

Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey

Campus Monterrey

Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud



“Alternativas para el tratamiento de displasia broncopulmonar por exposición a oxígeno suplementario en un modelo animal”

Disertación presentada por

Gabriela Guzmán Navarro

sometida a la

Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud

como un requisito parcial para obtener el grado académico de

Doctor

en

Ciencias Clínicas

Monterrey Nuevo León, 15 de Junio de 2021

Dedicatoria

A mis padres

Ya que gracias a ellos, estoy aquí.

A mi esposo e hijos

Ya que sin ellos, no valdría la pena estar aquí.

Reconocimientos

A mi familia porque siempre me estuvo apoyando y ha sido mi principal motivación de superación. A mis padres porque con esfuerzo y sacrificio siempre me han impulsado a superarme.

A la Doctora Fabiola Castorena, por su invaluable guía y su apoyo incondicional, pero sobre todo por brindarme su amistad.

Al Dr. Víctor Lara Díaz por sus consejos y su asesoría. Y por ser el primero que me brindó la oportunidad entrar al doctorado.

A los miembros de mi comité doctoral: la Dra. María Isabel Hernández Ochoa, el Dr. Mario Abelardo Bermúdez de León y el Dr. Carlos Enrique Guerrero Beltrán por sus recomendaciones y aportaciones al proyecto.

A todos los profesores y alumnos que de una u otra manera participaron en este proyecto y que hicieron posible la mayoría de los experimentos. Gracias por sus enseñanzas, por su asesoría y por hacer divertido el trabajo en el laboratorio y el bioterio: Mtra. Irene Martín-Estal, Dr. José Eduardo Pérez Saucedo, Dra. Raquel Cuevas-Díaz Durán, Dr. Luis E Cuervo Pérez , Dr. Álvaro Barbosa Quintana, Química Isabel García, Veterinarios CITES, Dra. Laura Villarreal-Alvarado, Dra. Nora Letechipia Mendoza, Lic. Anakaren Vaquera-Vázquez, Dra. Tania Cuevas-Cerda, Dra. Karina Garza-García, Lic. Paola Morales Martínez, Dr. Jorge Saldaña Rodríguez, Dr. Rodolfo Benavides Guajardo, Dra. Andrea Leal López, Dra. Marcela Galindo Rangel, Fabiola Velázquez y Ricardo Jiménez.

Gracias al Tecnológico de Monterrey, al Dr. José Antonio Dávila Rivas y al Dr. Manuel Pérez por apoyarme con la beca del doctorado.

“Alternativas para el tratamiento de displasia broncopulmonar por exposición a oxígeno suplementario en un modelo animal”

por

Gabriela Guzmán Navarro

Resumen

La exposición a condiciones de hiperoxia-hipoxia provoca un arresto del desarrollo alveolar en los bebés prematuros con displasia broncopulmonar, donde las especies reactivas de oxígeno y el estrés oxidante se ven incrementados. El receptor de hidrocarburos de arilo (AhR) es uno de los principales activadores del sistema antioxidante que protege a los tejidos del daño oxidante.

El presente trabajo tiene como objetivo determinar si la activación prenatal del receptor de hidrocarburos de arilo mediante la administración del Indole-3-carbinol (I3C) a ratas preñadas, protege a las crías al ser expuestas a un esquema de hiperoxia-hipoxia. Para evaluar la activación de los genes regulados por la activación del AhR (*CYP1A1*, *CYP1B1*, *UGT1A6*, *NQO1* y *GSTA1*), se cuantificó el nivel de expresión de mRNA mediante la reacción de polimerasa en cadena en tiempo real (RT-PCR). Utilizando el modelo de Ratner modificado, se evaluó el Conteo radial alveolar (RAC) y el grado de fibrosis.

Los resultados mostraron que la expresión relativa de los genes relacionados con la AhR en las crías de ratas, a las que se les administró prenatalmente el I3C fue significativamente diferente al del grupo control. El RAC fue significativamente menor en el grupo de hiperoxia-hipoxia que en el grupo no expuesto. Cuando las crías fueron tratadas prenatalmente con el I3C y expuestas al esquema de hiperoxia-hipoxia, observamos una recuperación en el RAC, y el índice de fibrosis fue similar al del grupo no expuesto. La evaluación de citocinas en plasma mostró un incremento en la vía de señalización del NF- κ B en las crías tratadas con el I3C, lo que sugiere que esta vía podría regular el proceso inflamatorio bajo la estimulación de este componente.

En conclusión el presente trabajo demuestra que la administración prenatal del I3C activa los genes relacionados con el AhR en las crías, lo que atenúa el daño pulmonar provocado por la exposición a condiciones de hiperoxia-hipoxia.

Lista de Figuras

Figura 1. Etapas del desarrollo pulmonar	14
Figura 2. Esquema de factores patofisiológicos implicados en el desarrollo de DBP.....	16
Figura 3. Vía de señalización del receptor de hidrocarburos de Arilo	31
Figura 4. Rata Sprague Dawley con sus crías.....	35
Figura 5. Esquema del diseño del estudio.....	36
Figura 6. A: concentrador Respironics Everflo-OPI. B: sensor de oxígeno Lutron (Oxygen Meter)	38
Figura 7. Esquema de hiperoxia-hipoxia	38
Figura 8. A: Obtención de órganos de las crías. B: cerebro de cría retirado para almacenamiento.....	40
Figura 9. Pulmón de cría de rata de 13 días de vida	40
Figura 10. Sección de pulmón incluido en parafina. Bloque de parafina en caset.....	41
Figura 11. Línea perpendicular para conteo del RAC.....	43
Figura 12. Medida semiautomática del índice de intersección lineal media	44
Figura 13. Escala de Ashcroft modificada	46
Figura 14. Imagen representativa de gel de agarosa con muestras de RNA extraídas de pulmón.....	49
Figura 15. Termociclador Quant Studio 5.0.....	51
Figura 16. Imagen representativa de una membrana Rat Cytokine Antibody Array	53
Figura 17. Efecto de administración prenatal del I3C en la expresión relativa del gen AhR en ratas recién nacidas	56
Figura 18. Efecto de administración prenatal del I3C en la expresión relativa del gen Cyp1a1 en ratas recién nacidas.....	57
Figura 19. Efecto de administración prenatal del I3C en la expresión relativa del gen Cyp1b1 en ratas recién nacidas.....	58
Figura 20. Efecto de administración prenatal del I3C en la expresión relativa del gen Nqo1 en ratas recién nacidas.....	59
Figura 21. Efecto de administración prenatal del I3C en la expresión relativa del gen Ugt1a6 en ratas recién nacidas.....	60
Figura 22. Efecto de administración prenatal del I3C en la expresión relativa del gen Gsta1 en ratas recién nacidas.....	61
Figura 23. Efecto del I3C en la ganancia de peso de las crías en el día 6 de vida.....	62

Figura 24. Efecto del I3C en la ganancia de peso de las crías en el día 13 de vida.....	63
Figura 25. Efecto del I3C en la ganancia de peso de las crías en el día 21 de vida.....	64
Figura 26. Efecto del I3C en el conteo alveolar radial, en pulmones de ratas recién nacidas expuestas a ciclos de hiperoxia-hipoxia y sacrificadas en el día 6 de vida.....	65
Figura 27. Efecto del I3C en la histopatología, en pulmones de ratas recién nacidas expuestas a ciclos de hiperoxia-hipoxia y sacrificadas en el día 13 de vida	66
Figura 28. Representación gráfica de la media del RAC \pm DE en el día 13 de vida.....	67
Figura 29. Efecto del I3C en la Lm, en pulmones de ratas recién nacidas expuestas a ciclos de hiperoxia-hipoxia y sacrificadas en el día 13 de vida	68
Figura 30. Hallazgos histopatológicos en tejido pulmonar teñido con Hematoxilina y Eosina, de crías de rata a los 6 días de vida	69
Figura 31. Cortes histopatológicos de pulmones de ratas recién nacidas expuestas a ciclos de hiperoxia-hipoxia y sacrificadas en el día 13 de vida	70
Figura 32. Inmunohistoquímica de TGF- β	71
Figura 33. Efecto del I3C en el nivel de proteína TGF- β en tejido pulmonar de crías expuestas a hipoxia/hiperoxia en el día 13 de vida	72
Figura 34. Representación gráfica de la expresión relativa de mRNA de los genes relacionados con la DBP	73
Figura 35. Patrón de imagen de la membrana Rat Cytokine Antibody Array	74
Figura 36. Evaluación de la expresión de citocinas en plasma en el día 6 de vida.....	75
Figura 37. Análisis del nivel de expresión relativa de las citocinas diferencialmente expresadas en plasma en el día 6 de vida	76
Figura 38. Análisis del nivel de expresión relativa de citocinas con una respuesta exacerbada con la exposición y el tratamiento, en plasma en el día 6 de vida	77
Figura 39. Imagen representativa de la activación de la vía de señalización regulada por el receptor del factor de necrosis tumoral tipo 1(TNFR1)	87
Figura 40. Imagen representativa de la activación de la vía de señalización regulada por STAT3	92
Figura 41. Esquema propuesto de protección del I3C del daño pulmonar por exposición a oxígeno.....	98

Contenido

Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Resumen	vi
Lista de Figuras	vii
1 Introducción	11
1.1 Justificación	12
2 Definición de la displasia broncopulmonar	13
2.1 Patología de la nueva displasia broncopulmonar.....	14
2.2 Etiopatogenia.....	15
2.2.1 Factores genéticos.....	17
2.2.2 Infecciones pre y postnatales.....	18
2.2.3 Volutrauma e hiperoxia	18
2.2.4 Estrés oxidante	19
2.2.5 Inflamación.....	19
2.3 Factor de necrosis tumoral α (TNF- α)	19
2.3.1 Regulación transcripcional del gen del TNF	21
2.3.2 Activación de NF-kB.....	22
2.4 Biomarcadores del desarrollo de DBP	23
2.5 Tratamientos actuales de la DBP	24
2.6 Nutraceuticos.....	27
2.6.1 Indol-3-carbinol	28
2.7 Receptor de hidrocarburos de arilo (AhR).....	30
3 Pregunta de investigación.....	33
4 Objetivos	34
4.1 Objetivo general	34
4.2 Objetivos especificos.....	34
5 Metodología	35
5.1 Modelo animal	35
5.2 Diseño experimental.....	36
5.2.1 Administración de inductores del AhR	37
5.2.2 Exposición a oxígeno suplementario	37
5.3 Sexado de animales	39
5.4 Eutanasia de las crías y obtención de órganos y tejidos.....	39
5.5 Toma y procesamiento de muestras biológicas	39
5.5.1 Obtención de plasma	39
5.5.2 Obtención de tejidos	39

5.6	Análisis histopatológico	40
5.6.1	Conteo Radial Alveolar (RAC)	42
5.6.2	Índice de intersección lineal media (Lm).....	43
5.6.3	Índice de fibrosis	44
5.6.4	Inmunohistoquímica	47
5.7	Extracción de RNA y ensayos de PCR en tiempo real	48
5.7.1	Extracción de RNA a partir de tejido de pulmón	48
5.7.2	RT-PCR (síntesis de DNA complementario)	49
5.7.3	Curva de dilución de cDNA.....	50
5.7.4	PCR Tiempo Real	51
5.8	Determinación de citocinas en plasma	52
5.9	Análisis estadístico	54
6	Resultados	55
6.1	Características del modelo experimental	55
6.1.1	Activación prenatal de los genes dependientes de AhR en las ratas recién nacidas	55
6.1.2	Efecto de hiperoxia-hipoxia en la ganancia de peso de las crías	62
6.2	Efecto de la administración del I3C en la histopatología pulmonar	65
6.2.1	Conteo Alveolar Radial en el día 6 de vida	65
6.2.2	Conteo Alveolar Radial en el día 13 de vida	66
6.2.3	Efecto en el Índice de intersección lineal media (Lm) en el día 13 de vida.....	67
6.2.4	Efecto en los cambios fibróticos en el día 13 de vida.....	69
6.2.5	Análisis inmunohistoquímico de TGF- β al día 13 postnatal	71
6.3	Efecto del I3C en la expresión de genes de biomarcadores de DBP en el día 13 de vida	73
6.4	Efecto del I3C en expresión de biomarcadores de DBP a nivel de proteína en el día 6 de vida	74
7	Discusión.....	78
8	Integración	97
9	Conclusión	99
10	Perspectivas	101
11	Apéndice A: Tabla de Abreviaturas	102
12	Bibliografía	104
	Artículos publicados	113
	Curriculum Vitae	136

Introducción

La displasia broncopulmonar (DBP) es la enfermedad respiratoria crónica más común en los recién nacidos prematuros, es decir los que nacen antes de la semana 37 de edad gestacional. A pesar de los avances en la atención perinatal, los bebés prematuros, es decir aquellos que nacen antes de la semana 37 de gestación, siguen teniendo un alto riesgo de padecer DBP (Stoll et al., 2015).

Debido a que los casos más graves de DBP ocurren en bebés extremadamente prematuros y muy prematuros, la prevención del parto prematuro sigue siendo la medida más efectiva para reducir el riesgo de DBP. Lamentablemente pocas intervenciones, como la administración de esteroides, tienen como objetivo mejorar la maduración y función pulmonar del prematuro en el período prenatal (Olaloko et al., 2018).

Actualmente sabemos que existe una deficiencia en el sistema antioxidante en los bebés prematuros, lo que aumenta el riesgo de daño irreversible a los pulmones (Berkelhamer & Farrow, 2014; Saugstad, 2003), por lo tanto, la exposición a concentraciones de oxígeno supra-fisiológicas y los períodos intermitentes de hipoxia aumentan las especies reactivas de oxígeno (ROS) mitocondriales y la vulnerabilidad de los tejidos al estrés oxidativo, lo que lleva a una lesión de las células alveolares en los pulmones en desarrollo (Wright & Kirpalani, 2011).

Justificación

La DBP es la enfermedad respiratoria crónica más común en los recién nacidos prematuros. Debido a que los casos más graves de DBP ocurren en bebés extremadamente prematuros y muy prematuros, la prevención del parto prematuro sigue siendo la medida más efectiva para reducir el riesgo de DBP. El objetivo de un buen manejo previo al desarrollo de la DBP es mejorar la función pulmonar, reducir el daño y la inflamación, mientras se mantiene una oxigenación adecuada que facilite el desarrollo pulmonar. Para ello se han evaluado diversas terapias, entre las que se encuentran estrategias ventilatorias, suplementación de oxígeno, metilxantinas, vitamina A, esteroides, diuréticos, beta-agonistas, inmunizaciones y una estrategia nutricional integral, sin haberse encontrado aún una estrategia 100% efectiva.

Hasta la fecha no existe tratamiento efectivo para los pacientes con DBP. Es imperativo identificar una nueva estrategia y buscar potenciales blancos terapéuticos en modelos animales, para su posterior evaluación en ensayos clínicos.

Definición del problema

A nivel mundial 11 de cada 100 bebés nacidos vivos, son prematuros, es decir nacen antes de 37 semanas de gestación y se espera que esta tasa se incremente en los siguientes años (Blencowe et al., 2013). En México nacen 2 millones de niños anualmente, el 7.7% son prematuros y en el estado de Nuevo León el 6.7% (Minguet-Romero et al., 2007). Lo que resulta en problemas de salud generando enfermedades respiratorias, parálisis cerebral; así como defectos auditivos, visuales y de alimentación (trastornos de la deglución). La gravedad de estas complicaciones a la salud es inversamente proporcional a la edad gestacional (Blencowe et al., 2013). Uno de los problemas más severos y que altera la calidad de vida de estos pacientes es la displasia broncopulmonar (DBP).

La DBP es la consecuencia respiratoria más común en los recién nacidos prematuros y se define como la necesidad de oxígeno complementario a las 36 semanas de edad gestacional. Dicha condición aumenta considerablemente su morbi-mortalidad y por ende la utilización de recursos económicos (McColley, 1998).

Se estima que la DBP a nivel mundial afecta a más del 40% de los neonatos extremadamente prematuros (de menos de 28 semanas de gestación) (A. Bhandari & Bhandari, 2009). En Estados Unidos afecta el 27% de los recién nacidos con peso muy bajo al nacer (<1500g)(A. Bhandari et al., 2016) y en México afecta del 20 al 40% de los recién nacidos con peso al nacer menor de 1 500 gramos y del 40 al 60% en recién nacidos con peso menor de 1000 gramos (Duck Hernández et al., 2012). Además, existe una relación inversa con la edad gestacional, el sexo (se presenta más frecuentemente en niños) y factores genéticos: ya que en los individuos caucásicos tienen mayor riesgo de presentar una DBP más severa (McColley, 1998).

2.1 Patología de la “nueva displasia broncopulmonar”

El desarrollo pulmonar (Figura 1) inicia en la 4ª semana de gestación con la formación de los muñones pulmonares y se divide en 5 etapas: 1) Etapa embrionaria en la cual ocurre el desarrollo de las vías aéreas mayores: la tráquea y los bronquios principales. 2) Etapa pseudoglandular la cual inicia en la 6ª-7ª semana y se forman las vías conductivas. 3) Etapa canalicular que inicia en la 16ª semana y se desarrollan los bronquios terminales que dan origen a los bronquiolos respiratorios. 4) Etapa sacular que inicia en la 26ª semana y es cuando se desarrolla la red capilar, los vasos linfáticos, los neumocitos tipo I se diferencian en neumocitos tipo II; 5) Etapa alveolar que inicia en la 36ª semana y continúa hasta los primeros años de la infancia, en la que ocurre la alveolarización (Thébaud et al., 2019).

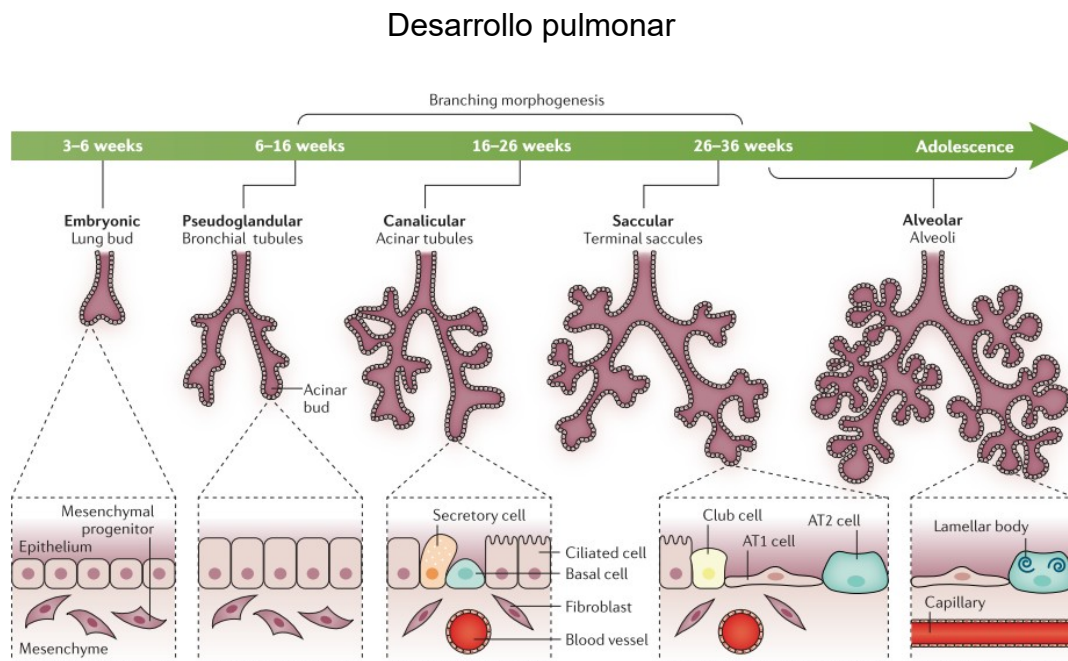


Figura 1. Etapas del desarrollo pulmonar. Tomado de Thébaud et al., 2019.

Los pulmones de los niños prematuros, particularmente entre las semanas 24 y 28 de gestación se encuentran en la etapa sacular, en esta etapa la producción de surfactante por las células epiteliales tipo II todavía no está completamente madura, por lo que los recién nacidos en esta etapa no pueden respirar adecuadamente desarrollando síndrome de distrés respiratorio. Northway describió por primera vez la DBP en la década de los setenta (Northway et al., 1967). Los bebés que describió presentaban daño en las grandes vías aéreas, edema intersticial y fibrosis del parénquima. Éstas eran las características de la vieja displasia broncopulmonar, es decir la presentación clínica asociada a falta de surfactante.

En años recientes, gracias al advenimiento del uso de esteroides prenatales y de surfactante, la severidad de los cuadros de distrés respiratorio ha disminuido. Con lo cual, en la actualidad, sobrevive un mayor número de bebés de nacimientos prematuros extremos sobrevive. Con estos avances terapéuticos se han modificado las características patológicas de la displasia broncopulmonar, siendo en la actualidad menor el grado de la fibrosis del músculo liso y la metaplasia epitelial. Sin embargo, se presenta con una mayor afectación en el desarrollo alveolar (A. Bhandari & Bhandari, 2009). Es decir hay menos alvéolos y los que se desarrollan son más grandes debido a una interferencia en la septación (Husain et al., 1998).

2.2 Etiopatogenia

La patogénesis de la DBP es multifactorial (Figura 2). Es el resultado de la alteración de los mecanismos pulmonares provocados por el uso de una alta concentración de oxígeno y ventilación mecánica con alta presión positiva, lo que produce daño celular al pulmón inmaduro, así como alteración del desarrollo vascular y alveolar. Hasta la fecha se han identificado varios factores que contribuyen a este proceso como: la susceptibilidad del huésped con un desarrollo pulmonar deficiente, cambios en los factores cruciales para el adecuado desarrollo y funcionamiento del mismo como el surfactante, el óxido nítrico, el sistema antioxidante (McColley, 1998).

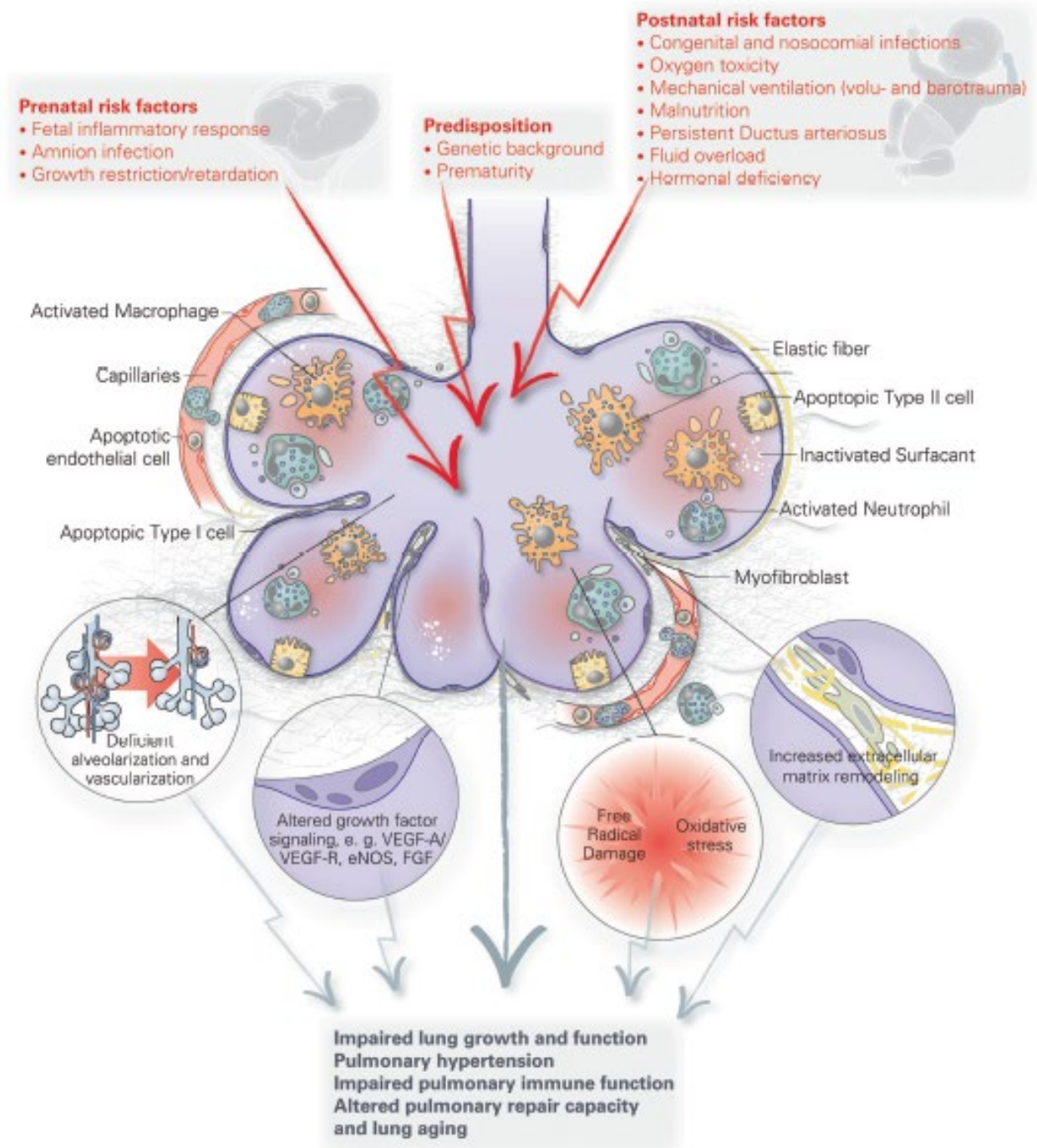


Figura 2. Esquema de los factores patofisiológicos implicados en el desarrollo de DBP. Tomada de Hilgendorff & O'Reilly, 2015.

2.2.1 Factores genéticos

Los factores genéticos pueden contribuir al desarrollo de DBP de varias formas. En un estudio que investigó bebés gemelos prematuros se encontró que los factores genéticos explican el 53% de la variación en el Desarrollo de DBP (V. Bhandari et al., 2006). Las principales variables genéticas asociadas con la predisposición a desarrollar DBP son polimorfismos, los cuales no son causales, pero muestran un incremento en la susceptibilidad de desarrollar la DBP, como las variaciones que afectan el surfactante (Hilgendorff & O'Reilly, 2015). También, se ha demostrado que en recién nacidos prematuros con DBP existen niveles elevados permanentemente del Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α), el cual es un mediador central de la respuesta inflamatoria. En un estudio publicado por Kazzi encontró que la sustitución del nucleótido adenina por guanina en la posición 308 dentro del locus del gen promotor de TNF- α en el cromosoma 6, se asocia con niveles elevados de TNF- α . Mientras que la misma sustitución de nucleótidos en la posición 238 se asocia con disminución de TNF- α , por lo que presentar este polimorfismo reduce el riesgo y la severidad de DBP (Kazzi et al., 2004).

Como se mencionó anteriormente el sexo masculino es otro factor de riesgo para el desarrollo de DBP. En un estudio noruego se encontró que el sexo femenino es un factor protector en el desarrollo de DBP en bebés que nacieron antes de 30 semanas de gestación, con un Odds ratio de 0.50 (95% IC 0.28-0.92) (Coarfa et al., 2017). Se ha encontrado dimorfismo sexual en citocinas como el del TGF- β (del inglés, Transforming Growth Factor) en donde se detectaron niveles aumentados de TGF- β en líquido endotraqueal en pacientes de sexo masculino comparados con sexo femenino, con el mismo peso al nacer, lo que se correlaciona con formas más severas de DBP (Jobe & Bancalari, 2001; Lecart et al., 2000). Aunque hay estudios que demuestran que existen diferencias en el transcriptoma en el desarrollo pulmonar entre niños y niñas, y estas diferencias pueden influir en el desarrollo y el grado de DBP, la edad gestacional al nacer influye en mayor medida para el desarrollo de DBP (Kho et al., 2016).

2.2.2 Infecciones pre y postnatales

Tanto infecciones prenatales como postnatales juegan un papel importante en los mecanismos implicados en la patogenia de la DBP. El influjo inicial de neutrófilos en el pulmón es acompañado por un aumento en el número de macrófagos durante el curso de la enfermedad (Hilgendorff & O'Reilly, 2015). La colonización de las vías aéreas con microorganismos como *Ureaplasma urealyticum*, se asocia con el diagnóstico de corioamnionitis, inflamación pulmonar lo que representa un aumento del riesgo de desarrollar DBP (McColley, 1998).

2.2.3 Volutrauma e hiperoxia

El desarrollo pulmonar alcanzado en la etapa canalicular y sacular, aunada a una deficiencia de surfactante y la complianza aumentada de la caja torácica, producen una capacidad residual disminuida y falla respiratoria. Por lo que para asegurar una función fisiológica se requiere la utilización de una concentración de Oxígeno (O₂) muy alta y/o el apoyo de ventilación mecánica. El efecto de la hiperoxia, es decir de concentraciones altas de O₂, ha sido demostrado en la patogénesis de la DBP. En estudios animales se ha demostrado que la hiperoxia por sí sola puede detener la septación pulmonar (Popova, 2013).

En estudios recientes se ha demostrado que aún con exposiciones cortas a hiperoxia afectan el desarrollo pulmonar. En este sentido recién nacidos entre la semana 24 y 28 de gestación que fueron reanimados con O₂ al 30% en lugar del 90%, la incidencia de DBP se redujo del 37 al 15.4%. Recién nacidos expuestos a concentraciones de O₂ al 90% tienen niveles elevados de TNF- α e Interleucina 8 (IL-8). Además, se sabe que la toxicidad por oxígeno está mediada por Especies reactivas de Oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) (M. Vento et al., 2006).

2.2.4 Estrés Oxidante

Como se mencionó anteriormente la toxicidad por oxígeno está mediada por las ROS (M. Vento et al., 2006). Los bebés prematuros nacen con su sistema antioxidantes inmaduro, por lo que al exponerse a la hiperoxia se producen radicales libres que generan estrés oxidante y la activación de vías inflamatorias mediante la activación del Factor Nuclear Kapa- Beta (NF-kB).

2.2.5 Inflamación

Diversos estudios demuestran que los mediadores inflamatorios juegan un papel importante en la patogénesis de la DBP. La respuesta inflamatoria puede ser desencadenada por diversos factores como: la ventilación mecánica, ROS, e infecciones pre y posnatales (Hilgendorff & O'Reilly, 2015).

La liberación de citocinas promueve la formación de capilares dismórficos, relacionados a una reducción de la expresión del VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial, VEGF por sus siglas en inglés) (Hilgendorff & O'Reilly, 2015).

Múltiples genes asociados en la patogénesis de la broncodisplasia pulmonar son controlados por el NF-kB, el cual también es activado por ROS, inflamación o ventilación mecánica. Uno de los genes que es activado por el NF-kB es el TNF- α (por sus siglas en inglés para factor de necrosis tumoral α) (Wright & Kirpalani, 2011).

2.3 Factor de necrosis tumoral alfa

El TNF- α es una proteína que produce un espectro de respuestas fisiológicas y celulares, incluyendo: fiebre, shock, daño tisular, necrosis tumoral, anorexia, inducción de otras citocinas y moléculas inmunoreguladoras, proliferación celular, diferenciación y apoptosis. El TNF- α ha sido implicado en la patogenia de muchas enfermedades. Es producido rápidamente por macrófagos activados, monocitos y muchas otras células. Y orquesta la respuesta inflamatoria que es central para el éxito de la respuesta inmune innata, eliminando patógenos e iniciando el proceso

de sanación (Probert, 2015). Este factor se genera de dos formas: 1. Una forma transmembrana (tmTNF) la cual actúa por medio de contacto célula-célula, y 2. Una forma soluble (solTNF) la cual es liberada a la circulación sanguínea y es la responsable de los efectos inflamatorios sistémicos del TNF (Probert, 2015).

Se conocen dos receptores del TNF- α : el TNFR1, también llamado p55 o CD120 α que se expresa en la mayoría de las células y el TNFR2, también llamado p75 o CD120b que se localiza predominantemente en leucocitos y células endoteliales. La unión del TNF- α con su receptor activa diferentes vías que promueven la apoptosis, así como la activación del NF- κ B (Factor nuclear kappa B) lo que estimula mayor producción de TNF- α (Papadakis & Targan, 2000).

La unión de una molécula trimérica de TNF con el TNFR1 o TNFR2 produce que este trímero active el reclutamiento de varias proteínas de señalización hacia los dominios citoplasmáticos de los receptores. La agregación independiente de ligando del dominio citoplasmático de TNFR1 es inhibida por el SODD (del inglés: Silencer of death domains), que mantiene el TNFR1 en un estado monomérico e inactivo (Papadakis & Targan, 2000). Así los homotrímeros de TNF se unen al dominio extracelular de TNFR1 e inducen la señal mediante la trimerización del receptor de membrana después de que el SODD se disocia del DD (del inglés: Death domain) del receptor. El agregado DD del TNFR1 recluta la proteína adaptadora TRADD (del inglés: TNFR1-associated death domain protein). Posteriormente TRADD recluta otra proteína llamada FADD (del inglés: Fas-associated death domain), al TRAF2 (del inglés: TNFR-associated factor 2) y a la proteína RIP (del inglés: receptor-interacting protein1) para formar un complejo que forma una cascada que produce activación de JNK/SAPK y del NF- κ B. La activación de JNK induce la actividad de la Proteína activadora 1 (AP-1 por sus siglas en inglés), la cual es un factor de transcripción implicada en la regulación de la expresión de genes que controlan diferenciación, proliferación y apoptosis (Li & Lin, 2008).

La activación del TNFR2 produce reclutamiento de TRAF2, TRAF1, y de c-IAPs (del inglés: celular inhibitor of apoptosis proteins) en el dominio intracelular del receptor. Así TRAF2 puede mediar la activación de NF- κ B fosforilando IKK (del inglés I κ B-quinasa) y de JNK. Ahora se sabe que TRAF2 tiene mayor afinidad por TRADD que por los receptores TNFR1 y TNFR2, lo que explica por qué el TNF- α activa preferentemente al TNFR1, el cual utiliza TRADD como adaptador, en lugar del TNFR2 (Baud & Karin, 2001).

2.3.1 Regulación transcripcional del gen de TNF- α .

El gen que codifica para el TNF- α se localiza en la región clase III del complejo mayor de histocompatibilidad en el cromosoma 6. Tiene una secuencia conservada en la región 3' no traducida (3'UTR), que codifica para multímeros adenosina-uracilo conocidos como elementos ricos en adenosina-uracilo (ARE por sus siglas en inglés) presentes en el RNA mensajero del *TNF* y de otras citocinas. Esta secuencia juega un papel importante en el control postranscripcional del RNA mensajero del *TNF* confiriéndole represión translacional y también regulando su estabilidad. Sirve además de blanco específico de activación translacional por vías de señalización mediadas por otras quinasas como la JNK/SPAK (del inglés: stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase) y p38 MAPK (del inglés: mitogen-activated protein kinase). La delección de estas 69 pares de bases en ratones produce un aumento patológico de los niveles de TNF y el desarrollo de fenotipos de artritis y enfermedad de Crohn (Papadakis & Targan, 2000).

Estas familias de quinasas MAPK, JNK/SPAK y ERKs (del inglés: p42/44 extracellular signal-regulated kinases) forman 3 cascadas paralelas de señalización activadas por estímulos diferentes que pueden exacerbar la expresión del TNF (Papadakis & Targan, 2000).

2.3.2 Activación de NF- κ B.

La activación de NF- κ B por el TNFR1 es mediada por dos vías sinérgicas, la vía de fosfatidilinositol cinasa (PI3K)-Akt/protein quinasa B y la vía de la quinasa inductora de NF- κ B NIK-TRAF2. Este efecto es mediado por la activación de la I κ B-quinasa (IKK α). La fosforilación de IKK del complejo I κ B quinasa, favorece la degradación de I κ B e induce la activación de NF- κ B.

El factor de transcripción NF- κ B es un factor clave para la supervivencia celular, diferenciación linfocítica e inmunidad innata. El NF- κ B está compuesto de 5 subunidades, cada una capaz de homodimerizar o heterodimerizar con otra y asociarse con otros factores de transcripción, regulando así genes específicos en tejidos específicos. Los dímeros se mantienen inactivos en el citoplasma asociados a la proteína inhibidora I κ B. La activación del NF- κ B por las I κ B cinasas, IKK α y β , en respuesta a citocinas, factores de crecimiento, o productos bacterianos producen la fosforilación y degradación de I κ Bs. La remoción de I κ B permite que el complejo NF- κ B se transloque al núcleo y regule diversos blancos que regulan inflamación, adherencia celular, y supervivencia celular. En adultos, la activación del tiene un resultado pro inflamatorio como en el caso del asma y de la fibrosis quística (Iosef et al., 2012).

A diferencia del daño pulmonar que aparece en los adultos resultado de la activación proinflamatoria, modelos animales con ratas recién nacidas, se ha observado que existe una activación sostenida de heterodímeros p65/p50, mientras que en los adultos sólo se activan transitoriamente heterodímeros p65/p50, seguidos de una activación permanente de homodímeros p50/p50. Lo que hace que en los recién nacidos haya menos inflamación y apoptosis en los modelos de daño pulmonar inducida por lipopolisacáridos (LPS). La inhibición de la actividad de NF- κ B en recién nacidos produce un incremento en el infiltrado de neutrófilos y macrófagos, así como incremento de la expresión de citocinas pro inflamatorias (Alvira et al., 2007).

Se ha demostrado que la actividad del NF- κ B tiene un papel esencial para el desarrollo pulmonar postnatal, favoreciendo la angiogénesis y promoviendo una adecuada alveolarización. La alteración en la angiogénesis afecta la alveolarización, provocando DBP. Uno de los genes blanco del NF- κ B es el gen que codifica el VEGF. El VEGF se encuentra disminuido en los pulmones de los niños que presentan DBP, así como en modelos animales de DBP inducida por hiperoxia (Thébaud et al., 2005).

El bloqueo de la actividad del NF- κ B en el día 6 en un modelo animal de ratón, produjo disminución de la alveolarización similar a la observada en la DBP además de disminución de la densidad capilar. Lo que también se ha demostrado *in vitro* (Iosef et al., 2012).

Estos resultados hacen suponer que tratamientos que disminuyen la activación de NF- κ B pueden alterar el desarrollo alveolar del pulmón, así fármacos como los glucocorticoides pueden acelerar el desarrollo de surfactante, pero inhibir la septación secundaria durante el desarrollo pulmonar en el periodo sacular del desarrollo pulmonar. Y debido a que la alveolarización continua durante los primeros años de vida, el uso de fármacos inhibidores de NF- κ B en etapas tempranas de la vida, podría causar un deterioro en la función pulmonar a largo plazo (Iosef et al., 2012).

2.4 Biomarcadores del desarrollo de DBP.

Debido a la falta de un tratamiento efectivo para la DBP, los científicos se han enfocado en desarrollar estrategias de prevención apoyados en la identificación de biomarcadores para el diagnóstico temprano y que permita el desarrollo de blancos terapéuticos. En la actualidad los biomarcadores pueden ser detectados en diversos fluidos como: sangre, orina, suero, aspirado traqueal o lavado alveolar. Entre los biomarcadores medidos en sangre, que son buenos predictores para el diagnóstico temprano de DBP están la glicoproteína secretada por los neumocitos tipo 2 y células del epitelio bronquial: KL6 (Krebs von den Lungen), la proteína secretora de las células claras CC16, la glicoproteína NGAL

(lipocalina asociada a gelatinasa de los neutrófilos) (Rivera et al., 2016).

En sangre de cordón se ha encontrado que niveles elevados de IL-6, IL-6R, gp130 y MMP-9 (metaloproteínasa de matriz 9) que se correlacionan con alto riesgo de DBP. La IL-6 es una citocina involucrada en inflamación, hematopoyesis y regulación inmune. Al unirse a su receptor IL-6R se asocia a la proteína gp130 activando una vía de señalización que promueve la expresión de genes. Otro estudio encontró niveles aumentados de TGF- β 1, PDGF y VEGF con una disminución de IL-6 en pacientes con la nueva definición de DBP (G. Vento et al., 2006).

En secreciones de aspirado traqueal se ha encontrado un aumento de citocinas proinflamatorias aumentadas como el TNF- α , IL-8, IL-1 β e IL-6, MCP (proteínas químo atrayente de monocitos, por sus siglas en inglés monocyte chemo-attractant proteins), MCP-1, MCP-2 y MCP-2, así como MIP (proteínas inflamatorias de macrófagos, MIP por sus siglas en inglés macrophage inflammatory proteins) MIP-1a y MIP-1b que se correlacionan con el aumento del riesgo de DBP (Bose et al., 2008; Niedermaier & Hilgendorff, 2015).

En ratones transgénicos la sobre expresión de TNF- α , TGF- β , IL-6 o IL-11 también pueden producir un arresto en la alveolarización, lo que sugiere que un ambiente pro-inflamatorio en los bebés prematuros puede generar una septación alterada (Jobe & Bancalari, 2001).

2.5 Tratamientos actuales de la DBP.

Actualmente no hay un tratamiento específico para curar la DBP pero el tratamiento se basa en minimizar un mayor daño pulmonar y proveer soporte a la función pulmonar de los bebés prematuros.

Estudios han demostrado que la administración de corticoesteroides mejora la función y reduciendo la inflamación pulmonar disminuyendo los requerimientos de soporte respiratorio requerido por los bebés prematuros con DBP dependientes de ventilación mecánica.

En cuanto a la administración prenatal de esteroides, aunque existen múltiple evidencia que muestra que el uso de esteroides prenatales en mujeres en tratamiento con un parto potencialmente pretérmino reduce el riesgo de complicaciones y de mortalidad neonatal, existe múltiple evidencia de la ineffectividad en disminución del riesgo de DBP. Los efectos de esteroides prenatales descritos son: reducción de movimientos fetales, de movimientos respiratorios, reducción de peso al nacer, aumento del riesgo de enfermedades cardiovasculares en edad adulta (Olaloko et al., 2018).

Los esteroides sistémicos se suelen administrar en forma posnatal, puede hacerse en forma temprana (<7 días posnatal) para prevenir el desarrollo de la displasia y en forma tardía (>7 días posnatal) en el tratamiento de la enfermedad pulmonar ya establecida. Ambas formas de administración han demostrado reducir la incidencia de DBP, pero la administración temprana de este fármaco se relaciona con parálisis cerebral. En la revisión sistemática de Doyle, publicada por Cochrane (Doyle et al., 2017), el tratamiento tardío con esteroides se asoció con reducción de la mortalidad a los 28 días de vida, con una reducción de la enfermedad pulmonar crónica a las 28 y 36 semanas de edad posmenstrual, y con una reducción de necesidad de oxígeno en casa, pero se mostró una tendencia de incremento en el riesgo de infección y sangrado gastrointestinal, hiperglicemia, glucosuria e hipertensión (Doyle et al., 2017). Debido a estos riesgos los autores concluyen que los beneficios de la administración posnatal de esteroides no sobrepasan los efectos negativos. Y recomiendan restringir la utilización de corticoesteroides posnatales en niños con DBP severa, especialmente deseable en niños dependientes de ventilación mecánica invasiva, utilizando tratamientos alternativos en la medida de lo posible (Olaloko et al., 2018).

En niños con muy bajo peso al nacer con apnea del prematuro, definida como episodios inexplicables de cese de la respiración por 20 segundos o más, o una pausa respiratoria de menor duración asociada a bradicardia, cianosis, palidez y/o hipotonía; a quienes se les administró de cafeína, tuvieron una reducción de la tasa de DBP (Ali et al., 2013).

La administración profiláctica de surfactante disminuye la severidad de síndrome de distrés respiratorio en recién nacidos. Sin embargo, su utilización no ha mostrado una reducción en la incidencia de DBP (Ali et al., 2013).

Los diuréticos han sido utilizados como tratamiento de la DBP. Los diuréticos disminuyen el edema pulmonar y disminuyen la resistencia vascular periférica. El más comúnmente utilizado es la furosemida, un diurético de asa, que causa reabsorción del líquido intersticial pulmonar, vasodilatación pulmonar y sistémica, reduciendo el volumen extracelular. En la revisión sistemática de Stewart (2011) observaron que la administración de furosemida a pretérminos a las 3 semanas de vida tuvo efectos mínimos en la incidencia de DBP. Los efectos potencialmente adversos de los diuréticos de asa son alteraciones electrolíticas ototoxicidad, nefrocalcinosis, osteopenia, por lo que es necesario realizar más ensayos clínicos para estudiar la seguridad de la furosemida en bebés de menos de 29 semanas de gestación. En la actualidad la evidencia no justifica el uso rutinario de furosemida para prevención de DBP, aunque la mejoría en el manejo del edema pulmonar agudo justifica su uso en algunos pacientes.

Desde que los broncodilatadores se empezaron a utilizar para tratar a pacientes asmáticos disminuyendo la resistencia pulmonar, han sido utilizados para tratar el broncoespasmo en pacientes con DBP, pero la respuesta en pacientes con DBP es heterogénea esto debido a que previamente se observó que es dependiente de la vía de administración y de factores genéticos. Beta agonistas y anticolinérgicos inhalados mejoran la función pulmonar en forma aguda, pero en dos revisiones sistemáticas no se demostró beneficio a largo plazo (Michael et al., 2018).

Basados en el hecho de que los prematuros carecen de un sistema productor de surfactante y de antioxidantes bien desarrollado y que en estudios como el publicado por Shenai en 1985 encontraron que los bebés que desarrollan DBP

tienen niveles menores de Vitamina A, (Tyson et al., 1999) propuso la administración de 5,000 IU de Vitamina A 3 veces por semana por 4 semanas lo cual ligeramente disminuyó el riesgo de desarrollar DBP en bebés con peso extremadamente bajo. (Ali et al., 2013).

La nutrición es otro factor muy importante en la prevención y el manejo de la DBP. Las dificultades para su alimentación pueden afectar el estado nutricional de los bebés prematuros, un bebé malnutrido puede tener un cuadro clínico de displasia más severo debido al compromiso en el crecimiento pulmonar (Biniwale & Ehrenkranz, 2006).

El manejo nutricional de los bebés con peso muy bajo al nacer se establece desde su nacimiento garantizando un adecuado crecimiento, vigilando la restricción de líquidos. En este sentido la restricción de líquidos, así como la nutrición parenteral con un adecuado aporte de proteínas y lípidos y una nutrición enteral temprana pueden ayudar a disminuir la incidencia de DBP.

Se han probado diversas estrategias para mejorar el sistema antioxidante de los bebés prematuros. La utilización de ácidos grasos poli-insaturados omega-3 como el ácido docosahexaenoico o DHA ha sido probada en diversos ensayos clínicos aleatorios. Un meta-análisis de 18 ensayos concluyó que la suplementación de omega 3 no disminuyó el riesgo de DBP (Michael et al., 2018).

La citrulina es un aminoácido producto del metabolismo de la L-arginina durante la producción endógena de óxido nítrico en las células endoteliales. La administración de citrulina disminuye la hipertensión pulmonar en modelos animales de DBP en roedores expuestos a hipoxia e hiperoxia. Y actualmente se encuentra en estudios clínicos fase I (Michael et al., 2018).

2.6 Nutracéuticos.

Los nutracéuticos o alimentos funcionales son suplementos dietéticos que proveen componentes bioactivos y enriquecidos provenientes de recursos naturales, y que

tienen beneficios adicionales a la salud más allá de su valor nutricional y son usados con el propósito de mejorar el estado patofisiológico del que los consume (Kalra, 2003).

2.6.1 El Indol-3-carbinol.

Como ya se comentó anteriormente debido a la falta de un tratamiento efectivo para la DBP, los científicos continúan con la búsqueda de intervenciones preventivas y de tratamiento para mejorar el pronóstico y la calidad de vida de los pacientes con DBP. En las últimas décadas se han utilizado diferentes nutrientes o alimentos funcionales en diversos estudios, con el objetivo de identificar aquellos con un rol potencial en el manejo de la DBP.

Los indoles son un componente natural de muchas plantas principalmente de vegetales crucíferos. Químicamente son compuestos orgánicos, heterocíclicos y aromáticos que tienen una estructura química cíclica, consistente de un anillo de 6 miembros unido a un anillo de pirrol que contiene nitrógeno (Ahmad et al., 2011).

El indol-3-carbinol (I3C) es un indol que se encuentra en vegetales crucíferos del género Brassica. Es un derivado de la hidrólisis de la glucobrasicina, un glucosinolato que predomina en vegetales como el brócoli, coles de bruselas, calabaza, coliflor, mostaza, rábanos y nabos. La cantidad de I3C en estos alimentos es variable y su disponibilidad depende del procesamiento y preparación de estos alimentos. La cantidad de I3C en la dieta varía enormemente, con rangos desde 20 hasta 120mg al día dependiendo de la cantidad ingerida de vegetales crucíferos (Ahmad et al., 2011).

El I3C, en el ambiente ácido del estómago se dimeriza formando una mezcla compleja de componentes biológicamente activos, el más estudiado es su dímero el DIM, el cual representa el 10 al 20% de los componentes derivados. En 2004, Anderton y cols. demostraron la farmacocinética y la disposición tisular del I3C posterior a administración oral en ratones, utilizando una dosis de 250mg/kg equivalente a una dosis en humanos de 20mg/kg, significativamente mayor al

promedio ingerido en la dieta. El trabajo de Anderton mostró que el I3C tiene una rápida y extensa distribución en plasma y en tejidos como hígado, riñón, corazón, cerebro y pulmones (Anderton et al., 2004).

Al I3C se le atribuyen propiedades anticancerígenas por su capacidad de inducir apoptosis y de inhibir la proliferación, crecimiento e invasión de células cancerígenas. El I3C puede regular a la baja productos de genes anti-apoptóticos como Bcl-2, Bcl-X1, survivina; regular a la alta factores pro-apoptóticos como Bax y activar la caspasa-9 y caspasa-2. Hay estudios que demuestran que induce apoptosis en cáncer de mama, cáncer de células escamosas, colangiocarcinoma, cáncer de colon, de cérvix, de ovario, de páncreas y próstata (Ahmad et al., 2011; Reed et al., 2008).

En el estudio realizado por Kim y colaboradores en 2009, en un modelo animal de metástasis pulmonar, observaron que la administración de oral DIM puede inhibir las metástasis a pulmón de carcinoma de mama en ratones, con una disminución de los niveles de MMP-2, MMP-9, TIMP-1, VCAM-1, IL-1B, IL-6, Y TNF- α (E. J. Kim et al., 2009).

Estudios recientes han indicado que compuestos como los indoles pueden desempeñar un papel crítico en la modulación de la respuesta inmune y las enfermedades inflamatorias. Y se ha demostrado sus propiedades anti-inflamatorias mediante la reducción de la generación de ROS de macrófagos peritoneales múridos y macrófagos activados con LPS (Benson & Shepherd, 2011).

La vida media estimada del I3C está en el rango de 12-24 horas antes de ser completamente metabolizados y/o excretados. El I3C se encuentra como suplemento alimenticio en una gran variedad de presentaciones y dosis (Reed et al., 2008). Al administrar prenatalmente el I3C se activa el receptor AhR el cual se transloca al núcleo e induce la expresión de genes que codifican enzimas de fase I y fase II del metabolismo (Fujisawa-Sehara et al., 1987). En estudios previos se demostró que ratones recién nacidos deficientes del AhR son más susceptibles al

daño pulmonar ocasionado por hiperoxia, asociado a la falta de expresión de enzimas de fase I y fase II, sugiriendo que el AhR juega un papel importante en la protección a la exposición de oxígeno (Shivanna et al., 2013b).

2.7 Receptor de hidrocarburos de Arilo.

Una de las hipótesis de este trabajo es que al administrar de forma prenatal el I3C esto protegerá a las crías de los efectos adversos por la exposición al oxígeno suplementario a través de la activación del sistema de batería de genes asociados al AhR. La activación de este receptor que también es un factor de transcripción y del cual se conocen diferentes ligandos, entre ellos productos de combustión incompleta de combustibles fósiles, madera, carbón y tabaco, principalmente. Pero además se han identificado ligandos naturales como el I3C que se encuentra en vegetales crucíferos.

Como se mencionó el AhR es un factor de transcripción ampliamente estudiado en relación con el metabolismo y la toxicidad. Aunque, más recientemente, se ha establecido su función en la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria.

En ausencia de ligando, el AhR se encuentra asociado a dos proteínas chaperonas 90 (Hsp90), una proteína p23 y una proteína XAP2. Es importante destacar que la activación del complejo de transcripción de la AhR no depende solamente de la interacción biomolecular receptor-ligando, si no que ésta activación es regulada por numerosos factores auxiliares. Las proteínas chaperonas Hsp90 y p23 sirven para mantener el plegado apropiado, la adecuada unión al ligando y la efectividad transcripcional de la AhR (Beischlag et al., 2008).

En la figura 3 se representa la activación del AhR en la célula cuando se le une un ligando. En el citosol, el AhR normalmente está unido a la Hsp90, y a la proteína p23. Después de la unión del ligando, el AhR se disocia de Hsp90 y p23, se transloca desde el citosol al núcleo, se heterodimeriza con el translocador nuclear del AhR (ARNT) y se une a una secuencia denominada elemento de respuesta a dioxinas (DRE), dentro de un conjunto de genes diana que codifican para la

proteína represora del AhR (AhRR) y las enzimas relacionadas con el metabolismo de fase I y fase II tales como: citocromo P450 (CYP1A1, CYP1B1 y el CYP1A2), la glutatión S-transferasa- α (GST- α), NADP-H quinona oxidorreductasa-1 (NQO1), Uridina Difosfato glucuronosil transferasa (UDPGT) y aldehído deshidrogenasa (ALDH) (Shivanna et al., 2013).

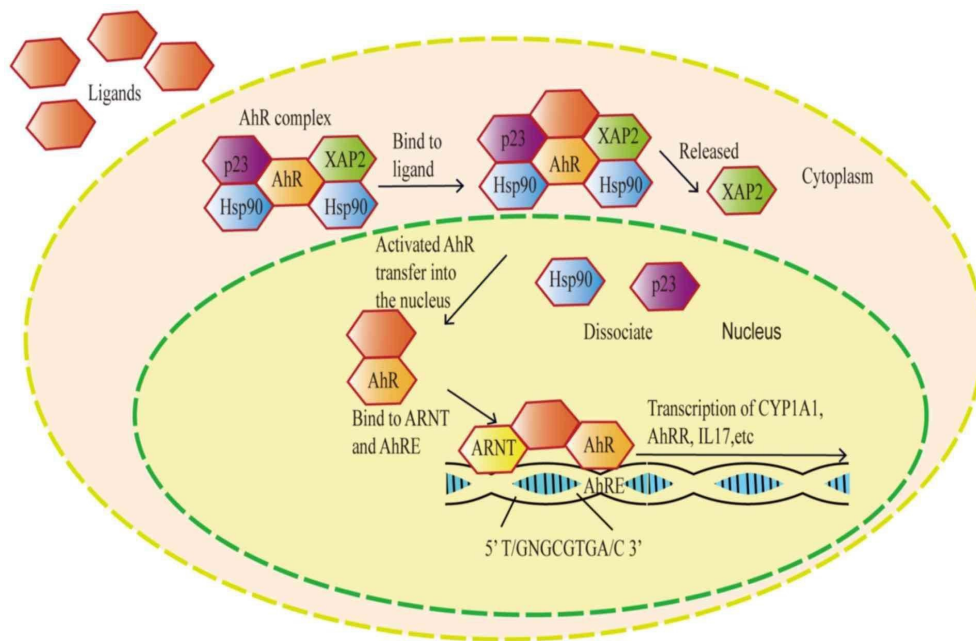


Figura 3. Vía de señalización del receptor de hidrocarburos de Arilo. Tomado de Zhu et al., 2019.

El AhR se activa principalmente en el hígado, pulmones, timo, riñones en humanos y se ha demostrado que protege a ratones adultos y crías contra el daño pulmonar ocasionado por altas concentraciones de oxígeno, debido a que se incrementa la expresión de enzimas asociadas con éste. Se ha demostrado que el AhR atenúa la inflamación pulmonar mediada por humo del tabaco, sugiriendo que es un supresor de la inflamación pulmonar. Adicionalmente, en ratones adultos deficientes de AhR aumenta la susceptibilidad de sufrir daño pulmonar causado por hiperoxia (Shivanna et al., 2013a).

A través de los años se han descubierto varios ligandos de AhR: endógenos y naturales que varían enormemente en estructura química y afinidad. La mayoría de los ligandos naturales de AhR se introducen en los sistemas biológicos mediante el consumo de alimentos, como en el caso de los flavonoides, estilbenos, carotenoides e indoles (Safe & Kim, 2008).

Pregunta de investigación

¿El indol-3-carbinol, un inductor del AhR administrado en forma prenatal disminuye el daño pulmonar ocasionado por exposición a hiperoxia-hipoxia en un modelo animal de rata recién nacida?

Objetivo general

Buscar nuevas estrategias para la detección temprana y el tratamiento de displasia broncopulmonar en un modelo mrido.

Objetivos Específicos

1. Determinar la dosis terapéutica, vía y tiempo de administración de inductores del AhR (I3C) para disminuir el daño pulmonar.
2. Determinar la activación de la batería de genes relacionados con el AhR por PCR en tiempo real: *AHR*, *CYP1A1*, *CYP1B1*, *GSTA1*, *NQO1*, *ALDH1A1*.
3. Desarrollar un modelo de DBP por exposición a oxígeno suplementario:
 - a. Establecer biomarcadores de DBP en el día 13 de vida (medir niveles de expresión de genes asociados con el desarrollo de DBP).
 - b. Determinar parámetros fisiopatológicos del desarrollo del modelo de DBP (Conteo radial Alveolar, línea interseptal media y grado de fibrosis)
4. Determinar el efecto del I3C a través de la evaluación de los parámetros histopatológicos de DBP: Conteo radial alveolar, determinación de la línea interseptal media y grado de fibrosis.
5. Establecer biomarcadores de inflamación previo al desarrollo de DBP con un array de proteínas y determinar si el tratamiento con I3C disminuye el nivel de citocinas.
6. Análisis de resultados.

Metodología

5.1 Modelo Animal

El protocolo de investigación se sometió al Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales, de la Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, del Tecnológico de Monterrey con número de folio 2016-006. Y fue aprobado el 3 de marzo del 2016.

Se utilizó como modelo a la rata Sprague Dawley (Harlan Laboratories) para generar displasia broncopulmonar. Se trabajó bajo la normativa legal vigente, en particular lo establecido sobre la protección de los animales utilizados para la experimentación (Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999), siguiendo las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio de la Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud del Tecnológico de Monterrey.

Las condiciones de temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de $55\pm 10\%$ y ciclos de 12 horas de luz artificial y 12 horas de oscuridad. Se mantuvieron constantes durante todo el protocolo, así como las condiciones de mantenimiento para la realización de los ensayos en los animales.

Todas las ratas fueron estabuladas en condiciones normales, se alimentaron con la dieta estándar para roedores (AIN93G), según se señala en el diseño experimental, y agua ad libitum. Para reducir el impacto a la salud por el uso de oxígeno suplementario, 24 horas después del nacimiento, las crías de una camada fueron estabuladas junto con otra camada que hubiera nacido el mismo día, y la camada experimental fue atendida por las nodrizas en turnos alternos de 48 horas.

Durante el periodo de evaluación se midió el consumo de agua y alimento por la nodriza, y la madre. Así como el peso corporal tanto de la madre como de la nodriza y de las crías.



Figura 4. Rata Sprague Dawley con sus crías.

5.2 Diseño experimental.

Con las crías de rata Sprague Dawley se formaron grupos de estudio a lo largo del desarrollo del protocolo, que fueron anestesiados y llevados a eutanasia en distintos momentos de acuerdo con los objetivos de la investigación y como se observa en la figura 5. El esquema que se siguió en los grupos de estudio fue:

Esquema	Condiciones
Grupo 1 control	Aire ambiente (21%).
Grupo 2 expuestas (ciclos de hiperoxia e hipoxia)	A partir del día 1 de nacimiento las ratas recién nacidas fueron expuestas al esquema de hiperoxia (80 ± 4) e hipoxia (10%).
Grupo 3 tratadas con I3C prenatalmente + expuestas (ciclos de hiperoxia e hipoxia)	Se administró vía oral a ratas preñadas el I3C (100mg/kg de peso corporal) a partir del día 17 de gestación y hasta el nacimiento.

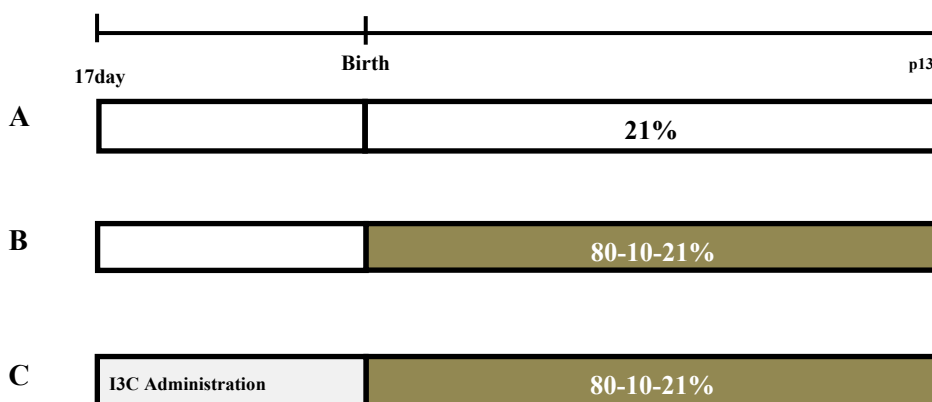


Figura 5. Esquema del diseño del estudio. Grupo A: control; grupo B expuesto a hiperoxia- hipoxia; grupo C: tratado con I3C y expuesto a hiperoxia-hipoxia. A partir del día 17 de gestación se inició con el tratamiento prenatal con I3C vía oral. Una vez que las crías nacieron a las 24h de nacimiento las ratas recién nacidas fueron expuestas al esquema de hiperoxia-hipoxia, la pauta de exposición se basó en el esquema publicado por Ratner en el 2009.

5.2.1 Administración de inductores del AhR.

Se administró a ratas preñadas mediante una cánula oral, una dosis diaria de Indol 3-Carbinol (I3C, #17256 de Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA), pulverizado a dosis de 100mg/kg de peso corporal a partir del día 17 de gestación y hasta el nacimiento. El vehículo que se empleó fue 0.5mL de aceite vegetal de maíz (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA).

5.2.2 Exposición a oxígeno suplementario.

A partir del día 1 de nacimiento las ratas recién nacidas fueron expuestas al esquema de hiperoxia-hipoxia.

La exposición a oxígeno suplementario se realizó en una cámara previamente diseñada en el Laboratorio del Centro de Investigación e Innovación en Salud (CITES) de la Escuela de Medicina del Tecnológico de Monterrey. El flujo de oxígeno fue generado por un concentrador Respironics Everflo-OPI (Tecnología Milenium 120v-60 GHz, 3.4 A).

Se utilizó un sensor de oxígeno (marca Lutron COD: DO-5510HA, de Oxigen Meter). El nivel de CO₂ ambiental fue menor a 1.5% y se midió con un sensor de CO₂ (METER-TES-1370) y para desplazar el oxígeno en cada ciclo de hipoxia se utilizó nitrógeno de ultra-alta pureza (Praxair). Cabe mencionar que durante toda la etapa de exposición fueron monitoreados de forma constante los niveles de los gases antes mencionados.

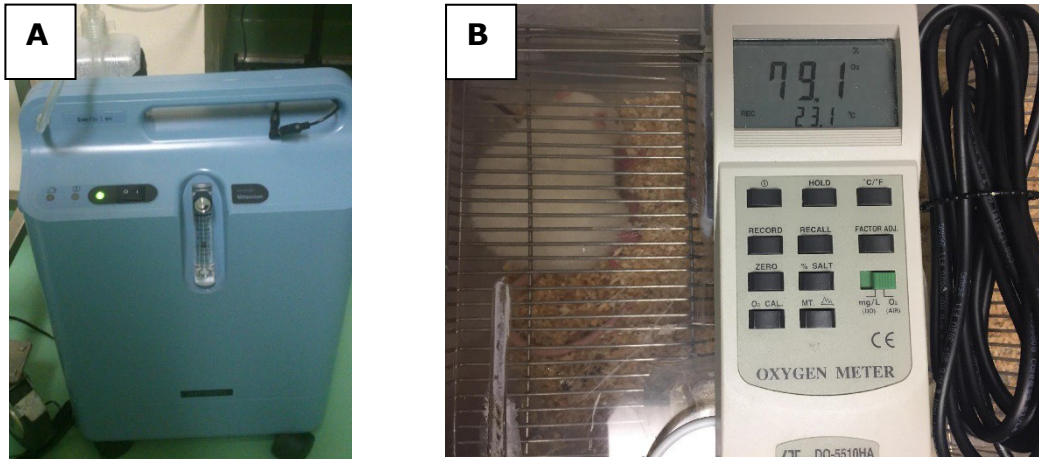
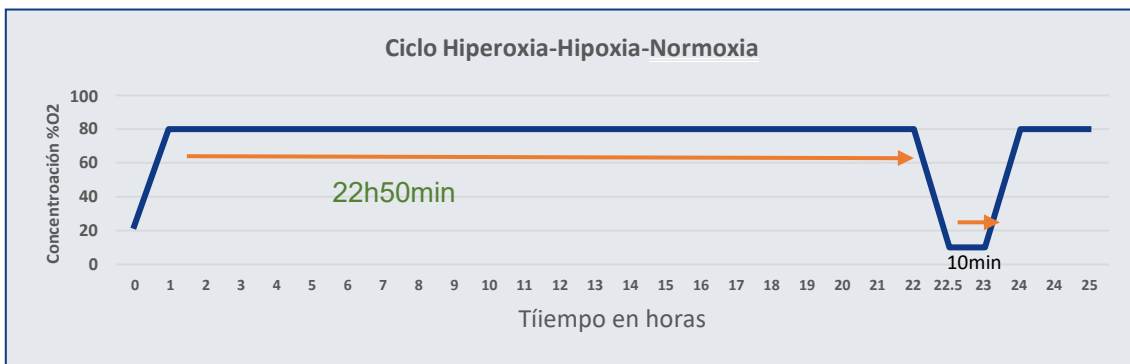


Figura 6. A: concentrador Respironics Everflo-OPI. B: sensor de oxígeno Lutron (Oxygen Meter).

La pauta de exposición se basó en el esquema publicado por Ratner en el 2009. El esquema a utilizar fue 80% de oxígeno por 22.5 horas y 10% de oxígeno por 10 minutos, con un retorno gradual del 21% a 80% por 1 hora (Figura 7). Los periodos de hipoxia se realizaron diariamente por 7 días y después en días alternos hasta completar los 12 días de exposición. Se realizó el sacrificio de las crías completados los 5 y 12 días de exposición. En todo momento se mantuvo el registro del número de animales sobrevivientes y fallecidos.



CICLOS DE HIPEROXIA/HIPOXIA

Esquema	tiempo/día	nacimiento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
hiperoxia 80%	22h 50min													
hipoxia 10%	10 min													
recuperación 21%	1h													

Figura 7. Esquema de hiperoxia-hipoxia basado en lo publicado por Ratner et al en el 2009.

5.3 Sexado de los animales.

Para determinar el sexo de las crías al momento de extraer los órganos se verificó mediante la visualización directa la presencia de los órganos sexuales respectivos.

5.4 Eutanasia de las crías y obtención de órganos y tejidos.

A las crías se les administró una sobredosis de xilacina (15 mg/Kg) y ketamina (80 mg/Kg) por vía intraperitoneal. El día del sacrificio se aleatorizaron las crías que iban a ser procesadas para estudios histopatológicos y las que iban a ser procesadas para obtención de plasma o tejido pulmonar para determinar los niveles de expresión a nivel de RNA mensajero.

5.5 Toma y procesamiento de muestras biológicas.

5.5.1 Obtención de plasma.

Se tomaron muestras de sangre por punción cardiaca en tubos con EDTA para la separación de plasma a 4,000 rpm por 3 minutos. Para medir citocinas y actividad enzimática. Se almacenó a -80°C hasta su procesamiento.

5.5.2 Obtención de tejidos.

Se extrajeron los órganos (pulmones, corazón, bazo, riñones, hígado y cerebro) (Figura 8). El exceso de sangre en los órganos fue retirado con PBS estéril a una temperatura de 4 °C. Los tejidos se pesaron y fragmentaron para su almacenaje en RNAlater® (Ambion, RNA Company) a 4 °C por 24 horas y posteriormente a -20 °C hasta la extracción de RNA o su posterior uso.



**Figura 8. A: Obtención de órganos de las crías, para su almacenaje en RNAlater®.
B: cerebro de cría retirado para almacenaje.**

5.6. Análisis histopatológico.

Los pulmones de 5 individuos de cada grupo fueron perfundidos vía transventricular, con 0.5 a 1 mL de solución de formaldehído 4% en PBS pH 7.4, y con la misma solución a presión constante de 25 cm de agua por 3 min a través de una cánula traqueal (Jelco 24G ó 22G, acoplado a una jeringa de 3 mL, una llave de 3 vías y una columna para medición de presión en cm de agua). Los pulmones se disecaron de la cavidad torácica y fueron fijados en solución 4% de formaldehído en PBS pH 7.4 a 4°C durante 72 horas (Figura 9). Posteriormente los pulmones fueron inmersos en bloques de parafina.

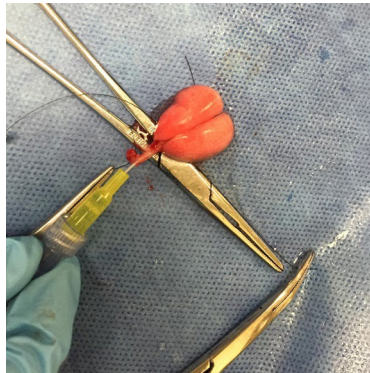


Figura 9. Pulmón de cría de rata de 13 días de vida. Perfundido mediante una cánula traqueal con solución de formaldehído 4% en PBS pH 7.4.

Secciones de pulmón en parafina, de 5 μ M de espesor, fueron montadas en portaobjetos SuperFrost plus (Menzel_Gläzer, Alemania). Una vez desparafinizados, los tejidos se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para el conteo radial alveolar y examinar infiltrado inflamatorio mediante la medición del número de neutrófilos, monocitos y macrófagos en 20 campos diferentes con el objetivo 10X, o tricrómico de Masson para la evaluación del grado de fibrosis.



Figura 10. Sección de pulmón incluido en parafina. Bloque de parafina en caset.

Se buscaron intencionadamente hallazgos histopatológicos consistentes con la descripción microscópica de DBP como agrandamiento de espacios alveolares por ausencia de tabiques alveolares (Funkhouser, 2020), infiltrado alveolar e intersticial con células inflamatorias como linfocitos, macrófagos y neutrófilos; hiperplasia bronquiolar determinada por un incremento en las células escamosas que limitan la superficie interna de los bronquiolos (Coalson, 2003) y edema peri-bronquial definido como una cantidad excesiva de líquido en el tejido intersticial peri-bronquial (Kemp et al., 2008).

5.6.1 Conteo Radial Alveolar (RAC).

Para evaluar el Conteo Radial Alveolar se realizaron cortes anatomopatológicos teñidos con Hematoxilina-Eosina. Utilizando cortes de 5µm, se colocaron en laminillas.

Las muestras se desparafinaron a 60°C durante 40 minutos. Se colocaron en Solución Hemo-D 7 minutos, y después se realizaron 12 pases en etanol 100%, 6 pases en etanol 90%, 6 pases en etanol 70% y se dejaron 5 minutos en agua bidestilada. Posteriormente, se sumergieron 5 minutos en Hematoxilina de Harris, con posterior lavado en agua corriente hasta lograr el aclaramiento de la misma. Se realizaron 4 pases en alcohol ácido, con posterior lavado en agua corriente hasta el aclaramiento de la misma.

Finalmente se incubaron las laminillas 3 minutos en eosina y posteriormente se realizaron 6 pases en etanol 70%, 6 pases en etanol 90%, 12 pases en etanol 100% y 18 pases en Solución Hemo-D. Se secaron las muestras y se les puso una gota de DPX a cada muestra, se les colocó el cubreobjetos y se dejaron secar para la toma de imágenes y el análisis de los resultados.

La toma de imágenes digitales de los cortes anatomopatológicos teñidos con hematoxilina y eosina se realizaron con una cámara AxioCam HRm (Zeiss Microscopy, Oberkochen, Germany) conectado a un microscopio de luz Axio ImageZ1 a una magnificación de 10x. Un total de 20 imágenes por cada individuo fueron analizadas. El grado de alveolarización se midió evaluando el conteo radial alveolar mediante la técnica descrita por Emery y Mithal (Emery & Mithal, 1960).

El RAC es el número de alvéolos cerrados que son interceptados por una línea trazada perpendicularmente desde un bronquiolo terminal hacia la pleura más cercana. Un patólogo cegado a los casos realizó el conteo del RAC.

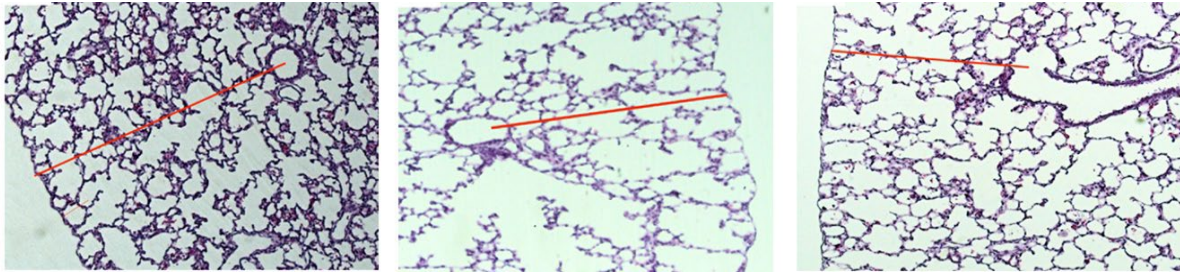


Figura 11. Imagen representativa de la estandarización de la línea perpendicular para el conteo del RAC. La línea roja representa el número de alvéolos cerrados que son intersectados, trazada desde un bronquiolo terminal hacia la pleura más cercana. (RAC) (Emery & Mithal, 1960).

5.6.2 Índice de intersección lineal media (Lm)

Se obtuvieron imágenes digitales de secciones de tejido pulmonar teñido con Hematoxilina-eosina, usando una cámara AxioCam HRm (Zeiss Microscopy, Oberkochen, Germany) conectada a un microscopio Axio ImageZ1 light microscope a 10× de magnificación.

Mediante el método semi-automatizado propuesto por Crowley para determinar la media de la distancia libre entre las superficies de intercambio gaseoso en los acinos alveolares. Se generaron imágenes de 800x 600 píxeles, aquellas donde no se observaron imágenes enteramente cubiertas por tejido pulmonar se descartaron. Se analizaron 5 imágenes por individuo y 3 individuos por grupo. En promedio se generaron 1,093 cuerdas alveolares (longitud en μM de la distancia entre 2 paredes de un mismo alveolo) por imagen y 5,469 cuerdas alveolares por individuo utilizando el protocolo semi-automatizado de ImageJ con una trama de

20 líneas horizontales semi-transparentes y 20 líneas verticales semitransparentes.

El índice de intersección lineal media se determinó basado en el método descrito por Crowley, de forma semiautomática, donde la imagen del campo pulmonar se convierte en una imagen de 8 bits, luego el umbral de Huang binariza la imagen para denotar espacio aéreo y pulmón. Luego, se agregan líneas de prueba semitransparentes a la imagen y se usa el umbral de color para aislar las cuerdas alveolares según el color de los píxeles (Crowley et al., 2019) (Figura 12).

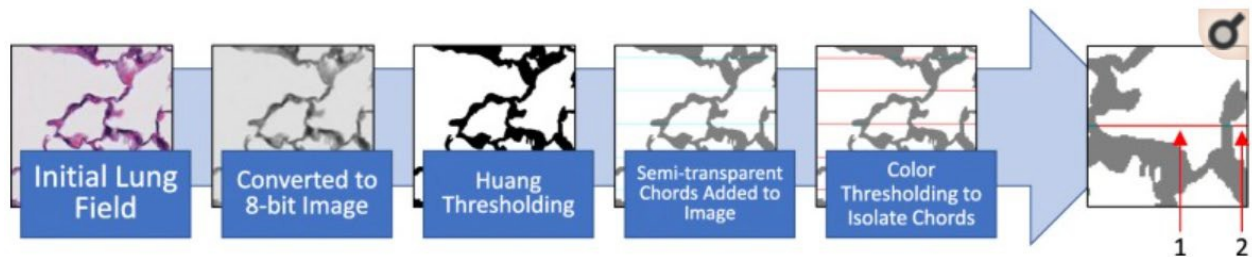


Figura 12. Análisis del índice de intersección lineal media la línea. Se realizó de forma semiautomática, donde el campo pulmonar inicial se convierte en una imagen de 8 bits, luego el umbral de Huang binariza la imagen para denotar espacio aéreo y pulmón. Luego, se agregan líneas de prueba semitransparentes a la imagen y se usa el umbral de color para aislar las cuerdas alveolares según el color de los píxeles. Figura tomada de Crowley et al., 2019.

5.6.3 Índice de fibrosis.

El grado de fibrosis fue evaluado en tejido pulmonar usando cortes anatomopatológicos teñidos con tricrómico de Masson.

Para la tinción de tricrómico de Masson se utilizaron cortes de $5\mu\text{m}$ del bloque cardiopulmonar en bloque de parafina y colocados en laminillas, las muestras se desparafinaron a 60°C durante 40 minutos. Se colocaron en solución Hemo-D 7 minutos, y después se realizaron 12 pases en etanol 100%, 6 pases en etanol 90%,

6 pases en etanol 70% y se dejaron 5 minutos en agua bidestilada. Posteriormente, se sumergieron 5 minutos en hematoxilina férrica (1g de hematoxilina, 100mL etanol 95%, 4mL de cloruro férrico 29% en agua, 95mL agua bidestilada y 1mL de ácido clorhídrico), con posterior lavado en agua corriente hasta lograr el aclaramiento de esta. Se sumergieron 5 minutos en escarlata de Biebrich-Fucsina ácida (1gr de Fucsina Ácida, 100mL agua bidestilada, 0.5mL ácido acético glacial, 1gr Ponceau de Xilidina, 100mL agua bidestilada y 0.5mL ácido acético glacial), con posterior lavado en agua corriente hasta el aclaramiento de esta. Después se tiñeron con ácido fosfomolibdico - ácido fosfotúngstico (25mL ácido fosfomolibdico 5%, 25mL de ácido fosfotúngstico 5%) durante 5 minutos, seguido de azul de anilina (2.5g azul de anilina, 100mL agua bidestilada y 2mL ácido acético glacial) durante 5 minutos y ácido acético 1% durante 2 minutos. Finalmente, realizaron 6 pases en etanol 70%, 6 pases en etanol 90%, 12 pases en etanol 100% y 18 pases en solución hemo-D. Se secaron las muestras y se montaron, se les colocó una gota de DPX sobre la muestra y un cubreobjetos sobre la misma.

Una vez teñidos se obtuvieron imágenes digitales de los cortes anatomopatológicos teñidos con tricómico de Masson usando una cámara AxioCam HRm (Zeiss Microscopy, Oberkochen, Germany) conectado a un microscopio de luz (Axio ImageZ1, Jena, Germany) a una magnificación de 20X. Cinco campos de cada laminilla fueron fotografiados para cada individuo. Los campos en los que se observaban grandes porciones de bronquiolos terminales fueron descartados. Los campos fueron aleatorizados en forma cegada y observados por un patólogo certificado. En cada campo el patólogo determinó el mayor grado de fibrosis observado, de acuerdo con la escala de Ashcroft modificada, que se muestra en la imagen (Figura 13)(Hübner et al., 2008).

Table 2. Characterization of the Modified Scale

Grade of Fibrosis	Sample Photograph	Modified Scale
0	Figure 1A	Alveolar septa: No fibrotic burden at the most flimsy small fibers in some alveolar walls Lung structure: Normal lung
1	Figure 1B	Alveolar septa: Isolated gentle fibrotic changes (septum $\leq 3\times$ thicker than normal) Lung structure: Alveoli partly enlarged and rarefied, but no fibrotic masses present
2	Figure 1C	Alveolar septa: Clearly fibrotic changes (septum $>3\times$ thicker than normal) with knot-like formation but not connected to each other Lung structure: Alveoli partly enlarged and rarefied, but no fibrotic masses
3	Figure 1D	Alveolar septa: Contiguous fibrotic walls (septum $>3\times$ thicker than normal) predominantly in whole microscopic field Lung structure: Alveoli partly enlarged and rarefied, but no fibrotic masses
4	Figure 1E	Alveolar septa: Variable Lung structure: Single fibrotic masses ($\leq 10\%$ of microscopic field)
5	Figure 1F	Alveolar septa: Variable Lung structure: Confluent fibrotic masses ($>10\%$ and $\leq 50\%$ of microscopic field). Lung structure severely damaged but still preserved
6	Figure 1G	Alveolar septa: Variable, mostly not existent Lung structure: Large contiguous fibrotic masses ($>50\%$ of microscopic field). Lung architecture mostly not preserved
7	Figure 1H	Alveolar septa: Non-existent Lung structure: Alveoli nearly obliterated with fibrous masses but still up to five air bubbles
8	Figure 1I	Alveolar septa: Non-existent Lung structure: Microscopic field with complete obliteration with fibrotic masses

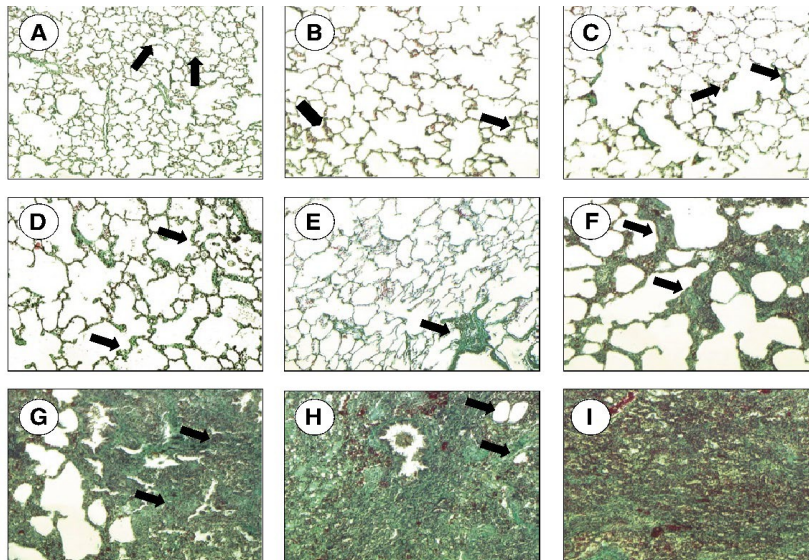


Figura 13. Escala de Ashcroft modificada. (Hübner et al., 2008).

Debido a que el efecto observado corresponde a un grado de fibrosis menor de 3, en todos los casos; se subdividieron los grados 1, 2 y 3 en dos categorías cada uno de acuerdo a lo siguiente: a) si el engrosamiento del tabique alveolar se debía a conglomerado celular o b) si el engrosamiento del tabique alveolar se debía a incremento en la matriz extracelular. La media de todos los campos fue registrada para obtener el índice de fibrosis.

5.6.4 Inmunohistoquímica

Posterior a hacer cortes de 5µm del bloque cardiopulmonar en bloque de parafina y colocados en laminillas, las muestras se desparafinizaron a 60°C durante 40 minutos. Se colocaron en solución hemo-D 5 minutos, y después se realizaron 6 pases en etanol 100%, 6 pases en etanol 90%, 6 pases en etanol 70% y se dejaron 5 minutos en agua bidestilada. Se incubaron las laminillas en H₂O₂ al 3% durante 30 minutos en oscuridad, con posterior lavado en agua corriente. Después, se realizó la recuperación de las muestras calentando las laminillas sumergidas en solución retrieval (50mL tris 50mM pH 9.0, 10mL EDTA 2mM pH 8.0 en 940mL agua bidestilada) durante 3 minutos en horno de microondas a potencia 3 de 10, se dejaron enfriar 5 minutos a temperatura ambiente y se repitió el calentado bajo las mismas condiciones.

Posteriormente, se colocaron las muestras sumergidas en hielo por 20 minutos y después se lavaron las laminillas en agua corriente. Se adicionó suficiente suero bovino fetal al 10% para cubrir la muestra y se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se removió el exceso de suero bovino fetal al 10% y se colocó la cantidad suficiente de anticuerpo primario disuelto en suero bovino fetal al 10% para cubrir la muestra. Para TGF-β1 se utilizó el anticuerpo ab25121 de abcam® en dilución 1:200, y para B-actina se utilizó el anticuerpo ab8227 de abcam® en dilución 1:1,000. En ambos casos, se utilizó el anticuerpo secundario cabra ab205718 de abcam® dirigido a IgG de conejo en dilución 1:5,000. Para gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se utilizó el anticuerpo sc-48167 en dilución 1:50 como primario y el anticuerpo sc-2953 en dilución 1:25, ambos de Santa Cruz Biotechnologies®. La incubación con el

anticuerpo primario fue durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C.

5.7 Procesamiento del tejido para la extracción de RNA y ensayos de PCR en tiempo real.

5.7.1 Extracción de RNA a partir de tejido de pulmón.

La extracción de RNA se realizó a partir de tejido pulmonar previamente colocado en el reactivo RNAlater (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y almacenado según las instrucciones del fabricante. Una vez terminada la recolección de muestras, se efectuó la extracción de RNA total de los tejidos usando el reactivo TRIzol® (Invitrogen): aproximadamente 100 mg de tejido de pulmón derecho fue depositado en un mortero previamente congelado a -80 °C (ultra congelador Panasonic vip Series MDF-U53VA-PA). Una vez macerado el tejido se añadió 1 mL del reactivo TRIzol® (Reagent Invitrogen™), y posteriormente se pasó a un microtubo de 1.5 mL (con aproximadamente 1 mL de la muestra). A partir de este punto, la extracción se realizó siguiendo las especificaciones del fabricante. El RNA se resuspendió en agua (Sigma Water DEPC), se validó la integridad y la cuantificación de la muestra.

La integridad del RNA fue evaluada en gel de agarosa. Se preparó agarosa al 1.2 % en 100 mL con buffer TBE al 1× (Invitrogen™), añadiendo 1 µL de bromuro de etidio (50 mg/mL). Una vez polimerizado, el gel se colocó en una cámara de electroforesis horizontal (Owl Separation Systems) y sumergido en buffer TBE al 1×. Se colocaron 2 µL de muestra de RNA con 3 µL de buffer de carga gelred (Biotium, Hayward, CA, USA). Las muestras fueron separadas por electroforesis a 70-100 volts durante 20-30 minutos. En la figura 14 se muestra la imagen representativa de uno de los geles realizados, donde se aprecia la integridad de las subunidades ribosomales 28S, 18S y 5S.

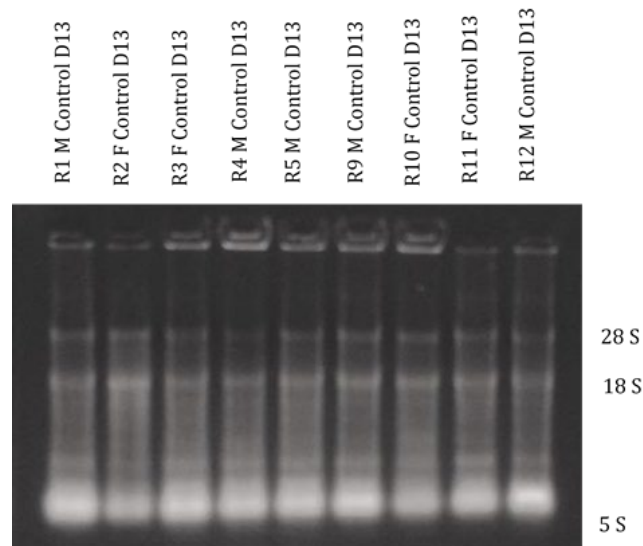


Figura 14. Imagen representativa de gel de agarosa con muestras de RNA extraídas de pulmón. Gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio. La codificación de las muestras es: R, Rata; M/F, macho y hembra, respectivamente; muestras representativas del grupo control; día 13 de vida. El bandeo representa a las subunidades ribosomales 28S, 18S y 5S.

Los parámetros de calidad del RNA total se determinaron en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) se cuantificó a 260 y 280 nm y se verificó la pureza (≥ 1.8 en la relación de absorbancia 260/280). El RNA se almacenó a -80°C hasta su análisis.

5.7.2 Síntesis de DNA complementario para la RT-PCR.

La síntesis de cDNA se llevó a cabo ajustando todas las muestras de RNA total a $500\text{ng}/\mu\text{L}$ y usando el kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Las condiciones de la síntesis fueron la siguiente: Se realizó a partir de una concentración de $500\text{ ng}/\mu\text{L}$ de RNA total. En la primera parte del protocolo se añadió $1\ \mu\text{L}$ de oligo(dT) ($50\ \mu\text{M}$) más $1\ \mu\text{L}$ de mezcla de dNTPs ($10\ \text{mM}$). La muestra se aforó con agua DEPC a un volumen final de $10\ \mu\text{L}$. La mezcla se incubó a $65\ ^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos en un termociclador Corbett Research. Posteriormente, el tubo se colocó en hielo donde

se adicionó el mix de síntesis el cual está compuesto de 2 µL de buffer RT (10×), 4 µL de MgCl₂ (25 mM), 2 µL de DTT (0.1 M), 1 µL de RNaseOUT™ (40 U/µL) y 1 µL de SuperScript®III RT (200 U/µL). Una vez añadido el mix de síntesis se obtuvo un volumen final de 20 µL de reacción. La mezcla se homogenizó por pipeteo suave, y se incubó a 50 °C por 50 minutos, y posteriormente a 85 °C por 5 minutos. Los tubos se colocaron en hielo y finalmente se adicionó 1 µL de RNasa H (2 U/µL). Las muestras se incubaron a 37°C por 20 minutos. Las muestras se almacenaron a -20°C en un congelador (Norlake Scientific®).

5.7.3 Curva de dilución de cDNA.

Para realizar el análisis cuantitativo de las muestras, se realizó el rango dinámico de dilución a partir de diluciones del cDNA. Dichas diluciones se realizaron de forma consecutiva desde 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, y 1:1024 para cada uno de los genes: *AhR*, *r18s*, *Cyp1a1*, *Cyp1b1*, *Nqo1* y *Ugt1a6*. Las reacciones se realizaron utilizando la TaqMan® Universal Master Mix II Mix (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA).

La mezcla de reacción fue la siguiente: 10 µL de TaqMan® Universal Master Mix II (2×), 1 µL de la mezcla iniciadores/sonda (20X) para los genes *r18s*, *AhR*, *Cyp1a1*, *Cyp1b1*, *Ugt1a6* y *Nqo1*, 2 µL de cDNA de las diluciones antes mencionadas y 7 µL de agua grado biología molecular, para un volumen final de 20 µL. Se usaron sus respectivos controles negativos y positivos.

La dilución óptima para la reacción de RT-qPCR fue de 1:16 para todos los genes que fueron evaluados. Las condiciones de amplificación tiempo, temperatura y número de ciclos fue de: 95°C 10 minutos, 35 ciclos (95°C por 15 segundos y 60°C por 1 minuto), 4°C para finalizar.

5.7.4 PCR Tiempo Real.

La PCR cuantitativa se realizó en un equipo termociclador Quant Studio 5.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para cada uno de los genes a evaluar en el ensayo se utilizó la dilución 1:16 del cDNA. Las condiciones para la RT-qPCR establecidas previamente se utilizaron en la determinación de la expresión de los genes seleccionados. Como control se utilizó el gen ribosomal 18S (r18S), marcado con mar FAM® (Applied Biosystems), los primers específicos fueron seleccionados de la página de internet: Thermo Scientific (<https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-assays/tagman-gene-expression.html>) para los siguientes genes: *AhR* (Rn00565750_m1), *Cyp1a1* (Rn00487218_m1), *Cyp1b1* (Rn00564055_m1), *Nqo1* (Rn00566528_m1), *Ugt1a6* (Rn00756113_m1), *Aldh1a1* (Rn00755484_m1), *Aldh3a1* (Rn00694669_m1), and *Gsta1* (Rn01757146_m1).



Figura 15. Termociclador Quant Studio 5.0

Las condiciones de la reacción: inició con una incubación a 50°C por 2 minutos y luego a 95°C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos, cada uno de 15 segundos a 95°C para desnaturalización, luego 1 minuto a 60°C para alineación y extensión. Cada muestra se realizó por triplicado con sus respectivos controles negativos y positivos.

El resultado fue analizado usando el método comparativo de Ct (threshold cycle). La expresión relativa del gen fue calculada usando la fórmula de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001) y los resultados fueron expresados como la expresión relativa respecto al control endógeno.

5.8 Determinación de citocinas en plasma.

Para determinar la expresión a nivel de proteína de se utilizó el Rat Cytokine Antibody Array (Abcam®), es un ensayo análogo a un ELISA el cual consiste en en pares de anticuerpos fijados en una membrana como substrato en lugar de una placa. La captura de anticuerpos es suministrada en una membrana en la que cada par de pozos representa una citocina diferente.

El Kit incluye las siguientes citocinas: ActivinA, Agrin, Thymus Chemokine-1, B7-2/CD86, CINC-1, CINC-2alpha, CINC-3, CNTF, Fas Ligand, Fractalkine, GM-CSF, ICAM-1, IFN-gamma, IL-1 R6, IL-10, IL-13, IL-1alpha, IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-6, Leptin, LIX, L-Selectin, MCP-1, MIP-3alpha, MMP-8, beta-NGF, PDGFAA, Prolactin R, RAGE, TIMP-1, TNF- α , VEGF.

Brevemente, la membrana fue incubada por 30 minutos a 4°C en un buffer bloqueador, (todos los reactivos y buffers estaban incluidos en el kit). Las muestras de plasma se incubaron en la membrana toda la noche a temperatura ambiente. Los siguientes pasos se realizaron a temperatura ambiente. Y todos los lavados consistieron en 3 lavados con el buffer de lavado I, por 5 minutos cada uno, seguido de 2 lavados in buffer de lavado II, por 5 minutos cada uno. La mezcla de anticuerpos anti-citocina biotinilados (1:2000) se agregó a la membrana y se incubó por 2 horas. La membrana se lavó e incubó con estreptavidina HRP-conjugada (1:1000) por 2 horas. Se realizaron lavados y se incubó en 500 μ L de buffer de detección por 2 minutos. Finalmente, la membrana fue revelada con Kodak BioMax Light film (Sigma) a temperatura ambiente por 1 minuto. La señal de quimioluminiscencia unida a las citocinas fue capturada por el lector de quimioluminiscencia (Bio-Rad) y almacenada en una imagen de alta resolución. Se utilizó el programa ImageJ. para obtener la intensidad de la señal de las citocinas.

Se desarrollaron patrones en ImageJ para la localización automática de puntos y el procesamiento de imágenes. Para cada punto, los valores netos de intensidad

se determinaron como la suma de la señal de intensidad de píxeles por encima del umbral de corrección de fondo. Los umbrales de corrección de fondo se determinaron para cada punto como los valores de intensidad media de los píxeles en las esquinas del cuadrado en el que se inscribe cada punto, como se ilustra en la Figura 16.

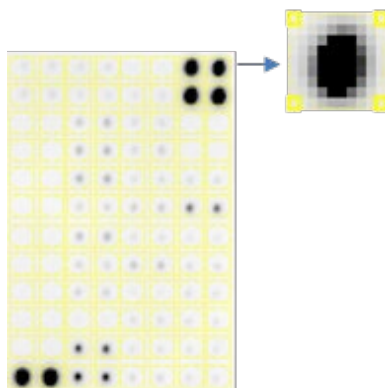


Figura 16. Imagen representativa de una membrana Rat Cytokine Antibody Array (Abcam®). Donde cada punto se determinó con la suma de la señal de intensidad de píxeles por encima del umbral de corrección de fondo.

Los valores de intensidad del punto se procesaron adicionalmente restando los valores de intensidad media de los puntos en blanco correspondientes a cada fila. Los valores de puntos de fondo corregidos se normalizaron utilizando las intensidades medias de los puntos de control positivo encontradas en la membrana Control 2, la cual fue seleccionada como ensayo de referencia.

Para el análisis de agrupamiento del conjunto de citocinas: se descargó un compendio de conjuntos de genes, incluidas vías canónicas y ontologías de genes, de MsigDB 3 (<http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb>).

Los símbolos genéticos correspondientes a citocinas expresadas diferencialmente se utilizaron para encontrar conjuntos de genes enriquecidos mediante una prueba hipergeométrica (función `phyper` para R's). Los conjuntos de genes se consideraron enriquecidos si tenían un valor de $p < 0.05$ y al menos cuatro genes.

5.9 Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS ver.19 (Licencia institucional ITESM) y R's.

Los datos se reportaron como promedio (\pm desviación estándar) y en otros casos por la variabilidad y el número de muestras se representó como media (\pm error estándar de la media). Para la comparación de dos grupos se utilizó la prueba U de Mann-Whitney, y para la comparación de dos o más grupos se utilizó el análisis de Kruskal-Wallis. Se consideró una $p < 0.05$ como una diferencia significativa.

Variable	Tipo de Distribución	Tipo de prueba
Ganancia de peso de madre	Normal	Paramétrica
Ganancia de peso de las crías	Normal	Paramétrica
Consumo de agua y alimento	Normal	Paramétrica
Conteo radial alveolar	Normal	Paramétrica
Índice de intersección lineal media	Normal	Paramétrica
Nivel de expresión de TGF- β	Normal	Paramétrica
Nivel de mRNA	No normal	No paramétrica
Nivel de proteína de citocinas plasmáticas	No normal	No paramétrica

Resultados

6.1. Características del modelo experimental.

6.1.1 Activación prenatal de los genes dependientes de AhR en las ratas recién nacidas.

Una vez que se realizó la administración prenatal del I3C se decidió evaluar en los primeros días de vida la activación de los genes dependientes de la AhR en las crías, se cuantificó mediante la determinación de la expresión del RNA mensajero de los siguientes genes: *AhR*, *Cyp1a1*, *Cyp1b1*, *Nqo1*, *Ugt1a6*, *Gsta1*, *Aldh1a1*, y *Aldh1a3* en los pulmones de ratas recién nacidas al momento de nacer (T0), a las 24 y 72 horas de vida.

Al evaluar los niveles de expresión del gen *AhR* se encontró que estos se encontraban al doble en el grupo tratado con I3C que en el grupo control y este efecto fue mayor a las 24 horas ($p < 0.01$), seguido de un efecto significativamente menor a las 72 horas.

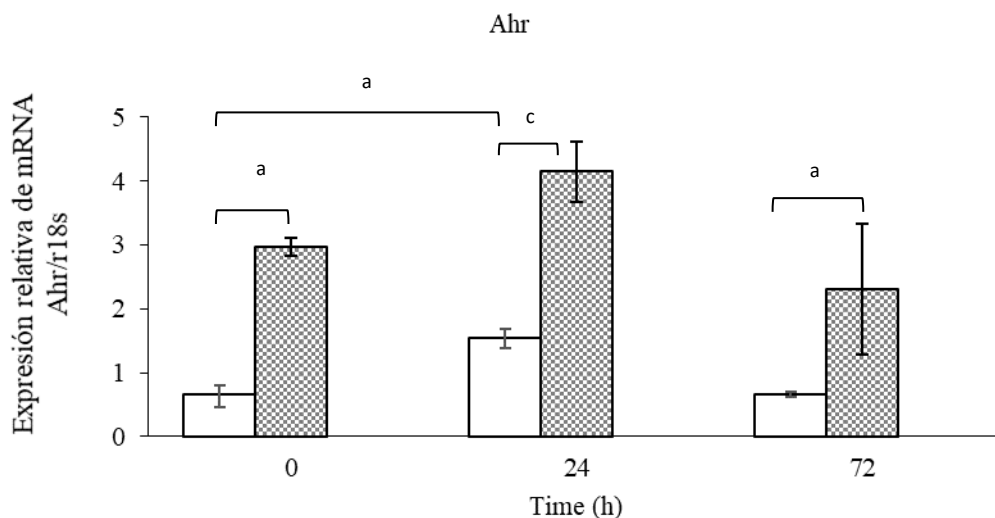


Figura 17. Efecto de la administración prenatal del I3C en la expresión relativa del gen AhR en ratas recién nacidas. Grupo control: barras blancas: crías expuestas al aire ambiente (21% de O₂; n=16), y grupo I3C: barras rayadas: crías de rata a las que se administró prenatalmente I3C (100mg/kg) y expuestas al aire ambiente (21% de O₂; n= 16). El gen del AhR fue evaluado a las 0, 24 y 72 horas de vida en tejido pulmonar de las crías. El efecto significativo se muestra con ^a $p < 0.05$ y ^c $p < 0.001$.

El nivel de expresión del *Cyp1a1* mostró un patrón similar al de AhR aunque con un mayor efecto al nacer las ratas tratadas con I3C mostraron un incremento significativo y dicho efecto se exacerbaba a las 24 horas mostraron un incremento de 40- veces respecto al nivel de expresión del grupo control ($p < 0.001$) (Figura 18). Y finalmente cuando se evaluó el efecto a las 72 horas se observó que esta había disminuido con respecto a las 72 horas posnatal pero este efecto fue similar al grupo control.

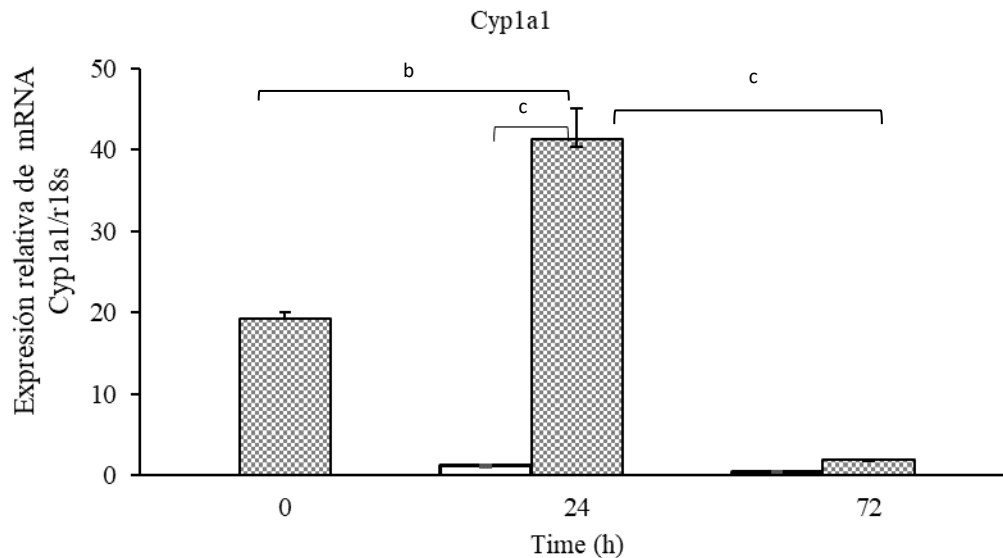


Figura 18. Efecto de la administración prenatal del I3C en la expresión relativa del gen *Cyp1a1* en ratas recién nacidas. Grupo control: barras blancas: crías expuestas al aire ambiente (21% de O₂; n=16), y grupo I3C: barras rayadas: crías de rata a las que se administró prenatalmente I3C (100mg/kg) y expuestas al aire ambiente (21% de O₂; n=16). El gen *Cyp1a1* fue evaluado a las 0, 24 y 72 horas de vida en tejido pulmonar de las crías. El efecto significativo se muestra con ^b $p < 0.01$ y ^c $p < 0.001$.

Al evaluar el nivel de expresión del *Cyp1b1* (Figura 19) en el grupo tratado con I3C si bien mostró un incremento al nacer ($p < 0.05$), se observó una reducción a las 24 horas y un aumento de 4 veces a las 72 horas comparado con los niveles del grupo control ($p < 0.001$).

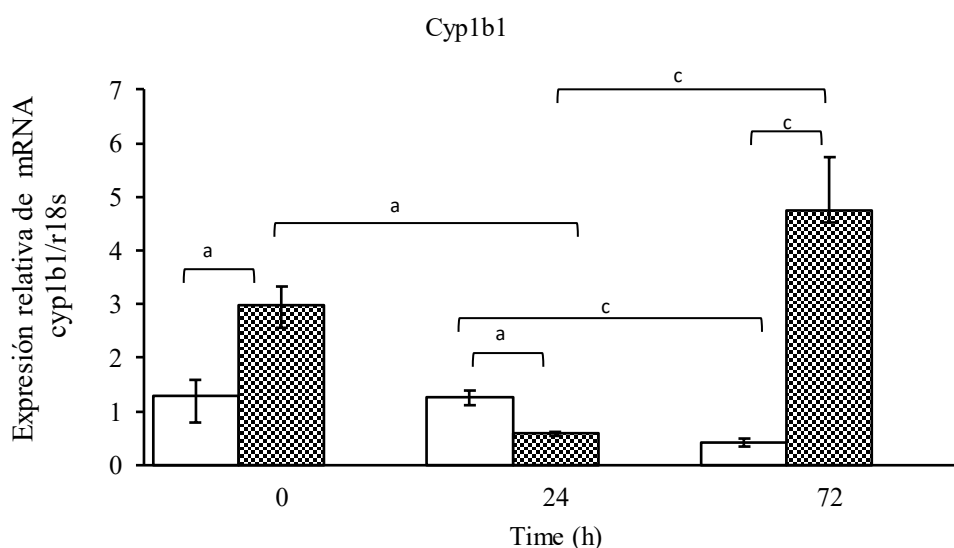


Figura 19. Efecto de la administración prenatal del I3C en la expresión relativa del gen *Cyp1b1* en ratas recién nacidas. Grupo control: barras blancas: crías expuestas al aire ambiente (21% de O_2 ; $n=16$), y grupo I3C: barras rayadas: crías de rata a las que se administró prenatalmente I3C (100mg/kg) y expuestas al aire ambiente (21% de O_2 ; $n=16$). El gen *Cyp1b1* fue evaluado a las 0, 24 y 72 horas de vida en tejido pulmonar de las crías. El efecto significativo se muestra con ^a $p < 0.05$ y ^c $p < 0.001$.

La expresión de *Nqo1* no mostró cambios al momento del nacimiento en el grupo tratado con I3C. Aunque a las 24 y 72 horas de vida los niveles fueron significativamente mayores en el grupo tratado con I3C, que en el observado en el grupo control ($p < 0.01$) para cada grupo, respectivamente (Figura 20).

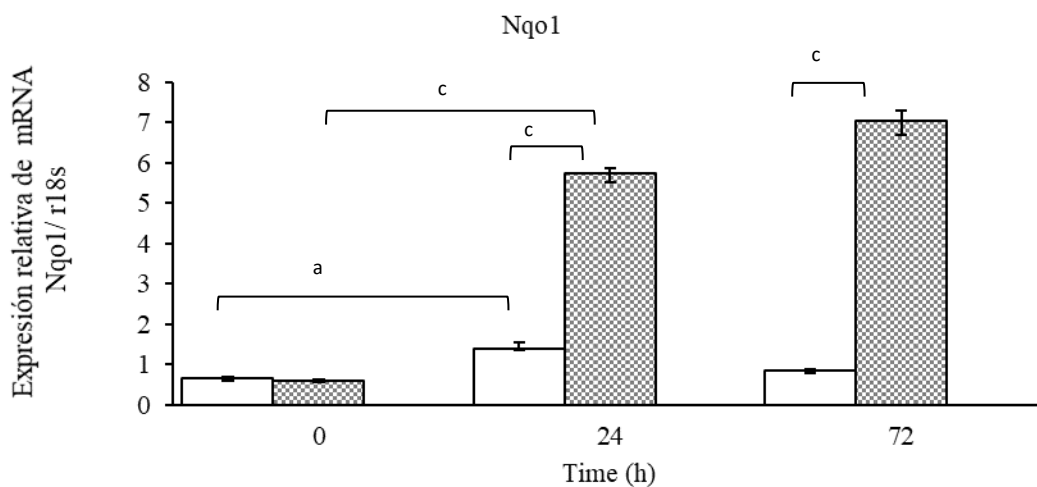


Figura 20. Efecto de la administración prenatal del I3C en la expresión relativa del gen *Nqo1* en ratas recién nacidas. Grupo control: barras blancas: crías expuestas al aire ambiente (21% de O_2 ; $n=16$), y grupo I3C: barras rayadas: crías de rata a las que se administró prenatalmente I3C (100mg/kg) y expuestas al aire ambiente (21% de O_2 ; $n= 16$). El gen *Nqo1* fue evaluado a las 0, 24 y 72 horas de vida en tejido pulmonar de las crías. El efecto significativo se muestra con ^a $p < 0.05$ y ^c $p < 0.001$.

El nivel de expresión de *Ugt1a6* y *Gsta1* mostraron un patrón similar cuando los animales fueron tratados con I3C, al nacer no se observaron cambios significativos y posteriormente a las 72 horas se observó hasta un incremento de 7 veces y 11 veces, respectivamente al comparar con el grupo control ($p < 0.01$). Si bien se logró detectar la presencia del mRNA del gen *Aldh3a1* este no mostró cambios significativos en el grupo tratado con I3C con respecto al grupo control.

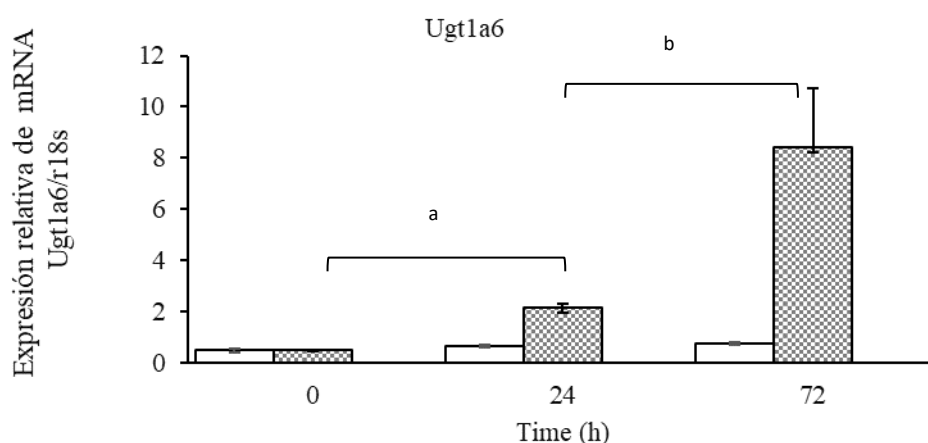


Figura 21. Efecto de la administración prenatal del I3C en la expresión relativa del gen *Ugt1a6* en ratas recién nacidas. Grupo control: barras blancas: crías expuestas al aire ambiente (21% de O_2 ; $n=16$), y grupo I3C: barras rayadas: crías de ratas a las que se administró prenatalmente I3C (100mg/kg) y expuestas al aire ambiente (21% de O_2 ; $n= 16$). El gen *Ugt1a6* fue evaluado a las 0, 24 y 72 horas de vida en tejido pulmonar de las crías. El efecto significativo se muestra con ^a $p < 0.05$, y ^b $p < 0.01$.

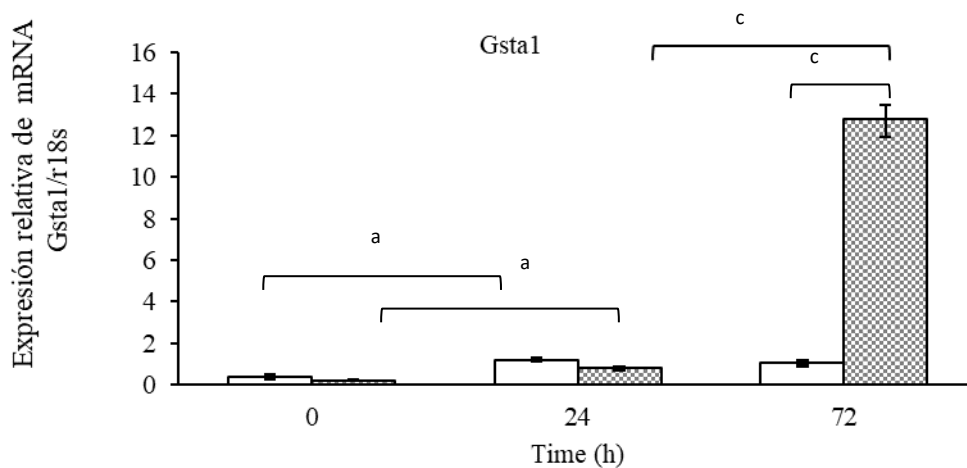


Figura 22. Efecto de la administración prenatal del I3C en la expresión relativa del gen *Gsta1* en ratas recién nacidas. Grupo control: barras blancas: crías expuestas al aire ambiente (21% de O₂; n=16), y grupo I3C: barras rayadas: crías de ratas a las que se administró prenatalmente I3C (100mg/kg) y expuestas al aire ambiente (21%de O₂; n= 16). El gen *Gsta1* fue evaluado a las 0, 24 y 72 horas de vida en tejido pulmonar de las crías. El efecto significativo se muestra con ^a $p < 0.05$ y ^c $p < 0.001$.

6.1.2 Efecto de hiperoxia-hipoxia en la ganancia de peso de las crías.

Una vez que se confirmó la activación de los genes dependientes de la AhR en las crías de las ratas tratadas con el I3C prenatalmente, 24 horas después de nacer fueron expuestas a los ciclos de hiperoxia-hipoxia.

Durante todo el experimento se vigiló el estado general de salud de todos los animales, se registró el peso de las crías, consumo de agua y alimento por la madre y la nodriza.

Al comparar los pesos corporales en los 3 grupos (Grupo control, Grupo expuesto y Grupo I3C + exposición), observamos que no había diferencia en la ganancia de peso en los primeros 6 días de vida de las crías (Figura 23). La ganancia de peso en el grupo control fue de $13.5 \pm 2.3\text{g}$, en el grupo expuesto fue de $11.4 \pm 0.47\text{g}$ y en el grupo tratado con I3C y expuesto de $11.6 \pm 0.7\text{g}$.

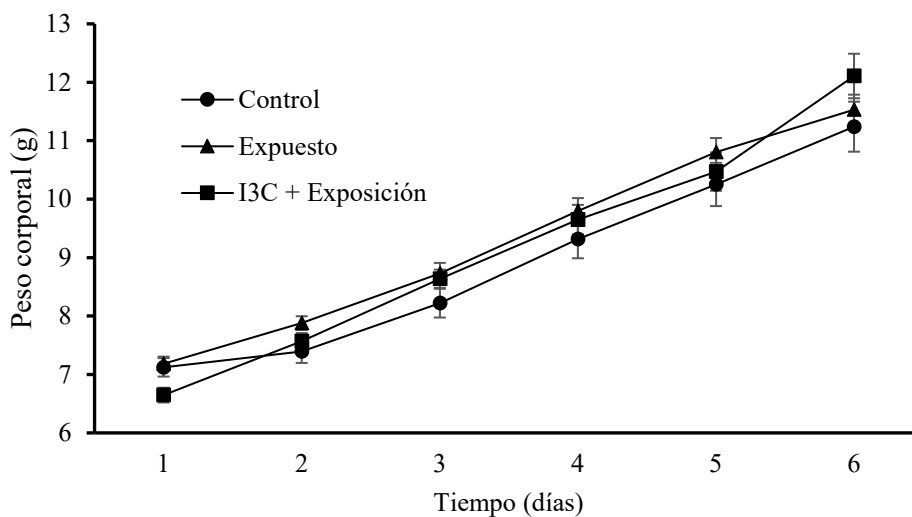


Figura 23. Efecto del I3C en la ganancia de peso corporal de las crías desde el día 1 al día 6 de vida. Grupo control (aire ambiente 21% de O_2 ; $n=26$), grupo expuesto hiperoxia-hipoxia (80-10-21% de O_2 ; $n=18$) y grupo tratado con I3C + exposición a hiperoxia-hipoxia (80-10-21% de O_2 ; $n=18$). Los datos están representados como la media \pm DE.

La exposición a hiperoxia-hipoxia disminuyó significativamente el peso corporal de las crías en el día 13 de vida (20 ± 1 g), comparados con la media de peso corporal de las crías del grupo control (25 ± 3.0 g) ($p < 0.05$) Figura 24. Cuando las ratas preñadas fueron tratadas con el I3C y las crías fueron expuestas a hiperoxia-hipoxia (22 ± 1 g), el peso corporal fue similar al grupo expuesto y menor que la del grupo control.

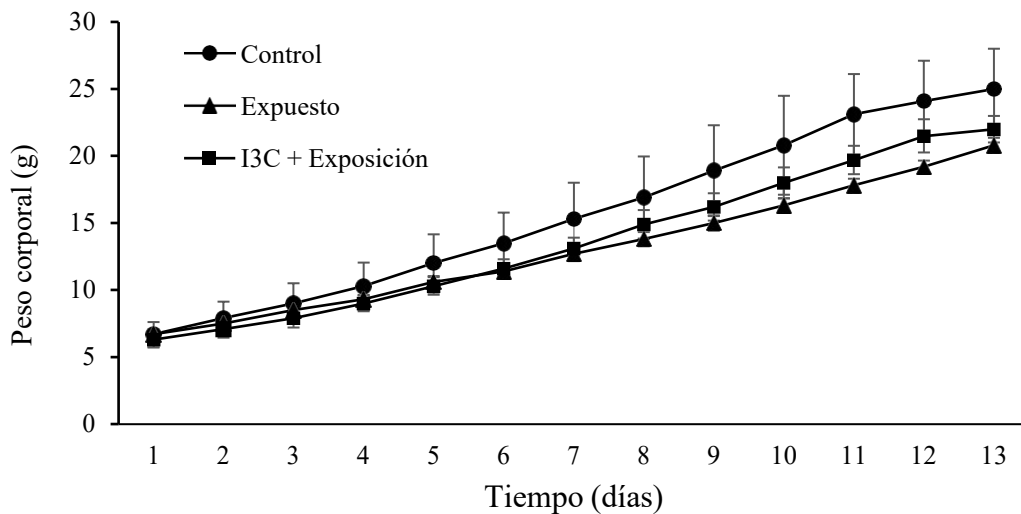


Figura 24. Efecto del I3C en la ganancia de peso corporal de las crías desde el día 1 al día 13 de vida. Grupo control (aire ambiente 21% de O₂; n=10), grupo expuesto hiperoxia-hipoxia (80-10-21% de O₂; n=11) y grupo tratado con I3C + exposición a hiperoxia-hipoxia (80- 1021% de O₂); n=7). Los datos están representados como la media \pm DE.

El consumo de agua y alimento se mantuvo constante durante todo el experimento.

A los 3 grupos se les dio seguimiento en cuanto a ganancia de peso, consumo de agua y alimento hasta el día 21 de vida. En la figura 25 se muestra la gráfica de ganancia de peso en la cual vemos que el grupo tratado con I3C y expuesto al esquema de hiperoxia-hipoxia tuvo una recuperación importante en la ganancia de peso ($43.8 \pm 0.7g$) comparado con el grupo expuesto ($35.4 \pm 0.6g$), y una diferencia menor con respecto al grupo control ($50.2 \pm 0.6g$).

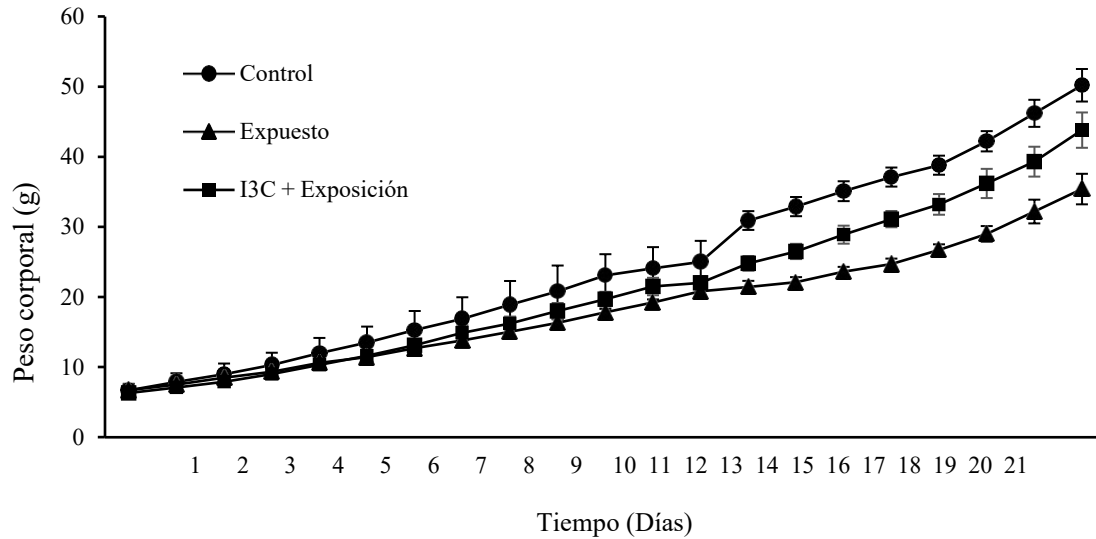


Figura 25. Efecto del I3C en la ganancia de peso corporal de las crías desde el día 1 al día 21 de vida. Grupo control (aire ambiente 21% de O₂; n=10), grupo expuesto hiperoxia-hipoxia (80-10-21% de O₂; n=11) y grupo tratado con I3C + exposición a hiperoxia-hipoxia (80- 1021% de O₂); n=7). Los datos están representados como la media \pm DE.

6.2 Efecto de la administración del I3C en la histopatología pulmonar.

6.2.1 Conteo Alveolar Radial en el día 6 de vida.

El establecimiento del modelo de displasia broncopulmonar se determinó por el RAC. Una vez procesados los tejidos se realizó una tinción con H&E que nos permitió visualizar los daños generados por la exposición y realizar el análisis de los cortes histológicos de pulmones de las crías expuestas a ciclos de hiperoxia-hipoxia, en los que se observaron: signos histológicos de arresto alveolar, una pobre septación alveolar y sacos terminales agrandados.

La media del RAC fue significativamente menor en el grupo expuesto a hiperoxia-hipoxia (4.2 ± 0.5) comparado con la media del RAC en el grupo control (8.6 ± 0.8) ($p < 0.01$) (Figura 26).

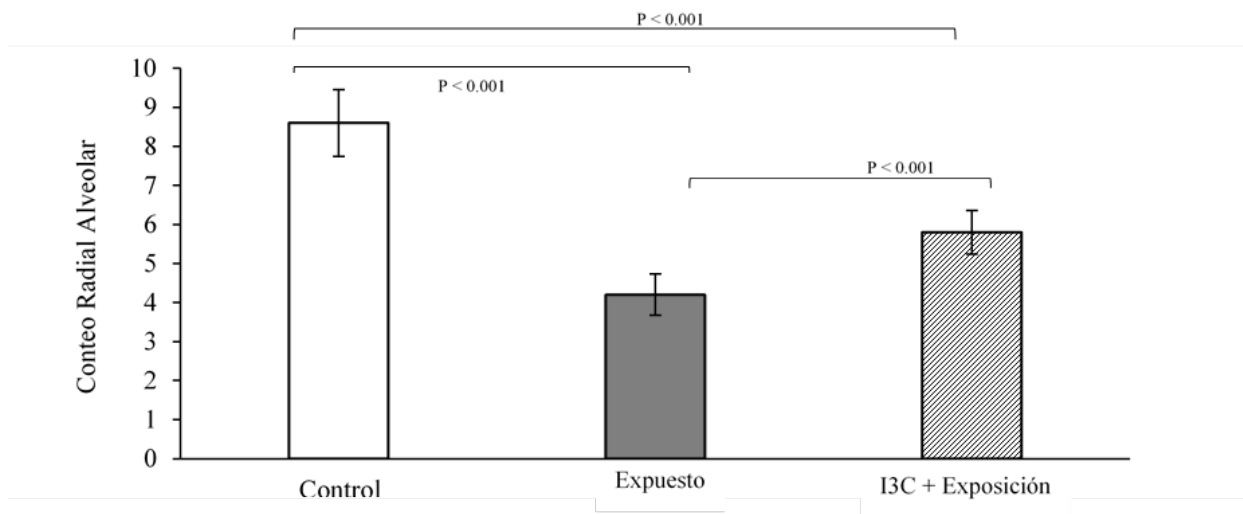


Figura 26. Efecto del I3C en el conteo alveolar radial, en pulmones de ratas recién nacidas expuestas a ciclos de hiperoxia-hipoxia y sacrificadas en el día 6 de vida.

Grupo control (Barra blanca: aire ambiente 21% de O₂; n=12), grupo expuesto a hiperoxia-hipoxia (Barra negra 80-10-21% de O₂; n= 5), grupo tratado con I3C + hiperoxia-hipoxia (Barra con rayas: I3C 100mg/kg + 80-10-21% de O₂; n=5). Los datos están representados como la media ± DE.

Las crías de la madre tratada con I3C que fueron expuestas a los ciclos de hiperoxia-hipoxia mostraron un ligero incremento en la media del RAC (5.8 ± 0.5) comparado con la media del RAC en las crías expuestas a hiperoxia-hipoxia ($p < 0.05$).

6.2.2 Conteo Alveolar Radial en el día 13 de vida.

El análisis histopatológico de pulmones de crías expuestas a ciclos de hiperoxia-hipoxia mostraron signos de arresto alveolar, pobre septación alveolar y sacos terminales agrandados (Figura 27).

La media del RAC fue significativamente menor en el grupo expuesto a hiperoxia-hipoxia (4.0 ± 1.0) comparado con la media del RAC en el grupo control (8.0 ± 2.0) ($p < 0.01$).

Las crías de la madre tratada con I3C que fueron expuestas a los ciclos de hiperoxia-hipoxia mostraron un ligero incremento en la media del RAC (6.0 ± 1.0) comparado con la media del RAC en las crías expuestas a hiperoxia-hipoxia ($p < 0.05$) (Figura 28).

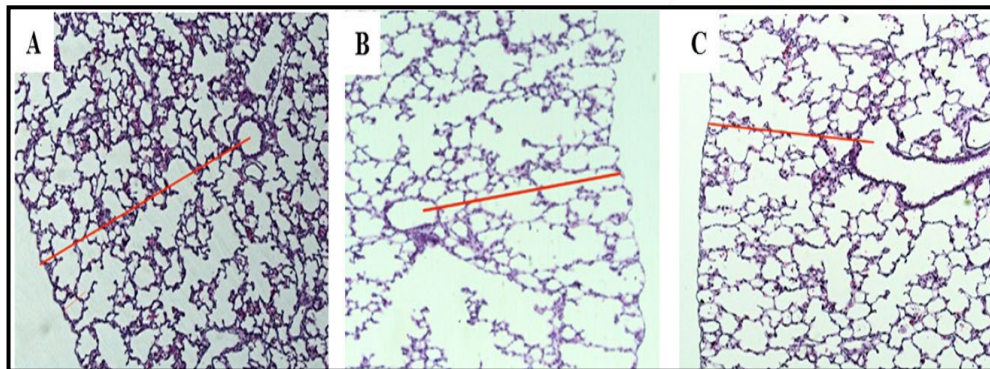


Figura 27. Efecto del I3C en la histopatología, en pulmones de ratas recién nacidas expuestas a ciclos de hiperoxia-hipoxia y sacrificadas en el día 13 de vida. Cortes histopatológicos de pulmones de ratas, teñidos con Hematoxilina y Eosina, magnificación 20x. A: grupo control, B grupo expuesto a hiperoxia-hipoxia, C: grupo tratado con I3C + hiperoxia-hipoxia.

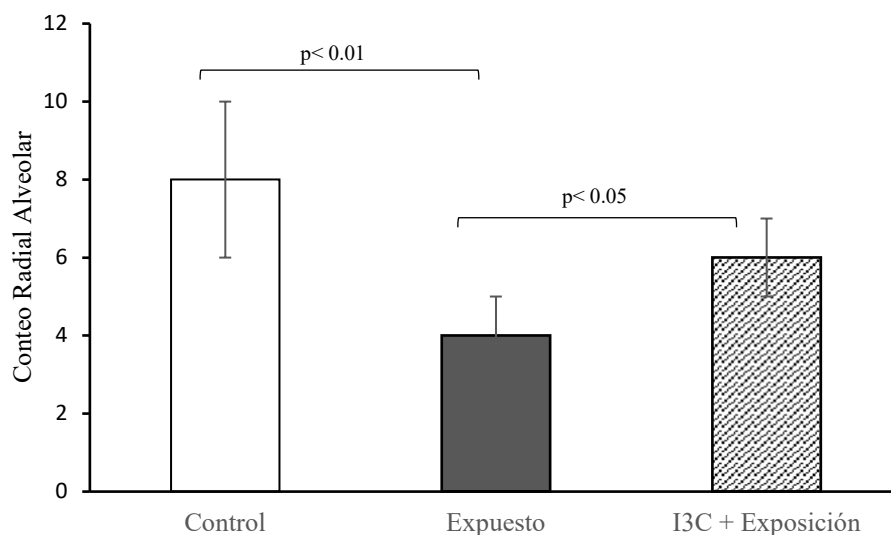


Figura 28. Representación gráfica de la media del RAC ± DE en el día 13 de vida.

Grupo control (Barra blanca: aire ambiente 21% de O₂; n=10), grupo expuesto a hiperoxia-hipoxia (Barra negra 80-10-21% de O₂; n= 11), grupo tratado con I3C + hiperoxia-hipoxia (Barra con rayas: I3C 100mg/kg + 80-10-21% de O₂; n=7).

6.2.3 Efecto en el Índice de intersección lineal media (Lm) en el día 13 de vida.

El índice de intersección lineal median os indica la distancia libre entre las superficies de intercambio gaseoso en los acinos alveolares. El Lm fue mayor en el grupo expuesto ($30.90 \pm 0.329 \mu\text{M}$) que en el grupo control ($21.74 \pm 0.1843 \mu\text{M}$) ($p < 0.01$). En el grupo tratado con I3C y expuestos a hiperoxia-hipoxia presentaron una disminución en la Lm ($27 \pm 0.23 \mu\text{M}$) comparada con el grupo expuesto ($p < 0.05$; Figura 29).

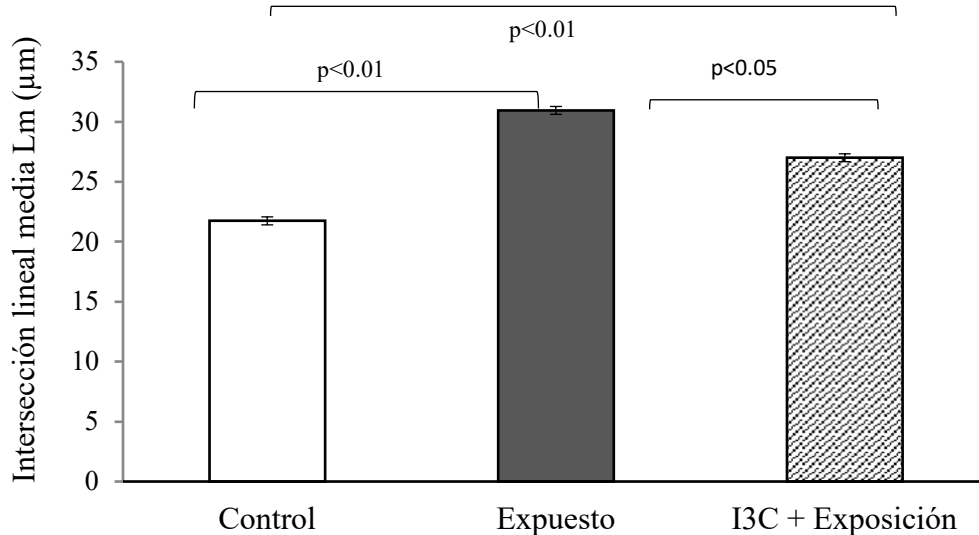


Figura 29. Efecto del I3C en la Lm, en pulmones de ratas recién nacidas expuestas a ciclos de hiperoxia-hipoxia y sacrificadas en el día 13 de vida. Representación gráfica de la media de la Lm \pm SE. Grupo control (Barra blanca: aire ambiente 21% de O₂; n=10), grupo expuesto a hiperoxia-hipoxia (Barra negra 80-10-21% de O₂; n= 11), grupo tratado con I3C + hiperoxia-hipoxia (Barra con rayas: I3C 100mg/kg + 80-10-21% de O₂; n=7).

De las alteraciones observadas más relevantes se encontró que en cuatro individuos del grupo hiperoxia-hipoxia, se observó un grado moderado de enfisema pulmonar, lo cual encontramos en menor frecuencia en el grupo de crías tratadas con I3C y expuestas a hiperoxia-hipoxia y no encontramos presente en las crías del grupo control. También se observó que aproximadamente en el 60% de las crías del grupo expuesto a hiperoxia-hipoxia mostraban edema peribronquial, hemorragia, e infiltrado intersticial y alveolar, además de hiperplasia bronquial. Pero las crías del grupo tratado con I3C y expuesta a hiperoxia-hipoxia no mostraba estas alteraciones (Figura 30). Cabe mencionar que el daño generado en los tejidos expuestos a hiperoxia-hipoxia mostraban una heterogeneidad en las alteraciones observadas.

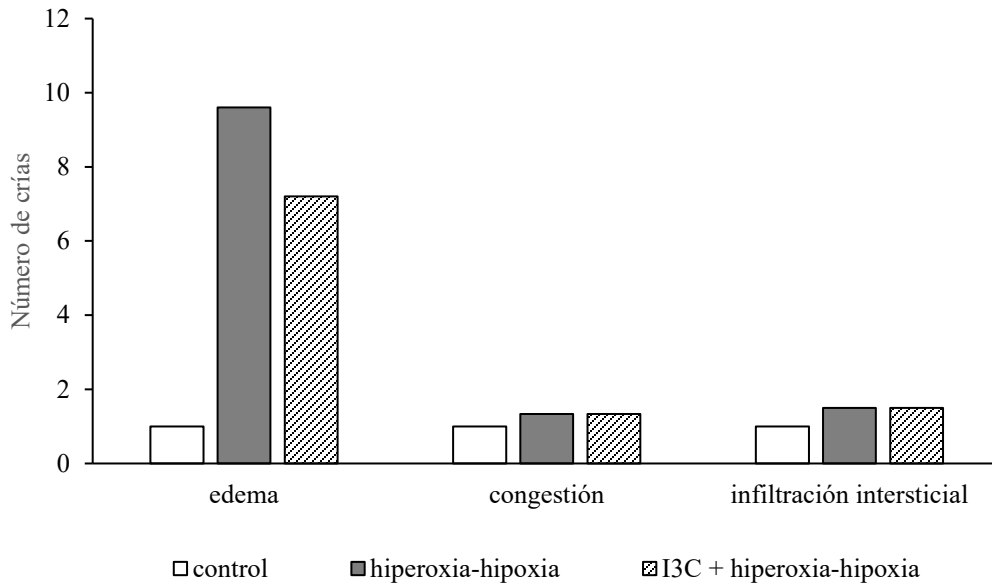


Figura 30. Hallazgos histopatológicos en tejido pulmonar teñido con Hematoxilina y Eosina, de crías de rata a los 6 días de vida. Grupo control (Barra blanca: aire ambiente 21% de O₂; n=12), grupo expuesto a hiperoxia-hipoxia (Barra negra 80-10-21% de O₂; n= 5), grupo tratado con I3C + hiperoxia-hipoxia (Barra con rayas: I3C 100mg/kg + 80-10-21% de O₂; n=5). Los valores están normalizados con respecto al grupo control.

6.2.4 Efecto en los cambios fibróticos en el día 13 de vida.

Se realizó el análisis de los cambios fibróticos de acuerdo a la escala de Ashcroft modificada. En el día 13 de vida ninguna cría de los 3 grupos mostró un grado de fibrosis >1 de acuerdo a esta escala, la severidad de las lesiones variaba de una región a otra. En el grupo control se observó predominantemente una arquitectura pulmonar normal (grado 0). En el grupo expuesto se observó fibrosis de los septos alveolares (engrosamiento >3 veces lo normal de los septos alveolares) con formación de nidos fibróticos que no conectaban con otras estructuras, alveolos parcialmente agrandados, pero no masas fibróticas (grado 1), y en el grupo tratado con I3C y expuesto al esquema de hiperoxia-hipoxia se observó un patrón similar al del grupo control (grado 0). En algunos cortes se observaron conglomerados celulares, más que un incremento de matriz extracelular (Figura 31).

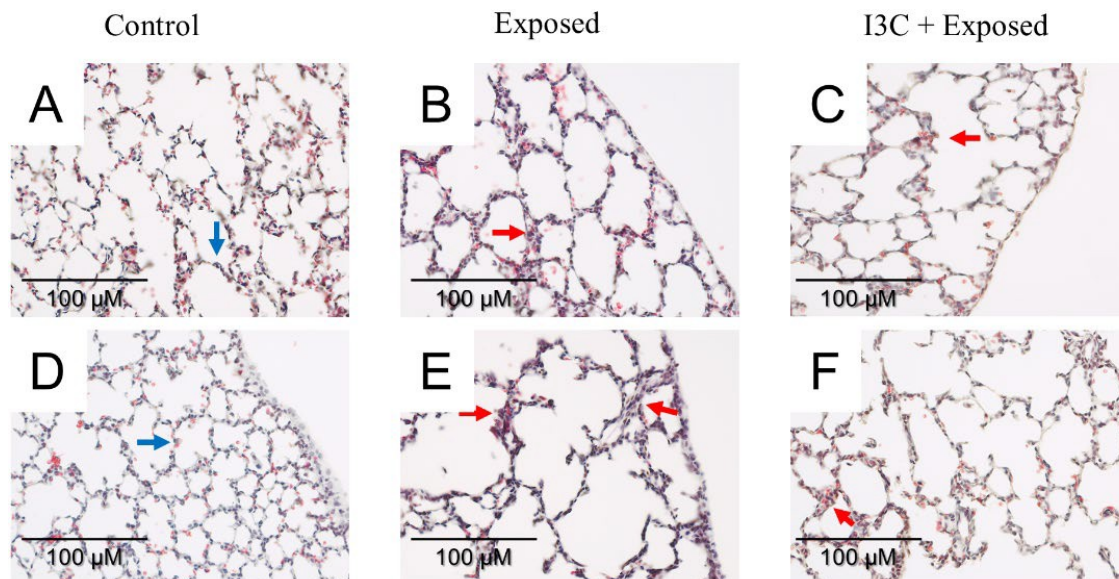


Figura 31. Cortes histopatológicos de pulmones de ratas recién nacidas expuestas a ciclos de hiperoxia-hipoxia y sacrificadas en el día 13 de vida. Los cortes se tiñeron con tricrómico de Massón. Magnificación 20x: A y D: grupo control (aire ambiente 21% de O₂; n=10), B y E: grupo expuesto a hiperoxia-hipoxia (80-10% de O₂; n= 11), C y F: grupo tratado (I3C 100mg/kg + 80-10% de O₂; n=7). Flechas azules muestran un pulmón normal y las flechas rojas muestran un tabique alveolar engrosado con ligeros cambios fibróticos. Cinco campos fueron fotografiados para cada cría y fueron numerados al azar en forma cegada, los campos predominantemente ocupados por bronquios o vasos sanguíneos fueron descartados.

6.2.5 Análisis inmunohistoquímico de TGF- β al día 13 postnatal.

Se utilizó la técnica de inmunohistoquímica para determinar la presencia y nivel específico de TGF- β 1 utilizando anticuerpos marcados que se unen al TGF- β 1 en el tejido pulmonar de las crías en el día 13 de vida.

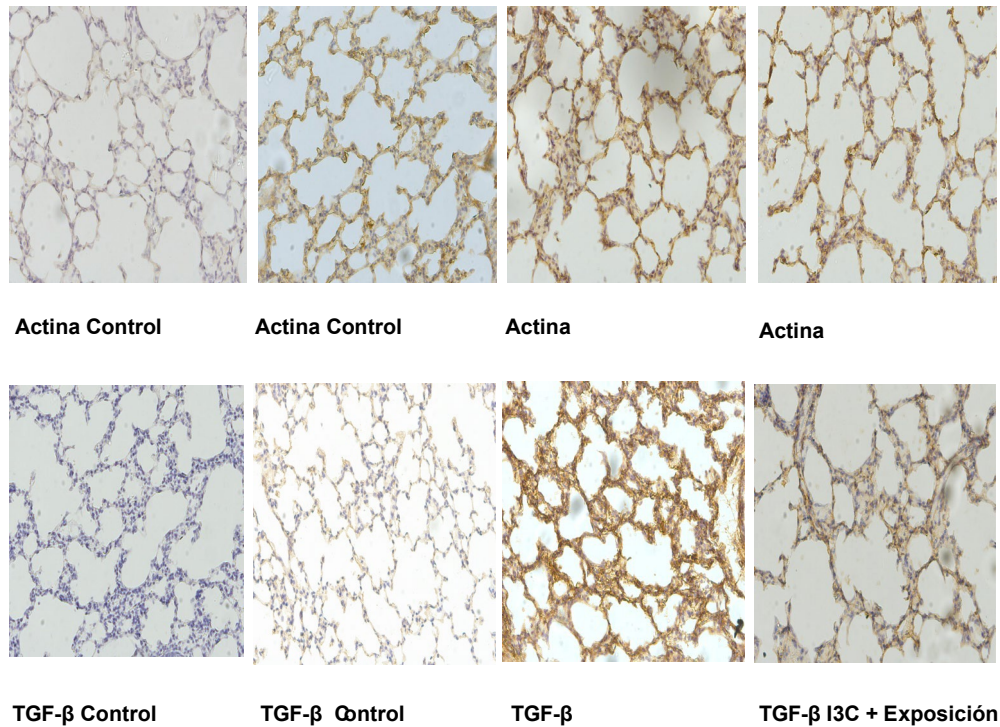


Figura 32. Análisis Inmunohistoquímico de tejido pulmonar de ratas recién nacidas expuestas a hiperoxia-hipoxia y sacrificadas en el día 13 de vida.

Se usó como control endógeno β -actina (magnificación 20X).

Los cambios en la expresión de TGF- β 1 en los 3 grupos se analizó mediante una ANOVA.

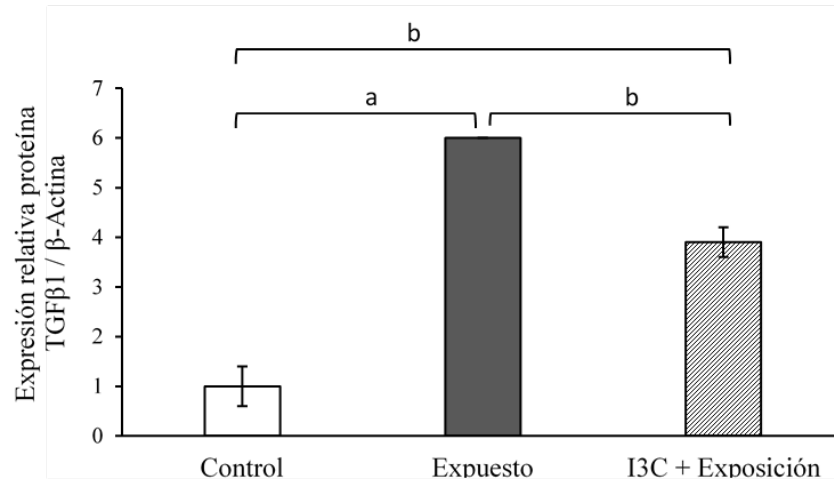


Figura 33. Efecto de la administración del I3C prenatal sobre el nivel de proteína del factor de crecimiento transformante (TGF- β) en pulmón de las crías expuestas a hipoxia/hiperoxia en el día 13 de vida. Se usó como control endógeno β -actina, los resultados están expresados como la media \pm DE (n=3), cada imagen se capturó a 20X de 5 sitios diferentes del tejido, la intensidad de la señal fue captada en un fotodocumentador. Los cambios en la expresión se analizaron con una ANOVA. ^a $p < 0.001$, ^b $p < 0.01$

6.3 Efecto en expresión de genes biomarcadores de DBP en día 13 de vida.

Uno de los objetivos de este trabajo fue determinar biomarcadores de efecto por la exposición a hiperoxia-hipoxia por lo que se realizó una búsqueda exhaustiva en la literatura y se evaluó el nivel de expresión de genes relacionados con el desarrollo de DBP. Se decidió evaluar los genes de: *Vegf-A* y sus receptores *FLt1* y *Kdr*, El inhibidor tisular de la metaloproteinasa-2 (*Timp-2*), angiopoyetiva (*Ang*), El factor de crecimiento de queratinocitos (*Fgf7*), *Ccl2*, factor inducible por hipoxia (*Hif-1*), factor de crecimiento transformante b (*Tgf-β*) y observamos que la expresión de mRNA de todos ellos estaba disminuida en el grupo expuesto a hiperoxia-hipoxia comparado con el grupo control a los 13 días de vida (Figura 34).

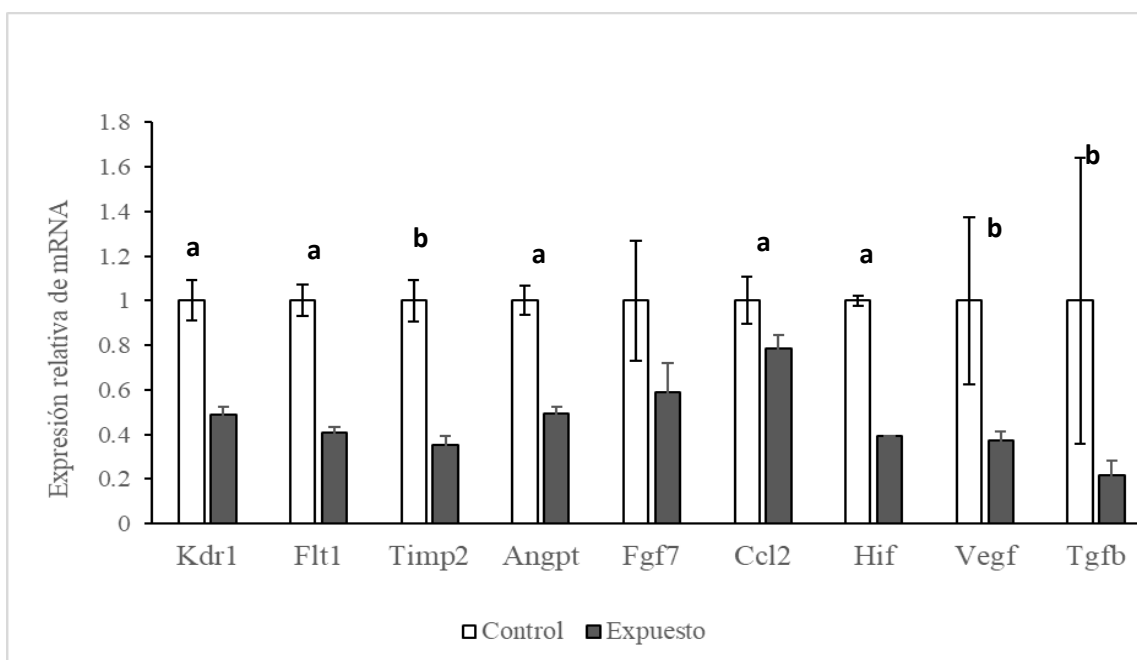


Figura 34. Representación gráfica de la expresión relativa de mRNA de genes relacionados con la DBP. Todos los genes fueron evaluados en tejido pulmonar de las crías en el día 13 de vida. ^a ($p < 0.001$) y ^b ($p < 0.05$)

6.4 Efecto en expresión de biomarcadores de DBP a nivel de proteína en día 6 de vida.

Al encontrar que varios de los biomarcadores se encontraban reprimidos se determinó establecer los daños previos al establecimiento de la DBP. Por lo que uno de los hallazgos previamente descritos al desarrollo de DBP es un proceso inflamatorio exacerbado. Por lo que se evaluaron los niveles de expresión de citocinas inflamatorias. Para esto se utilizó el Rat Cytokine Antibody Array, análogo a un ELISA para analizar las citocinas en el plasma de las ratas en el día 6 de vida.

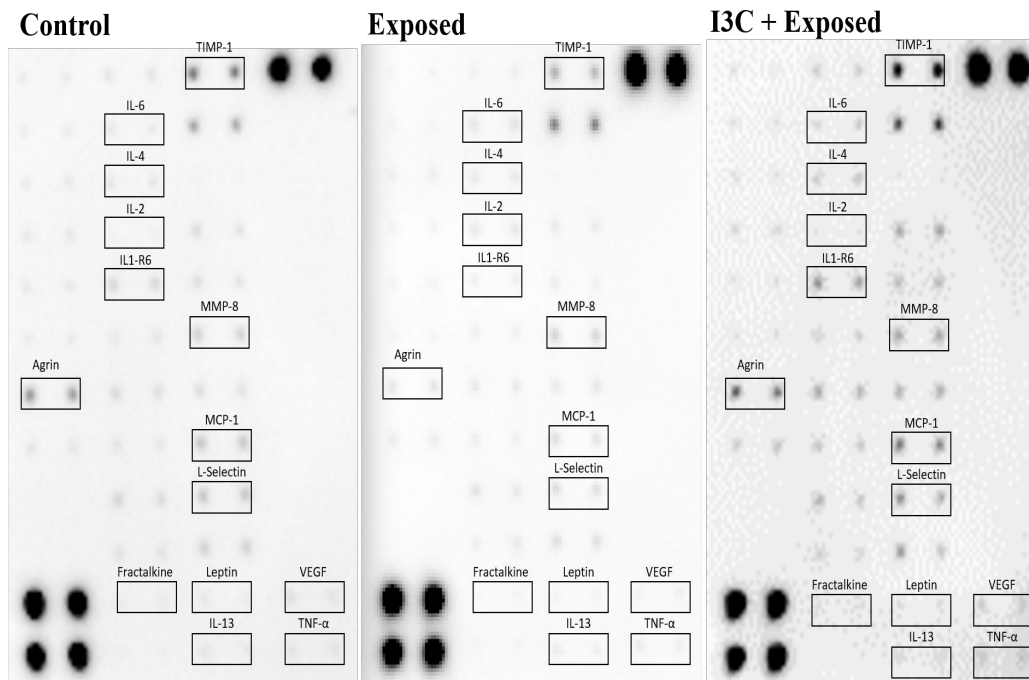


Figura 35. Patrón de imagen de la membrana Rat Cytokine Antibody Array (Abcam®). Donde cada punto se determinó con la suma de la señal de intensidad de píxeles por encima del umbral de corrección de fondo.

Al realizar el análisis se observó que podíamos agrupar las citocinas dependiendo los cambios en su expresión comparada con el grupo control (Figura 36).

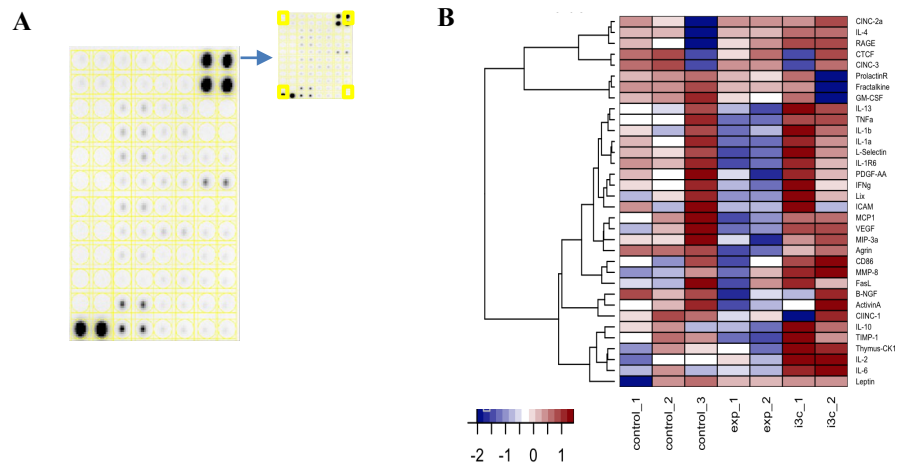


Figura 36. Evaluación de la expresión de citocinas en plasma en el día 6 de vida. (A) Patrón de imagen de la membrana Rat Cytokine Antibody Array (Abcam®), donde cada punto se determinó con la suma de la señal de intensidad de píxeles por encima del umbral de corrección de fondo. (B) Gráfica de calor con niveles de expresión normalizados y escalados de citocinas en plasma en el día 6 de vida.

Así se identificaron los cambios en la expresión de citocinas en los grupos. Los resultados indicaron que la expresión en 8 de los mediadores de inflamación: TNF- α , IL-13, VEGF, L-selectina, MCP1, Agrina, el receptor 6 de la Interleucina 1 (IL-1R6), el inhibidor tisular de metaloproteinaseas-1 (TIMP-1), estuvieron reprimidos en el grupo expuesto comparados con el grupo control.

Sin embargo, sólo L-selectina, MCP1, Agrina, IL-1R6 y TIMP-1 fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$), y la expresión de estas proteínas fue recuperada con el tratamiento con el I3C (Figura 37).

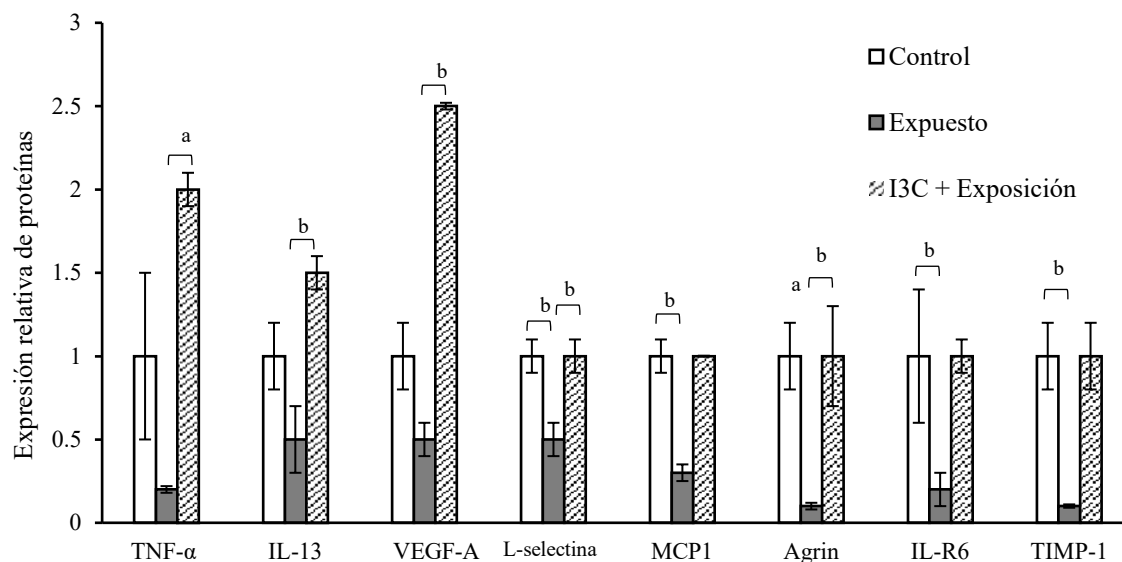


Figura 37. Análisis del nivel de expresión relativa de las citocinas diferencialmente expresadas en plasma en el día 6 de vida. Grupo control (Barra blanca: aire ambiente 21% de O₂; n=3), grupo expuesto a hiperoxia-hipoxia (Barra gris 80-10% de O₂; n= 2), grupo tratado con I3C + hiperoxia-hipoxia (Barra negra: I3C 100mg/kg + 80-10% de O₂; n=2). La respuesta de cada una de las proteínas fue normalizado con su respectivo control, el valor de ^a $p < 0.001$. ^b $p < 0.05$.

Otras proteínas, como la Leptina y la IL-4 se sobreexpresaron en el grupo tratado con I3C, mostrando un incremento de 30 y 180 veces, respectivamente, comparado con el grupo expuesto ($p < 0.05$). La expresión de fractalquina fue reprimida en el grupo expuesto y en el grupo de I3C ($p < 0.05$) con respecto al grupo control. Aunque la mmp-8, IL-2, e IL-6 fueron sobre expresados en el grupo tratado con el I3C ($p < 0.05$), no se observaron cambios en el grupo control y expuesto lo que significa que dicho efecto es por la presencia del compuesto.

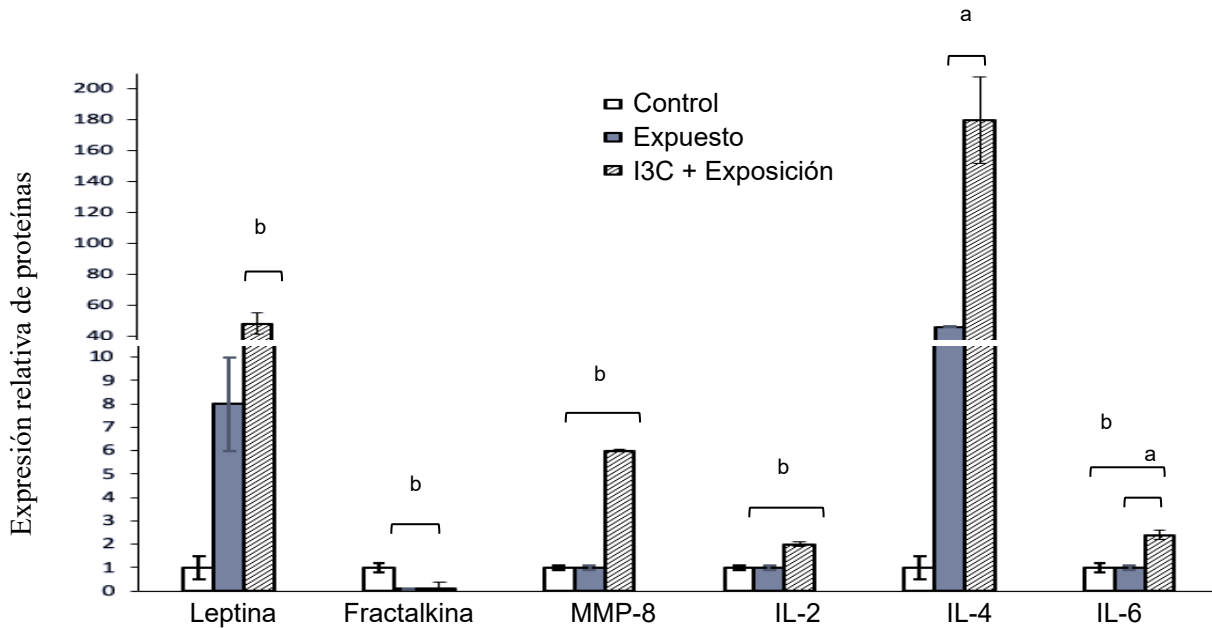


Figura 38. Análisis del nivel de expresión relativa de las citocinas que mostraron respuesta exacerbada con la exposición y el tratamiento, en plasma en el día 6 de vida. Grupo control (Barra blanca: aire ambiente 21% de O₂; n=3), grupo expuesto a hiperoxia- hipoxia (Barra gris 80-10% de O₂; n= 2), grupo tratado con I3C + hiperoxia-hipoxia (Barra negra: I3C 100mg/kg + 80-10% de O₂; n=2). La respuesta de cada una de las proteínas fue normalizado con su respectivo control, el valor de ^a $p < 0.001$. ^b $p < 0.05$.

DISCUSIÓN

La displasia broncopulmonar es la principal causa de enfermedad crónica y de morbilidad bebés prematuros. Se presenta debido a que al nacer sus pulmones no están completamente desarrollados por lo es necesario la administración de oxígeno suplementario para ayudarles a respirar. Sin embargo la exposición a oxígeno les produce efectos negativos en el desarrollo pulmonar, ya que el oxígeno favorece que haya inflamación y estrés oxidante. Provocando que sus pulmones desarrollen un menor número de alvéolos, de mayor tamaño y un aumento de fibras musculares en los bronquios y una disminución de capilares. Dando como resultado que al crecer tengan una capacidad pulmonar menor, mayor riesgo de infecciones respiratorias y que presenten otras complicaciones como el edema o la hipertensión pulmonar.

El objetivo principal de este proyecto fue probar que el tratamiento en ratas preñadas con I3C un inductor del AhR protege a las crías del daño pulmonar por exposición a hiperoxia-hipoxia. El daño pulmonar secundario a la exposición de oxígeno está mediada por ROS, las cuales participan en procesos fisiológicos como el crecimiento celular, la diferenciación y la respuesta inflamatoria (Buczynski et al., 2013). Cuando la producción de ROS supera la capacidad antioxidante de las células, se presenta estrés oxidante produciendo daño celular y tisular a través de la peroxidación de lípidos, daño del ADN y oxidación de proteínas. Aunado a esto, el sistema antioxidante de los bebés prematuros es relativamente deficiente lo que los hace más vulnerables al estrés oxidante (Buczynski et al., 2013). La activación o sobreexpresión de estos sistemas antioxidantes en los primeros días de vida ha sido estudiada en modelos animales de hiperoxia-hipoxia. La sobreexpresión de superóxido dismutasa (SOD) extracelular en células epiteliales respiratorias de ratones recién nacidos expuestos a hiperoxia mejoran la supervivencia y conserva la proliferación de células alveolares tipo II (Auten et al., 2006; Wispe et al., 1992).

Una forma de activar las enzimas antioxidantes es a través de la modulación del AhR, ya que su activación, también regulada por Nrf2 (factor nuclear derivado de eritroide 2); aumenta la expresión de las enzimas de fase I y fase II (e.g., CYP450 y NQO1) (Shivanna et al., 2015).

La activación del AhR mediante ligandos específicos en roedores ya ha sido reportada anteriormente. La activación de la vía de señalización mediada por la AhR protege a los ratones recién nacidos del daño hiperóxico al facilitar proliferación de células epiteliales y endoteliales y mitigando la alteración de la alveorización y vascularización (Bhattacharya et al., 2014; Shivanna et al., 2016).

En la primera etapa de este trabajo se confirmó que el I3C activa el sistema antioxidante en las crías de ratas expuestas a través de la barrera transplacentaria, activando la vía de señalización AhR y apoyando la hipótesis de que la activación prenatal de enzimas protectoras y antioxidantes puede desempeñar un papel en el estrés oxidante.

Previamente se comprobó que el administrar el I3C a las hembras gestantes da como resultado la aparición de metabolitos I3C en el hígado de madres y recién nacidos, lo que provocó la inducción de los genes Cyp1a1 y Cyp1b1 (Larsen-Su & Williams, 2001). Los resultados obtenidos en este trabajo fueron similares a los encontrados previamente para el Cyp1a1 y Cyp1b1, lo que demuestra los efectos de otros inductores de CYP450 en crías de ratones pretratados con β -naftoflavona (β NF) y expuestos a hiperoxia postnatal (Couroucli et al., 2006), así como a aquellos que demuestran el efecto protector de β NF- α en ratas adultas con lesión pulmonar aguda (Shivanna et al., 2013a; Sinha et al., 2005).

Una vez que se demostró la activación de la vía de la AhR en las crías de rata mediante la administración prenatal del I3C, se trabajó en la implementación del modelo animal de DBP.

El modelo de displasia broncopulmonar que utiliza a la rata como modelo animal, ha sido utilizado desde la década de los 90's (Chen et al., 1997). Y diversos artículos han demostrado que la exposición a altas concentraciones de oxígeno en la etapa neonatal de las ratas reproduce los cambios histopatológicos observados en los bebés prematuros con la nueva DBP. La exposición a hiperoxia produce alteración en la alveolarización resultando en un menor número de sacos alveolares, así como sacos alveolares de mayor tamaño. La hipertensión pulmonar que se genera produce alteración del crecimiento vascular con acumulación de proteínas plasmáticas, depósito extravascular de fibrina, incremento de colágeno, así como de infiltrado de células inflamatorias y depósito desorganizado de elastina (O'Reilly & Thébaud, 2014).

Otras ventajas de utilizar a la rata como modelo animal de la BDP se han descrito ampliamente en la literatura: las ratas al nacer tienen su desarrollo pulmonar equivalente al de los bebés extremadamente prematuros (estadio sacular de los bebés que nacen entre la semana 26 y 28 de gestación), y su desarrollo continúa *ex útero*. Aunque al nacer las ratas sus pulmones son estructuralmente inmaduros, son funcionalmente maduros ya que sus neumocitos tipo II producen surfactante, lo que evita la necesidad de inducir un parto pretérmino y otras intervenciones como resucitación, intubación, administración de surfactante (O'Reilly & Thébaud, 2014).

Una de las debilidades en el uso de este modelo, al igual que todos los modelos que utilizan roedores que nacen sin intervención, es que las crías de rata al nacer presentan su desarrollo pulmonar en estadio sacular, similar al de los bebés prematuros, pero a diferencia de estos bebés, la rata en esta etapa es completamente competente de realizar el intercambio gaseoso sin requerir oxígeno suplementario (Berger & Bhandari, 2014).

En la segunda etapa de este proyecto se estableció el desarrollo del modelo de DBP en rata basado en el descrito por Ratner (2009), esto debido a que utilizaba un esquema de episodios hipoxia e hiperoxia constante en los primeros días (1d-7d) e intermitente a partir del 8d-13d postnatal. Este esquema se asemeja a lo clínicamente acontece a los bebés prematuros que están en cuidados intensivos con oxígeno suplementario. A dicho modelo se le realizaron las siguientes modificaciones: se utilizó rata para facilitar la manipulación quirúrgica de las crías, así como obtener una mayor cantidad de tejidos.

En nuestro modelo se logró evocar los cambios histopatológicos observados en los bebés con la nueva DBP: una disminución en el número de alvéolos, alvéolos con mayor tamaño y engrosamiento del tabique alveolar. El RAC fue significativamente menor en el grupo expuesto a hiperoxia-hipoxia comparado con el grupo control; y las crías del grupo expuesto presentaron una Lm significativamente mayor que las del grupo control, lo que se traduce en una disminución en la alveolarización y alveolos más grandes. Esta disminución en el desarrollo alveolar tiene como consecuencia la disminución de la superficie de intercambio gaseoso, y el engrosamiento del tabique alveolar incrementa la distancia por la que debe difundir el oxígeno desde el espacio aéreo hacia los capilares como se observó en otros estudios previamente descritos (Husain et al., 1998).

Además, de los cambios histopatológicos se evaluó el nivel de expresión de genes relacionados con el desarrollo de DBP (*Vegf*, *Flt1*, *Kdr*, *Timp-2*), *Ang*, *Fgf7*, *Ccl2*, *Hif-1* y *Tgf-β*) de acuerdo con la literatura publicada.

VEGF es miembro de una familia de factores de crecimiento angiogénicos, que incluye VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y factor de crecimiento placentario. Esta proteína juega un papel importante papel en la señalización de células endoteliales y epiteliales, ya que de acuerdo con el sistema vascular, las células endoteliales son un requisito indispensable para la formación de la estructura

alveolar (Hoeben et al., 2004; Zhao et al., 2005). Su expresión está regulada por varios factores de crecimiento, incluido el crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento transformante beta TGF- β , TNF- α e IL-1 β , y diversas alteraciones ambientales como estrés oxidante, la acidosis, y la hiperoxia e hipoxia modula los niveles de expresión. En condiciones normales, el factor de hipoxia inducible 1 alpha (HIF1- α) se dimeriza con HIF1- β y se une al promotor de *Vegf* para iniciar la transcripción. VEGF se une a dos receptores: VEGFR-1 o FLT-1 y VEGFR-2 o KDR/FLK-1. FLT-1 promueve la migración de células endoteliales, mientras que su unión a KDR produce diferenciación, proliferación y migración de células endoteliales, y diferenciación de angioblastos.

En nuestro modelo de DBP encontramos que tanto la expresión de mRNA de *Vegf*, *Kdr1* y *Flt1*, estaba disminuida en el grupo expuesto a hiperoxia-hipoxia comparado con el grupo control a los 13 días de vida. Esto concuerda con lo que encontró Benn en el 2010 mostrando que los niveles de VEGF en los bebés prematuros tienden a estar disminuidos en aquellos que presentan displasia broncopulmonar (Been et al., 2010). Bhandari encontró que los niveles de VEGF tienden a ser altos en las primeras 12 horas de vida y disminuyen en los días 3-5 y luego aumentan en los días 21-28 en bebés que desarrollan DBP (V. Bhandari, 2008).

En un estudio de un modelo animal de infección intrauterina / inflamación, con ratas SD preñadas con inoculación endocervical con *E. coli*, los resultados demostraron que la expresión de *Vegf* estaba disminuida en el tejido pulmonar fetal y neonatal después de iniciada la infección intrauterina en la etapa pseudoglandular, lo cual juega un papel importante en el desarrollo de displasia broncopulmonar (Pan et al., 2018). Así mismo, Thébaud et al., 2005; y Wang et al., 2007 encontraron una disminución en los niveles de expresión de proteína de VEGF en ratas recién nacidas expuestas a hiperoxia el día PN14 (Meller & Bhandari, 2012). En el estudio presentado por Tambunting en el 2005 realizado en babuinos extremadamente prematuros, se observó que la expresión de mRNA tanto *Kdr1* como *Flt1* fue menor en el grupo expuesto a hiperoxia, comparada con la del grupo control (Tambunting et al., 2005).

Las metaloproteinasas de la matriz extracelular son una familia de enzimas proteolíticas que actúan remodelando la matriz extracelular (ECM), y su actividad está regulada mediante la unión con inhibidores tisulares de metaloproteinasas de matriz (TIMP) (Paiva & Granjeiro, 2014). Los TIMPs participan en equilibrar la síntesis y degradación de ECM. El inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1 (TIMP- 1) es una proteína multifuncional que se expresa en una variedad de células humanas y tejidos y participa en una variedad de procesos biológicos (Stetler- Stevenson, 2008). TIMP-1 está relacionado con la regulación de diversas actividades biológicas: incluido el crecimiento celular y supervivencia, migración celular, diferenciación y apoptosis (Liang et al., 2019). TIMP-2 juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis tisular al suprimir la proliferación de tejido pulmonar en respuesta a factores angiogénicos que median la actividad de las proteasas pulmonares, lo que conduce a la remodelación de la matriz extracelular. Lee et al. (2015) midió los niveles de TIMP-2 en sueros de bebés prematuros al nacer, y observó que los niños que desarrollaron DBP presentaban niveles reducidos de TIMP-2 al nacer, en comparación con aquellos que no la desarrollaron (Lee et al., 2015). En otro estudio donde la expresión de genes relacionados con la angiogénesis, así como los genes *MMP* y *TIMP* se midieron en bebés que desarrollaron DBP, no se encontraron diferencias entre los niveles de *TIMP* entre los individuos que si la desarrollaron con respecto a los que no lo hicieron (Yang et al., 2017). Se han reportado un aumento en los niveles de MMP- 8 y 9 y una disminución de los niveles de TIMP-2 en lactantes que desarrollan DBP (A. Bhandari & McGrath-Morrow, 2013; Duck Hernández et al., 2012). Similar a lo reportado en la literatura, en nuestro modelo de DBP encontramos una disminución en la expresión del mRNA del *Timp-2* en el grupo expuesto a hiperoxia-hipoxia comparado con el grupo control en el día 13 de vida.

CCL2, es una proteína que pertenece a la superfamilia de quimiocinas, que participan en procesos inflamatorios e inmunorreguladores. Tiene actividad quimiotáctica para los monocitos y basófilos. Cui y cols., encontraron en un modelo de DBP inducido por lipopolisacáridos LPS, que el aumento de la expresión de mRNA del gen de *Ccl2* está relacionado con la hipoalveolarización.

En nuestro estudio, a diferencia de Fulton, encontramos una expresión disminuida del gen de *Ccl2* en el grupo expuesto a hiperoxia-hipoxia en comparación con el grupo de control, posiblemente relacionado a la utilización de LPS como mecanismo para el modelo de DBP (Cui et al., 2020)(Fulton et al., 2018).

Miembros de la familia de factores TGF- β que incluye TGF- β , activinas y proteínas morfogenéticas óseas (BMP) son factores cruciales durante el desarrollo normal del pulmón, así como en la respuesta al pulmón. Entre los marcadores fibróticos, el TGF- β 1 está aumentado en los aspirados traqueales de los lactantes que desarrollan DBP (Lal & Ambalavanan, 2015).

FGF7 o factor de crecimiento de queratinocitos, es un potente estímulo de proliferación del desarrollo de células alveolares tipo 2. Es liberado por fibroblastos pulmonares (Danan et al., 2002). Danan encontró que una alta concentración de FGF7 en aspirados traqueales de bebés prematuros predijo la ausencia de DBP (Danan et al., 2002). Frank en 2003, administró KGF7 por vía subcutánea a ratas recién nacidas expuestas a hiperoxia, KGF7 no logró reducir el daño morfológico producido por hiperoxia, pero mostró un efecto protector contra el desarrollo de hipertensión pulmonar y el consiguiente agrandamiento del corazón derecho (Frank, 2003). De acuerdo con la literatura de nuestro estudio, la expresión de mRNA de *Fgf7* está disminuida en el grupo expuesto, lo que podría significar que su expresión podría estar inhibida con la vía de activación del NF- κ B.

La angiopoyetina es una proteína que interactúa con la vía del VEGF para determinar el destino de los vasos sanguíneos durante la angiogénesis. Se ha encontrado que concentraciones disminuidas de Ang-1 y concentraciones elevadas de endostatina en muestras de sangre de cordón umbilical pueden predecir el desarrollo de DBP (Lal & Ambalavanan, 2015). La Angiopoyetina 1 está disminuida en bebés con DBP establecida y retinopatía del prematuro severa, mientras que los valores de la angiopoyetina-2 se encuentra aumentada en el aspirado traqueal de bebés con DBP establecida (A. Bhandari & McGrath-Morrow,

2013; Stark et al., 2018). Similar a lo encontrado en la literatura, en nuestro modelo de DBP encontramos niveles disminuidos del mRNA de la Angiopoyetina en el grupo expuesto a hiperoxia-hipoxia comparado con el grupo control en el día 13 de vida.

Como se mencionó previamente, el desarrollo de la microvasculatura es un pre requisito en el adecuado desarrollo sacular que precede a la alveolarización, el crecimiento vascular y pulmonar en el estadio fetal está promovido por un ambiente hipóxico, lo que promueve la angiogénesis a través del HIF (factor inducible por hipoxia) (Asikainen et al., 2005). El HIF-1 es un heterodímero compuesto de la proteína HIF- α y el ARNT (proteína translocadora nuclear de hidrocarburos de arilo) también conocido como HIF-1B. El HIF- α activado se acumula en el núcleo donde se une al ARNT, lo cual lo liga a una secuencia específica de ADN llamada HRE (elemento de respuesta a hipoxia), de genes blanco que provocando el incremento en la transcripción de genes inducibles por hipoxia. En el estudio publicado por Asikainen en el 2005 se encontró que la expresión de mRNA de *Hif-1* está disminuida en babuinos expuestos a hiperoxia comparados con el grupo control en su modelo animal de DBP (Asikainen et al., 2005). En nuestro estudio también encontramos una disminución en la expresión del mRNA de *Hif-1* en el grupo expuesto a hiperoxia-hipoxia comparado con el grupo control.

La tercera etapa de este trabajo consistió en administrar el I3C prenatalmente y determinar el efecto de este compuesto en el modelo animal de DBP. Observamos los cambios morfométricos. Las crías de los grupos expuesto a hiperoxia-hipoxia; y del grupo tratado con I3C y expuesto a hiperoxia hipoxia mostraron una menor ganancia de peso comparadas con las crías del grupo control al día 13 de vida. Posterior a este día los animales se mantuvieron con aire ambiente hasta el día 21 observando una mayor ganancia de peso en el grupo tratado con I3C, comparado con el grupo expuesto pero este efecto fue menor que con el grupo control.

La evaluación histopatológica confirmó que el grupo tratado con I3C y expuesto a hiperoxia-hipoxia tuvo un aumento en el RAC y una disminución en Lm comparado con el grupo expuesto a hiperoxia-hipoxia pero fue menor al grupo control. No se encontró un grado de fibrosis establecida en los grupos expuestos (Hübner et al., 2008) a hiperoxia-hipoxia posiblemente a que las crías se evaluaron en el día 13 de vida, y la mayoría de los estudios de modelos animales de fibrosis indican que la fibroproliferación ocurre entre el día 2 y 14 posterior al insulto y el desarrollo de fibrosis se da entre el día 14 y 28 (Jenkins et al., 2017).

Notablemente, en el grupo tratado con I3C y expuesto a hiperoxia-hipoxia el porcentaje de animales con cambios pro-fibróticos fue menor incluso que en el grupo control, indicando una relación entre la vía de señalización de AhR y el TGF- β . A nivel de mRNA sólo se midió la expresión de *Tgf- β* en el grupo control y el grupo expuesto, aquí, contrario a lo encontrado en la literatura encontramos una mayor expresión en el grupo control que en el grupo expuesto a hiperoxia-hipoxia. Pero a nivel de expresión de proteína observada mediante la inmunohistoquímica, se encontró que hubo una disminución significativa en la expresión de TGF- β 1 en el grupo tratado con I3C, comparado con el grupo expuesto.

Aunque en los humanos y en el ratón los promotores de TGF- β no tienen un sitio de respuesta canónico de la Ahr, la unión de la AhR con su ligando produce una disminución en la transcripción de TGF- β 2 e induce la expresión de PAI-1 y PAI-2, lo cual a su vez reprime la señalización de TGF- β , por lo tanto disminuyendo los depósitos de fibrina (Puga et al., 2005). Otro estudio encontró que los niveles de TGF- β están sobre expresados en fibroblastos embrionarios de ratones deficientes de AhR, y que la sobre activación del AhR en estas células, reduce los niveles de TGF- β 1 (Kung et al., 2009).

Estos hallazgos sugieren que la activación del AhR por el I3C en ratas recién nacidas podría reducir la fibrosis causada por exposición a hiperoxia-hipoxia, mejorando la alveolarización.

Adicionalmente, para establecer el efecto pro-inflamatorio en el modelo establecido se decidió hacer mediciones de biomarcadores en búsqueda de posibles blancos terapéuticos en el día 6 de vida. Para dicho objetivo se utilizó un arreglo que detecta 34 citocinas relacionadas los subtipos de células T y aquellas reguladas por el NF- κ B, el cual es un mediador de inflamación ligado a la patogénesis de la DBP (Wright & Kirpalani, 2011).

Las citocinas se agruparon usando la plataforma KEGG y a la bibliografía previamente publicada; y se seleccionaron aquellas que mostraran diferencias significativas y que tuviera una respuesta similar en el grupo tratado con I3C y el grupo control o que tuviera una respuesta significativa cuando era tratada con el compuesto y además que coincidan en una misma vía de señalización.

Con estas condiciones, se agruparon en dos vías de señalización: aquellas citocinas que son reguladas TNF- α que induce a su receptor TNF-R1 y activa de forma significativa: VEGF, MCP-1, Fractalkina, MMP-8, IL-6, IL-13, TIMP-1 y Selectina-L (Figura 39) (Naudé et al., 2011; Newton & Dixit, 2012), y la otra vía que corresponde a la ruta leptina-STAT3 (Figura 40).

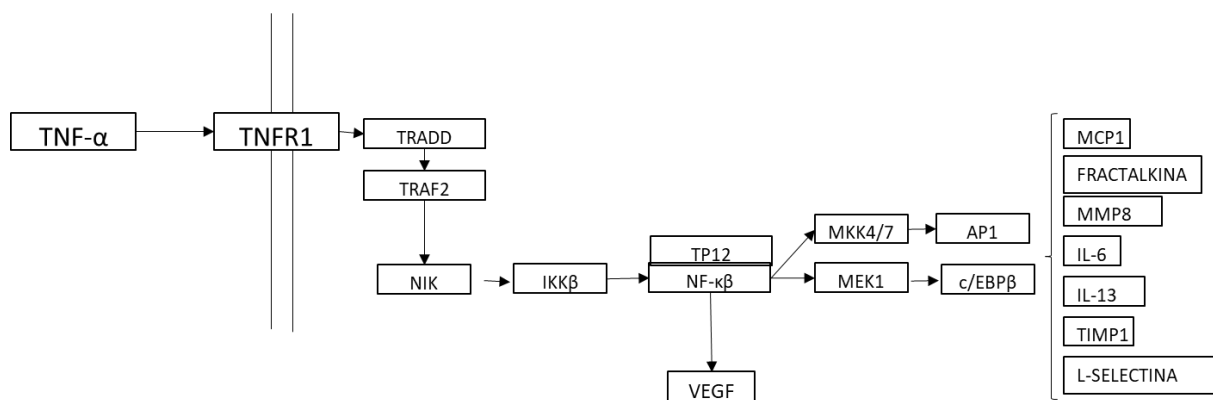


Figura 39. Imagen representativa de la activación de la vía de señalización regulada por el receptor del factor de necrosis tumoral tipo 1 (TNFR1). (Tomada de: https://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=map04668&keyword=TNF%20cytokines).

El análisis realizado establece que la activación de TNF- α , la vía proinflamatoria del NF- κ B, orquesta la activación de varias proteínas, lo que resulta en el aumento de la respuesta inflamatoria y de la apoptosis celular (Liu & Lin, 2005). En este mismo sentido se han encontrado niveles elevados de TNF- α en recién nacidos prematuros que desarrollaron DBP (V. Bhandari, 2010). También, se ha descrito que el TNF- α tiene un papel crítico en la aparición y desarrollo de la lesión pulmonar aguda causada por isquemia y reperfusión (Narita et al., 2004). Estudios preclínicos y clínicos han encontrado que la represión de la expresión de TNF- α puede reducir la progresión de la inflamación en algunas enfermedades, por ejemplo, la enfermedad de Crohn (D. H. Kim & Rossi, 2007).

Si bien en nuestro estudio observamos que el grupo control tenía niveles de expresión de TNF- α más elevados que en el grupo expuesto y estos niveles eran aún más elevados en el grupo tratado con I3C con un valor $p=0.001$, la activación de otras citocinas anti-inflamatorias pueda resultar benéfico como se observó en la evaluación histopatológica.

En pacientes con displasia broncopulmonar se determinó el nivel de expresión de VEGF en células endoteliales de líquido de lavado broncoalveolar de pacientes con DBP y se encontró que el VEGF estaba significativamente reducido (Been et al., 2010). Así como en estudios previos, nuestro estudio revela que el nivel de VEGF en el grupo expuesto a los ciclos de hiperoxia-hipoxia se encontró disminuido con respecto al grupo control, al comparar el grupo expuesto y con el grupo que se le administró prenatalmente el I3C se observó aumento en los niveles de expresión, lo que apoyaría a un efecto protector de este compuesto.

La proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) es una citocina pro-inflamatoria. Es un potente factor quimiotáctico para monocitos y juega un papel importante en ciertas condiciones fisiopatológicas (Gu et al., 1999). Grandes cantidades de MCP-1 se encuentran en células endoteliales, fibroblastos y células mononucleares. Los principales inductores de la expresión de MCP-1 son la IL-1B,

TNF- α y IFN- γ (Brown et al., 1994). En nuestro estudio observamos que en el grupo expuesto disminuye de forma significativa el nivel de MCP-1 al compararlo con el grupo control ($p < 0.05$). Interesantemente el grupo tratado con I3C se comportó igual que el grupo control.

Fractalquina es una citocina pro-inflamatoria producida en exceso cuando las células endoteliales pulmonares están expuestas a estímulos inflamatorios (Schulz et al., 2007). Se han encontrado niveles elevados en sangre de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica e hipertensión pulmonar y la exposición a bajos niveles de oxígeno en humanos y en animales conlleva a una sobreproducción de esta citocina (Stenmark et al., 2006). E6011 es un nuevo anticuerpo monoclonal humanizado anti-fractalquina que se desarrolló como blanco terapéutico para enfermedad de Crohn, artritis reumatoide y colangitis biliar primaria. En un modelo de colitis inducida por células T de transferencia y un modelo de colitis inducida por oxazolona se mostró que el anticuerpo suprime el daño en colon (Motoi et al., 2015). Así mismo, en un modelo de artritis inducida por colágeno en ratones, usado comúnmente como modelo de enfermedad para artritis reumatoide, el anticuerpo contra fractalquina demostró efectividad, por lo que podría ser un blanco terapéutico también para DBP (Hoshino-Negishi et al., 2019). Si bien en nuestro estudio encontramos que la fractalquina se encuentra reprimida de forma significativa en el grupo expuesto al igual que en el grupo tratado con I3C con respecto al grupo control. Es necesario hacer estudios a profundidad y saber si la fractalquina puede funcionar como un blanco terapéutico en DBP.

La metaloproteinasa de matriz-8 (MMP-8) es una proteinasa que se transcribe y traduce en precursores de polimorfonucleares (PMN) en la médula ósea tanto en humanos como en ratones (Craig et al., 2013), esta se asocia con actividad antiinflamatoria y en un estudio de un modelo hiperóxico de lesión pulmonar en ratones, redujo la mortalidad mediado en parte por la escisión e inactivación de MIP-1 α (siglas en inglés Macrophage Inflammatory Protein-1 α) (Quintero et al., 2010). En nuestro estudio encontramos que en el grupo expuesto al I3C se

encuentra sobre expresada en comparación con el grupo control y el grupo expuesto, lo que sería un efecto deseado como función antiinflamatoria y protectora.

La IL-6 es una citocina que se produce en sitios de inflamación tisular y se libera en la circulación por una variedad de diferentes tipos de células, incluidos macrófagos, linfocitos, células endoteliales, células epiteliales y fibroblastos (Gadient & Patterson, 1999). En un estudio con 80 recién nacidos prematuros con peso muy bajo al nacer, donde 26 desarrollaron displasia broncopulmonar se mostró que la IL-6 en suero y aspirado traqueal fue mayor en el grupo con DBP en el primer día después del nacimiento ($p < 0.05$). Y los niveles de IL-6 en el aspirado traqueal aumentaron persistentemente en el día 28 de vida en el grupo DBP ($p < 0.05$) y se concluyó como predictor del desarrollo de DBP con una sensibilidad del 81.5% y una especificidad del 77.8% (Hsiao et al., 2017). En nuestro estudio encontramos un aumento significativo en la concentración de IL-6 en el grupo expuesto con tratamiento con I3C en comparación con el grupo control y con el grupo expuesto sin tratamiento, con lo cual podemos inferir que el efecto del compuesto no se da a este nivel y/o que no es suficiente para alcanzar a prevenir dicho efecto en las condiciones estudiadas.

La IL-4 es una citoquina pleiotrópica, producida principalmente por células T activadas, pero también por mastocitos, basófilos y eosinófilos (Nelms et al., 1999). Se ha demostrado que la IL-4 y la IL-13 inhiben la producción de varias citoquinas inflamatorias importantes en el desarrollo de la displasia broncopulmonar (Baier et al., 2003). En este trabajo se observó que en el grupo expuesto hay una sobre expresión de IL-4, y la administración del I3C exagera dicho efecto de forma significativa en comparación con el grupo control, en ambos casos ($p < 0.004$). Lo que demuestra que el I3c induce los niveles de expresión de IL-4.

Por otra parte, como se mencionó anteriormente, TIMP-1 participa en la regulación de diversas actividades biológicas, incluido el crecimiento celular y supervivencia, migración celular, diferenciación y apoptosis (Liang et al., 2019). También se ha descrito que TIMP-1 mejora la expresión de las citocinas de supervivencia y diferenciación, como la IL-10, que también contribuyen al efecto anti-apoptótico (Guedez et al., 2001). En este estudio se identificó concentraciones disminuidas de TIMP-1 en el grupo expuesto a hiperoxia-hipoxia sin tratamiento en comparación el grupo control con un valor p de 0.017 sin haber diferencia significativa entre el tratado con I3C y el grupo control. Lo que implica que el tratamiento con I3C normaliza la expresión del TIMP-1 en las ratas del grupo expuesto a los ciclos de hiperoxia-hipoxia.

Otra de las proteínas modificada fue L-selectina, que es una glicoproteína transmembrana de tipo I y una molécula de adhesión celular que se expresa en la mayoría de los leucocitos circulantes (Thiel et al., 1997). La forma circulante soluble de L-selectina, se utiliza como un biomarcador de la actividad leucocitaria activada durante la inflamación aguda o crónica, la activación de neutrófilos con estímulos proinflamatorios, como los péptidos de formilo, TNF- α o agonistas del receptor tipo Toll, provoca una disminución rápida de L-selectina (Hazeldine et al., 2015). En este estudio se evidenció que hay una represión de esta citocina en el grupo expuesto en comparación con el grupo control ($p < 0.05$); cuando los animales son tratados prenatalmente con el I3C y posteriormente expuestos a ciclos de hipoxia e hiperoxia se observó un efecto similar y estadísticamente significativo al resultado encontrado en el grupo el grupo control, lo que puede conferir un efecto protector al administrar el I3C.

Otro agrupamiento de citocinas se hizo identificando aquellas que al ser tratadas con el compuesto mostraran una respuesta exacerbada y una vez realizado el análisis se observó que varias de las proteínas convergen en la vía de señalización regulada por leptina-STAT3 como es el caso de: IL-2 (inmunidad innata), IL-6 y TNF α (vía proinflamatoria) como se muestra en la figura 40 (Hu et al., 2018).

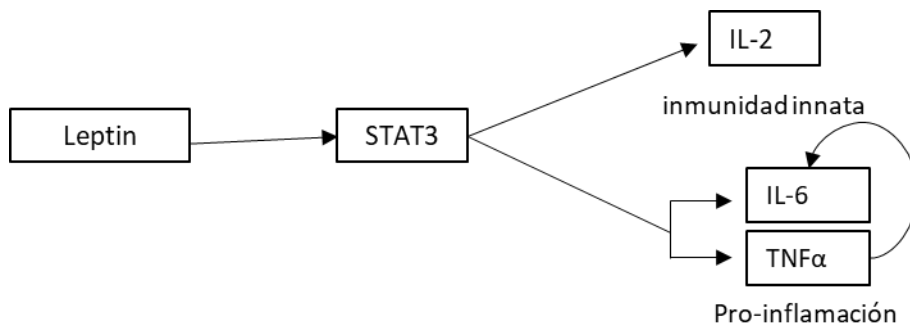


Figura 40. Imagen representativa de las vías que son inducidas en el grupo tratado con el I3C. Vía de señalización leptina/STAT3 activa IL-2 (inmunidad innata) y estimula la secreción de IL-6 o TNF α (vía proinflamatoria). (https://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=map04668&keyword=TNF%20cytokines)

La leptina es una hormona producida principalmente por los adipocitos, así como en otras células, aunque en cantidades más bajas. Se ha descrito la expresión de leptina en células epiteliales bronquiales y macrófagos alveolares del pulmón humano. El sistema respiratorio tiene receptores de leptina, principalmente la isoforma Ob-Rb, que se considera funcional y la más efectiva. Se ha descrito que la leptina desempeña un papel en la regulación del diámetro de las vías respiratorias, el desarrollo pulmonar y la patogénesis de las enfermedades respiratorias. Un estudio mostró asociación entre concentraciones altas de leptina en plasma y una función pulmonar disminuida independientemente del tejido adiposo en niños sanos, lo que corrobora que la leptina tiene un rol funcional en el sistema respiratorio (Eising et al., 2014). Las concentraciones de leptina aumentan durante la infección y la sepsis, ya que la expresión de leptina está regulada por varias citoquinas proinflamatorias, incluido el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), IL-1 y factor inhibitorio de leucemia (Otero et al., 2005; Zhang et al., 2000). Un estudio demostró que la exposición exógena a la leptina durante 5 días en corderos prematuros en el día 125-130 gestacional (de término son 145 días) aumentó la expresión de la proteína B tensioactiva, disminuyó el grosor de la

pared alveolar y aumentó el volumen pulmonar, sugiriendo que la capacidad residual funcional en estos corderos prematuros fue mayor que en el grupo control (De Blasio et al., 2016). En este trabajo se encontró que en el expuesto se muestran niveles elevados de leptina y este efecto se exagera con el tratamiento prenatal con I3C. Una de la explicación del posible efecto anorexigénico del I3C es que sobre expresa Leptina, la cual tiene un efecto de saciedad a nivel de sistema nervioso central (Choi et al., 2012).

La IL-2 es la principal linfocina responsable de la proliferación de linfocitos. La liberación de IL-2 puede contribuir a la respuesta alterada de la vía aérea que sigue a la presentación del antígeno y la activación de los linfocitos de la vía aérea (Renzi et al., 1991). En este estudio se observó que en los animales tratados prenatalmente con I3C existe un aumento significativo en la expresión de IL-2 en comparación con el grupo control, contrario a lo que esperábamos. Por lo que hace necesario estudiar a mayor profundidad la activación de dicha vía.

La agrina es un heparán sulfato proteoglicano extracelular grande que es crucial para el desarrollo de la unión neuromuscular (Bassat et al., 2017). Previamente, en un estudio se encontró que la expresión de la agrina está asociada con la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) y es significativamente menor en casos muy graves de EPOC en comparación con los casos moderados y sus resultados mostraron que la deficiencia de agrina puede jugar un papel crítico en el desarrollo y la progresión de la EPOC. En este estudio además se encontró que el tratamiento con el compuesto JQ1, cuerpos cetónicos, selenio, progesterona y propiltiouracilo podría aumentar la expresión de agrina, lo que indica su potencial en el tratamiento de enfermedades humanas relacionadas con la agrina (Xiao et al., 2018). En nuestros resultados observamos que en el grupo expuesto hay una represión de la expresión de agrina, comparada con el grupo tratada con el I3C y con el grupo control respectivamente con un valor p de 0.043, lo que nos indica su posible efecto anti-inflamatorio.

La IL-1 es una citocina pro-inflamatoria y de daño tisular. El receptor 6 de la interleucina 1 es uno de los receptores para IL-1. El antagonista del receptor de interleucina 1 (IL1RA) se ha visto que puede prevenir el desarrollo de DBP administrado a una dosis baja en el modelo de DBP de "doble impacto" en roedores neonatos de hiperoxia e inflamación perinatal, por lo que podría ser un blanco terapéutico (Nold et al., 2013). IL-1RA, también llamada anakinra o Kineret, y glyburide, también conocida como Diabeta, ya están aprobadas por la Administración Federal de Medicamentos (FDA) para el tratamiento de la artritis reumatoide y la diabetes tipo 2, respectivamente, lo que las hace atractivas opciones de tratamiento. Los estudios futuros deberán mostrar si su uso también sería seguro en los neonatos (Collins et al., 2017). En este estudio se encontró que la exposición a hiperoxia-hipoxia reprime el nivel de expresión del IL-1R6 y al tratar a las ratas con el I3C este efecto se revierte de forma significativa con un valor p de 0.013, observándose un nivel de expresión igual que al grupo control.

Si bien este estudio es exploratorio y como tal es necesario validar en otros modelos tanto *In vivo* como *In vitro*, los hallazgos encontrados evidencian la presencia de citocinas que potencialmente se pueden usar como blancos terapéuticos. Por ejemplo la activación de varias de estas citocinas convergen en la vía de STAT3 es un factor de transcripción que se identificó por primera vez en 1994 como factor de respuesta de fase aguda que se une selectivamente a la IL-6 y la unión del ligando inicia una cascada que contribuye a la fosforilación de la tirosina STAT3, la dimerización y translocación al núcleo, donde STAT3 modula la transcripción de genes diana que gobiernan varias funciones biológicas importantes, como como gasto de energía, diferenciación celular y respuestas inmunes. La activación de la STAT3 mediante la Leptina, puede promover la activación de señalización de la vía pro-inflamatoria o anti-inflamatoria en macrófagos dependiendo si la proteína SOCS (suppressor of cytokine signaling) es activada. Promueve la activación de células NK mediante la expresión de IL-2 y también promueve la secreción de interleucinas proinflamatorias como IL-6 y TNF (Villarino et al., 2017).

Otra posible vía de activación de STAT3 es a través de la activación de la proteína chaperona Hsp90 del AhR. Varios estudios han demostrado que a nivel cardiaco, las proteínas chaperonas tienen un rol importante en la regulación del balance de la síntesis y degradación de proteínas, ayudan con el plegado de proteínas. Los miembros de la familia de chaperonas Hsp90 son el tipo más abundante de chaperonas en el citosol, y en este grupo se incluyen la Hsp90a, Hsp90b, Hsp90N, TNF receptor-associated protein 1 (TRAP1), y Grp94 (Ranek et al., 2018).

El rol de Hsp90 en los cardiomiocitos en el remodelado asociado con hipertrofia cardiaca involucra la interacción entre los cardiomiocitos y los fibroblastos. El remodelado patológico del corazón involucra incremento de la masa ventricular izquierda y depósito de matriz extracelular. La producción de TGF- β por los cardiomiocitos activa a los fibroblastos adyacentes para que incrementen el depósito de matriz extracelular. En los fibroblastos, el receptor de TGF- β 1 se encuentra en un complejo unido a una proteína Hsp90. La inhibición de Hsp90 extracelular disminuye la producción de colágeno y la activación de TGF- β 1. En un estudio en el que se utilizaron ratones carentes de Hsp90aa1 (Hsp90^{-/-}), la síntesis de colágeno se redujo, implicando la relación entre la actividad de Hsp90 en la membrana plasmática y la relación adyuvante de Hsp90 y TGF- β R1. Otros investigadores han encontrado que la Hsp90 modula la formación de colágeno mediante la activación de STAT3 en los fibroblastos (Ranek et al., 2018)

La Hsp90 en los cardiomiocitos regulan la liberación de IL-6, mediante p65 y su liberación en exosomas. Esta liberación de IL-6 es responsable de la activación de STAT3, lo que culmina en exceso de síntesis de colágeno (Datta et al., 2017). Es posible que la Hsp90 que se encuentra asociada al AhR pueda participar en la liberación de IL-6 y la activación de STAT3, en el tejido pulmonar, similar a lo que ocurre en los cardiomiocitos.

Con este estudio podemos hipotetizar que el I3C activa la vía del TNF- α lo cual activa al NF- κ B y promueve la expresión de Vegf, Mcp1, Timp-1, L-selectina, MMP-8, IL-6 e IL-13, y reprime la expresión de fractalkina. Proponemos que Los niveles elevados de TNF- α en el grupo tratado con I3C pueden promover a los linfocitos Th2 (T helper 2), los cuales secretan IL-4. Finalmente, aunque TNF- α sea una citocina pro-inflamatoria, los niveles observados de IL-4, pueden tener un efecto protector en el desarrollo de DBP. En estudios previos se ha demostrado el efecto benéfico del I3C en los niveles de citocinas pro-inflamatorias (Benson & Shepherd, 2011; Mohammadi et al., 2018). Jiang en un modelo murino de daño pulmonar agudo inducido por lipopolisacárido y tratado con I3C observó que el grupo tratado por el compuesto había una disminución en la infiltración de células inmunológicas y la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1b, IL-6, y TNF α) (Jiang et al., 2013).

El I3C puede ser considerado como un agente posiblemente preventivo que permite la activación de la vía de señalización de NF- κ B. Debería ser evaluado en ensayos clínicos para la prevención de la DBP.

Integración

Como se observa en la figura 40 al nacer las crías que son expuestas al esquema de hiperoxia/hipoxia lo cual les genera estrés oxidante e inflamación. En este estudio se puede hipotetizar que al administrar prenatalmente el I3C, éste se une al AhR el cual se encuentra en el citosol unido a las proteínas chaperonas: p23, XAP2 y Hsp90. La unión del I3C con el AhR permite que éste se transloque al núcleo y se una al ARNT (translocador nuclear del AhR). Este complejo ligando-AhR-ARNT se une a una secuencia denominada DRE (elemento de respuesta a dioxinas) y promueve la transcripción de *CYP1A1*, *CYP1B1*, la glutatión S-transferasa- α (*GSTA1*), NADPH quinona oxidoreductasa-1 (*NQO1*), y Glucuronosil transferasa (*UGT1A6*).

El AhR también activa la vía del TNF- α lo cual activa al NF- κ B y promueve la expresión de VEGF, MCP1, TIMP-1, L-selectina, metaloproteínasa 8, IL-6 e IL-13, y reprime la expresión de fractalkina. Los niveles elevados de TNF- α en el grupo tratado con I3C pueden promover a los linfocitos Th2 (T helper 2), los cuales secretan IL-4.

La proteína chaperona Hsp90 puede activar STAT3 lo cual promueve la expresión de Leptina y la activación de señalización de la vía pro-inflamatoria o anti-inflamatoria en macrófagos promoviendo la activación de células NK mediante la expresión de IL-2 y también promueve la secreción de interleucinas proinflamatorias como IL-6.

Finalmente aunque TNF- α sea una citocina pro-inflamatoria, los niveles observados de IL-4 e IL-13, pueden tener un efecto protector en el desarrollo de DBP disminuyendo fibrosis y aumentando la alveolarización.

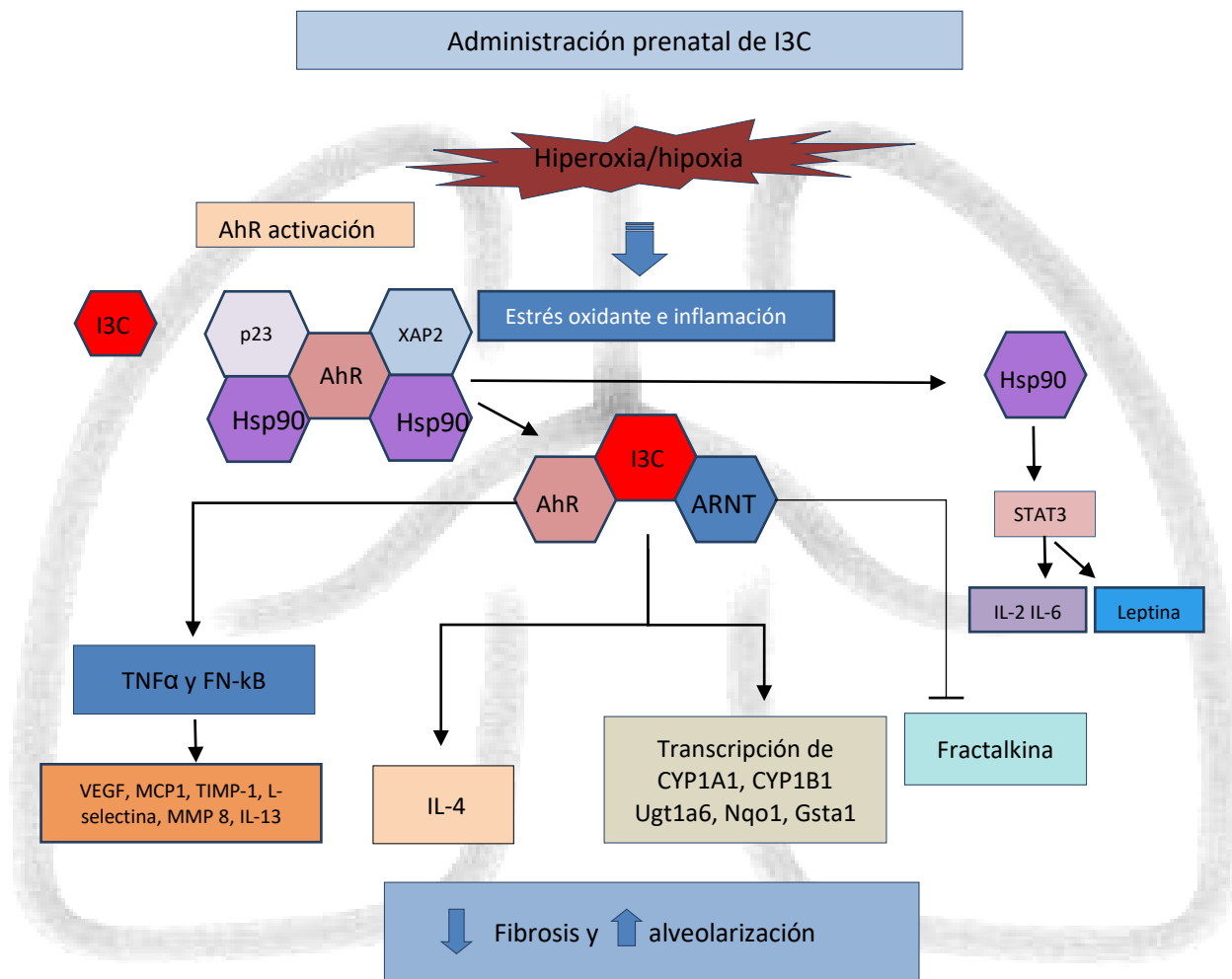


Figura 41. Esquema propuesto de protección del I3C del daño pulmonar por exposición a oxígeno: la administración prenatal del I3C activa el AhR. Al nacer las crías que son expuestas al esquema de hiperoxia/hipoxia aumentan la actividad de las enzimas antioxidantes UGT1A6:Glucuronosil transferasa, NQO1 Quinona oxidoreductasa y GSTA1 Glutation transferasa. Además el I3C activa la vía del TNF α lo cual activa al NF-kB y promueve la expresión de VEGF e IL-13. El TNF α puede activar a los linfocitos Th2 (T helper 2), los cuales secretan IL-4. Hsp90 activa STAT3 aumentando Leptina y puede promover la activación de señalización de la vía pro-inflamatoria o anti-inflamatoria en macrófagos promoviendo la activación de células NK mediante la expresión de IL-2 y también promueve la secreción de interleucinas proinflamatorias como IL-6. Finalmente aunque TNF α sea una citocina pro-inflamatoria, los niveles observados de IL-4 e IL-13, pueden tener un efecto protector en el desarrollo de DBP, disminuyendo la fibrosis y aumentando la alveolarización.

Conclusión

- Se determinó la dosis terapéutica, vía y tiempo de administración del I3C, y la activación de la batería de genes relacionados con el AhR. Los resultados indican que con la administración prenatal del I3C en forma intragástrica a una dosis de 100mg/kg, el I3C atraviesa barrera placentaria y aumenta la expresión de los genes relacionados con el AhR en las crías de las madres tratadas prenatalmente.

- Se desarrolló el modelo de displasia broncopulmonar por exposición a oxígeno suplementario y con la evaluación de los parámetros fisiopatológicos del desarrollo del modelo de DBP y sus biomarcadores de en el día 13 de vida podemos decir que nuestro modelo logró evocar los cambios histopatológicos observados en los bebés con displasia broncopulmonar:

- Con respecto al efecto en la alveolarización se observó:
 - Una disminución en el número de alvéolos, alvéolos con mayor tamaño y engrosamiento del tabique alveolar.
 - El RAC fue significativamente menor en el grupo expuesto a hiperoxia-hipoxia comparado con el grupo control.
 - Las crías del grupo expuesto presentaron un índice de intersección lineal media significativamente mayor que las del grupo control.

- Se determinó el efecto del I3C a través de la evaluación de los parámetros histopatológicos de DBP: Conteo radial alveolar, el índice de intersección lineal media y grado de fibrosis.

- El I3C mejoró la alveolarización en el modelo de DBP.
 - Aumentó el RAC.
 - Disminuyó el índice de intersección lineal media.

- El I3C disminuyó el TGF- β a nivel de proteína, lo que podría traducirse en una disminución en el grado de fibrosis (datos que precisan validarse por WesterBlot).

- Nuestro modelo permitió establecer biomarcadores de inflamación previo al desarrollo de DBP por medio de un arreglo de proteínas. Así mismo, nuestros resultados sugieren que el tratamiento con I3C podría disminuir el nivel de algunas citocinas e inducir al de TNF- α en animales expuestos a hiperoxia-hipoxia.

Perspectivas

Los resultados han generado nuevas preguntas que pueden derivar en nuevos proyectos de investigación y que pueden fortalecer la validez de nuestros resultados. En modelos animales se puede continuar con la evaluación de la vía de señalización de NF-kB, en los grupos tratados en el I3C, la confirmación de los niveles de citocinas en aspirado traqueal y la medición de enzimas antioxidantes en pulmón y plasma. Además, de la evaluación de fármacos ya comercializados que regulen la vía de señalización dependiente de NF-kB o la vía de señalización de STAT-3.

En estudios clínicos se puede probar el utilizar medicamentos ya existentes que van dirigidos en disminuir la activación de vías inflamatorias como los Anti-TNF como el Etanercept, o el infliximab; el canakinumab que es un anticuerpo monoclonal anti IL-1; u otras moléculas como el anticuerpo neutralizante del factor de crecimiento de tejido conectivo (FG-3019) el cuál ya probó su efectividad en ensayos clínicos fase I y II para la fibrosis pulmonar del adulto.

Apéndice A

Tabla A.1 Abreviaciones

	Descripción
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
AhR	Receptor de hidrocarburos de arilos.
AIN93G	Dieta estándar para roedores.
ALDH	Aldehído deshidrogenasa.
ARNT	Translocador nuclear del AhR.
CITES	Centro de Investigación e Innovación en Salud.
CO ₂	Dióxido de Carbono.
CYP	Citocromo P450.
CysLT	Cisteinil leucotrieno.
CX3CL1	Fractalquina
DBP	Displasia Broncopulmonar.
DIM	3,3'-diindolilmetano.
DREs/XREs	Elementos de respuesta a Dioxin-Xenobióticos.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
ELISA	Enzimo-inmunoanálisis de adsorción.
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.
EUA	Estados Unidos de América.
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FGF7	Factor de crecimiento fibroblástico 7
FIRS	Síndrome de respuesta inflamatoria fetal.
GST- α	Glutación S-transferasa- α .
Hsp90	Proteínas de choque térmico 90.
H&E	Hematoxilina y eosina.
ICAM	Molécula de adhesión intercelular.
IL	Interleucina.
IL-1RA	Antagonista del receptor de interleucina 1.
I3C	Indol-3-Carbinol.
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.
kg	Kilogramo.

LPS	Lipopolisacárido.
MAC	Membrana alveolo-capilar.
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1.
MEC	Matriz Extracelular.
mg	Miligramo.
MIP	Proteínas Inflamatorias de Macrófagos.
MMP	Metaloproteinasas de matriz.
NAD(P)H	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato.
NF- κB	Factor de transcripción nuclear kappa B.
NICHD	Instituto Nacional de Salud Infantil y Desarrollo Humano.
NQO1	Quinona oxidorreductasa-1
OMS	Organización Mundial de la Salud.
PBS	Buffer fosfato salino.
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
PMN	Polimorfonucleares
p32	Fosfoproteína
RAC	Conteo radial alveolar.
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno.
SD	Sprague Dawley.
SDG	Semanas de gestación.
SDR	Síndrome de Dificultad Respiratoria.
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
TIMP-1	Inhibidor Metalopeptidasa-1
TLR-2	Receptor 2 tipo Toll.
TNF	Factor de Necrosis Tumoral.
TNFR1	Receptor del Factor de Necrosis Tumoral Tipo 1.
UDPGT	Uridina Difosfato glucuronosil transferasa.
VEGF	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular.
XAP2	Proteína 2 asociada a X

Referencias

- Ahmad, A., Sakr, W. A., & Wahidur Rahman, K. M. (2011). Mechanisms and therapeutic implications of cell death induction by indole compounds. In *Cancers* (Vol. 3, Issue 3, pp. 2955–2974). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/cancers3032955>
- Ali, Z., Schmidt, P., Dodd, J., & Jeppesen, D. L. (2013). Bronchopulmonary dysplasia: A review. In *Archives of Gynecology and Obstetrics* (Vol. 288, Issue 2, pp. 325–333). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00404-013-2753-8>
- Alvira, C. M., Abate, A., Yang, G., Dennery, P. A., & Rabinovitch, M. (2007). Nuclear factor- κ B activation in neonatal mouse lung protects against lipopolysaccharide-induced inflammation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 175(8), 805–815. <https://doi.org/10.1164/rccm.200608-1162OC>
- Anderton, M. J., Manson, M. M., Verschoyle, R. D., Gescher, A., Lamb, J. H., Farmer, P. B., Steward, W. P., & Williams, M. L. (2004). Pharmacokinetics and tissue disposition of indole-3-carbinol and its acid condensation products after oral administration to mice. *Clinical Cancer Research*, 10(15), 5233–5241. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0163>
- Asikainen, T. M., Ahmad, A., Schneider, B. K., & White, C. W. (2005). Effect of preterm birth on hypoxia-inducible factors and vascular endothelial growth factor in primate lungs. *Pediatric Pulmonology*, 40(6), 538–546. <https://doi.org/10.1002/ppul.20321>
- Auten, R. L., O'Reilly, M. A., Oury, T. D., Nozik-Grayck, E., & Whorton, M. H. (2006). Transgenic extracellular superoxide dismutase protects postnatal alveolar epithelial proliferation and development during hyperoxia. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00133.2005>
- Baier, R. J., Loggins, J., & Kruger, T. E. (2003). Interleukin-4 and 13 concentrations in infants at risk to develop bronchopulmonary dysplasia. *BMC Pediatrics*, 3(1), 8. <https://doi.org/10.1186/1471-2431-3-8>
- Bassat, E., Mutlak, Y. E., Genzelinakh, A., Shadrin, I. Y., Baruch Umansky, K., Yifa, O., Kain, D., Rajchman, D., Leach, J., Riabov Bassat, D., Udi, Y., Sarig, R., Sagi, I., Martin, J. F., Bursac, N., Cohen, S., & Tzahor, E. (2017). The extracellular matrix protein agrin promotes heart regeneration in mice. *Nature*, 547(7662), 179–184. <https://doi.org/10.1038/nature22978>
- Baud, V., & Karin, M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 11, Issue 9, pp. 372–377). Trends Cell Biol. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(01\)02064-5](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(01)02064-5)
- Been, J. V., Rours, I. G., Kornelisse, R. F., Jonkers, F., de Krijger, R. R., & Zimmermann, L. J. (2010). Chorioamnionitis Alters the Response to Surfactant in Preterm Infants. *Journal of Pediatrics*, 156(1). <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.07.044>
- Beischlag, T. V., Morales, J. L., Hollingshead, B. D., & Perdew, G. H. (2008). The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. In *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* (Vol. 18, Issue 3, pp. 207–250). Begell House Inc. <https://doi.org/10.1615/CritRevEukarGeneExpr.v18.i3.20>
- Benson, J. M., & Shepherd, D. M. (2011). Dietary ligands of the aryl hydrocarbon receptor induce anti-inflammatory and immunoregulatory effects on murine dendritic cells. *Toxicological Sciences*, 124(2), 327–338. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr249>
- Berger, J., & Bhandari, V. (2014). Animal models of bronchopulmonary dysplasia. The term mouse models. In *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00159.2014>
- Berkelhamer, S. K., & Farrow, K. N. (2014). Developmental regulation of antioxidant enzymes and their impact on neonatal lung disease. In *Antioxidants and Redox Signaling*. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5515>
- Bhandari, A., & Bhandari, V. (2009). Pitfalls, problems, and progress in bronchopulmonary dysplasia. In *Pediatrics*. <https://doi.org/10.1542/peds.2008-1962>
- Bhandari, A., Carroll, C., & Bhandari, V. (2016). BPD following preterm birth: A model for chronic lung disease and a substrate for ARDS in childhood. In *Frontiers in Pediatrics*

- (Vol. 4, Issue JUN, p. 1). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fped.2016.00060>
- Bhandari, A., & McGrath-Morrow, S. (2013). Long-term pulmonary outcomes of patients with bronchopulmonary dysplasia. In *Seminars in Perinatology* (Vol. 37, Issue 2, pp. 132–137). <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2013.01.010>
- Bhandari, V. (2008). Molecular mechanisms of hyperoxia-induced acute lung injury. *Frontiers in Bioscience*, 13(17), 6653–6661. <https://doi.org/10.2741/3179>
- Bhandari, V. (2010). Hyperoxia-derived lung damage in preterm infants. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 15(4), 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2010.03.009>
- Bhandari, V., Bizzarro, M. J., Shetty, A., Zhong, X., Page, G. P., Zhang, H., Ment, L. R., & Gruen, J. R. (2006). Familial and genetic susceptibility to major neonatal morbidities in preterm twins. *Pediatrics*, 117(6), 1901–1906. <https://doi.org/10.1542/peds.2005-1414>
- Bhattacharya, S., Zhou, Z., Yee, M., Chu, C. Y., Lopez, A. M., Lunger, V. A., Solleti, S. K., Resseguie, E., Buczynski, B., Mariani, T. J., & O'reilly, M. A. (2014). The genome-wide transcriptional response to neonatal hyperoxia identifies ahr as a key regulator. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 307(7), L516–L523. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00200.2014>
- Biniwale, M. A., & Ehrenkranz, R. A. (2006). The Role of Nutrition in the Prevention and Management of Bronchopulmonary Dysplasia. In *Seminars in Perinatology* (Vol. 30, Issue 4, pp. 200–208). *Semin Perinatol.* <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2006.05.007>
- Blencowe, H., Cousens, S., Chou, D., Oestergaard, M., Say, L., Moller, A.-B., Kinney, M., & Lawn, J. (2013). Why focus on preterm birth? Born Too Soon: The global epidemiology of 15 million preterm births. In *Reproductive Health* (Issue 10). <http://www.reproductive-health-journal.com/content/10/S1/S2>
- Bose, C. L., Dammann, C. E. L., & Laughon, M. M. (2008). Bronchopulmonary dysplasia and inflammatory biomarkers in the premature neonate. In *Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition* (Vol. 93, Issue 6). *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* <https://doi.org/10.1136/adc.2007.121327>
- Brown, Z., Gerritsen, M. E., Carley, W. W., Strieter, R. M., Kunkel, S. L., & Westwick, J. (1994). Chemokine gene expression and secretion by cytokine-activated human microvascular endothelial cells. Differential regulation of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in response to interferon-gamma - PubMed. *Am J Pathol.*, 145(4), 913–921. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7943180/>
- Buczynski, B. W., Maduekwe, E. T., & O'Reilly, M. A. (2013). The role of hyperoxia in the pathogenesis of experimental BPD. In *Seminars in Perinatology*. <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2013.01.002>
- Chen, Y., Martinez, M. A., & Frank, L. (1997). Prenatal dexamethasone administration to premature rats exposed to prolonged hyperoxia: A new rat model of pulmonary fibrosis (bronchopulmonary dysplasia). *Journal of Pediatrics*, 130(3), 409–416. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(97\)70202-6](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(97)70202-6)
- Coalson, J. J. (2003). Pathology of new bronchopulmonary dysplasia. In *Seminars in Neonatology* (Vol. 8, Issue 1, pp. 73–81). W.B. Saunders Ltd. [https://doi.org/10.1016/S1084-2756\(02\)00193-8](https://doi.org/10.1016/S1084-2756(02)00193-8)
- Coarfa, C., Zhang, Y., Maity, S., Perera, D. N., Jiang, W., Wang, L., Couroucli, X., Moorthy, B., & Lingappan, K. (2017). Sexual dimorphism of the pulmonary transcriptome in neonatal hyperoxic lung injury: Identification of angiogenesis as a key pathway. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 313(6), L991–L1005. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00230.2017>
- Collins, J. J. P., Tibboel, D., de Kleer, I. M., Reiss, I. K. M., & Rottier, R. J. (2017). The future of bronchopulmonary dysplasia: Emerging pathophysiological concepts and potential new avenues of treatment. In *Frontiers in Medicine* (Vol. 4, Issue MAY, p. 1). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00061>
- Couroucli, X. I., Liang, Y. W., Jiang, W., Barrios, R., & Moorthy, B. (2006). Attenuation of oxygen-induced abnormal lung maturation in rats by retinoic acid: Possible role of cytochrome P4501A enzymes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.100677>
- Craig, V. J., Quintero, P. A., Fyfe, S. E., Patel, A. S., Knolle, M. D., Kobzik, L., & Owen, C. A.

- (2013). Profibrotic Activities for Matrix Metalloproteinase-8 during Bleomycin-Mediated Lung Injury. *The Journal of Immunology*, 190(8), 4283–4296.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201043>
- Crowley, G., Kwon, S., Caraher, E. J., Haider, S. H., Lam, R., Batra, P., Melles, D., Liu, M., & Nolan, A. (2019). Quantitative lung morphology: semi-automated measurement of mean linear intercept. *BMC Pulmonary Medicine*, 19(1), 206. <https://doi.org/10.1186/s12890-019-0915-6>
- Choi, Y., Kim, Y., Park, S., Lee, K. W., & Park, T. (2012). Indole-3-carbinol prevents diet-induced obesity through modulation of multiple genes related to adipogenesis, thermogenesis or inflammation in the visceral adipose tissue of mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(12), 1732–1739.
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.12.005>
- Cui, T. X., Brady, A. E., Fulton, C. T., Zhang, Y. J., Rosenbloom, L. M., Goldsmith, A. M., Moore, B. B., & Popova, A. P. (2020). CCR2 Mediates Chronic LPS-Induced Pulmonary Inflammation and Hypoalveolarization in a Murine Model of Bronchopulmonary Dysplasia. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.579628>
- Danan, C., Franco, M. L., Jarreau, P. H., Dassieu, G., Chailley-Heu, B., Bourbon, J., & Delacourt, C. (2002). High concentrations of keratinocyte growth factor in airways of premature infants predicted absence of bronchopulmonary dysplasia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 165(10), 1384–1387.
<https://doi.org/10.1164/rccm.200112-134BC>
- Datta, R., Bansal, T., Rana, S., Datta, K., Datta Chaudhuri, R., Chawla-Sarkar, M., & Sarkar, S. (2017). Myocyte-Derived Hsp90 Modulates Collagen Upregulation via Biphasic Activation of STAT-3 in Fibroblasts during Cardiac Hypertrophy. *Molecular and Cellular Biology*, 37(6). <https://doi.org/10.1128/mcb.00611-16>
- De Blasio, M. J., Boije, M., Kempster, S. L., Smith, G. C. S., Charnock-Jones, D. S., Denyer, A., Hughes, A., Wooding, F. B. P., Blache, D., Fowden, A. L., & Forhead, A. J. (2016). Leptin Matures Aspects of Lung Structure and Function in the Ovine Fetus. *Endocrinology*, 157(1), 395–404. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1729>
- Doyle, L. W., Cheong, J. L., Ehrenkranz, R. A., & Halliday, H. L. (2017). Late (> 7 days) systemic postnatal corticosteroids for prevention of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. In *Cochrane Database of Systematic Reviews* (Vol. 2017, Issue 10). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001145.pub4>
- Duck Hernández, E., Cullen Benítez, P. J., Salgado Ruiz, E., & Guzmán Cisneros, B. (2012). Displasia broncopulmonar. *An Med (Mex)*, 57(3), 223–231. www.medigraphic.org.mx
- Eising, J. B., Uiterwaal, C. S. P. M., Evelein, A. M. V., Visseren, F. L. J., & Van Der Ent, C. K. (2014). Relationship between leptin and lung function in young healthy children. In *European Respiratory Journal* (Vol. 43, Issue 4, pp. 1189–1192). European Respiratory Society. <https://doi.org/10.1183/09031936.00149613>
- Emery, J. L., & Mithal, A. (1960). The number of alveoli in the terminal respiratory unit of manduring late intrauterine life and childhood. *Archives of Disease in Childhood*. <https://doi.org/10.1136/adc.35.184.544>
- Frank, L. (2003). Protective effect of keratinocyte growth factor against lung abnormalities associated with hyperoxia in prematurely born rats. *Biology of the Neonate*, 83(4), 263–272. <https://doi.org/10.1159/000069480>
- Fujisawa-Sehara, A., Sogawa, K., Yamane, M., & Fujii-Kuriyama, Y. (1987). Characterization of xenobiotic responsive elements upstream from the drug-metabolizing cytochrome p-450c gene: A similarity to glucocorticoid regulatory elements. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/15.10.4179>
- Funkhouser, K. (2020). Chapter 9: Pulmonary Pathology. In *Pathology: A Modern Case Study* (2e ed.). McGrawHill.
- Gadient, R. A., & Patterson, P. H. (1999). Leukemia inhibitory factor, interleukin 6, and other cytokines using the GP130 transducing receptor: Roles in inflammation and injury. In *Stem Cells* (Vol. 17, Issue 3, pp. 127–137). AlphaMed Press. <https://doi.org/10.1002/stem.170127>
- Gu, L., Tseng, S. ., & Rollins, B. . (1999). Monocyte chemoattractant protein-1. *Chemical Immunology*.
- Guedez, L., Mansoor, A., Birkedal-Hansen, B., Lim, M. S., Fukushima, P., Venzon, D., Stetler-Stevenson, W. G., & Stetler-Stevenson, M. (2001). Tissue inhibitor of metalloproteinases 1 regulation of interleukin-10 in B-cell differentiation and lymphomagenesis. *Blood*, 97(6), 1796–1802. <https://doi.org/10.1182/blood.V97.6.1796>
- Hazeldine, J., Hampson, P., Opoku, F. A., Foster, M., & Lord, J. M. (2015). N-Formyl peptides drive

- mitochondrial damage associated molecular pattern induced neutrophil activation through ERK1/2 and P38 MAP kinase signalling pathways. *Injury*, 46(6), 975–984.
<https://doi.org/10.1016/j.injury.2015.03.028>
- Hilgendorff, A., & O'Reilly, M. A. (2015). Bronchopulmonary dysplasia early changes leading to long-term consequences. In *Frontiers in Medicine*. <https://doi.org/10.3389/fmed.2015.00002>
- Hoeben, A., Landuyt, B., Highley, M. S., Wildiers, H., Van Oosterom, A. T., & De Bruijn, E. A. (2004). Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. In *Pharmacological Reviews* (Vol. 56, Issue 4, pp. 549–580). *Pharmacol Rev*. <https://doi.org/10.1124/pr.56.4.3>
- Hoshino-Negishi, K., Ohkuro, M., Nakatani, T., Kuboi, Y., Nishimura, M., Ida, Y., Kakuta, J., Hamaguchi, A., Kumai, M., Kamisako, T., Sugiyama, F., Ikeda, W., Ishii, N., Yasuda, N., & Imai, T. (2019). Role of Anti-Fractalkine Antibody in Suppression of Joint Destruction by Inhibiting Migration of Osteoclast Precursors to the Synovium in Experimental Arthritis. *Arthritis & Rheumatology*, 71(2), 222–231. <https://doi.org/10.1002/art.40688>
- Hsiao, C. C., Chang, J. C., Tsao, L. Y., Yang, R. C., Chen, H. N., Lee, C. H., Lin, C. Y., & Tsai, Y. G. (2017). Correlates of Elevated Interleukin-6 and 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine Levels in Tracheal Aspirates from Very Low Birth Weight Infants Who Develop Bronchopulmonary Dysplasia. *Pediatrics and Neonatology*, 58(1), 63–69.
<https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2016.01.004>
- Hu, W., Lv, J., Han, M., Yang, Z., Li, T., Jiang, S., & Yang, Y. (2018). STAT3: The art of multitasking of metabolic and immune functions in obesity. In *Progress in Lipid Research* (Vol. 70, pp. 17–28). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.04.002>
- Hübner, R. H., Gitter, W., El Mokhtari, N. E., Mathiak, M., Both, M., Bolte, H., Freitag-Wolf, S., & Bewig, B. (2008). Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples. *BioTechniques*. <https://doi.org/10.2144/000112729>
- Husain, A. N., Siddiqui, N. H., & Stocker, J. T. (1998). Pathology of arrested acinar development in postsurfactant bronchopulmonary dysplasia. *Human Pathology*. [https://doi.org/10.1016/S0046-8177\(98\)90280-5](https://doi.org/10.1016/S0046-8177(98)90280-5)
- Iosef, C., Alastalo, T. P., Hou, Y., Chen, C., Adams, E. S., Lyu, S. C., Cornfield, D. N., & Alvira, C. M. (2012). Inhibiting NF-κB in the developing lung disrupts angiogenesis and alveolarization. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 302(10). <https://doi.org/10.1152/ajplung.00230.2011>
- Jenkins, R. G., Moore, B. B., Chambers, R. C., Eickelberg, O., Konigshoff, M., Kolb, M., Laurent, G. J., Nanthakumar, C. B., Olman, M. A., Pardo, A., Selman, M., Sheppard, D., Sime, P. J., Tager, A. M., Tatler, A. L., Thannickal, V. J., & White, E. S. (2017). An official American thoracic society workshop report: Use of animal models for the preclinical assessment of potential therapies for pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0096ST>
- Jiang, J., Kang, T. B., Shim, D. W., Oh, N. H., Kim, T. J., & Lee, K. H. (2013). Indole-3-carbinol inhibits LPS-induced inflammatory response by blocking TRIF-dependent signaling pathway in macrophages. *Food and Chemical Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.03.040>
- Jobe, A. H., & Bancalari, E. (2001). Bronchopulmonary dysplasia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 163(7), 1723–1729.
<https://doi.org/10.1164/ajrccm.163.7.2011060>
- Kalra, E. K. (2003). Nutraceutical - Definition and Introduction. In *AAPS PharmSci* (Vol. 5, Issue 3). <http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/dietsupp.html>.
- Kazzi, S. N. J., Kim, U. O., Quasney, M. W., & Buhimschi, I. (2004). Polymorphism of tumor necrosis factor-alpha and risk and severity of bronchopulmonary dysplasia among very low birth weight infants. *Pediatrics*, 114(2). <https://doi.org/10.1542/peds.114.2.e243>
- Kemp, W., Burns, D., & Brown, T. (2008). *Pathology: The Big Picture*. McGrawHill.
- Kho, A. T., Chhabra, D., Sharma, S., Qiu, W., Carey, V. J., Gaedigk, R., Vyhldal, C. A., Leeder, J. S., Tantisira, K. G., & Weiss, S. T. (2016). Age, sexual dimorphism, and disease associations in the developing human fetal lung transcriptome. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 54(6), 814–821.
<https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0326OC>
- Kim, D. H., & Rossi, J. J. (2007). Strategies for silencing human disease using RNA interference. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 8, Issue 3, pp. 173–184).
<https://doi.org/10.1038/nrg2006>
- Kim, E. J., Shin, M., Park, H., Hong, J. E., Shin, H. K., Kim, J., Kwon, D. Y., & Park, J. H. Y.

- (2009). Oral administration of 3,3'-diindolylmethane inhibits lung metastasis of 4T1 murine mammary carcinoma cells in BALB/c mice. *Journal of Nutrition*, 139(12), 2373–2379. <https://doi.org/10.3945/jn.109.111864>
- Kung, T., Murphy, K. A., & White, L. A. (2009). The aryl hydrocarbon receptor (AhR) pathway as a regulatory pathway for cell adhesion and matrix metabolism. In *Biochemical Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.09.031>
- Lal, C. V., & Ambalavanan, N. (2015). Biomarkers, Early Diagnosis, and Clinical Predictors of Bronchopulmonary Dysplasia. In *Clinics in Perinatology* (Vol. 42, Issue 4, pp. 739–754). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2015.08.004>
- Larsen-Su, S. A., & Williams, D. E. (2001). Transplacental exposure to indole-3-carbinol induces sex-specific expression of CYP1A1 and CYP1B1 in the liver of fischer 344 neonatal rats. *Toxicological Sciences*, 64(2), 162–168. <https://doi.org/10.1093/toxsci/64.2.162>
- Lecart, C., Cayabyab, R., Buckley, S., Morrison, J., Kwong, K. Y., Warburton, D., Ramanathan, R., Jones, C. A., & Minoo, P. (2000). Bioactive transforming growth factor-beta in the lungs of extremely low birthweight neonates predicts the need for home oxygen supplementation. *Biology of the Neonate*, 77(4), 217–223. <https://doi.org/10.1159/000014219>
- Lee, C., An, J., Kim, J. H., Kim, E. S., Kim, S. H., Cho, Y. K., Cha, D. H., Han, M. Y., Lee, K. H., & Sheen, Y. H. (2015). Low levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 at birth maybe associated with subsequent development of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. *Korean Journal of Pediatrics*, 58(11), 415–420. <https://doi.org/10.3345/kjp.2015.58.11.415>
- Li, H., & Lin, X. (2008). Positive and negative signaling components involved in TNF α -induced NF- κ B activation. In *Cytokine* (Vol. 41, Issue 1, pp. 1–8). Cytokine. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2007.09.016>
- Liang, T., Gao, W., Zhu, L., Ren, J., Yao, H., Wang, K., & Shi, D. (2019). TIMP-1 inhibits proliferation and osteogenic differentiation of hBMSCs through Wnt/ β -catenin signaling. *Bioscience Reports*, 39(1), 20181290. <https://doi.org/10.1042/BSR20181290>
- Liu, J., & Lin, A. (2005). Role of JNK activation in apoptosis: A double-edged sword. In *Cell Research* (Vol. 15, Issue 1, pp. 36–42). Cell Res. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290262>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- McColley, S. A. (1998). Bronchopulmonary dysplasia: Impact of surfactant replacement therapy. *Pediatric Clinics of North America*, 45(3), 573–586. [https://doi.org/10.1016/S0031-3955\(05\)70028-6](https://doi.org/10.1016/S0031-3955(05)70028-6)
- Meller, S., & Bhandari, V. (2012). VEGF levels in humans and animal models with RDS and BPD: Temporal relationships. *Experimental Lung Research*, 38(4), 192–203. <https://doi.org/10.3109/01902148.2012.663454>
- Michael, Z., Spyropoulos, F., Ghanta, S., & Christou, H. (2018). Bronchopulmonary Dysplasia: An Update of Current Pharmacologic Therapies and New Approaches. *Clinical Medicine Insights: Pediatrics*, 12, 117955651881732. <https://doi.org/10.1177/1179556518817322>
- Minguet-Romero, R., Cruz Cruz, P. del R., Aguilu Ruíz-Rosas, R., & Hernández-Valencia, M. (2007). Incidencia de nacimientos pretérmino en el IMSS. In *Ginecol Obstet Mex* (Vol. 82). www.femecog.org.mx
- Mohammadi, S., Memarian, A., Sedighi, S., Behnampour, N., & Yazdani, Y. (2018). Immunoregulatory effects of indole-3-carbinol on monocyte-derived macrophages in systemic lupus erythematosus: A crucial role for aryl hydrocarbon receptor. *Autoimmunity*, 51(5), 199–209. <https://doi.org/10.1080/08916934.2018.1494161>
- Motoi, S., Ohkuro, M., Ikeda, W., Hamaguchi, A., Muramoto, K., Sato, T., Yasuda, N., Kajiwara,

- A., Kawano, T., & Imai, T. (2015). Mo1682 Inflammation via the Fractalkine (CX3CL1)/CX3CR1 Pathway Is Distinct From the TNF Pathway in Murine Colitis Model. *Gastroenterology*, 148(4), S-684. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(15\)32312-x](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(15)32312-x)
- Narita, K., Kuwabara, Y., & Fujii, Y. (2004). Lung injury after intestinal ischemia-reperfusion may be avoided by the reduced absorption of locally produced cytokines. *Surgery Today*, 34(11), 937–942. <https://doi.org/10.1007/s00595-004-2847-9>
- Naudé, P. J. W., Den Boer, J. A., Luiten, P. G. M., & Eisel, U. L. M. (2011). Tumor necrosis factor receptor cross-talk. In *FEBS Journal* (Vol. 278, Issue 6, pp. 888–898). FEBS J. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08017.x>
- Nelms, K., Keegan, A. D., Zamorano, J., Ryan, J. J., & Paul, W. E. (1999). THE IL-4 RECEPTOR: Signaling Mechanisms and Biologic Functions. *Annual Review of Immunology*, 17(1), 701–738. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.701>
- Newton, K., & Dixit, V. M. (2012). Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(3). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006049>
- Niedermaier, S., & Hilgendorff, A. (2015). Bronchopulmonary dysplasia - an overview about pathophysiologic concepts. *Molecular and Cellular Pediatrics*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/s40348-015-0013-7>
- Nold, M. F., Mangan, N. E., Rudloff, I., Cho, S. X., Shariatian, N., Samarasinghe, T. D., Skuza, E. M., Pedersen, J., Veldman, A., Berger, P. J., & Nold-Petry, C. A. (2013). Interleukin-1 receptor antagonist prevents murine bronchopulmonary dysplasia induced by perinatal inflammation and hyperoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(35), 14384–14389. <https://doi.org/10.1073/pnas.1306859110>
- Northway, W. H., Rosan, R. C., & Porter, D. Y. (1967). Pulmonary Disease Following Respirator Therapy of Hyaline-Membrane Disease. *New England Journal of Medicine*, 276(7), 357–368. <https://doi.org/10.1056/nejm196702162760701>
- O'Reilly, M., & Thébaud, B. (2014). Animal models of bronchopulmonary dysplasia. The term rat models. In *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* (Vol. 307, Issue 12, pp. L948–L958). American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00160.2014>
- Olaloko, O., Mohammed, R., & Ojha, U. (2018). Evaluating the use of corticosteroids in preventing and treating bronchopulmonary dysplasia in preterm neonates. *International Journal of General Medicine*, Volume 11, 265–274. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S158184>
- Otero, M., Lago, R., Lago, F., Casanueva, F. F., Dieguez, C., Gómez-Reino, J. J., & Gualillo, O. (2005). Leptin, from fat to inflammation: Old questions and new insights. In *FEBS Letters* (Vol. 579, Issue 2, pp. 295–301). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.11.024>
- Paiva, K. B. S., & Granjeiro, J. M. (2014). Bone tissue remodeling and development: Focus on matrix metalloproteinase functions. In *Archives of Biochemistry and Biophysics* (Vol. 561, pp. 74–87). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.07.034>
- Pan, J., Zhan, C., Yuan, T., Wang, W., Shen, Y., Sun, Y., Wu, T., Gu, W., Chen, L., & Yu, H. (2018). Effects and molecular mechanisms of intrauterine infection/inflammation on lung development. *Respiratory Research*, 19(1), 93. <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0787-y>
- Papadakis, K. A., & Targan, S. R. (2000). Tumor necrosis factor: Biology and therapeutic inhibitors. *Gastroenterology*, 119(4), 1148–1157. <https://doi.org/10.1053/gast.2000.18160>
- Popova, A. P. (2013). Mechanisms of bronchopulmonary dysplasia. In *Journal of Cell Communication and Signaling* (Vol. 7, Issue 2, pp. 119–127). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12079-013-0190-x>
- Probert, L. (2015). TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. In *Neuroscience* (Vol. 302, pp. 2–22). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.038>
- Puga, A., Tomlinson, C. R., & Xia, Y. (2005). Ah receptor signals cross-talk with multiple developmental pathways. *Biochemical Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.06.043>
- Quintero, P. A., Knolle, M. D., Cala, L. F., Zhuang, Y., & Owen, C. A. (2010). Matrix

- Metalloproteinase-8 Inactivates Macrophage Inflammatory Protein-1 α To Reduce Acute Lung Inflammation and Injury in Mice. *The Journal of Immunology*, 184(3), 1575–1588. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900290>
- Ranek, M. J., Stachowski, M. J., Kirk, J. A., & Willis, M. S. (2018). The role of heat shock proteins and co-chaperones in heart failure. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 373, Issue 1738). Royal Society Publishing. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0530>
- Ratner, V., Slinko, S., Utkina-Sosunova, I., Starkov, A., Polin, R. A., & Ten, V. S. (2009). Hypoxic stress exacerbates hyperoxia-induced lung injury in a neonatal mouse model of bronchopulmonary dysplasia. *Neonatology*. <https://doi.org/10.1159/000178798>
- Reed, G. A., Sunega, J. M., Sullivan, D. K., Gray, J. C., Mayo, M. S., Crowell, J. A., & Hurwitz, A. (2008). Single-dose pharmacokinetics and tolerability of absorption-enhanced 3,3'-diindolylmethane in healthy subjects. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 17(10), 2619–2624. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0520>
- Renzi, P., Du, T., Sapienza, S., Wang, N., & Martin, J. (1991). Acute effects of interleukin-2 on lung mechanics and airway responsiveness in rats. *The American Review of Respiratory Disease*, 143, 380–380. <https://repositorio.tec.mx/bitstream/handle/11285/636220/Tesis LCVA versión FINAL.pdf?sequence=1>
- Rivera, L., Siddaiah, R., Oji-Mmuo, C., Silveyra, G. R., & Silveyra, P. (2016). Biomarkers for bronchopulmonary dysplasia in the preterm infant. In *Frontiers in Pediatrics* (Vol. 4, Issue MAR). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fped.2016.00033>
- Safe, S., & Kim, K. (2008). Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways. In *Journal of Molecular Endocrinology* (Vol. 41, Issues 5–6, pp. 263–275). Society for Endocrinology. <https://doi.org/10.1677/JME-08-0103>
- Saugstad, O. D. (2003). Bronchopulmonary dysplasia - Oxidative stress and antioxidants. In *Seminars in Neonatology*. [https://doi.org/10.1016/S1084-2756\(02\)00194-X](https://doi.org/10.1016/S1084-2756(02)00194-X)
- Schulz, C., Schäfer, A., Stolla, M., Kerstan, S., Lorenz, M., Von Brühl, M. L., Schiemann, M., Bauersachs, J., Gloe, T., Busch, D. H., Gawaz, M., & Massberg, S. (2007). Chemokine fractalkine mediates leukocyte recruitment to inflammatory endothelial cells in flowing whole blood: A critical role for P-selectin expressed on activated platelets. *Circulation*, 116(7), 764–773. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.695189>
- Shivanna, B., Maity, S., Zhang, S., Patel, A., Jiang, W., Wang, L., Welty, S. E., Belmont, J., Coarfa, C., & Moorthy, B. (2016). Gene expression profiling identifies cell proliferation and inflammation as the predominant pathways regulated by Aryl hydrocarbon receptor in primary human fetal lung cells exposed to hyperoxia. *Toxicological Sciences*, 152(1), 155–168. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw071>
- Shivanna, B., Zhang, S., Patel, A., Jiang, W., Wang, L., Welty, S. E., & Moorthy, B. (2015). Omeprazole attenuates pulmonary aryl hydrocarbon receptor activation and potentiates hyperoxia-induced developmental lung injury in newborn mice. *Toxicological Sciences*. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv183>
- Shivanna, B., Zhang, W., Jiang, W., Welty, S. E., Couroucli, X. I., Wang, L., & Moorthy, B. (2013a). Functional deficiency of aryl hydrocarbon receptor augments oxygen toxicity-induced alveolar simplification in newborn mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.01.003>
- Shivanna, B., Zhang, W., Jiang, W., Welty, S. E., Couroucli, X. I., Wang, L., & Moorthy, B. (2013b). Functional deficiency of aryl hydrocarbon receptor augments oxygen toxicity-induced alveolar simplification in newborn mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 267(3), 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.01.003>
- Sinha, A., Muthiah, K., Jiang, W., Couroucli, X., Barrios, R., & Moorthy, B. (2005). Attenuation of hyperoxic lung injury by the CYP1A inducer β -naphthoflavone. *Toxicological Sciences*. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi226>
- Stark, A., Dammann, C., Nielsen, H. C., & Volpe, M. A. V. (2018). A pathogenic relationship of bronchopulmonary dysplasia and retinopathy of prematurity? A review of angiogenic mediators in both diseases. In *Frontiers in Pediatrics* (Vol. 6, p. 125). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00125>
- Stenmark, K. R., Fagan, K. A., & Frid, M. G. (2006). Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: Cellular and molecular mechanisms. In *Circulation Research* (Vol. 99, Issue

- 7, pp. 675–691). Lippincott Williams & Wilkins.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000243584.45145.3f>
- Stetler-Stevenson, W. G. (2008). Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: Metalloproteinase-independent biological activities. In *Science Signaling* (Vol. 1, Issue 27). Sci Signal. <https://doi.org/10.1126/scisignal.127re6>
- Stoll, B. J., Hansen, N. I., Bell, E. F., Walsh, M. C., Carlo, W. A., Shankaran, S., Laptook, A. R., Sánchez, P. J., Van Meurs, K. P., Wyckoff, M., Das, A., Hale, E. C., Bethany Ball, M., Newman, N. S., Schibler, K., Poindexter, B. B., Kennedy, K. A., Michael Cotten, C., Watterberg, K. L., ... Higgins, R. D. (2015). Trends in care practices, morbidity, and mortality of extremely preterm Neonates, 1993–2012. In *JAMA - Journal of the American Medical Association* (Vol. 314, Issue 10, pp. 1039–1051). American Medical Association. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.10244>
- Tambunting, F., Beharry, K. D. A., Waltzman, J., & Modanlou, H. D. (2005). Impaired lung vascular endothelial growth factor in extremely premature baboons developing bronchopulmonary dysplasia/chronic lung disease. *Journal of Investigative Medicine*, 53(5), 253–263. <https://doi.org/10.2310/6650.2005.53508>
- Thébaud, B., Goss, K. N., Laughon, M., Whitsett, J. A., Abman, S. H., Steinhorn, R. H., Aschner, J. L., Davis, P. G., McGrath-Morrow, S. A., Soll, R. F., & Jobe, A. H. (2019). Bronchopulmonary dysplasia. In *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 5, Issue 1). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0127-7>
- Thébaud, B., Ladha, F., Michelakis, E. D., Sawicka, M., Thurston, G., Eaton, F., Hashimoto, K., Harry, G., Haromy, A., Korbitt, G., & Archer, S. L. (2005). Vascular endothelial growth factor gene therapy increases survival, promotes lung angiogenesis, and prevents alveolar damage in hyperoxia-induced lung injury: Evidence that angiogenesis participates in alveolarization. *Circulation*, 112(16), 2477–2486. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.541524>
- Thiel, M., Zourelidis, C., Chambers, J. D., vonAndrian, U. H., Arfors, K. E., Messmer, K., & Peter, K. (1997). Expression of β_2 -Integrins and L-Selectin on Polymorphonuclear Leukocytes in Septic Patients. *European Surgical Research*, 29(3), 160–175. <https://doi.org/10.1159/000129521>
- Tyson, J. E., Wright, L. L., Oh, W., Kennedy, K. A., Mele, L., Ehrenkranz, R. A., Stoll, B. J., Lemons, J. A., Stevenson, D. K., Bauer, C. R., Korones, S. B., Donovan, E. F., Carlo, W. A., Shankaran, S., Stark, A. R., Papile, L.-A., Jobe, A., Stacewicz-Sapuntzakis, M., Verter, J., & Fanaroff, A. A. (1999). Vitamin A Supplementation for Extremely-Low-Birth-Weight Infants. *New England Journal of Medicine*, 340(25), 1962–1968. <https://doi.org/10.1056/NEJM199906243402505>
- Vento, G., Capoluongo, E., Matassa, P. G., Concolino, P., Vendettuoli, V., Vaccarella, C., Frezza, S., Zuppi, C., Romagnoli, C., & Ameglio, F. (2006). Serum levels of seven cytokines in premature ventilated newborns: Correlations with old and new forms of bronchopulmonary dysplasia. *Intensive Care Medicine*, 32(5), 723–730. <https://doi.org/10.1007/s00134-006-0138-1>
- Vento, M., Escrig, R., Saenz, P., Izquierdo, I., Sastre, J., & Viña, J. (2006). Does oxygen concentration used for resuscitation influence outcome of asphyxiated newborn infants treated with hypothermia? In *Pediatrics* (Vol. 117, Issue 6, pp. 2326–2328). Pediatrics. <https://doi.org/10.1542/peds.2005-2804>
- Villarino, A. V., Kanno, Y., & O'Shea, J. J. (2017). Mechanisms and consequences of Jak-STAT signaling in the immune system. In *Nature Immunology* (Vol. 18, Issue 4, pp. 374–384). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ni.3691>
- Wang, W., Wei, W., Nign, Q., & Luo, X. (2007). [Effect of intra-amniotic endotoxin priming plus hyperoxic exposure on the expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in lungs of preterm newborn rats] - PubMed. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*, 533–538. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17953812/>
- Wispe, J. R., Warner, B. B., Clark, J. C., Dey, C. R., Neuman, J., Glasser, S. W., Crapo, J. D., Chang, L. Y., & Whitsett, J. A. (1992). Human Mn-superoxide dismutase in pulmonary epithelial cells of transgenic mice confers protection from oxygen injury. *Journal of Biological Chemistry*.

- Wright, C. J., & Kirpalani, H. (2011). Targeting inflammation to prevent bronchopulmonary dysplasia: Can new insights be translated into therapies? In *Pediatrics*.
<https://doi.org/10.1542/peds.2010-3875>
- Xiao, Z., Shu, J., Zhou, F., & Han, Y. (2018). JQ1 is a potential therapeutic option for COPD patients with agrin overexpression. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, *314*(4), L690–L694. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00500.2017>
- Yang, M., Chen, B. L., Huang, J. B., Meng, Y. N., Duan, X. J., Chen, L., Li, L. R., & Chen, Y. P. (2017). Angiogenesis-related genes may be a more important factor than matrix metalloproteinases in bronchopulmonary dysplasia development. *Oncotarget*, *8*(12), 18670–18679. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14722>
- Zhang, H. H., Kumar, S., Barnett, A. H., & Eggo, M. C. (2000). Tumour necrosis factor- α exerts dual effects on human adipose leptin synthesis and release. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *159*(1–2), 79–88. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(99\)00194-X](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(99)00194-X)
- Zhao, L., Wang, K., Ferrara, N., & Vu, T. H. (2005). Vascular endothelial growth factor co-ordinates proper development of lung epithelium and vasculature. *Mechanisms of Development*, *122*(7–8), 877–886. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2005.04.001>

Artículos publicados

Prenatal indole-3-carbinol administration activates aryl hydrocarbon receptor-responsive genes and attenuates lung injury in a bronchopulmonary dysplasia model [WEB OF SCIENCE](#)



Authors: Guzman-Navarro, Gabriela, de Leon, Mario Bermudez, Martin-Estal, Irene; ... Castorena-Torres, Fabiola; see more

Published: Mar 2021 in Experimental Biology and Medicine

DOI: 10.1177/1535370220963789

Indole-3-Carbinol and 3,3'-Diindolylmethane Compounds Attenuate Hyperoxia/Hypoxia-Induced Lung Injury in Newborn Rats [WEB OF SCIENCE](#)



Authors: Guzman-Navarro, G.; Vaquera-Vazquez, A.; Cuevas-Cerda, T.; ... Castorena-Torres, F.; see more

Published: 2018 in Neonatology

LETTER TO THE EDITOR To the Editor: Concerning Kaya et al [WEB OF SCIENCE](#)



Authors: Guzman-Navarro, Gabriela, Castorena-Torres, Fabiola, Javier Lara-Diaz, Victor

Published: Oct 2017 in Fetal and Pediatric Pathology

DOI: 10.1080/15513815.2017.1310338



Animal model of Bronchopulmonary dysplasia, Approach to reality

Published:

DOI: 10.1542/PEDS.142.1_MEETINGABSTRACT.170

Original Research

Prenatal indole-3-carbinol administration activates aryl hydrocarbon receptor-responsive genes and attenuates lung injury in a bronchopulmonary dysplasia model

Gabriela Guzmán-Navarro^{1,*}, Mario Bermúdez de León², Irene Martín-Estal¹, Raquel Cuevas-Díaz Durán¹, Laura Villarreal-Alvarado¹, Anakaren Vaquera-Vázquez¹, Tania Cuevas-Cerda¹, Karina Garza-García¹, Luis Eduardo Cuervo-Pérez³, Álvaro Barbosa-Quintana³, José Eduardo Pérez-Saucedo¹, Víctor J Lara-Díaz¹  and Fabiola Castorena-Torres^{1,*} 

¹Tecnológico de Monterrey, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Monterrey 64710, Mexico; ²Departamento de Biología Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social, Monterrey 64720, Mexico; ³Hospital San José, Sistema de Salud del Tecnológico de Monterrey, Monterrey 64710, Mexico

Corresponding author: Fabiola Castorena-Torres. Email: fcastorena@tec.mx

*These authors contributed equally to this work

Impact statement

Bronchopulmonary dysplasia (BPD) is developed by preterm infants when they are exposed to hyperoxia–hypoxia cycles. To search new effective and innocuous therapeutic options to decrease the damage caused by supplemental oxygen is one of goals in BPD treatment. In our study, using an animal model, we have shown a beneficial effect of indole-3-carbinol (I3C), a cruciferous vegetable derivative, to treat BPD. I3C can diffuse through the placental membrane and activates the antioxidant system in fetuses. I3C reduces the destruction of alveolar septa and reduces fibrosis in pup lungs. This information provides the basis for the use of innocuous molecules contained in plants to prevent BPD in those babies from women with high risk to get preterm delivery.

Abstract

Hyperoxia–hypoxia exposure is a proposed cause of alveolar developmental arrest in bronchopulmonary dysplasia in preterm infants, where mitochondrial reactive oxygen species and oxidative stress vulnerability are increased. The aryl hydrocarbon receptor (AhR) is one of the main activators of the antioxidant enzyme system that protects tissues and systems from damage. The present study aimed to determine if the activation of the AhR signaling pathway by prenatal administration of indole-3-carbinol (I3C) protects rat pups from hyperoxia–hypoxia-induced lung injury. To assess the activation of protein-encoding genes related to the AhR signaling pathway (*Cyp1a1*, *Cyp1b1*, *Ugt1a6*, *Nqo1*, and *Gsta1*), pup lungs were excised at 0, 24, and 72 h after birth, and mRNA expression levels were quantified by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction assays (RT-qPCR). An adapted Ratner's method was used in rats to evaluate radial alveolar counts (RACs) and the degree of fibrosis. The results reveal that the relative expression of AhR-related genes in rat pups of prenatally I3C-treated dams was significantly different from that of untreated dams. The RAC was significantly lower in the hyperoxia–hypoxia group (4.0 ± 1.0) than that in the unexposed control group (8.0 ± 2.0 ; $P < 0.01$). When rat

pups of prenatally I3C-treated dams were exposed to hyperoxia–hypoxia, an RAC recovery was observed, and the fibrosis index was similar to that of the unexposed control group. A cytokine antibody array revealed an increase in the NF- κ B signaling cascade in I3C-treated pups, suggesting that the pathway could regulate the inflammatory process under the stimulus of this compound. In conclusion, the present study demonstrates that I3C prenatal treatment activates AhR-responsive genes in pup's lungs and hence attenuates lung damage caused by hyperoxia–hypoxia exposure in newborns.

Keywords: Bronchopulmonary dysplasia, hyperoxia–hypoxia, aryl hydrocarbon receptor, indole-3-carbinol, murine model, newborns

Experimental Biology and Medicine 2020; 0: 1–12. DOI: 10.1177/1535370220963789

Introduction

Bronchopulmonary dysplasia (BPD) is the most common chronic respiratory disease in preterm infants and is a major form of neonatal chronic lung disease.¹ Exposure to supraphysiological oxygen levels is a proposed cause of alveolar developmental arrest in BPD. Intermittent periods of hypoxia increase mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production and tissue vulnerability to oxidative stress, leading to alveolar cell injury in developing lungs. Additionally, antioxidant deficiencies and immature defenses increase the risk of irreversible lung damage.²⁻⁴ In a neonatal murine model that mimics human infant development, brief episodes of oxygen desaturation exacerbated oxidative stress during the initial stages of BPD.⁵ Pulmonary morphological changes, including larger alveoli, a decreased alveolar number, and increased interstitial thickness, accompany the aforementioned oxidative stress events. All these alterations are consistent with those found in BPD in human neonates.⁶

One protein responsible for a cell's antioxidant system is the aryl hydrocarbon receptor (AhR). This molecule has several endogenous and exogenous ligands and is located in the cytoplasm, where it interacts with chaperones: two 90 kDa heat shock transcriptional regulators,⁶⁻⁹ a co-chaperone (p23), and a single molecule of the hepatitis X-associated protein-2.^{10,11} After being stimulated, the AhR exposes a nuclear localization sequence that translocates the AhR complex (formed by AhR/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) into the nucleus.^{12,13} Here, the AhR dissociates and dimerizes with the AhR nuclear translocator, activating all genes with xenobiotic response elements.¹⁴ Most of these genes encode phase I and phase II antioxidant enzymes, such as cytochrome P450 (CYP450) members, glutathione S-transferase α , and NAD(P)H quinone reductase-1 (NQO1).¹⁵⁻¹⁹ Some of these genes are also regulated by the nuclear factor erythroid-derived 2 (Nrf2) via antioxidant response elements as a reply to oxidative stress.²⁰ It has been demonstrated that both adult and newborn mice deficient in the AhR have a greater susceptibility to lung lesions because of hyperoxia due to the low or null expression of phase I and phase II antioxidant enzymes.^{19,21,22} These results suggest that the AhR is important in the protection of the lungs from oxygen-induced injury.

Recently, several studies have proposed different phytochemicals derived from fruits or vegetables as an adjuvant treatment for BPD. Vitamin A is involved in the proliferation and maintenance of epithelial cells, and it is necessary for both cellular differentiation and surfactant production within the lung but only had a modest benefit in reducing BPD risk among preterm infants.²³ Regarding the use of different sources of intravenous fat, a study comparing soy oil emulsion-based with mixed oil sources failed to reach a significant difference in the incidence of BPD; moreover, in the study conducted by Guthrie *et al.* in 2017, the soy oil emulsion-based group showed a 46% BPD incidence, whereas the mixed oil-based group had a 24% BPD incidence.²⁴ Additionally, indole-3-carbinol (I3C) is a cruciferous vegetable derivative that can induce phase I

and phase II drug-metabolizing enzymes, anti-oxidative stress responses, the anti-inflammatory NF- κ B signaling pathway, and cell cycle arrest and apoptosis.²⁵ It has been recently reported that I3C suppresses inflammation-driven lung cancer in mice and acts as a potent inhibitor of ischemia-reperfusion-induced inflammation, but this effect has never been evaluated in the context of BPD.²⁶ For this reason, I3C could help to reduce the deleterious effects observed in neonates exposed to hyperoxia-hypoxia cycles, in which several inflammatory and anti-inflammatory cytokines have demonstrated an important role in the immunomodulation of lung damage.^{27,28}

In the present study, we used a BPD rat model to determine if I3C prenatal administration would activate the AhR signaling pathway in neonatal pups, thus protecting them from hyperoxia-hypoxia-induced lung injury.

Materials and methods

Chemicals

I3C (I7256) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Animals

Sprague Dawley pregnant rats (Harlan Laboratories, Bar Harbor, ME, USA) were housed in normal conditions with 12:12 h light-dark cycles. All animals had *ad libitum* access to food and water, and body weight and food intake were recorded daily. The animals were handled according to the protocol approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the Tecnológico de Monterrey (ID: 2015-Re-015), in full compliance with the Official Mexican Standard (NOM-062-ZOO-1999) for the production, care, and use of laboratory animals for scientific purposes.

Animal treatment

Pregnant rats were treated daily with I3C by oral gavage (100 mg/kg body weight) suspended in 0.5 mL of corn oil (as a vehicle) daily, starting on day 17 of gestation until birth (day 21). Control rats from all groups received corn oil as a vehicle. Two pregnant rats were handled simultaneously at the same time, starting with the control group, then the exposed group and finally with the exposed group treated with I3C. Pups from multiple litters were pooled before being randomly assigned and redistributed to dams. A total of 79 pups were divided as follows: to validate the AhR activation in pup's lungs, into a control group ($n = 15$) and an I3C-treated group ($n = 15$); to measure an array of cytokines in plasma, into a control group ($n = 9$, spots by duplicates), a hyperoxia-hypoxia group ($n = 6$, spots by duplicates), and an I3C-treated exposed group ($n = 6$, spots by duplicates); and to test the BPD model through histopathology, either for radial alveolar count (RAC) or fibrosis index or both, into a control group ($n = 10$), a hyperoxia-hypoxia group ($n = 11$), and an I3C-treated exposed group ($n = 7$). Nurse rats were euthanized with intraperitoneal sodium pentobarbital (150 mg/kg), according the AVMA Guidelines for the Euthanasia of

Animals: 2013 Edition. Absence of corneal reflex and absence of rhythmic breathing were used as a confirmatory method of euthanasia.²⁹ All pups were deeply anesthetized according to guidelines published by Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Iowa³⁰ at 0, 24 and 72 h after birth, and blood was extracted by intracardiac puncture and lungs were dissected. These tissues were preserved either in RNA later for RT-qPCR analyses or PBS-formalin for histological analyses.

BPD model

BDP in neonatal rats was developed based on Ratner's method.^{5,31} From the second postnatal day, pups were exposed to 80% oxygen in a chamber designed at the Laboratory Center for Research and Innovation in Health (Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnológico de Monterrey). A Respironics EverFlo-OPI oxygen concentrator (120v-Millennium Technology 60GHz, 3.4A) generated the oxygen flow. An oxygen sensor (Lutron model DO-5510HA COD meter) was installed to constantly monitor the oxygen concentration inside the chamber. The experimental model is illustrated in Figure 1. Hyperoxia exposure was interrupted with intermittent exposure to hypoxic stress at 10% oxygen for 10 min (N₂ balanced) and air at 21% oxygen for 50 min to clean the cages once a day, in continuous and intermittent episodes until the 13th day. To reduce the use of mothers exposed to supplemental

oxygen, a nurse attended the experimental litter in alternate 24 h shifts.

RNA isolation, cDNA synthesis, and real-time RT-qPCR assays

The lungs stored in RNA later were subject to total RNA extraction using the TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA concentration and purity were estimated by UV spectrophotometry using a Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA), and RNA integrity was assessed by electrophoresis on 1% agarose gels stained with GelRed (Biotium, Landing Parkway Fremont, CA, USA). Isolated RNA was stored at -80°C until analysis.

Then, cDNA was prepared from 500 ng of the total RNA using the SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

TaqMan Universal PCR Master Mix (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA) was used for the PCR analyses, in a total volume of 20 µL containing 400 pmol/L of each oligonucleotide and 200 pmol/L of TaqMan probes. The assays were performed in a 96-well reaction plate on a Quant Studio 5.0 thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Ribosomal 18S RNA was used as an endogenous control (Applied Biosystems). The specific primers and probes related to the AhR signaling pathway were selected from the Thermo Scientific webpage

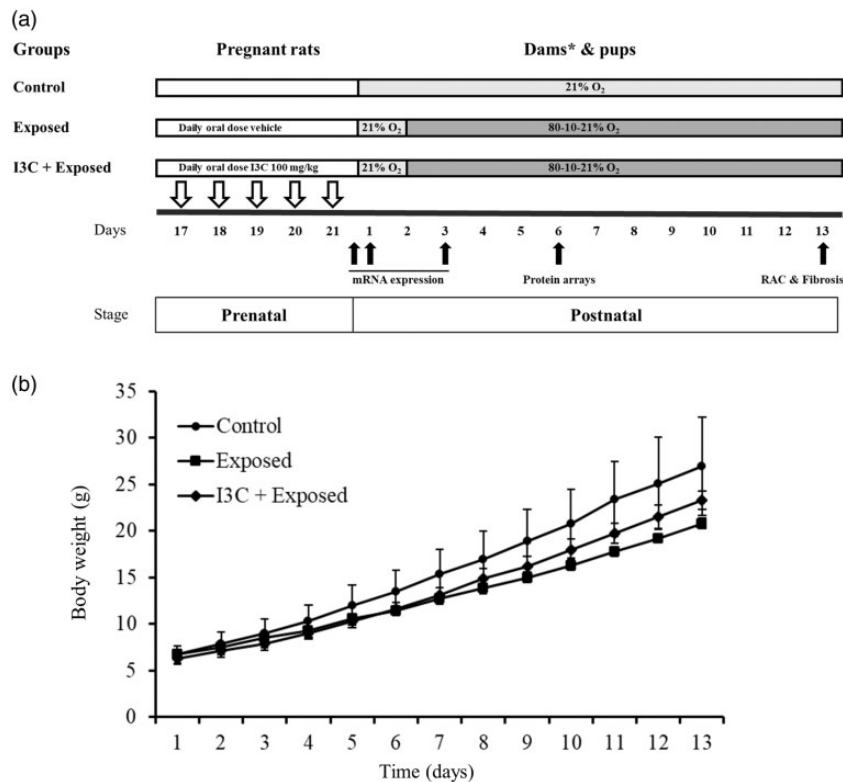


Figure 1. Effect of indole-3-carbinol (I3C) on newborn rat body weights. (a) Study design of the experimental model: control group (air environment: 21% O₂; *n* = 10), untreated exposed group (80%–10%–21% O₂; *n* = 11), and exposed group treated with I3C (100 mg/kg; 80%–10%–1% O₂; *n* = 7). For more details, see the Material and methods section. *Dams were changed on alternate days and all control groups received daily corn oil as a vehicle. (b) Body weight gain of newborn rats was evaluated daily for 13 days after birth. *P* < 0.05 control group vs. exposed group; *P* > 0.05 exposed group vs. I3C + exposed group.

(<https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-assays/taqman-gene-expression.html>; Table 1). Thermal cycling was performed with an initial incubation at 50°C for 2 min and then denatured at 95°C for 10 min, followed by 35 cycles. Each cycle consisted of heating at 95°C for 15 s for denaturalization and then 1 min at 60°C for annealing and extension. Each sample was run in triplicate, and negative controls were included in the same plate. Results were analyzed using the comparative threshold cycle method for relative gene expression.³²

Cytokine protein array

A rat cytokine antibody array membrane (ab133992, Abcam, Cambridge, UK) was used to detect cytokines in plasma samples (from a pool of two or three pups) at day 6. Arrays contain spots by duplicate for each cytokine. The membrane was incubated for 30 min at 4°C in a blocking buffer. Then, samples were incubated on the membrane overnight at 4°C and were washed in buffer I for 5 min, followed by two washes in buffer II (5 min each). A biotinylated anti-cytokine mix of antibodies (1:2 000) was added to the membrane and incubated for 2 h. The membrane was washed and incubated with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (1:1 000) for 2 h before being incubated in 500 µL of detection buffer for 2 min and was then finally exposed to Kodak BioMax Light film (Sigma) at room temperature for 1 min. The chemiluminescent signal from bound cytokines was captured by the ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, CA, USA) and stored as a high-resolution TIFF image. ImageJ software was used to obtain cytokine signal intensities.

ImageJ scripts were developed for automated spot location and image processing. For each spot, raw intensity values were determined as the summed signal intensity of pixel values above a background correction threshold. Background correction thresholds were determined for each spot as the mean intensity values of the pixels in the corners of the square in which each spot was inscribed. Spot intensity values were further processed by subtracting the mean intensity values of the blank spots corresponding to each row. Background-corrected spot values were normalized using the positive control spots' mean intensities found in the control membrane, which was selected as the reference array.

Gene set enrichment analysis

A compendium of gene sets, including canonical pathways and gene ontologies, were downloaded from MsigDB 3 (<http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb>). Gene symbols corresponding to differentially expressed cytokines were used to find enriched gene sets through a hypergeometric test (R's *phyper* function). Gene sets were considered enriched if they had a *P* value of <0.05 and at least four genes.

Pulmonary histopathology

All the pups were deeply anesthetized and then perfused with a formalin solution (Sigma, St. Louis, MO, USA) by intracardiac puncture at 13th day, because is the common timeframe of saccular to alveolar development in rats, similar to preterm human infants.⁶ Next, the trachea was cannulated with an 18G catheter (Introcan Safety, Braun, Germany) connected to a three-way stopcock and a central venous pressure measuring tube (Manometer Set, Smiths Medical, USA), which had been filled with PBS-formalin. The lungs were gently expanded with the formalin solution until reaching a stable pressure of 20 cmH₂O. The tracheas were ligated, and each cardiopulmonary block was carefully dissected, excised, and immersed in a vial of PBS-formalin and then processed for routine paraffin embedding. Five-micrometer thick sections were obtained from the frontal plane of both lungs. Histological findings consistent with the microscopic description of bronchopulmonary dysplasia were intentionally sought; i.e., alveolar spaces enlarged by the destruction of alveolar septa,³³ interstitial and alveolar infiltrate of inflammatory cells such as lymphocytes, macrophages, and neutrophils, bronchiolar hyperplasia determined by an increase in squamous cells that limit the internal surface of the bronchioles,³⁴ and defined peribronchial edema with an excessive amount of fluid in the peribronchial interstitial tissue.³⁵

Radial alveolar count

Digital images were obtained from sections stained with hematoxylin and eosin using an Infinity1 camera (Lumenera Corporation, Ottawa, ON, USA) connected to an Axio ImagerZ1 light microscope (Zeiss Microscopy, Oberkochen, Germany) at a magnification of 10×. In total, 560 areas were examined, 20 from each pup. The degree of alveolarization was measured by calculating the RAC according to the method established by Emery and

Table 1. Genes of cognate mRNAs quantified by RT-qPCR in this study.

Gene symbol	Gene name	Referencea
<i>AhR</i>	Aryl hydrocarbon receptor	Rn00565750_m1
<i>Cyp1a1</i>	Cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1	Rn00487218_m1
<i>Cyp1b1</i>	Cytochrome P450, family 1, subfamily b, polypeptide 1	Rn00564055_m1
<i>Nqo1</i>	NAD(P)H dehydrogenase 1, quinone 1	Rn00566528_m1
<i>Ugt1a6</i>	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A6	Rn00756113_m1
<i>Aldh1a1</i>	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1	Rn00755484_m1
<i>Aldh3a1</i>	Aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1	Rn00694669_m1
<i>Gsta1</i>	Glutathione S-transferase A1 (alpha-class GST)	Rn01757146_m1

^a<https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-assays/taqman-gene-expression.html>

Mithal.³⁶ An investigator blind to the study group examined the digital images twice to determine the RAC. Any RAC values that did not match both examinations were reviewed a third time. The RAC was evaluated as the number of closed alveoli transected by a line drawn perpendicular to the terminal bronchiole toward the nearest pleura. Histological evidence of tissue injury was positive if one of the following was observed: (1) accumulation of neutrophils in the alveolar or interstitial space, (2) thickening of the alveolar wall, or (3) evidence of hemorrhaging or atelectasis.³⁷

Mean linear intercept

Digital images of the hematoxylin and eosin stained lung sections were obtained using an AxioCam HRm camera (Zeiss Microscopy) connected to an Axio ImageZ1 light microscope at 10× magnification. We use the semi-automated method proposed by Crowley *et al.*³⁸ to assess the mean free distance between gas exchange surfaces in the acinar airway complex. A set of images of 800 × 600 pixels were generated; fields with not entirely tissue were excluded. Five images per individual and three individuals

per group were included in the analysis. On average 1093 chords per image and 5469 per lung were assessed using the protocol for semi-automated quantification using ImageJ program with an overlaid of 20 semi-transparent horizontal and 20 semi-transparent vertical lines. Based on the described method, the number and size of the alveolar were determined.

Analysis of fibrosis

The degree of fibrosis in the lungs was evaluated using paraffin sections stained with Masson’s trichrome. Samples were systematically scanned in a microscope using a 20× objective. Five fields were photographed from each pup lung and were randomly numbered in a blind fashion; fields predominantly occupied with portions of large bronchi or vessels were not counted. A certified pathologist assessed the photographs, recording the highest degree of fibrosis in every field according to a modified Ashcroft scale,³⁹ in which fibrosis was scored using a 9-grade scale. Grade 0 indicated no fibrotic burden in the smallest fibers in the alveolar walls and normal lungs. Grade 1 denoted isolated light fibrotic changes, a septum

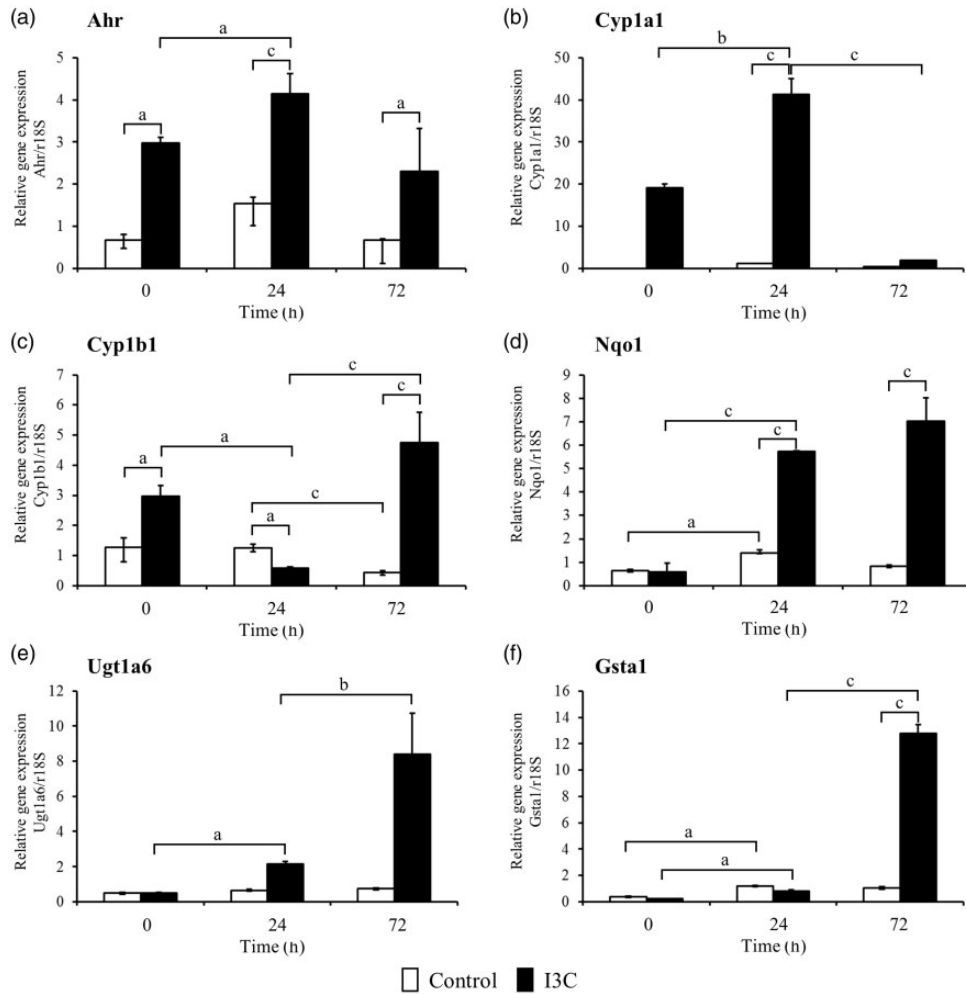


Figure 2. Effect of I3C prenatal administration in relative gene expression of *Ahr* (a), *Cyp1a1* (b), *Cyp1b1* (c), *Nqo1* (d), *Ugt1a6* (e), and *Gsta1* (f) in both experimental groups: control group (open bars; pups exposed to 21% O₂; n = 16) and I3C group (closed bars; pups from pregnant dams administered with 100 mg/kg of I3C and exposed to 21% O₂; n = 16). All genes were evaluated at 0, 24, and 72 h after birth in rat pup lungs. ^aP < 0.05, ^bP < 0.01, and ^cP < 0.001.

less than or equal to three times thicker than normal, and alveoli partly enlarged and rarefied but without fibrotic masses present. Grade 2 indicated clearly fibrotic changes with a septum more than three times thicker than normal with knot-like formations that were not connected to each other and partly enlarged and rarefied alveoli without fibrotic masses. Grade 3 indicated contiguous fibrotic walls and a septum more than three times thicker than normal. Grade 4 signified the presence of separate fibrotic masses. Grade 5 indicated confluent fibrotic masses in >10%, but <50%, of the microscopic fields. Grade 6 denoted the presence of fibrotic masses in >50% of the fields. Grade 7 signified the presence of nearly obliterated alveoli by fibrous masses but still with up to five air

bubbles. Grade 8 indicated the complete obliteration of alveoli by fibrous masses.³⁹

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard deviation. Significance was determined by Student's *t*-test or a one-way ANOVA, followed by Tukey's test. Differences were statistically significant if *P* was less than 0.05. The statistical analysis was performed using IBM-SPSS Statistics software (version 22; IBM Corporation, Armonk, NY, USA). For the cytokine antibody array membrane, normalized background-corrected spot values from all the membranes were processed using R programming language 2.

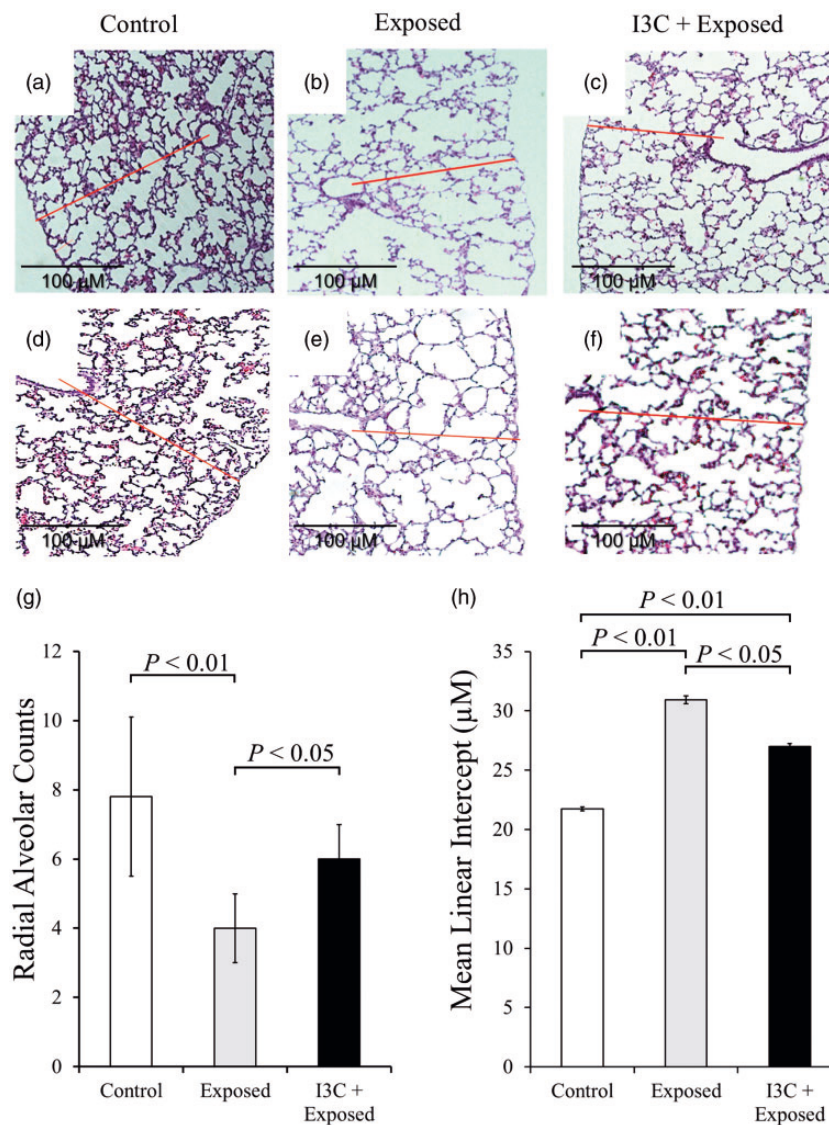


Figure 3. Effect of prenatal I3C administration on radial alveolar counts (RACs) and media linear interception (MLI) in newborn rats exposed to hyperoxia-hypoxia cycles. Histopathological analysis in formalin-fixed rat lungs stained with hematoxylin and eosin on postnatal day 13 (magnification 10 \times): (a and d) control group (air environment 21% O₂; *n* = 10), (b and e) untreated exposed group (80%–10%–21% O₂; *n* = 11), and (c and f) exposed group treated with I3C (100 mg/kg; 80%–10%–21% O₂; *n* = 7). Representative images from two different rats are included. The red line, from the center of the respiratory bronchiole to the nearest interlobular septa, counts each bisected saccule. (g) Graphic representation of mean \pm SEM for RAC of each group, in which the *P* value is depicted. (h) Graphic representation of mean \pm SEM for MLI of each group, in which the *P* value is depicted. (A color version of this figure is available in the online journal.)

Spot values were transformed using a \log_2 scale. Cytokine differential expression between samples was calculated using paired two-tailed *t*-tests. Differences among samples were deemed significant with *P* values of <0.05 .

Results

Effect of hyperoxia-hypoxia cycles and I3C treatment on weight gain

To determine the effect of hyperoxia-hypoxia cycles and I3C treatment in neonatal rats, the body weight was recorded until day 13 of life and compared within each age studied. We found that neonatal rats exposed to hyperoxia-hypoxia had a lower mean body weight (20 ± 1 g) compared with control pups (25 ± 3 g; $P < 0.05$). When pregnant dam rats were treated with I3C and pups were exposed to hyperoxia-hypoxia cycles, the mean body weight of the offspring was a quite similar to that of the exposed group (22 ± 1 g) but they did not reach to the control group ($P > 0.05$; Figure 1(b)).

Activation of AhR-dependent genes by I3C

To determine if prenatal activation of AhR-dependent genes in rat pup lungs was sustained at 0, 24, and 72 h after birth, AhR-related genes (*Ahr*, *Cyp1a1*, *Cyp1b1*, *Nqo1*, *Ugt1a6*, *Gsta1*, *Aldh1a1*, and *Aldh1a3*) were quantified by RT-qPCR assays (Figure 2). Previously, to evaluate the effect of corn oil on genetic expression, the expression levels of the *Ahr* and *Cyp1a1* genes were compared in a group without treatment and another treated with corn oil. No significant differences were observed between the expression of *Ahr* and *Cyp1a1* between the groups during 72 h of evaluation (data not shown), then the group of animals treated with corn oil was used as control in the subsequent experiments. The *Ahr* gene expression was found to be twofold higher in the I3C group than that in the

control group at birth ($P < 0.05$), and this effect was higher at 24 h, followed by a drop at 72 h (Figure 2(a)). In a similar pattern, the *Cyp1a1* gene expression increased 40-fold in the I3C group compared with that in the control group at 24 h ($P < 0.001$; Figure 2(b)).

The *Cyp1b1* gene expression in the I3C group exhibited an increase at birth ($P < 0.05$), followed by a reduction at 24 h and a fourfold increase after 72 h compared with that in the control group ($P < 0.01$; Figure 2(c)). The *Nqo1* gene expression levels were similar at birth in both groups; however, at 24 and 72 h after birth, these levels were significantly higher than those in the control group ($P < 0.01$; Figure 2(d)).

The *Ugt1a6* and *Gsta1* gene expression levels followed a similar pattern in the I3C group, indicating a 7-fold (Figure 2(e)) and 11-fold (Figure 2(f)) increase at 72 h compared with those in the control group ($P < 0.01$ and $P < 0.001$), respectively. The *Aldh1a1* and *Aldh3a1* gene expression levels did not differ significantly between the experimental groups (data not shown).

These results indicate that I3C, when prenatally administered to dams, activates AhR-dependent genes in exposed pups.

The effect of hyperoxia-hypoxia exposure on lung histopathology

Histopathological examination of lung sections in pups exposed to hyperoxia-hypoxia cycles revealed histological signs of alveolar arrest, poor alveolar septation, and enlarged terminal air sacs (Figure 3(a) to (f)). The mean RAC was significantly lower, as expected,⁵ in the exposed group (4.0 ± 1.0) compared with that in the control group (8.0 ± 2.0 ; $P < 0.01$; Figure 3(g)). Pups from the exposed group treated with I3C presented an increase in the mean RAC (6.0 ± 1.0) compared with untreated exposed pups ($P < 0.05$; Figure 3(g)); meanwhile, the MLI was higher in the exposed group ($30.90 \pm 0.329 \mu\text{m}$) than control group

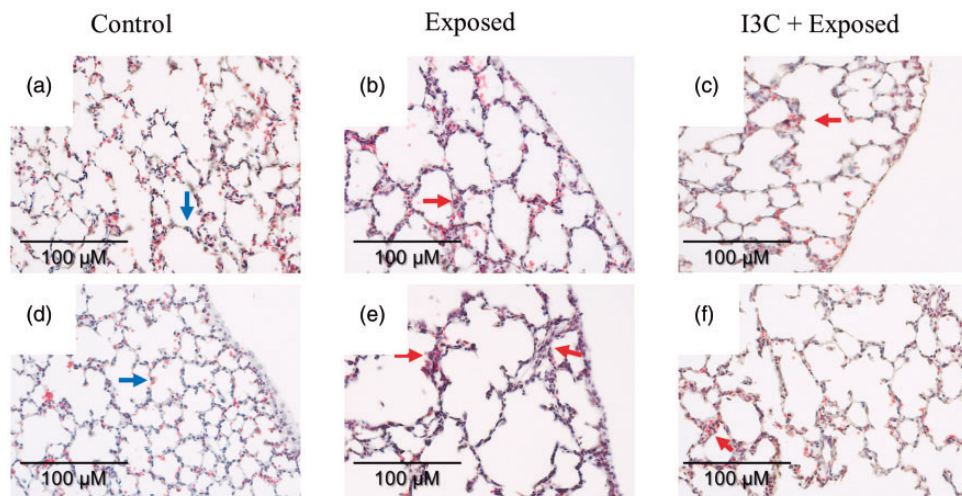


Figure 4. Fibrotic changes by prenatal I3C administration in the lungs of newborn rats exposed to hyperoxic-hypoxic cycles. Histopathological analysis of formalin-fixed rat lungs stained with Masson's trichrome on postnatal day 13 (magnification 20 \times): blue arrows indicate normal lung structure, and red arrows denote isolated alveolar septa with gentle fibrotic changes. Control group (a and d) (air environment of 21% O_2 ; $n = 5$), (b and e) untreated exposed group (80%–10%–21% O_2 ; $n = 5$), and (c and f) exposed group treated with I3C (100 mg/kg; 80%–10%–21% O_2 ; $n = 5$). Five fields were photographed for each pup and were randomly numbered in a blind fashion; fields predominantly occupied by portions of large bronchi or vessels were not counted. (A color version of this figure is available in the online journal.)

Table 2. Main findings of fibrosis by hyperoxia-hypoxia cycles and I3C treatment.

Group	Fibrosis scoring
Control	Predominately normal lung architecture.
Exposed	Fibrosis alveolar septa: clearly fibrotic changes (septum >3× thicker than normal) with knot-like formation but not connected to each other lung structure, alveoli partly enlarged and rarefied but no fibrotic masses.
I3C + Exposed	Predominately normal lung architecture.

($21.74 \pm 0.1843 \mu\text{m}$; $P < 0.01$). Pups from the exposed group treated with I3C presented a decrease in the mean MLI ($27 \pm 0.23 \mu\text{m}$) compared with untreated exposed pups ($P < 0.05$; Figure 3(h)). Additionally, in four individual pups of the exposed group, moderate emphysema was found but was less common in pups from the I3C group; it was not present in pups from the control group (data not shown). Additionally, approximately 60% of individuals in the exposed group presented peribronchial edemas, hemorrhages, interstitial or alveolar infiltrates (mainly lymphocytes and macrophages and rarely neutrophils), or bronchial hyperplasia, but pups from the I3C group did not present any of these alterations (data not shown).

In the fibrosis analysis, no field exhibited a fibrosis degree greater than one, according to the modified Ashcroft scale (Figure 4(a) to (f)). The severity of the lesions varied from one region to another with the spectrum of microscopic fields ranging from normal lung to complete fibrosis. Lung sections from control animals revealed predominately normal lung architecture (grade 0). In the exposure animals group, we observed fibrosis alveolar septa, clear fibrotic changes (septum >3× thicker than normal) with knot-like formation but not connected to each other lung structure; alveoli partly enlarged and rarefied, but no fibrotic masses (grade 1), and when the animals were treated with I3C compound they showed a pattern similar to the control group (grade 0; Table 2). Some pups showed cell conglomerates rather than an increase in the extracellular matrix. However, further studies are needed to confirm this effect and whether it is dependent on the evaluation time.

Effect of I3C on inflammatory cytokines

Additionally, to elucidate the anti-inflammatory effect of I3C, a cytokine antibody array membrane was employed to analyze plasma samples from pups six days after birth (supplementary material). We choose P6 due to the equivalence in the saccular stage in preterm human infants.⁶ The results indicated that the expression of eight inflammatory mediators (tumor necrosis factor- α (TNF α), interleukin-13 (IL-13), vascular endothelial growth factor (VEGF), L-selectin, monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1), agrin, IL-1R6, and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) were repressed in the exposed group compared with that in the control group; however, only L-selectin, MCP1, agrin, IL-1R6, and TIMP1 were statistically significant ($P < 0.05$), and the expression of these

proteins was recovered by treatment (Figure 5(a)). Other proteins, such as leptin and IL-4, were upregulated in the exposed group, and they reached values of 30- and 180-fold, respectively, in the I3C group ($P < 0.05$; Figure 5(b)). Fractalkine expression was downregulated to <10% in the exposed group and 1% in the I3C group ($P < 0.05$) with respect to that in the control group. Although matrix metalloproteinase 8 (MMP-8), IL-2, and IL-6 were upregulated in the I3C group ($P < 0.01$), they were not modified in the exposed group.

Discussion

This study aimed to test the hypothesis that treatment of pregnant rats with I3C, an AhR inducer, would protect their offspring from hyperoxia- and hypoxia-induced lung injury. Oxygen toxicity in the lungs is mediated by ROS, and these molecules participate in both abnormal and normal signaling pathways, such as cell growth, differentiation, and inflammatory response.⁴⁰ However, when ROS production exceeds the antioxidant capacity of the cells, oxidative stress ensues, producing cellular and tissue damage through lipid peroxidation, DNA damage, and protein oxidation; thus, there are important antioxidant enzymatic lung defenses (e.g., superoxide dismutase [SOD], catalase, and glutathione peroxidase).⁴⁰ The antioxidant system is relatively deficient in immature neonates, making them more vulnerable to oxidative stress.⁴¹ For this reason, the activation or overexpression of these antioxidant systems in the first days of life has been studied in animal hyperoxia-hypoxia models. Overexpression of extracellular SOD in the respiratory epithelial cells of newborn mice exposed to hyperoxia improves survival and preserves the proliferation of type II alveolar cells.^{42,43} Nevertheless, another way to activate antioxidant enzymes is through modulation of the AhR, since its activation, also regulated by Nrf2, increases the expression of phase I and phase II enzymes (e.g., the CYP450 and NQO1).⁴⁴ The function of AhR in rodents exposed to hyperoxia has been previously reported. AhR-mediated signaling protects newborn mice from hyperoxic damage by facilitating endothelial and epithelial cell proliferation and thereby mitigating the disruption of alveolization and vascularization.^{45,46}

This study confirms that I3C activates the antioxidant system in exposed pups through the transplacental barrier, activating AhR signaling pathway and supporting the hypothesis that prenatal activation of protective and antioxidant enzymes may play a role in oxidative stress diseases. It has been found that I3C in the diet of pregnant females results in the appearance of I3C metabolites in the liver of mothers and neonates, provoking the induction of the Cyp1a1 and Cyp1b1 genes.⁴⁷ In addition, our results are similar to those demonstrating the effects of other CYP450 inducers in pups from pre-treated mice with β -naphthoflavone (β NF) and exposed to postnatal hyperoxia⁴⁸ as well as to those demonstrating the protective effect of β NF in adult rats with acute lung injury.^{22,49} Additionally, I3C has suppressed immune cell infiltration and pro-inflammatory cytokine production (IL-1b, IL-6, and TNF α) in a mouse model of lipopolysaccharide-

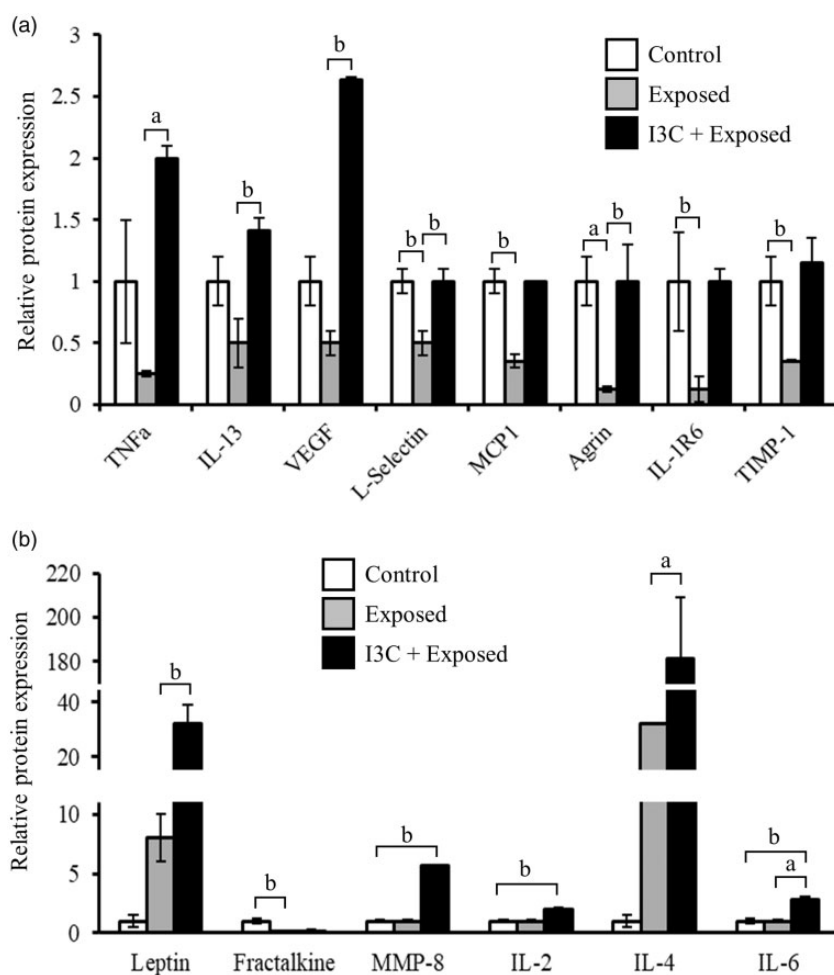


Figure 5. Comparison of cytokine expression levels through an inflammation antibody array. The levels of cytokine expression are relative to the expression of the control group. Membranes were probed with plasma protein extracts from control pups (white bars), pups exposed to hyperoxia–hypoxia cycles (gray bars), and pups from the exposed group treated with I3C (black bars). (a) Quantification of the signals (spots by duplicates) of eight candidate targets for which the control group exhibited significant downregulation compared with the exposed pups, but its expression was recovered by I3C treatment (TNF α , IL-13, VEGF, L-selectin, MCP1, agrin, IL-1R6, and TIMP1). (b) Quantification of the signals (spots by duplicates) of six candidate targets for which expression in the untreated exposed or I3C-treated group increased (leptin, MMP-8, IL-2, IL-4, and IL-6) or decreased (fractalkine) compared with that in the control group. ^a $P < 0.01$ and ^b $P < 0.05$.

induced acute lung injury.⁵⁰ Hyperoxia alone has induced *Cyp1a1* and *Cyp1a2* activation in the lungs and liver, probably via AhR-mediated mechanisms involving endogenous ligands for the AhR.^{21,48,51}

We observed that pups in both the I3C group and exposed group had less body weight gain than those in the control group. In this study, I3C was suspended in corn oil (with a high n-6/n-3 ratio). Corn oil is one of the most common vehicles used in animal studies. It is known that this kind of oil increases the fat content and enhances the cytochrome P-450 activity as other enzymes.⁵² Corn oil could aggravate lipid peroxidation in animals because its composition contains a high proportion of omega-6 PUFAs, but this condition has been associated with high concentration of corn oil in the diet (more than 20%).⁵³ Nevertheless, the corn oil doses used in this study are comparable with a standard diet for rodents.

The histological analysis confirmed that I3C-treated pups that were exposed to hyperoxia–hypoxia cycles had higher RAC and less MLI than untreated exposed pups, demonstrating that I3C attenuates lung damage from

oxygen exposure. Moreover, a degree of fibrosis greater than one was not found,³⁹ possibly owing to the short duration of the experiment (12 days), since fibrosis model studies have indicated that fibroproliferation occurs 2–14 days after the insult and fibrosis is established 14–28 days later.⁵⁴ In the present study, rat pups were sacrificed after 12 days of hyperoxia–hypoxia exposure, and it is conceivable that in this period, fibrosis was not yet established. Notably, in the I3C-exposed group, the percentage of animals with fibrosis was lower than that in the control group, indicating a relationship between the AhR and transforming growth factor beta (TGF- β) signaling pathways. Although human and mouse TGF- β promoters do not have canonical AhR response motifs, ligand-induced AhR activation represses TGF- β 2 transcription and induces PAI-1 and PAI-2 expression, which may further suppress TGF- β signaling, hence diminishing fibrosis deposition.⁵⁵ Another study found that TGF- β levels are overexpressed in mouse embryonic fibroblasts from AhR-null mice, revealing that overactivation of the AhR in mouse embryonic fibroblasts reduces the levels of TGF- β 1.⁵⁶ These, and our findings, suggest that

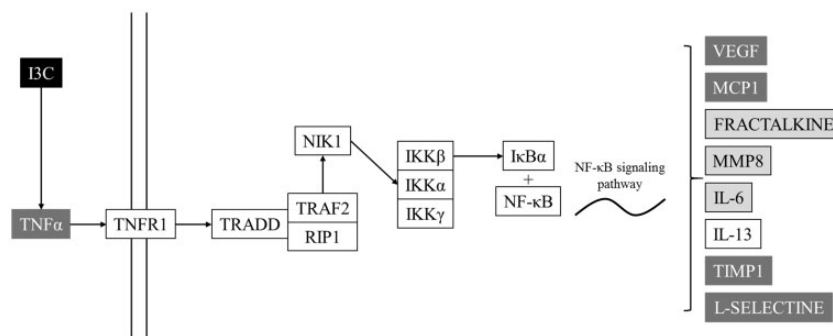


Figure 6. Hypothetical scheme of I3C effect on the inflammation process induced by hyperoxia-hypoxia cycles. Tumor necrosis factor- α (TNF α) can induce the inflammation process through its receptor, TNFR1, which mediates the association of some adaptor proteins, such as TRADD or TRAF2, which, in turn, initiate the recruitment of signal transducers. TNFR1 signaling activates several genes controlled by the NF- κ B pathway. Protein names in dark gray boxes (VEGF, MCP1, TIMP1, L-selectin, and TNF α) were upregulated, whereas genes in light gray boxes (fractalkine, MMP-8, and IL-6) were downregulated by I3C. Adapted from https://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=map04668&keyword=TNF%20cytokines

activation of the AhR by I3C in newborn rats could reduce fibrosis caused by hyperoxia-hypoxia exposure, thus improving alveolarization. An anti-inflammatory response of I3C was evaluated, in an exploratory way, by an array of cytokines, including those associated with T cell subsets and those regulated by NF- κ B, which is a central cellular mediator of inflammation and is linked to the pathogenesis of BPD.⁵⁷ The main modified proteins were those involved in the regulation of the NF- κ B signaling pathway (Figure 6). We hypothesized that I3C activates TNF α and thus activates the NF- κ B pathway, which promotes the expression of VEGF, MCP1, TIMP1, L-selectin, MMP-8, IL-6, and IL-13, and represses fractalkine expression. The higher levels of TNF α in the I3C-treated group could be explained by the fact that NF- κ B increases TNF α expression. We also hypothesized that I3C can promote T helper type (Th2) cells, which secrete IL-4. Finally, although TNF α is a well-known cytokine inducer, the high level of IL-4 observed, compared with the pro-inflammatory cytokines, had a protective effect on BPD. Accordingly, previous studies have shown a beneficial effect of I3C on the levels of pro-inflammatory mediators and the expression of some cytokines.^{58,59}

The present model, unlike those used in other studies, uses periods of hypoxia (with the fraction of inspired oxygen at 10%) that increase the deleterious effects of hyperoxia,⁶⁰ which we believe creates a better approximation to the clinical scenario faced by human preterm infants during intensive care.

The I3C could be considered as a possible preventive agent that permits the NF- κ B activation. This has shown promise in clinical trials aimed at preventing BPD. However, it is necessary to demonstrate in the near future the effect of I3C treatment on the activation of NF- κ B for a better understanding of the health benefits in premature newborns.

The authors recognize that this study has several limitations. The determination of the inflammatory cells number, evaluation of oxidative stress, evaluation of generation of mucous associated to I3C treatment,⁶¹ and the confirmation of levels of interleukins, including to NF- κ B and TGF- β , in the bronchoalveolar lavage fluid a large number of animals are necessary to strengthen our conclusions. Then, additional studies are needed to evaluate the

molecular mechanisms involved in the development of lung damage and the effect of I3C in newborn rats.

Conclusions

In summary, we propose that oral administration of AhR ligands is safe for pregnant rats and increases the activity of antioxidant enzymes in their puppies, resulting in a decrease in pulmonary lesion induced by hyperoxia-hypoxia, thus improving alveolarization and RAC and decreasing fibrosis. Our findings are consistent with the concept that a functional response of AhR to harmless dietary substrates during pregnancy can protect against pulmonary injury induced by hyperoxia-hypoxia.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

GGN, LVA, AVV, TCC, and KGG conducted the lab activities; GGN, RCDD, LECP, ABQ, and JEPS conducted data analysis; MBL, IME, and FCT designed the strategy for experiments; IME, LECP, ABQ, VJLD, JEPS, and FCT supervised the lab work; GGN, MBL, VJLD, and FCT co-wrote the final version of the manuscript; GGN, MBL, VJLD, IME, and FCT revised the final version of the manuscript; FCT contributed with the financial support. All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank María Isabel García-Cruz for her technical and administrative assistance. Authors thank Jorge Saldaña, Fabiola Velázquez, and Ricardo Jiménez for their technical support.

DECLARATION OF CONFLICTING INTERESTS


The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.


FUNDING

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was supported by the Tecnológico de

Monterrey and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología [grant number 242616].

ORCID IDS

Víctor J Lara-Díaz  <https://orcid.org/0000-0002-1498-8561>

Fabiola Castorena-Torres  <https://orcid.org/0000-0002-1157-0004>

REFERENCES

- Davidson LM, Berkelhamer SK. Bronchopulmonary dysplasia: chronic lung disease of infancy and long-term pulmonary outcomes. *J Clin Med* 2017;**6**:4
- Chess PR, D'Angio CT, Pryhuber GS, Maniscalco WM. Pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Semin Perinatol* 2006;**30**:171–8
- Saugstad OD. Bronchopulmonary dysplasia-oxidative stress and antioxidants. *Semin Neonatol* 2003;**8**:39–49
- Berkelhamer SK, Farrow KN. Developmental regulation of antioxidant enzymes and their impact on neonatal lung disease. *Antioxid Redox Signal* 2014;**21**:1837–48
- Ratner V, Slinko S, Utkina-Sosunova I, Starkov A, Polin RA, Ten VS. Hypoxic stress exacerbates hyperoxia-induced lung injury in a neonatal mouse model of bronchopulmonary dysplasia. *Neonatology* 2009;**95**:299–305
- O'Reilly M, Thebaud B. Animal models of bronchopulmonary dysplasia. The term rat models. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2014;**307**:L948–58
- Burbach KM, Poland A, Bradfield CA. Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;**89**:8185–9
- Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y. Ah receptor, a novel ligand-activated transcription factor. *J Biochem* 1997;**122**:1075–9
- Beischlag TV, Luis Morales J, Hollingshead BD, Perdev GH. The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2008;**18**:207–50
- Denis M, Gustafsson JA, Wikstrom AC. Interaction of the Mr = 90,000 heat shock protein with the steroid-binding domain of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 1988;**263**:18520–3
- Carver LA, Bradfield CA. Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo. *J Biol Chem* 1997;**272**:11452–6
- Hord NG, Perdev GH. Physicochemical and immunocytochemical analysis of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator: characterization of two monoclonal antibodies to the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. *Mol Pharmacol* 1994;**46**:618–26
- Pollenz RS, Sattler CA, Poland A. The aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein show distinct subcellular localizations in Hepa 1c1c7 cells by immunofluorescence microscopy. *Mol Pharmacol* 1994;**45**:428–38
- Schulte KW, Green E, Wilz A, Platten M, Daumke O. Structural basis for aryl hydrocarbon receptor-mediated gene activation. *Structure* 2017;**25**:1025–33
- Rushmore TH, Pickett CB. Transcriptional regulation of the rat glutathione S-transferase Ya subunit gene. Characterization of a xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by phenolic antioxidants. *J Biol Chem* 1990;**265**:14648–53
- Favreau LV, Pickett CB. Transcriptional regulation of the rat NAD(P)H:quinone reductase gene. Identification of regulatory elements controlling basal level expression and inducible expression by planar aromatic compounds and phenolic antioxidants. *J Biol Chem* 1991;**266**:4556–61
- Emi Y, Ikushiro S, Iyanagi T. Xenobiotic responsive element-mediated transcriptional activation in the UDP-glucuronosyltransferase family 1 gene complex. *J Biol Chem* 1996;**271**:3952–8
- Fujisawa-Sehara A, Sogawa K, Yamane M, Fujii-Kuriyama Y. Characterization of xenobiotic responsive elements upstream from the drug-metabolizing cytochrome P-450c gene: a similarity to glucocorticoid regulatory elements. *Nucleic Acids Res* 1987;**15**:4179–91
- Couroucli XI, Welty SE, Geske RS, Moorthy B. Regulation of pulmonary and hepatic cytochrome P4501A expression in the rat by hyperoxia: implications for hyperoxic lung injury. *Mol Pharmacol* 2002;**61**:507–15
- Chen C, Kong AN. Dietary chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling. *Free Radic Biol Med* 2004;**36**:1505–16
- Jiang W, Welty SE, Couroucli XI, Barrios R, Kondraganti SR, Muthiah K, Yu L, Avery SE, Moorthy B. Disruption of the Ah receptor gene alters the susceptibility of mice to oxygen-mediated regulation of pulmonary and hepatic cytochromes P4501A expression and exacerbates hyperoxic lung injury. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;**310**:512–9
- Shivanna B, Zhang W, Jiang W, Welty SE, Couroucli XI, Wang L, Moorthy B. Functional deficiency of aryl hydrocarbon receptor augments oxygen toxicity-induced alveolar simplification in newborn mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013;**267**:209–17
- Schwartz E, Zelig R, Parker A, Johnson S. Vitamin a supplementation for the prevention of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants: an update. *Nutr Clin Pract* 2017;**32**:346–53
- Guthrie G, Premkumar M, Burrin DG. Emerging clinical benefits of new-generation fat emulsions in preterm neonates. *Nutr Clin Pract* 2017;**32**:326–36
- Leibelt DA, Hedstrom OR, Fischer KA, Pereira CB, Williams DE. Evaluation of chronic dietary exposure to indole-3-carbinol and absorption-enhanced 3,3'-diindolylmethane in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci* 2003;**74**:10–21
- Ampofo E, Lachnitt N, Rudzitis-Auth J, Schmitt BM, Menger MD, Laschke MW. Indole-3-carbinol is a potent inhibitor of ischemia-reperfusion-induced inflammation. *J Surg Res* 2017;**215**:34–46
- Borger JG, Lau M, Hibbs ML. The influence of innate lymphoid cells and unconventional T cells in chronic inflammatory lung disease. *Front Immunol* 2019;**10**:1597
- Garth J, Barnes JW, Krick S. Targeting cytokines as evolving treatment strategies in chronic inflammatory airway diseases. *Int J Mol Sci* 2018;**19**:3402
- Australian code for the care and use of animals for scientific purposes*. 8th ed. National Health and Medical Research Council, 2013, https://www.nhrc.gov.au/about-us/publications/australian-code-care-and-use-animals-scientific-purposes#toc_1833 (2013, accessed 9 October 2020).
- Anesthesia (Guideline). Vertebrate Animal Research of Iowa University, USA, <https://animal.research.uiowa.edu/iacuc-guide-lines-anesthesia> (2020, accessed 9 October 2020).
- Ratner V, Kishkurno SV, Slinko SK, Sosunov SA, Sosunov AA, Polin RA, Ten VS. The contribution of intermittent hypoxemia to late neurological handicap in mice with hyperoxia-induced lung injury. *Neonatology* 2007;**92**:50–8
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001;**25**:402–8
- Funkhouser WK. Chapter 9: Pulmonary pathology. In: Reisner HM (ed.) *Pathology: a modern case study*. 2nd ed. New York, NY: McGraw-Hill, 2020.
- Coalson JJ. Pathology of bronchopulmonary dysplasia. *Semin Perinatol* 2006;**30**:179–84
- Kemp WL, Burns DK, Brown TG. *Pathology: the big picture*. New York, NY: McGraw-Hill, 2008.
- Emery JL, Mithal A. The number of alveoli in the terminal respiratory unit of man during late intrauterine life and childhood. *Arch Dis Child* 1960;**35**:544–7
- Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, Groshong SD, Matthay MA, Slutsky AS, Kuebler WM; Group ALiAS. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011;**44**:725–38
- Crowley G, Kwon S, Caraher EJ, Haider SH, Lam R, Batra P, Melles D, Liu M, Nolan A. Quantitative lung morphology: semi-automated measurement of mean linear intercept. *BMC Pulm Med* 2019;**19**:206

39. Hubner RH, Gitter W, El Mokhtari NE, Mathiak M, Both M, Bolte H, Freitag-Wolf S, Bewig B. Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples. *Biotechniques* 2008;**44**:507-11
40. Buczynski BW, Maduekwe ET, O'Reilly MA. The role of hyperoxia in the pathogenesis of experimental BPD. *Semin Perinatol* 2013;**37**:69-78
41. Hilgendorff A, Ma O. Bronchopulmonary dysplasia early changes leading to long-term consequences. *Front Med* 2015;**2**:1-10
42. Auten RL, O'Reilly MA, Oury TD, Nozik-Grayck E, Whorton MH. Transgenic extracellular superoxide dismutase protects postnatal alveolar epithelial proliferation and development during hyperoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;**290**:L32-40
43. Wispe JR, Warner BB, Clark JC, Dey CR, Neuman J, Glasser SW, Crapo JD, Chang LY, Whitsett JA. Human Mn-superoxide dismutase in pulmonary epithelial cells of transgenic mice confers protection from oxygen injury. *J Biol Chem* 1992;**267**:23937-41
44. Shivanna B, Zhang S, Patel A, Jiang W, Wang L, Welty SE, Moorthy B. Omeprazole attenuates pulmonary aryl hydrocarbon receptor activation and potentiates hyperoxia-induced developmental lung injury in newborn mice. *Toxicol Sci* 2015;**148**:276-87
45. Bhattacharya S, Zhou Z, Yee M, Chu CY, Lopez AM, Lungner VA, Solleti SK, Resseguie E, Buczynski B, Mariani TJ, O'Reilly MA. The genome-wide transcriptional response to neonatal hyperoxia identifies AhR as a key regulator. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2014;**307**:L516-23
46. Shivanna B, Maity S, Zhang S, Patel A, Jiang W, Wang L, Welty SE, Belmont J, Coarfa C, Moorthy B. Gene expression profiling identifies cell proliferation and inflammation as the predominant pathways regulated by aryl hydrocarbon receptor in primary human fetal lung cells exposed to hyperoxia. *Toxicol Sci* 2016;**152**:155-68
47. Larsen-Su SA, Williams DE. Transplacental exposure to indole-3-carbinol induces sex-specific expression of CYP1A1 and CYP1B1 in the liver of Fischer 344 neonatal rats. *Toxicol Sci* 2001;**64**:162-8
48. Couroucli XI, Liang YW, Jiang W, Barrios R, Moorthy B. Attenuation of oxygen-induced abnormal lung maturation in rats by retinoic acid: possible role of cytochrome P4501A enzymes. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;**317**:946-54
49. Sinha A, Muthiah K, Jiang W, Couroucli X, Barrios R, Moorthy B. Attenuation of hyperoxic lung injury by the CYP1A inducer beta-naphthoflavone. *Toxicol Sci* 2005;**87**:204-12
50. Jiang J, Kang TB, Shim DW, Oh NH, Kim TJ, Lee KH. Indole-3-carbinol inhibits LPS-induced inflammatory response by blocking TRIF-dependent signaling pathway in macrophages. *Food Chem Toxicol* 2013;**57**:256-61
51. Zhang S, Patel A, Chu C, Jiang W, Wang L, Welty SE, Moorthy B, Shivanna B. Aryl hydrocarbon receptor is necessary to protect fetal human pulmonary microvascular endothelial cells against hyperoxic injury: mechanistic roles of antioxidant enzymes and RelB. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015;**286**:92-101
52. Takashima K, Mizukawa Y, Morishita K, Okuyama M, Kasahara T, Toritsuka N, Miyagishima T, Nagao T, Urushidani T. Effect of the difference in vehicles on gene expression in the rat liver - analysis of the control data in the toxicogenomics project database. *Life Sci* 2006;**78**:2787-96
53. Rahman KM, Sugie S, Okamoto K, Watanabe T, Tanaka T, Mori H. Modulating effects of diets high in omega-3 and omega-6 fatty acids in initiation and postinitiation stages of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Jpn J Cancer Res* 1999;**90**:31-9
54. Jenkins RG, Moore BB, Chambers RC, Eickelberg O, Königshoff M, Kolb M, Laurent GJ, Nanthakumar CB, Olman MA, Pardo A, Selman M, Sheppard D, Sime PJ, Tager AM, Tatler AL, Thannickal VJ, White ES, AAoRCaM B. An official American Thoracic Society workshop report: use of animal models for the preclinical assessment of potential therapies for pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2017;**56**:667-79
55. Puga A, Tomlinson CR, Xia Y. Ah receptor signals cross-talk with multiple developmental pathways. *Biochem Pharmacol* 2005;**69**:199-207
56. Kung T, Murphy KA, White LA. The aryl hydrocarbon receptor (AhR) pathway as a regulatory pathway for cell adhesion and matrix metabolism. *Biochem Pharmacol* 2009;**77**:536-46
57. Wright CJ, Kirpalani H. Targeting inflammation to prevent bronchopulmonary dysplasia: can new insights be translated into therapies?. *Pediatrics* 2011;**128**:111-26
58. Benson JM, Shepherd DM. Dietary ligands of the aryl hydrocarbon receptor induce anti-inflammatory and immunoregulatory effects on murine dendritic cells. *Toxicol Sci* 2011;**124**:327-38
59. Mohammadi S, Memarian A, Sedighi S, Behnampour N, Yazdani Y. Immunoregulatory effects of indole-3-carbinol on monocyte-derived macrophages in systemic lupus erythematosus: a crucial role for aryl hydrocarbon receptor. *Autoimmunity* 2018;**51**:199-209
60. Berger J, Bhandari V. Animal models of bronchopulmonary dysplasia. The term mouse models. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2014;**307**:L936-47
61. Busbee PB, Menzel L, Alrafas HR, Dopkins N, Becker W, Miranda K, Tang C, Chatterjee S, Singh U, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Indole-3-carbinol prevents colitis and associated microbial dysbiosis in an IL-22-dependent manner. *JCI Insight* 2020;**5**:e127551

(Received May 15, 2020, Accepted September 14, 2020)



Deliver optimal care
with **new** NRP®
8th Edition materials!

American Academy
of Pediatrics
DEDICATED TO THE HEALTH OF ALL CHILDREN®

[Advertising Disclaimer »](#)



PEDIATRICS®

Discover Pediatric Collections on [COVID-19](#) and [Racism and Its Effects on Pediatric Health](#)

Section on Neonatal-Perinatal Medicine Program: Day 1

Animal model of Bronchopulmonary dysplasia, Approach to reality

Gabriela Guzmán-Navarro, Karina Garza-García, Víctor Javier Lara-Díaz and Fabiola Castorena-Torres
Pediatrics May 2018, 142 (1 MeetingAbstract) 170; DOI: https://doi.org/10.1542/peds.142.1_MeetingAbstract.170

Article

Figures & Data

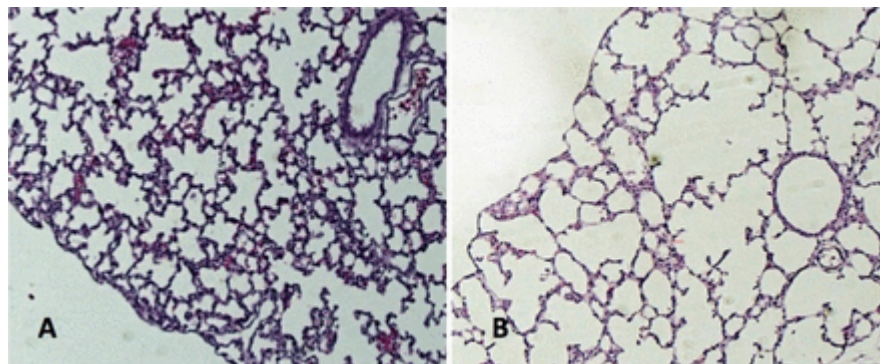
Info & Metrics

Comments

Background and purpose: Of the animal models used for the study of bronchopulmonary dysplasia (BPD), the rodent has advantages over other species: At birth the rats have a stage of lung development equivalent to that of premature humans; in addition, their reproductive cycles and gestation period are of short duration (O'Reilly, 2015). Most animal models use hyperoxia cycles, but introducing intermittent episodes of hypoxemia (inspiratory oxygen fraction of 8% to 10%) mimics more closely the clinical scenario to which preterm infants are exposed, and the deleterious effect of hyperoxia is potentiated (Berger & Bhandari, 2014). We sought to generate a model of BPD based on Ratner's hyperoxia/hypoxia model (Ratner et al., 2007), to evaluate the histopathological and morphometric changes and measure the expression levels of genes associated with the development of BPD. Methods: All animal experiments were performed in accordance with the guidelines set forth by the Institutional Animal Care and Use Committee at Tecnológico de Monterrey, and were approved by our institution's independent institutional review board. One-day-old Sprague-Dawley rat pups (Harlan Laboratories) were maintained at the vivarium of the school of Medicine, housed in cages kept on a 12 h light-

dark cycle at 24 ° C. Dams were permitted food and water ad libitum and pups were reared with alternate dams during the time of experimentation. Litter size ranged from 8 to 12 pups. We followed closely the model described by Ratner in 2007, with a modification consisting of terminating the exposure on the 13th postnatal day instead of the 14th. Results: Hyperoxia-hypoxia exposure resulted in a significantly decreased bodyweight at the 12th day of exposure, and survival rate of exposed pups was 80% on day 13, compared to un-exposed littermates. On radial alveolar count (RAC), exposed pups exhibited poor alveolar septation and enlarged terminal air sacs. The RAC median was 3 on exposed group and 6 in the unexposed group, $p = 0.01$, U Mann-Whitney test. We found significant changes in the gene expression of BPD associated biomarkers in exposed pups at the end of the experiment; monocyte chemoattractant protein-1 (ccl2), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (timp1), angiopoietin 1 (angpt1), vascular endothelial growth factor (vegf), fibroblast growth factor (fgf), hypoxia inducible factor-1 (hif1), transforming growth factor α 1 (tgf- α 1), keratinocyte growth factor (kgf), vascular endothelial growth factor receptor 1 precursor (flt-1) compared to age-matched unexposed controls. Conclusions: Our model resembles human disease. Significant modifications were observed in the expression of biomarkers and damage generation, manifest as a decreased alveolar count in the group exposed to hyperoxia/hypoxia.

Histopathology



[Download figure](#)

[Open in new tab](#)

[Download powerpoint](#)

Fig.1

Histopathology of rat lung in formaldehyde-fixed and hematoxylin and eosin stained on 13th postnatal day in (A) control group, (B) exposed group.

▲ Back to top



[Advertising Disclaimer »](#)

In this issue

Pediatrics

Vol. 142, Issue 1 MeetingAbstract
1 May 2018

[Table of Contents](#)

[Index by author](#)



View this article with **LENS**

[← Previous](#)

[✉ Email Article](#)

[© Request Permissions](#)

[🔔 Article Alerts](#)

[🌐 Citation Tools](#)

[↪ Share](#)

[🖨️ Print](#)

[🔔 Insight Alerts](#)

[Table of Contents](#)

Related Articles

Role of Gut Microbiota in Neonatal Lung Injury: Implications for Bronchopulmonary Dysplasia

Melissa H. Althouse et al., *Pediatrics*, 2019

Assessment of Long-Term Functional Outcomes In A Murine Model Of Bronchopulmonary Dysplasia

Lumeng J. Yu et al., *Pediatrics*, 2021

EXPRESSION AND MODULATION OF AQUAPORIN 5 IN HYPEROXIA-INDUCED LUNG INJURY

Feng Xu et al., *Pediatrics*, 2008

Caffeine Modulates Hyperoxia- Induced Angiogenesis in Newborn Mice

Lori Nielsen et al., Pediatrics, 2017

Caffeine Modulates Hyperoxia- Induced Angiogenesis in Newborn Mice

Vikramaditya Dumpa et al., Pediatrics, 2017

Interleukin-1 receptor antagonist prevents murine bronchopulmonary dysplasia induced by perinatal inflammation and hyperoxia [↗](#)

Marcel F. Nold et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2013

Activation of hypoxia-inducible factors in hyperoxia through prolyl 4-hydroxylase blockade in cells and explants of primate lung. [↗](#)

Tiina M Asikainen et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2005

IL-33-induced neutrophil extracellular traps degrade fibronectin in a murine model of bronchopulmonary dysplasia [↗](#)

Rui Jin et al., Cell Death Discov, 2020

Influence of nonylphenol exposure on basic growth, development, and thyroid tissue structure in F1 male rats [↗](#)

PeerJ

Painless Chronic Pancreatitis Associated with Exocrine Insufficiency [↗](#)

Endocrinology Advisor, 2020

Powered by **TREND MD**



▼ **Related Articles**

No related articles found.

[Google Scholar](#)

▶ **Cited By...**

▶ **More in this TOC Section**

▶ **Similar Articles**

Journal Info

[Editorial Board](#)

[Editorial Policies](#)

[Overview](#)

[Licensing Information](#)

Authors/Reviewers

Sharing Progress in Neonatology (SPIN): Moving towards Individualized Prenatal and Neonatal Care

Incorporating the 33rd International Workshop on Surfactant Replacement, Lübeck, May 31 – June 2, 2018

1

Hyperoxia-Induced Epigenetic Silencing of TGF-Beta Pathway: Potential Implications for Pathogenesis of BPD

M. Bik-Multanowski^{a*}, C. Revhaug^{b*}, A. Grabowska^a, A. Dobosz^a, A. Madetko-Talowska^a, M. Zasada^c, O.D. Saugstad^b

^aDepartment of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland;

^bDepartment of Pediatric Research, University of Oslo and Oslo University Hospital, Oslo, Norway; ^cDepartment of Pediatrics, Faculty of Medicine, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland

* Both authors contributed equally to the study.

Introduction: Supplemental oxygen exposure is a risk factor for development of bronchopulmonary dysplasia (BPD). Reactive oxygen species may damage lung tissue, but hyperoxia has also a potential to alter the genome activity by means of altering DNA methylation. Understanding the epigenetic potential of hyperoxia can enable further improvement of therapeutic strategies in BPD. **Objective:** To identify hyperoxia-related alterations of DNA methylation, which could affect the activity of crucial genetic pathways involved in development of hyperoxia lung injury. **Methods:** 24 newborn mice were randomized to hyperoxia (85% O₂) or normoxia for 14 days continued with normoxia for the subsequent 14 days. The mice were killed on day 28 and lung tissue was analyzed with use of microarrays dedicated for assessment of genome methylation and expression profiles. **Results:** The mean DNA methylation level was higher in the

hyperoxia in comparison with the normoxia group. The analysis of specific DNA fragments revealed hypermethylation of >1,300 gene promoters in the hyperoxia group confirming the presence of the DNA hypermethylation effects of hyperoxia. Further analysis showed significant enrichment of TGF-beta signaling pathway ($p = 0.0013$). The hypermethylated genes included Tgfb1, Crebbp and Creb1, which play central roles in TGF-beta signaling pathway and in cell cycle regulation. The genome expression analysis revealed complementary upregulation of genes that are crucial for cell cycle regulation in the normoxia group (Crebbp, Smad2, Smad3). **Conclusion:** These results suggest involvement of methylation of TGF-beta pathway genes in lung tissue reaction to hyperoxia. The data indicate hyperoxia may be a programming factor in newborn mice.

2

Exposure to Ureaplasma Is Associated with a Pro-Inflammatory State and Increased Risk of Nosocomial Sepsis in Very Immature Preterm Infants

K. Glaser^a, A. Gradzka-Luczewska^b, M. Szymankiewicz^b, C.P. Speer^a

^aUniversity Children's Hospital, University of Würzburg, Würzburg, Germany; ^bDepartment of Neonatology, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland

Background: The pathogenicity of ureaplasma and its impact on inflammation-related neonatal morbidities remains controversial. **Objective:** To study the prevalence of ureaplasma coloniza-

Abstract 8, Table 1. Total albumin and IL-8 after standardized BAL with 4 repeated lavages at 20 mL/kg

Treatment	Albumin, mg	IL-8, pg
Control (ventilation 15 min; $n = 5$)	2.6±0.4	74±55*
200 mg/kg Curosurf® + 4 h ventilation ($n = 6$)	2.3±0.2	207±101
+ 420 µg/kg budesonide + 4 h ventilation ($n = 7$)	2.5±0.9	111±61*
Control <i>E. coli</i> (ventilation 15 min; $n = 7$)	5.5±4.4	142±122
200 mg/kg Curosurf® + 4 h ventilation ($n = 6$)	4.0±1.7	19,600±11,400
+ 420 µg/kg budesonide + 4 h ventilation ($n = 7$)	3.9±2.3	27,600±25,200

Values are mean ± SD. * $p < 0.05$ versus Curosurf.

9

Modified Porcine Surfactant Restores Lung Homeostasis in LPS-Challenged and Artificially Ventilated Adult Rats

M. Kolomaznik^{a,b}, Z. Nova^{a,b}, D. Mokra^{a,b}, I. Zila^{a,b}, J. Kopincova^{a,b}, E. Vidomanova^{a,c}, H. Skovierova^{a,c}, E. Halasova^{a,c}, A. Calkovska^{a,b}

^aBiomedical Center Martin, ^bDepartment of Physiology, and ^cDepartment of Medical Biology, Jessenius Faculty of Medicine, Comenius University, Martin, Slovakia

Introduction: Pulmonary surfactant, an important part of the innate host defense system against invading pathogens, may be inactivated by bacterial endotoxin (lipopolysaccharide, LPS). We evaluated the effects of exogenous surfactant on lung function and surfactant proteins (SPs) in an animal model of LPS-induced lung injury. **Methods:** Adult anesthetized Wistar rats received intratracheally (i.t.) saline (control) or LPS (*E. coli*, O55:B5) at 500 or 1,000 µg/kg bw and were ventilated with 40% oxygen. After 1 h, animals with LPS received no treatment or Curosurf® (Chiesi Farmaceutici, Parma, Italy) at 50 mg of phospholipids/kg. All animals were ventilated for the next 4 h. At the end of the experiment, inflammatory markers and oxidative stress (TBARS) were evaluated in homogenized lung (HL) tissue and bronchoalveolar lavage fluid (BALF). Lung edema was expressed as wet/dry weight ratio. Expression of SP genes SFTPA, SFTPB, SFTPC, SFTPD was analyzed by real-time PCR with RPL-13a used as a reference gene. **Results:** LPS at 500 µg/kg after 5 h from i.t. administration induced lung edema ($p < 0.01$), increased levels of IL-1β ($p < 0.01$), ANGPT2 ($p < 0.05$) in HL and BALF and oxidative stress in HL (TBARS, $p < 0.05$). At least 1.5-fold decrease was present in the expression of all SPs in the lungs after LPS 500 µg/kg ($p < 0.05$ vs. controls), while LPS at 1,000 µg/kg further potentiated this effect. Administration of exogenous surfactant reduced IL-1β, MCP-1 and ANGPT2 in BALF (all $p < 0.05$) and lung edema ($p < 0.05$) and increased the expression of SP-A, B and C. **Conclusions:** In ventilated rats, intratracheal administration of LPS induced changes that resemble bacterial infection with inflammation, oxidative damage and reduced expression of all surfactant proteins. Exogenous surfactant at low dose restores lung function and increases SP-A, SP-B and SP-C expression, which indicates recovery of local immune processes in the lungs.

10

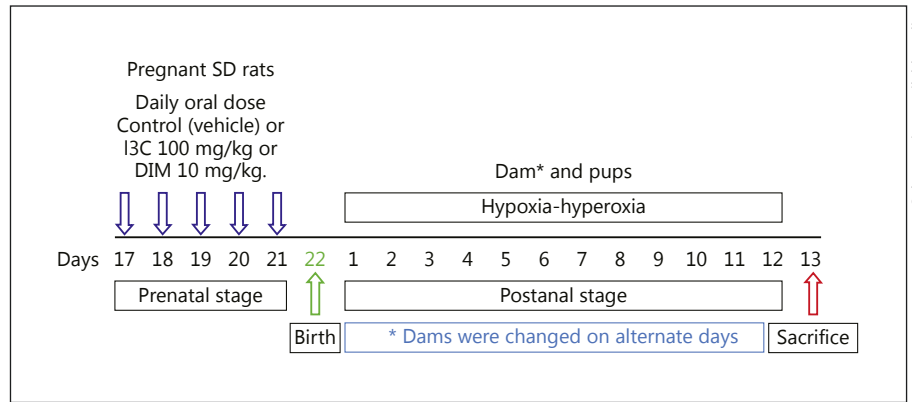
Indole-3-Carbinol and 3,3'-Diindolylmethane Compounds Attenuate Hyperoxia/Hypoxia-Induced Lung Injury in Newborn Rats

G. Guzmán-Navarro, A. Vaquera-Vázquez, T. Cuevas-Cerda, P. Morales-Martínez, M. Bermúdez de León, L.E. Cuervo-Pérez, A. Barbosa-Quintana, J. Saldaña-Rodríguez, V.J. Lara-Díaz, F. Castorena-Torres

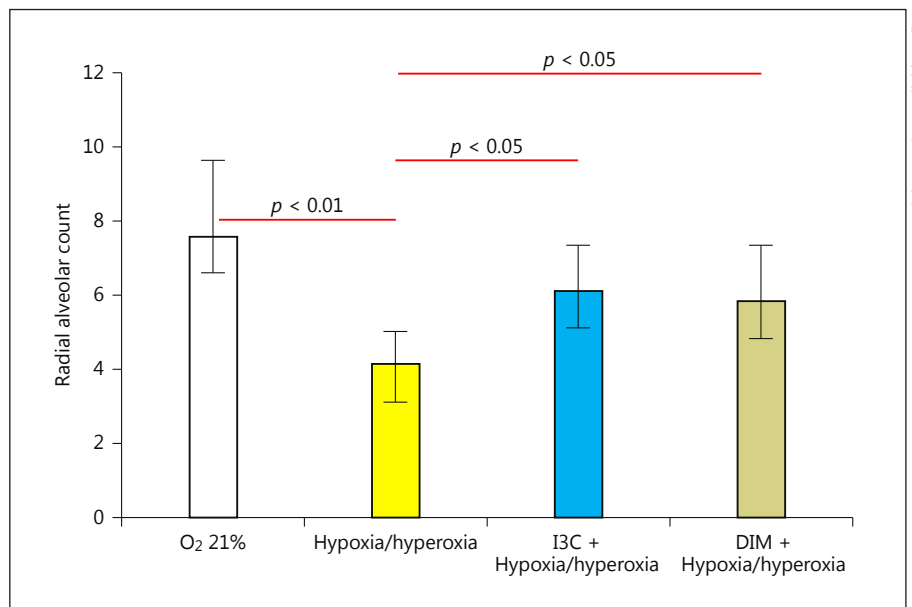
Tecnologico de Monterrey, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Monterrey, Mexico

Introduction: Bronchopulmonary dysplasia (BPD), characterized by an arrest of alveolar development, results from a complex set of circumstances. Our group has developed a Sprague-Dawley rat model of BPD, based on exposure for 13 days to cyclic hypoxia/hyperoxia (H/H). The Ahr (aryl hydrocarbon receptor), an activator of the antioxidant system, increases the expression of phase I enzymes (as P450-1A1) and phase II enzymes. **Objective:** To determine if prenatal activation of the Ahr pathway with Indole-3-carbinol (I3C) or 3,3'-diindolylmethane (DIM) protects rat pups from hypoxia/hyperoxia-induced lung injury, measuring body growth, relative expression of BPD and Ahr pathway-related genes, as well as radial alveolar counts in excised lungs. **Methods:** Figure 1 shows the protocol approved by the institutional Animal Care and Use Committee (#2015-RE-15, February 2016). After euthanasia, heart-lung blocks of excised pups were prepared for histopathological examination, RNA extraction and RT-PCR. **Results:** On the 13th postnatal day, H/H exposure caused decreased mean body weight from 20 ± 2.6 g (control) to 9.8 ± 1 g; I3C + H/H-treated pups had a mean body weight of 9.7 ± 0.7 g, while that of DIM + H/H-treated pups was 15.3 ± 1.1 g ($p < 0.05$). After H/H, a significant decrease in gene expression of hif1a, fgf7, ccl2, angp1, timp2, kdr1, fit1, vegf1 and tgfb ($p < 0.05$) was seen; these validate our BPD model. An increase of Ahr gene expression at birth, at 24 h and at 72 h was observed in I3C + H/H animals vs. controls, while it was only seen at birth for DIM + H/H-treated animals ($p < 0.05$). In I3C + H/H-treated animals, CYP1A1 gene expression was significantly increased at birth and at 24 h, while Nqo1 gene expression increased significantly at 24 and 72 h. Both treating compounds were accompanied by a significant increase in RAC means ($p < 0.05$) (Fig. 2). **Conclusions:** Gene expression results suggest a beneficial effect of I3C, which could become a welcome addition to the BPD preventive measures in human preterm neonates after carefully designed clinical trials.

Abstract 10, Figure 1. Experimental protocol. SD, Sprague-Dawley; I3C, Indole-3-carbinol; DIM, 3,3'-diindolylmethane.



Abstract 10, Figure 2. Radial alveolar counts (means \pm SD), measured by light microscopy on formaldehyde-fixed and hematoxylin-eosin stained lung preparations, at 10 \times magnification on 13th postnatal day. The control group was kept on room air; hypoxia-hyperoxia consisted of successive cycles of 80% oxygen for 21 h, followed by a descent to 10% oxygen for 15 min, then room air (21% oxygen) for 45 min followed by an increase from 21 to 80% oxygen in 2 h, from postnatal day 1 to postnatal day 12. I3C, Indole-3-carbinol; DIM, 3,3'-diindolylmethane.



11

Gene Expression Analysis of the Total RNA-Sequenced Human Bronchial Epithelial Cell Line (VA10 Cells) at Different Time Points of the Cell Culture

S. Takci^a, D. Salvi^b, S. Peysakovich^c, P. Sen^d, A. Hamvas^e

^aDepartment of Pediatrics, Gaziosmanpasa School of Medicine, Tokat, Turkey; ^bDepartment of Pediatrics, Northwestern University, Chicago, IL, USA; ^cDepartment of Pediatrics, Northwestern University, Chicago, IL, USA; ^dDepartment of Pediatrics, Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA; ^eDepartment of Pediatrics and Neonatology, Northwestern University Feinberg School of Medicine, Chicago, IL, USA

Introduction: The human bronchial epithelial cell line, VA10, undergoes branching and tube formation in 3D culture and thus could provide an in vitro model to understand lung development.

Objective: To identify changes in gene expression as VA10 cells transition from a 2D monolayer to branching in a 3D culture model. **Methods:** VA cells with a concentration of 1,000 cells per well were plated and incubated in a reconstituted basement membrane (Matrigel; BD, Bedford, MA, USA) for 3D cell culture. We collected cells around each morphologic transitional day 1 (baseline/monolayer), day 5 (cluster formation), day 10 (branching and tube formation beginning around day 7–8) and day 20 when no additional branching is observed. After cells were harvested and prepared, total RNA sequencing was performed (RNASeq; Illumina). We identified genes with greater than 2-fold difference in expression at each time point and then performed gene pathway analysis (Metascape; Enrichr) with the 500 genes exhibiting the greatest differences. **Results:** Over 25,369 genes (7,172 genes for monolayer to day 5; 7,110 genes for day 5 to day 10; 5,902 genes for day 10 to day 20; 6,540 genes for day 5 to day 20) were more than 2-fold differentially expressed. Eukaryotic translational elongation and organelle biosynthesis and maintenance were the strongest positively expressed pathways. Genes involved in organ morphogen-



To the Editor: Concerning Kaya et al.

Gabriela Guzmán-Navarro MD, Fabiola Castorena-Torres PhD & Víctor Javier Lara-Díaz MD, PhD

To cite this article: Gabriela Guzmán-Navarro MD, Fabiola Castorena-Torres PhD & Víctor Javier Lara-Díaz MD, PhD (2017): To the Editor: Concerning Kaya et al., Fetal and Pediatric Pathology, DOI: [10.1080/15513815.2017.1310338](https://doi.org/10.1080/15513815.2017.1310338)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/15513815.2017.1310338>



Published online: 14 Apr 2017.



[Submit your article to this journal](#)



Article views: 4



[View related articles](#)



[View Crossmark data](#)

LETTER TO THE EDITOR

To the Editor: Concerning Kaya et al.

Gabriela Guzmán-Navarro, MD, Fabiola Castorena-Torres, PhD,
and Víctor Javier Lara-Díaz, MD, PhD

Tecnologico de Monterrey, Escuela de Medicina, Monterrey, México

ARTICLE HISTORY Received 8 March 2017; Accepted 16 March 2017

We read with great interest the recent publication by Kaya et al., [1] in which they evaluated the effects of Etanercept in a model of neonatal rat lung damage derived from oxygen exposure. They found that Etanercept treatment decreased the oxidative damage as well as nuclear factor-kappa β (NF κ B) levels and increased the endogenous antioxidant enzyme and VEGF levels, which improves alveolarization as measured with radial alveolar count and lamellar body protein expression in the alveoli.


We would also like to add that previously Oncel et al., in August 2015, [2] published the article “Beneficial Effect of Etanercept on hyperoxic lung injury model in neonatal rats” in which they performed histopathological analysis, as well as measure of alveolar surface area, and tumor necrosis factor-alpha (TNF α) and transforming growth factor β (TGF-B) concentrations, the activity of superoxide dismutase and malondialdehyde in lung tissue. They demonstrated that prophylaxis with Etanercept, administered intraperitoneally to neonatal rats, improves alveolarization, and decreases oxidative stress in neonatal rats exposed to hyperoxia. However, in both studies they used a much higher dose than the current recommended dose in children older than 2 years for juvenile rheumatoid arthritis. Even considering that the route of administration was different, in these studies pups received cumulative doses of 50 and 100 mg/kg. Based on the fact that the half-life of Etanercept is 70 hours, [3] and the recommended dosage for children with Juvenile Rheumatoid Arthritis over 2 years is two times per week, we feel that considerable more research is needed to determine the most effective dose and the best periodicity of Etanercept administration, to achieve its best results as prophylaxis of hyperoxic lung injury in animal models, before this can be scaled to human trials.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the article.

References

- [1] Kaya G, Saldır M, Polat A, Fidancı MK, Erdem A, Erdem G, Tunc T. Evaluation of etanercept treatment in Newborn Rat Model with hyperoxic lung injury. *Fetal Pediatr Pathol.* 2016;35(5):327–338. doi:10.1080/15513815.2016.1189018

CONTACT Gabriela Guzmán-Navarro  gabriela.guzman@itesm.mx  Escuela de Medicina del Tecnológico de Monterrey, Ave. Ignacio Morones Prieto 3000 pte. Col. Los Doctores, CP 64710, Monterrey, Nuevo León, México.

- [2] Oncel MY, Yurttutan S, Alyamac Dizdar E, Gokce IK, Gonul II, Topal T, Dilmen U. Beneficial effect of etanercept on hyperoxic lung injury model in neonatal rats. *J Invest Surg.* 2016;29(1):1–5. doi:[10.3109/08941939.2015.1034898](https://doi.org/10.3109/08941939.2015.1034898)
- [3] Pfizer limited. (Ed.). (2015, December 24). Enbrel 50mg solution for injection in pre-filled syringe. Retrieved February 8, 2017 from <http://www.medicines.org.uk/emc/medicine/19162>

CURRÍCULUM VITAE ÚNICO

GABRIELA

GUZMAN

NAVARRO

Generado el : 30/may/2021

1. Datos personales

Fecha de nacimiento: 11/nov/1978
País de nacimiento: México
Nacionalidad: Mexicana
Correo electrónico: gabriela.guzman@itesm.mx
CVU: 818330

Nivel SNI:

Empleo actual

Inicio: 01/mar/2010
Nombre del puesto: PROFESOR CÁTEDRA
Institución: Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey

2. Grados académicos

Fecha de obtención:	28/feb/2002	Nivel de escolaridad:	Licenciatura
Título:	MÉDICO CIRUJANO		
Institución:	Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey		
Fecha de obtención:	21/feb/2008	Nivel de escolaridad:	Especialidad
Título:	PEDIATRA		
Institución:	Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey		
		Nivel de escolaridad:	Doctorado
Título:	Doctorado en Ciencias Clínicas		
Institución:	Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey		

4. Producción científica, tecnológica y de innovación

4.1 Publicación de artículos

Año de publicación: 2020

Título del artículo: Prenatal indole-3-carbinol administration activates aryl hydrocarbon receptor-responsive genes and attenuates lung injury in a bronchopulmonary

Nombre: Experimental Biology and Medicine

Número de la revista: 1

Volúmen de la revista: 1

País:

Páginas de: 1

a: 12

ISSN impreso: 15353702

ISSN electrónico: 15353699

Autores

Gabriela Guzmán Navarro

Mario Bermúdez de León

Irene Martín Estal

Raquel Cuevas-Díaz Durán

Laura Villarreal Alvarado

Anakaren Vaquera Vázquez

Tania Cuevas Cerda

Karina Garza García

Luis Eduardo Cuervo Pérez

Álvaro Barbosa Quintana

Autores

José Eduardo Pérez Saucedo

Víctor Lara Díaz

Fabiola Castorena Torres

Año de publicación: 2019

Título del artículo: Carotid intima-media thickness and its correlation with anthropometric and clinical variables in pediatric patients with obesity: An exploratory

Nombre: Medicina Universitaria

Número de la revista: 21

Volúmen de la revista: 3

País:

Páginas de: 100

a: 104

ISSN impreso: 16655796

ISSN electrónico: 25300709

Autores

Erika L Alba Rojas

Julieta Rodríguez de Ita

Jesús M Yañez Sánchez

Marcelo Salán Gómez

Marcos A Acosta Sandoval

Ricardo J Estrada Mendizabal

Margarita Riojas Barret

Gabriela Guzmán Navarro

Año de publicación: 2018

Título del artículo: Animal model of Bronchopulmonary dysplasia, Approach to reality

Nombre: Pediatrics

Número de la revista: 1

Volúmen de la revista: 142

País:

Páginas de: 1

a: 1

ISSN impreso: 00314005

ISSN electrónico: 10984275

Autores

Gabriela Guzmán Navarro

Karina Garza García

Victor Javier Lara Díaz

Fabiola Castorena Torres

Título del artículo: 3,3'- Indole-3-Carbinol and Diindolylmethane Compounds Attenuate Hyperoxia/Hypoxia-Induced Lung Injury in Newborn Rats

Nombre: Neonatology

Número de la revista: 1

Volúmen de la revista: 113

País:

Páginas de: 419

a: 420

ISSN impreso: 16617800

ISSN electrónico: 16617819

Autores

Gabriela Guzmán Navarro

Anakaren Vaquera Vázquez

Tania Cuevas Cerda

Mario Bermúdez de León

Luis Eduardo Cuervo Díaz

Autores

Alvaro Barbosa Quintana
Jorge Saldaña Rodríguez
Victor Javier Lara Díaz
Fabiola Castorena Torres

Año de publicación: 2017

Título del artículo: To the Editor: Concerning Kaya et al

Nombre: Fetal and pediatric pathology.

Número de la revista: 1

Volúmen de la revista: 14

País: United Kingdom

Páginas de: 1

a: 2

ISSN impreso: 15513815

ISSN electrónico: 15513823

Autores

Fabiola Castorena Torres
Víctor Javier Lara Díaz
Gabriela Guzmán Navarro

5. Formación de capital humano

5.1 Tesis dirigidas en PNPC

Fecha de aprobación: 23/oct/2018

Nombre: Rodrigo Alejandro de la Cruz

Programa PNPC: - Especialidad

Título de la tesis: Factores asociados al control del asma en la consulta de subespecialidad pediátrica en un hospital de tercer nivel

Institución: INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE MONTERREY

Estado de la tesis: Terminada

Fecha de aprobación: 08/oct/2019

Nombre: Laura Cecilia Villarreal Alvarado

Programa PNPC: - Especialidad

Título de la tesis: Cambios en la respuesta inflamatoria por exposición a oxígeno suplementario en un modelo de rata recién nacida tratada con un ligando

Institución: INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE MONTERREY

Estado de la tesis: Terminada

Fecha de aprobación: 25/oct/2019

Nombre: Diego De Gamboa Villarreal

Programa PNPC: - Especialidad

Título de la tesis: Factores que influyen en la no vacunación contra influenza en pacientes menores a 15 años que acuden a consulta externa.

Institución: INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE MONTERREY

Estado de la tesis: Terminada

Fecha de aprobación: 03/dic/2020

Nombre: Ramón Alanís Alvarez

Programa PNPC: Especialidad en Pediatría - Especialidad

Título de la tesis: Actitudes, percepción y estrategias de los padres ante la alimentación de sus hijos.

Institución: INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE MONTERREY

Estado de la tesis: Terminada

6. Comunicación pública de la ciencia, tecnología y de innovación

7. Vinculación

8. Premios y distinciones

8.2 Distinciones no CONACYT

Año: 2008 **Nombre de la distinción:** Graduada de Pediatría con Mención de Excelencia
Institución que otorgó premio o distinción: Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey
País: México

Este documento fue editado en Word de Microsoft en su totalidad por Gabriela Guzmán Navarro