. *Neurol Res Int.* 2012;2012:542976.
109. Lee JW, Davis JM. Future Applications of Antioxidants in Premature Infants. *Curr Opin Pediatr.* abril de 2011;23(2):161-6.
110. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* septiembre de 2008;295(3):L379-99.
111. Thickett DR, Armstrong L, Christie SJ, Millar AB. Vascular Endothelial Growth Factor May Contribute to Increased Vascular Permeability in Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* noviembre de 2001;164(9):1601-5.
112. Horowitz S. Pathways to cell death in hyperoxia. *Chest.* julio de 1999;116(1 Suppl):64S-67S.
113. Coalson JJ, Winter VT, Siler-Khodr T, Yoder BA. Neonatal Chronic Lung Disease in Extremely Immature Baboons. *Am J Respir Crit Care Med.* octubre de 1999;160(4):1333-46.
114. Thompson A, Bhandari V. Pulmonary Biomarkers of Bronchopulmonary Dysplasia. *Biomark Insights.* 2 de julio de 2008;3:361-73.
115. Marseglia L, D'Angelo G, Granese R, Falsaperla R, Reiter RJ, Corsello G, et al. Role of oxidative stress in neonatal respiratory distress syndrome. *Free Radical Biology and Medicine.* 1 de octubre de 2019;142:132-7.
116. Carvalho CG, Procianoy RS, Neto EC, Silveira RC. Preterm Neonates with Respiratory Distress Syndrome: Ventilator-Induced Lung Injury and Oxidative Stress. *Journal of Immunology Research.* 23 de abril de 2018;2018:e6963754.

117. Murch SH, MacDonald TT, Wood CB, Costeloe KL. Tumour necrosis factor in the bronchoalveolar secretions of infants with the respiratory distress syndrome and the effect of dexamethasone treatment. *Thorax*. 1 de enero de 1992;47(1):44-7.
118. Grigg JM, Barber A, Silverman M. Increased Levels of Bronchoalveolar Lavage Fluid Interleukin-6 in Preterm Ventilated Infants after Prolonged Rupture of Membranes. *Am Rev Respir Dis*. abril de 1992;145(4_pt_1):782-6.
119. Matalon S, Holm BA, Notter RH. Mitigation of pulmonary hyperoxic injury by administration of exogenous surfactant. *J Appl Physiol* (1985). febrero de 1987;62(2):756-61.
120. Matalon S, Wright JR. Surfactant proteins and inflammation: the yin and the yang. *Am J Respir Cell Mol Biol*. diciembre de 2004;31(6):585-6.
121. Boda D, Németh I, Pintér S. Surface tension, glutathione content and redox ratio of the tracheal aspirate fluid of premature infants with IRDS. *Biol Neonate*. octubre de 1998;74(4):281-8.
122. Dani C, Buonocore G, Longini M, Felici C, Rodriguez A, Corsini I, et al. Superoxide dismutase and catalase activity in naturally derived commercial surfactants. *Pediatric Pulmonology*. 2009;44(11):1125-31.
123. Lignelli E, Palumbo F, Myti D, Morty RE. Recent advances in our understanding of the mechanisms of lung alveolarization and bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 1 de diciembre de 2019;317(6):L832-87.
124. Baraldi E, Filippone M. Chronic lung disease after premature birth. *N Engl J Med*. 8 de noviembre de 2007;357(19):1946-55.
125. Perrone S, Tataranno ML, Buonocore G. Oxidative Stress and Bronchopulmonary Dysplasia. *J Clin Neonatol*. 2012;1(3):109-14.
126. Bracci R, Buonocore G. Chorioamnionitis: a risk factor for fetal and neonatal morbidity. *Biol Neonate*. 2003;83(2):85-96.
127. Perrone S, Tataranno ML, Negro S, Longini M, Marzocchi B, Proietti F, et al. Early identification of the risk for free radical-related diseases in preterm newborns. *Early Hum Dev*. abril de 2010;86(4):241-4.
128. Solberg R, Perrone S, Saugstad OD, Buonocore G. Risks and benefits of oxygen in the delivery room. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 1 de abril de 2012;25(sup1):41-4.
129. Haagsman HP. Interactions of surfactant protein A with pathogens. *Biochim Biophys Acta*. 19 de noviembre de 1998;1408(2-3):264-77.

130. Potter CF, Kuo NT, Farver CF, McMahon JT, Chang CH, Agani FH, et al. Effects of hyperoxia on nitric oxide synthase expression, nitric oxide activity, and lung injury in rat pups. *Pediatr Res.* enero de 1999;45(1):8-13.
131. Gitto E, Pellegrino S, Gitto P, Barberi I, Reiter RJ. Oxidative stress of the newborn in the pre- and postnatal period and the clinical utility of melatonin. *J Pineal Res.* marzo de 2009;46(2):128-39.
132. Inder TE, Darlow BA, Sluis KB, Winterbourn CC, Graham P, Sanderson KJ, et al. The correlation of elevated levels of an index of lipid peroxidation (MDA-TBA) with adverse outcome in the very low birthweight infant. *Acta Paediatr.* septiembre de 1996;85(9):1116-22.
133. Banks BA, Ischiropoulos H, McClelland M, Ballard PL, Ballard RA. Plasma 3-nitrotyrosine is elevated in premature infants who develop bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics.* mayo de 1998;101(5):870-4.
134. Gladstone IM, Levine RL. Oxidation of proteins in neonatal lungs. *Pediatrics.* mayo de 1994;93(5):764-8.
135. Varsila E, Pesonen E, Andersson S. Early protein oxidation in the neonatal lung is related to development of chronic lung disease. *Acta Paediatr.* noviembre de 1995;84(11):1296-9.
136. Filippone M, Bonetto G, Corradi M, Frigo AC, Baraldi E. Evidence of unexpected oxidative stress in airways of adolescents born very pre-term. *Eur Respir J.* noviembre de 2012;40(5):1253-9.
137. Saugstad OD. Bronchopulmonary dysplasia-oxidative stress and antioxidants. *Semin Neonatol.* febrero de 2003;8(1):39-49.
138. Revhaug C, Zasada M, Rognlien AGW, Günther CC, Grabowska A, Książek T, et al. Pulmonary vascular disease is evident in gene regulation of experimental bronchopulmonary dysplasia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* junio de 2020;33(12):2122-30.
139. Kietzmann T, Petry A, Shvetsova A, Gerhold JM, Görlach A. The epigenetic landscape related to reactive oxygen species formation in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol.* junio de 2017;174(12):1533-54.
140. Cuna A, Halloran B, Faye-Petersen O, Kelly D, Crossman DK, Cui X, et al. Alterations in Gene Expression and DNA Methylation during Murine and Human Lung Alveolar Septation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* julio de 2015;53(1):60-73.
141. Bik-Multanowski M, Revhaug C, Grabowska A, Dobosz A, Madetko-Talowska A, Zasada M, et al. Hyperoxia induces epigenetic changes in newborn mice lungs. *Free Radic Biol Med.* junio de 2018;121:51-6.

142. Lorente-Pozo S, Parra-Llorca A, Núñez-Ramiro A, Cernada M, Hervás D, Boronat N, et al. The Oxygen Load Supplied during Delivery Room Stabilization of Preterm Infants Modifies the DNA Methylation Profile. *J Pediatr.* noviembre de 2018;202:70-76.e2.
143. Tyson JE, Wright LL, Oh W, Kennedy KA, Mele L, Ehrenkranz RA, et al. Vitamin A supplementation for extremely-low-birth-weight infants. National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *N Engl J Med.* 24 de junio de 1999;340(25):1962-8.
144. Davis JM, Parad RB, Michele T, Allred E, Price A, Rosenfeld W, et al. Pulmonary outcome at 1 year corrected age in premature infants treated at birth with recombinant human CuZn superoxide dismutase. *Pediatrics.* marzo de 2003;111(3):469-76.
145. Escobar J, Cubells E, Enomoto M, Quintás G, Kuligowski J, Fernández CM, et al. Prolonging in utero-like oxygenation after birth diminishes oxidative stress in the lung and brain of mice pups. *Redox Biol.* 23 de mayo de 2013;1(1):297-303.
146. Cháfer-Pericás C, Rahkonen L, Sánchez-Illana A, Kuligowski J, Torres-Cuevas I, Cernada M, et al. Ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry determination of lipid peroxidation biomarkers in newborn serum samples. *Anal Chim Acta.* 30 de julio de 2015;886:214-20.
147. Hensley K, Maidt ML, Pye QN, Stewart CA, Wack M, Tabatabaie T, et al. Quantitation of protein-bound 3-nitrotyrosine and 3,4-dihydroxyphenylalanine by high-performance liquid chromatography with electrochemical array detection. *Anal Biochem.* 5 de septiembre de 1997;251(2):187-95.
148. Torres-Cuevas I, Kuligowski J, Cárcel M, Cháfer-Pericás C, Asensi M, Solberg R, et al. Protein-bound tyrosine oxidation, nitration and chlorination by-products assessed by ultraperformance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta.* 24 de marzo de 2016;913:104-10.
149. Dunnill MS. Quantitative methods in the study of pulmonary pathology. *Thorax.* diciembre de 1962;17(4):320-8.
150. Banerjee R, Evande R, Kabil Ö, Ojha S, Taoka S. Reaction mechanism and regulation of cystathionine β -synthase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics.* 11 de abril de 2003;1647(1):30-5.
151. Walter EC, Ehlenbach WJ, Hotchkin DL, Chien JW, Koepsell TD. Low birth weight and respiratory disease in adulthood: a population-based case-control study. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 de julio de 2009;180(2):176-80.
152. Northway WH, Moss RB, Carlisle KB, Parker BR, Popp RL, Pitlick PT, et al. Late pulmonary sequelae of bronchopulmonary dysplasia. *N Engl J Med.* 27 de diciembre de 1990;323(26):1793-9.

153. Bush A. COPD: A Pediatric Disease. *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. 1 de enero de 2008;5(1):53-67.
154. Abman SH, Bancalari E, Jobe A. The Evolution of Bronchopulmonary Dysplasia after 50 Years. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 de febrero de 2017;195(4):421-4.
155. Higgins RD, Jobe AH, Koso-Thomas M, Bancalari E, Viscardi RM, Hartert TV, et al. Bronchopulmonary Dysplasia: Executive Summary of a Workshop. *J Pediatr*. junio de 2018;197:300-8.
156. Hogan BLM, Barkauskas CE, Chapman HA, Epstein JA, Jain R, Hsia CCW, et al. Repair and regeneration of the respiratory system: complexity, plasticity, and mechanisms of lung stem cell function. *Cell Stem Cell*. 7 de agosto de 2014;15(2):123-38.
157. Committee on Fetus and Newborn, American Academy of Pediatrics. Respiratory support in preterm infants at birth. *Pediatrics*. enero de 2014;133(1):171-4.
158. Cernada M, Cubells E, Torres-Cuevas I, Kuligowski J, Escobar J, Aguar M, et al. Oxygen in the delivery room. *Early Human Development*. junio de 2013;89:S11-3.
159. Saugstad OD, Aune D. Optimal Oxygenation of Extremely Low Birth Weight Infants: A Meta-Analysis and Systematic Review of the Oxygen Saturation Target Studies. *Neonatology*. 2014;105(1):55-63.
160. Torres-Cuevas I, Parra-Llorca A, Sánchez-Illana A, Nuñez-Ramiro A, Kuligowski J, Cháfer-Pericás C, et al. Oxygen and oxidative stress in the perinatal period. *Redox Biol*. 12 de marzo de 2017;12:674-81.
161. Berfenstam R, Edlund T, Zettergren L. Hyaline Membrane Disease. *Acta Paediatrica*. 1958;47(5):527-33.
162. Hellstroem B. THE EFFECT OF HIGH OXYGEN CONCENTRATIONS AND HYPOTHERMIA ON THE LUNG OF THE NEWBORN MOUSE. *Acta Paediatr Scand*. septiembre de 1965;54:457-66.
163. Vento M, Moro M, Escrig R, Arruza L, Villar G, Izquierdo I, et al. Preterm resuscitation with low oxygen causes less oxidative stress, inflammation, and chronic lung disease. *Pediatrics*. septiembre de 2009;124(3):e439-449.
164. Jin Y, Peng LQ, Zhao AL. Hyperoxia induces the apoptosis of alveolar epithelial cells and changes of pulmonary surfactant proteins. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. enero de 2018;22(2):492-7.

165. Alejandre-Alcázar MA, Kwapiszewska G, Reiss I, Amarie OV, Marsh LM, Sevilla-Pérez J, et al. Hyperoxia modulates TGF- β /BMP signaling in a mouse model of bronchopulmonary dysplasia. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. febrero de 2007;292(2):L537-49.
166. Bouch S, O'Reilly M, Harding R, Sozo F. Neonatal exposure to mild hyperoxia causes persistent increases in oxidative stress and immune cells in the lungs of mice without altering lung structure. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2 de julio de 2015;309:ajplung.00359.2014.
167. Zhang W, Chen M, Li H, Yuan J, Li J, Wu F, et al. Hypoxia preconditioning attenuates lung injury after thoracoscopic lobectomy in patients with lung cancer: a prospective randomized controlled trial. *BMC Anesthesiology*. 11 de noviembre de 2019;19(1):209.
168. Rahman I. Inflammation and the regulation of glutathione level in lung epithelial cells. *Antioxid Redox Signal*. 1999;1(4):425-47.
169. Martín JA, Pereda J, Martínez-López I, Escrig R, Miralles V, Pallardó FV, et al. Oxidative stress as a signal to up-regulate gamma-cystathionase in the fetal-to-neonatal transition in rats. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 30 de noviembre de 2007;53 Suppl:OL1010-1017.
170. Madurga A, Golec A, Pozarska A, Ishii I, Mižíková I, Nardiello C, et al. The H₂S-generating enzymes cystathionine β -synthase and cystathionine γ -lyase play a role in vascular development during normal lung alveolarization. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 1 de octubre de 2015;309(7):L710-724.
171. Vadivel A, Alphonse RS, Ionescu L, Machado DS, O'Reilly M, Eaton F, et al. Exogenous Hydrogen Sulfide (H₂S) Protects Alveolar Growth in Experimental O₂-Induced Neonatal Lung Injury. *PLOS ONE*. 6 de marzo de 2014;9(3):e90965.
172. Madurga A, Mižíková I, Ruiz-Camp J, Vadász I, Herold S, Mayer K, et al. Systemic hydrogen sulfide administration partially restores normal alveolarization in an experimental animal model of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 1 de abril de 2014;306(7):L684-697.
173. McGrath-Morrow SA, Cho C, Soutiere S, Mitzner W, Tuder R. The Effect of Neonatal Hyperoxia on the Lung of p21Waf1/Cip1/Sdi1-Deficient Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. mayo de 2004;30(5):635-40.
174. Bezerra FS, Ramos C de O, Castro T de F, Araújo NP da S, de Souza ABF, Bandeira ACB, et al. Exogenous surfactant prevents hyperoxia-induced lung injury in adult mice. *Intensive Care Medicine Experimental*. 27 de marzo de 2019;7(1):19.

175. Simon RH, DeHart PD, Nadeau DM. Resistance of Rat Pulmonary Alveolar Epithelial Cells to Neutrophil- and Oxidant-induced Injury. *Am J Respir Cell Mol Biol.* septiembre de 1989;1(3):221-9.
176. Ho YS, Dey MS, Crapo JD. Antioxidant enzyme expression in rat lungs during hyperoxia. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* [Internet]. 1 de mayo de 1996 [citado 26 de octubre de 2022]; Disponible en: <https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajplung.1996.270.5.L810>
177. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biology.* 1 de abril de 2017;11:613-9.
178. McGillick EV, Orgeig S, Allison BJ, Brain KL, Niu Y, Itani N, et al. Maternal chronic hypoxia increases expression of genes regulating lung liquid movement and surfactant maturation in male fetuses in late gestation. *The Journal of Physiology.* 2017;595(13):4329-50.
179. Sosenko IR, Chen Y, Price LT, Frank L. Failure of premature rabbits to increase lung antioxidant enzyme activities after hyperoxic exposure: antioxidant enzyme gene expression and pharmacologic intervention with endotoxin and dexamethasone. *Pediatr Res.* abril de 1995;37(4 Pt 1):469-75.
180. Ansar M, Ivanciuc T, Garofalo RP, Casola A. Increased Lung Catalase Activity Confers Protection Against Experimental RSV Infection. *Sci Rep.* 27 de febrero de 2020;10(1):3653.
181. Ben-Ari J, Makhoul IR, Dorio RJ, Buckley S, Warburton D, Walker SM. Cytokine response during hyperoxia: sequential production of pulmonary tumor necrosis factor and interleukin-6 in neonatal rats. *Isr Med Assoc J.* mayo de 2000;2(5):365-9.
182. Johnston CJ, Wright TW, Reed CK, Finkelstein JN. Comparison of Adult and Newborn Pulmonary Cytokine Mrna Expression After Hyperoxia. *Experimental Lung Research.* 1 de enero de 1997;23(6):537-52.
183. Ehrhardt H, Pritzke T, Oak P, Kossert M, Biebach L, Förster K, et al. Absence of TNF- α enhances inflammatory response in the newborn lung undergoing mechanical ventilation. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.* 15 de mayo de 2016;310(10):L909-18.
184. D'Angio CT, LoMonaco MB, Chaudhry SA, Paxhia A, Ryan RM. Discordant pulmonary proinflammatory cytokine expression during acute hyperoxia in the newborn rabbit. *Exp Lung Res.* agosto de 1999;25(5):443-65.
185. Bhandari V, Elias JA. Cytokines in tolerance to hyperoxia-induced injury in the developing and adult lung. *Free Radic Biol Med.* 1 de julio de 2006;41(1):4-18.

186. Ward NS, Waxman AB, Homer RJ, Mantell LL, Einarsson O, Du Y, et al. Interleukin-6-induced protection in hyperoxic acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol.* mayo de 2000;22(5):535-42.
187. Voiriot G, Razazi K, Amsellem V, Tran Van Nhieu J, Abid S, Adnot S, et al. Interleukin-6 displays lung anti-inflammatory properties and exerts protective hemodynamic effects in a double-hit murine acute lung injury. *Respiratory Research.* 19 de abril de 2017;18(1):64.
188. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol.* mayo de 2015;16(5):448-57.
189. Nogueira-Silva C, Santos M, Baptista MJ, Moura RS, Correia-Pinto J. IL-6 Is Constitutively Expressed During Lung Morphogenesis and Enhances Fetal Lung Explant Branching. *Pediatr Res.* noviembre de 2006;60(5):530-6.
190. Jobe AH, Ikegami M. Antenatal infection/inflammation and postnatal lung maturation and injury. *Respiratory Research.* 11 de enero de 2001;2(1):27.
191. Shimoya K, Taniguchi T, Matsuzaki N, Moriyama A, Murata Y, Kitajima H, et al. Chorioamnionitis decreased incidence of respiratory distress syndrome by elevating fetal interleukin-6 serum concentration. *Human Reproduction.* 1 de octubre de 2000;15(10):2234-40.
192. Zhang SXL, Miller JJ, Stolz DB, Serpero LD, Zhao W, Gozal D, et al. Type I epithelial cells are the main target of whole-body hypoxic preconditioning in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* marzo de 2009;40(3):332-9.
193. Giusto K, Wanczyk H, Jensen T, Finck C. Hyperoxia-induced bronchopulmonary dysplasia: better models for better therapies. *Dis Model Mech.* 23 de febrero de 2021;14(2):dmm047753.
194. Zhu X, Lei X, Wang J, Dong W. Protective effects of resveratrol on hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats by alleviating apoptosis and ROS production. *J Matern Fetal Neonatal Med.* diciembre de 2020;33(24):4150-8.
195. Husari AW, Dbaibo GS, Bitar H, Khayat A, Panjarian S, Nasser M, et al. Apoptosis and the activity of ceramide, Bax and Bcl-2 in the lungs of neonatal rats exposed to limited and prolonged hyperoxia. *Respiratory Research.* 26 de julio de 2006;7(1):100.
196. Nardiello C, Mižíková I, Morty RE. Looking ahead: where to next for animal models of bronchopulmonary dysplasia? *Cell Tissue Res.* marzo de 2017;367(3):457-68.
197. Mitchell A, Wanczyk H, Jensen T, Finck C. Human induced pluripotent stem cells ameliorate hyperoxia-induced lung injury in a mouse model. *Am J Transl Res.* 2020;12(1):292-307.

198. Vosdoganes P, Lim R, Koulaeva E, Chan ST, Acharya R, Moss TJM, et al. Human amnion epithelial cells modulate hyperoxia-induced neonatal lung injury in mice. *Cytherapy*. agosto de 2013;15(8):1021-9.
199. O'Reilly M, Hansbro PM, Horvat JC, Beckett EL, Harding R, Sozo F. Bronchiolar remodeling in adult mice following neonatal exposure to hyperoxia: relation to growth. *Anat Rec (Hoboken)*. abril de 2014;297(4):758-69.
200. Zhang SXL, Miller JJ, Gozal D, Wang Y. Whole-body hypoxic preconditioning protects mice against acute hypoxia by improving lung function. *J Appl Physiol (1985)*. enero de 2004;96(1):392-7.
201. Bland RD, Ertsey R, Mokres LM, Xu L, Jacobson BE, Jiang S, et al. Mechanical ventilation uncouples synthesis and assembly of elastin and increases apoptosis in lungs of newborn mice. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. enero de 2008;294(1):L3-14.
202. Hao C, You J, Qiu H, Zhou O, Liu J, Zou W, et al. Hypoxic preconditioning improves the survival and pro-angiogenic capacity of transplanted human umbilical cord mesenchymal stem cells via HIF-1 α signaling in a rat model of bronchopulmonary dysplasia. *Biochem Biophys Res Commun*. 21 de mayo de 2022;605:111-8.

9 ANEXOS

9.1 AUTORIZACIÓN PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL



DIRECCIÓN GENERAL DE PRODUCCIÓN AGRARIA Y GANADERÍA

Ciutat Administrativa 9 d'Octubre
Castán Tobeñas, 77. Edif. B3 P2 46018 VALENCIA



Unión Europea

AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2015/VSC/PEA/00106

Vista la solicitud realizada en fecha **08/05/15** con nº reg. entrada **7802** por D/D^a. **Pilar Campins Falcó**, Vicerrectora de Investigación y Política Científica, centro usuario **ES460780001001**, para realizar el procedimiento:

"Efecto del precondicionamiento hipóxico sobre el estado oxidativo, inflamación y metabolismo en el sistema nervioso central y respiratorio de ratones nacidos en hipoxia con transición a 21% y/o 100% de O2."

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero,

Vista la propuesta del jefe del servicio de Sanidad y Bienestar Animal.

AUTORIZO:

la realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: **2015/VSC/PEA/00106** tipo **2**, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: **Universidad de Valencia-Estudio General**

Responsable del proyecto: **Isabel Torres Cuevas**

Establecimiento: **Animalario Facultad de Farmacia SCSIE Burjassot**

Necesidad de evaluación retrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, 21 de mayo de 2015

El director general de Producción Agraria y Ganadería

José Miguel Ferrer Arranz



