

Estudio del efecto de la eritropoyetina sobre la lesión por isquemia-reperfusión en un modelo experimental de enterocolitis necrotizante

Javier Lerena Rodriguez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Obstetricia, Ginecología, Pediatría,
Radiología y Anatomía

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ERITROPOYETINA SOBRE
LA LESIÓN POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN EN UN
MODELO EXPERIMENTAL DE ENTEROCOLITIS
NECROTIZANTE**

TESIS DOCTORAL

Autor: D.Javier Lerena Rodriguez

Directores:

Prof. Dr. D. Miguel Pera Román

Prof. Dr. D. Luis Morales Fochs

A mis padres Marta y Mario, muestra de amor incondicional
A mi hermano Diego, por acompañarme, apoyarme, por
estar...

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Dr.Lluís Morales Fochs, Catedrático de Pediatría, Ex-Jefe del Servicio de Cirugía Pediátrica del Hospital Sant Joan de Déu, Director de ésta tesis, por sus orientaciones y oportunas sugerencias.

Al Dr.Miguel Pera Román, Jefe de Sección de la Unidad de Cirugía Colorectal del Hospital del Mar, por su ayuda, por sus precisas indicaciones y por su valioso tiempo dedicado a la realización de ésta tesis.

A la Dra.Rosalía Carrasco, Médico Adjunta del Servicio de Cirugía Pediátrica del Hospital Sant Joan de Déu, quien me apoyó y colaboró en todo momento.

Al Dr.Joan Rodó Salas, Jefe de Sección de Urología, del Servicio de Cirugía Pediátrica del Hospital Sant Joan de Déu, por su afecto y paciencia, por su confianza depositada en mi persona.

Al Dr.Jaume Pérez Payarols, Ex Director Médico del Hospital Sant Joan de Déu, por su colaboración en un momento clave de la tesis.

Al Dr.Alberto Montaner Brunat y la Dra. Fredesvinda Mérida, por el apoyo y escucha dispensada en todo momento.

A la Orden Hospitalaria de San Juan de Dios, en particular a los Hnos. Pascual Piles y Joaquín Erra, símbolos de hospitalidad, por el afecto recibido.

A la Dra.Noelia Pérez, y a la Sra. Eva Rodríguez, del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Sant Joan de Déu, por su colaboración desinteresada en el estudio anatomopatológico, sin el que ésta tesis no hubiese sido posible.

A la Sra. Isabel Salas Navas y al Sr. Iván Ortega Sáez, y personal del Estabulario del Hospital Sant Joan de Déu, por las facilidades, ayuda y afecto desde el inicio.

Al Dr. Freud Cáceres, por ayudarme hasta el final en realización de ésta tesis.

Al Sr. Carlos Alaez, del Servicio de Medios Audiovisuales del Hospital Sant Joan de Déu, por su colaboración en la edición.

Al Dr. José María Ribó, Jefe del Servicio de Cirugía Pediátrica del Hospital Sant Joan de Déu, por sus sanos consejos en mis decisiones.

Al Dr. Francisco José Parri, Médico Adjunto del Servicio de Cirugía Pediátrica del Hospital Sant Joan de Déu, quien me escuchó en momentos difíciles, y me hizo ver la importancia de la realización de la tesis.

A la Dra. Margarita Vancells, Médico Adjunta del Servicio de Cirugía Pediátrica del Hospital Sant Joan de Déu, por su incondicional apoyo y cariño.

Al equipo de enfermería del Bloque Quirúrgico Infantil del Hospital Sant Joan de Déu, por la colaboración con el material quirúrgico, sin el cual éste trabajo no hubiera sido posible.

A mis compañeros y amigos del Servicio de Cirugía Pediátrica del Hospital Sant Joan de Déu, Montserrat Castañon, Jordi Rovira, Victoria Juliá, Asteria Albert, María de los Angeles Sancho, María Elena Muñoz, Luis García Aparicio, Xavier Tarrado, Jordi Prat, Ramón Sarget, Eloi Perich, Lucas Krauel, Cristina Aguilar, Laura Saura, Manuela Corradini, Juan Carlos Salarich, Nizar Al Tadmuri, Pilar Canals, Marta Olivares, Bernardo García Nuñez, Pedro Palazón, Oriol Martín, Esteban Halac, Rebeca Leal, Berhanu Chimdi, Anna Bosque y Cristina Cervelló, por ayudarme de alguna manera a ser mejor profesional y mejor persona.

"La sabiduría suprema es tener sueños bastante grandes para no perderlos de vista mientras se persiguen"

William Faulkner (1897-1962)

ÍNDICE

ÍNDICE

1. JUSTIFICACIÓN DE INTERES POR EL TEMA	
2. INTRODUCCIÓN	19
2.1. ENTEROCOLITIS NECROTIZANTE.....	23
2.1.1. Antecedentes históricos	23
2.1.2. Epidemiología	23
2.1.3. Etiología y Patogénesis.....	25
2.1.3.1. Isquemia- Reperusión intestinal	
2.1.3.2. Agentes infecciosos	
2.1.3.3. Inmadurez del Sistema defensivo local	
2.1.3.4. Alimentación enteral	
2.1.3.5. Fármacos	
2.1.3.6. Mediadores vasoactivos	
2.1.4. Diagnóstico.....	33
2.1.4.1. Manifestaciones clínicas	
2.1.4.2. Hallazgos de laboratorio	
2.1.4.3. Estudio microbiológico	
2.1.4.4. Pruebas de imagen	
2.1.4.5. Histopatología	
2.1.5. Tratamiento y pronóstico	40
2.1.6. Prevención.....	41
2.1.6.1. Profilaxis antibiótica	
2.1.6.2. Inmunoglobulinas	
2.1.6.3. Glucocorticoides	
2.1.6.4. Control de la respuesta inflamatoria	
2.1.6.5. Alimentación enteral	
2.1.6.6. Bifidobacterias- Probióticos	
2.1.6.7. Péptidos Trefoil	

2.1.7. Modelos Animales de ECN	46
2.2. ERITROPOYETINA.....	50
2.2.1. Efectos biológicos e indicaciones terapéuticas	
2.2.2. La eritropoyetina en el desarrollo fetal: su importancia como factor trófico del intestino	
2.2.3. Eritropoyetina y angiogénesis	
2.2.4. Eritropoyetina y ECN	
3. HIPÓTESIS	63
4. OBJETIVOS	67
5. MATERIAL Y MÉTODOS	71
5.1. ANIMALES.....	73
5.2. MODELO DE ENTEROCOLITIS NECROTIZANTE.....	75
5.3. ERITROPOYETINA.....	76
5.3.1. Eritropoyetina Recombinante humana	
5.3.2. Eritropoyetina Recombinante de rata	
5.4. DISEÑO EXPERIMENTAL	77
5.5. ESTUDIO MICROSCÓPICO	78
5.5.1. Altura media de las vellosidades (AMV)	
5.5.2. Grosor medio de las vellosidades (GMV)	
5.6. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE(T.de ELISA) ...	83

5.7. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.....	83
5.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	84
6. RESULTADOS.....	85
6.1. REPRODUCCIÓN DEL MODELO DE ECN.....	87
6.2. EFECTO PREVENTIVO DE LA EPO SOBRE LA MUCOSA INTESTINAL EN LA ECN EXPERIMENTAL.....	91
6.2.1. Análisis morfométrico	
6.2.2. Determinación de la concentración de VEGF en suero	
6.2.3. Estudio Inmunohistoquímico de la expresión de VEGF	
7. DISCUSIÓN	109
8. CONCLUSIONES	125
9. BIBLIOGRAFÍA	129

**1. JUSTIFICACIÓN
DEL INTERÉS
POR EL TEMA**

Justificación del interés por el tema

La enterocolitis necrotizante (ECN) es la enfermedad gastrointestinal adquirida más común en el recién nacido pretérmino. Se caracteriza por la aparición de lesiones isquémicas en el intestino delgado y colon que en ocasiones pueden progresar hacia la necrosis transmural y perforación de la pared intestinal, por lo que es una de las urgencias quirúrgicas más frecuentes durante el período neonatal ¹.

La incidencia de la ECN es de 1-3 por cada 1000 recién nacidos vivos ^{2,3}. Afecta a un 5% de niños con bajo peso al nacer y esta cifra asciende hasta el 10% en los de muy bajo peso. El 30-50% de ellos requerirán una intervención quirúrgica y la mortalidad en este grupo alcanza el 30% ⁴.

La etiología de la ECN es todavía desconocida. Numerosos factores han sido implicados en su patogénesis, entre los que destacan la inmadurez inmunológica de la mucosa intestinal, una perfusión inadecuada, la presencia de sustancias hiperosmolares en la dieta y determinados agentes infecciosos. El diagnóstico precoz, los avances en los cuidados neonatales y el tratamiento quirúrgico en algunos casos, han logrado una importante reducción de la mortalidad, siendo ésta todavía alrededor del 25% ⁵. No existe ningún tratamiento específico salvo medidas conservadoras una vez instaurada la enfermedad.

Aunque el tratamiento quirúrgico precoz ha contribuido en gran medida a mejorar la supervivencia, las secuelas ocasionadas por las amplias resecciones intestinales son numerosas. Entre éstas destaca el síndrome del intestino corto y la necesidad de nutrición parenteral prolongada con todos sus efectos secundarios ^{6,7}.

Con los avances de los cuidados en las unidades neonatales, la supervivencia de recién nacidos prematuros está aumentando, con el consecuente incremento del número de pacientes con un riesgo elevado de padecer ésta enfermedad.

Por ello es necesaria, no sólo la investigación y el desarrollo de nuevas formas de tratamiento sino también métodos de prevención que puedan ser aplicados en pacientes con riesgo aumentado.

La eritropoyetina (Epo) es una hormona producida por el riñón en respuesta a la anemia. Regula la producción de eritrocitos interactuando con receptores celulares específicos de superficie, inhibiendo la apoptosis celular y estimulando la maduración clonal. Desde el año 1985, la eritropoyetina recombinante es utilizada en el tratamiento de la anemia del embarazo ⁸. La presencia de Epo en la leche humana ⁹ y la reciente demostración de receptores funcionales de Epo en intestino delgado fetal y postnatal sugiere que la Epo está implicada en el crecimiento y desarrollo del tracto gastrointestinal ^{10, 11}. Además, estudios epidemiológicos han demostrado que el riesgo de enterocolitis es menor en recién nacidos prematuros cuyas madres habían recibido Epo durante el embarazo ¹². En base a estos estudios, nuestra hipótesis propone que la administración de Epo recombinante puede tener un efecto protector en el desarrollo de la enterocolitis necrotizante. Con el presente proyecto de investigación pretendemos estudiar el efecto que la administración de Epo tiene en un modelo animal de ECN.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 ENTEROCOLITIS NECROTIZANTE

2.2 ERITROPOYETINA

2.1. ENTEROCOLITIS NECROTIZANTE

2.1.1. Antecedentes históricos

Los primeros casos que probablemente correspondían a una ECN fueron descritos hace 170 años. Se trataba de 5 casos de recién nacidos prematuros que fallecieron a los 3 días de vida como consecuencia de una peritonitis con múltiples perforaciones intestinales, hallazgos muy sugestivos de ECN¹³. Sin embargo, la publicación del primer caso de ECN es atribuida a Generisch en 1891¹⁴. No fue hasta el año 1943 cuando se describió el primer caso tratado por Agerty y cols. Se trataba de un recién nacido de 35 semanas de gestación que presentaba una perforación ileal que fue suturada sin más complicaciones¹⁵.

Desde entonces y hasta la década de los 60, la cirugía ha sido la primera opción terapéutica. Sin embargo, durante los años 70 se comprobó que con un diagnóstico precoz el tratamiento podía ser conservador. En 1973, Bell publicó una clasificación basada en la gravedad de la enfermedad, que todavía hoy es utilizada como pauta de actuación¹⁶.

2.1.2. Epidemiología

La incidencia de la ECN es muy variable, dependiendo de la zona geográfica y del año que se considere. En EEUU, la incidencia es de 1 a 3 casos por cada 1000 recién nacidos vivos². Esta enfermedad afecta fundamentalmente a recién nacidos prematuros y/o de bajo peso para su edad de gestación. En concreto, en algunas series el 90% son niños prematuros mientras que sólo el 10% ocurre en niños nacidos a término, la mayoría de éstos con enfermedades que predisponen a una menor perfusión mesentérica^{17, 18}. Se ha calculado que aproximadamente un 12% de prematuros con un peso inferior a 1500 gr desarrollarán una ECN¹⁹. La ECN es más frecuente en varones y en la raza negra^{20, 21}.

En un estudio realizado sobre 123 casos, la edad media gestacional fue de 31 semanas²². Asimismo, se ha observado una relación inversa entre la edad gestacional y el momento en que se manifiesta la enfermedad. Los prematuros desarrollan la enfermedad entre los días 7 y 14 de vida, mientras que en los recién nacidos a término suele manifestarse en las primeras 48 horas²³.

Durante los últimos años ha aumentado la supervivencia de recién nacidos prematuros como consecuencia de los avances en las unidades de cuidados neonatales, por lo que también está aumentando el número de pacientes con un mayor riesgo de padecer la enfermedad²⁴. En el futuro, la ECN será la principal causa de muerte entre los recién nacidos prematuros, más frecuente incluso que el síndrome del distrés respiratorio neonatal²⁵.

La supervivencia global de los recién nacidos prematuros con ECN se encuentra entre el 60% y el 80%^{26, 27}, mientras que en recién nacidos a término alcanza el 90%^{28 17}. Este dato es sin embargo controvertido ya que otros autores²³ han encontrado un mayor número de complicaciones y una mortalidad superior en el grupo de pacientes con ECN nacidos a término. En cualquier caso, un elevado porcentaje de pacientes presentarán secuelas, no sólo digestivas como el síndrome de intestino corto, sino también retraso en el desarrollo psicomotor²⁹⁻³²

2.1.3. Etiología y patogénesis

La etiología de la ECN es desconocida, pero la mayoría de los estudios sugieren que es multifactorial. En 1975 Santulli y cols. propusieron que en el desarrollo de la enfermedad participan tres factores esenciales: la lesión hipóxico-isquémica de la mucosa inmadura, la alimentación artificial y la presencia de bacterias³³

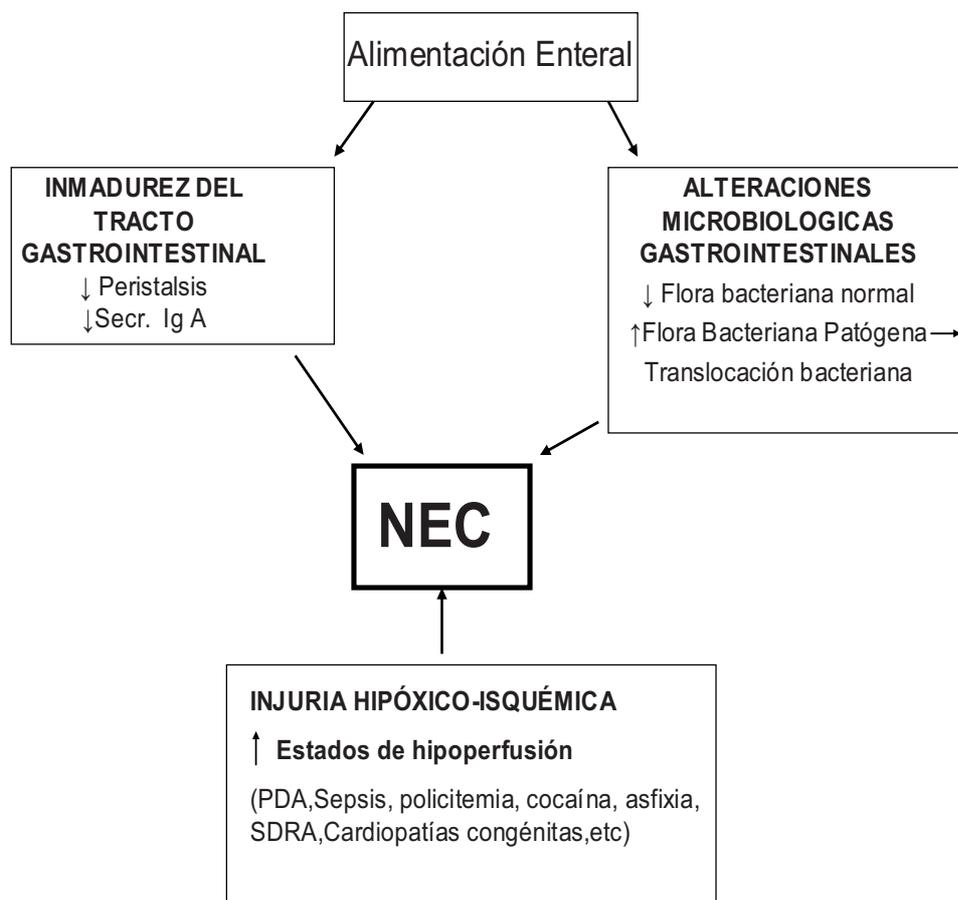


Figura 1 Mecanismos que intervienen en la patogénesis de la ECN

PDA= Ductus Arterioso Persistente, SDRA= Síndrome de Distress Respiratorio Agudo

2.1.3.1. Isquemia-reperfusión intestinal:

La isquemia intestinal transitoria seguida de reperfusión es uno de los factores más importantes en la etiopatogenia de la ECN. Una de las causas más frecuentes de esta hipoperfusión intestinal es la hipoxia perinatal que puede producir una vasoconstricción esplácnica con el fin de redistribuir el flujo sanguíneo hacia órganos vitales como el cerebro y el corazón. Esta hipótesis ha sido cuestionada ante la existencia de mecanismos reguladores que dan lugar a una vasodilatación en la gran mayoría de los territorios vasculares a los pocos minutos de haberse iniciado la isquemia. La disminución en el aporte de oxígeno y la acidosis son los principales estímulos de esta vasodilatación. Sin embargo, varios estudios experimentales sugieren que este sistema de autoregulación no está presente o es menos efectivo en recién nacidos ²⁴

Otra posible causa de hipoperfusión intestinal es la persistencia del conducto arterioso. En un estudio, se demostró la ausencia de flujo diastólico en el territorio vascular intestinal en recién nacidos con un conducto arterioso persistente ³⁴. Esta alteración podría explicar el mayor riesgo de ECN en pacientes con un conducto arterioso sintomático. Además, se comprobó que la administración rápida de indometacina producía una mayor disminución del flujo en la arteria mesentérica superior por mecanismos desconocidos. La presencia de catéteres umbilicales ³⁵ y la policitemia ³⁶ han sido también descritas como causas de isquemia en el territorio vascular intestinal, en este caso secundaria a la formación de trombos.

Se han empleado técnicas de eco-doppler con el fin de investigar si realmente existe una alteración del flujo esplácnico en aquellos recién nacidos con riesgo de presentar una ECN. En un estudio se demostró que la velocidad sistólica pico en la arteria mesentérica superior era entre un 20% y un 50% inferior en recién nacidos prematuros que habían presentado hipoxia perinatal comparada con la de recién nacidos a término sin complicaciones ³⁷. Sin embargo, en aquellos pacientes en los que se ha confirmado el diagnóstico de ECN, el flujo sanguíneo en la arteria mesentérica superior está aumentado, lo que se ha interpretado como un reflejo de la hiperemia post isquémica ³⁸.

Aunque muchos de los autores están de acuerdo en la influencia de las alteraciones de la perfusión intestinal en el desarrollo de la ECN, otros consideran que es sólo un factor más en la etiopatogenia de la enfermedad ³⁹. La disminución de la perfusión intestinal favorecería el sobrecrecimiento y la translocación bacteriana, lo cual podría llegar a desencadenar ECN en un paciente vulnerable. (Figura 2)

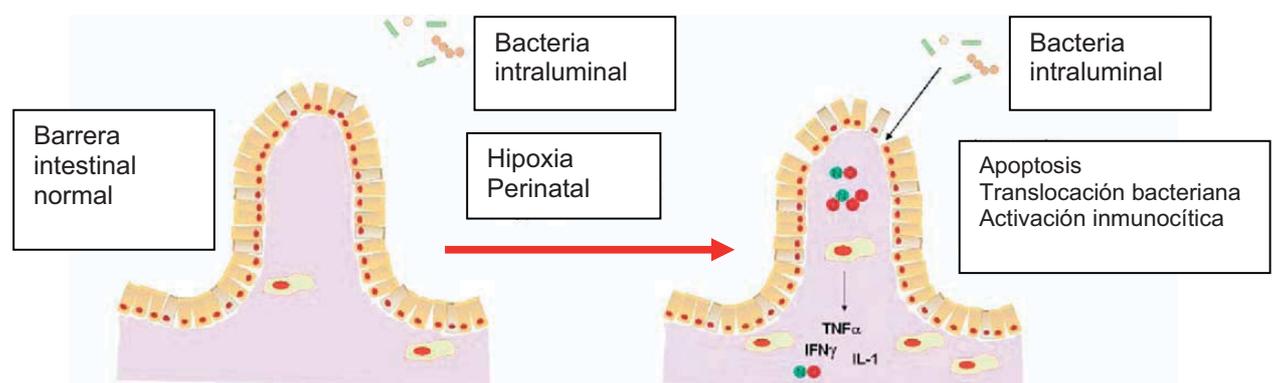


Figura 2 Hipoxia- isquemia intestinal, apoptosis, translocación bacteriana y colonización.

El hecho de que muchos niños afectados con procesos hipóxico-isquémicos no desarrollen ECN sugiere que la mala perfusión intestinal es un factor necesario pero no suficiente ^{20, 32,}

40, 41

Por todo ello, se considera la ECN una enfermedad multifactorial en la que algunos factores son conocidos y otros están por conocer.

2.1.3.2. Agentes infecciosos:

La ECN no ocurre durante el desarrollo fetal, cuando el intestino es estéril, por lo que la colonización anormal del tracto gastrointestinal del prematuro contribuye también a la patogénesis de ésta enfermedad (Figura 1) ⁴²

Aunque la infección bacteriana es considerada también necesaria en el desarrollo de la ECN, el lugar de la infección en la etiopatogenia de la enfermedad no es del todo conocido. La ECN podría ser una enfermedad infecciosa que afecta con más frecuencia pero no necesariamente a una mucosa intestinal previamente dañada. Esta hipótesis se apoya en las siguientes evidencias: en primer lugar, la aparición de brotes epidémicos de ECN en determinadas unidades neonatales y en ciertas estaciones del año sugiere la existencia de un agente infeccioso ⁴³. En segundo lugar, se han identificado algunos gérmenes con mayor frecuencia en las heces de recién nacidos con ECN, entre los que destacan *Klebsiella sp.*, *Escherichia Coli*, *Salmonella* y la toxina del *S. epidermidis* ^{44, 45}. Algunas especies de *Clostridium* (*C. perfringens* y *C. difficile*) han sido asociadas con casos especialmente graves de ECN.

Por último, se han reproducido en modelos experimentales lesiones similares a las de la ECN tras la administración de endotoxina bacteriana ⁴⁶. Es posible, sin embargo, que las bacterias desempeñen un papel secundario y sólo intervengan en la patogénesis de la enfermedad una vez que se ha producido un daño significativo en la mucosa intestinal,

que permita la translocación ²⁴. A ésta inmadurez se asocia el contacto con la flora nosocomial y los antibióticos en las unidades de cuidados neonatales ⁴⁷.

2.1.3.3. Inmadurez del sistema defensivo local:

Dado que la ECN afecta casi exclusivamente a neonatos pretérmino se ha sugerido que una barrera inmunológica intestinal inmadura participa también en la patogenia de la enfermedad (Figura 1) ⁴². Estos pacientes presentan unos niveles inferiores de linfocitos B y de inmunoglobulina A (IgA), que contribuye a la defensa local evitando la adhesión de agentes infecciosos a la superficie del epitelio. En un estudio aleatorizado no se diagnosticó ningún caso de ECN en un grupo de 88 pacientes que recibieron IgA e IgG por vía oral, mientras que aparecieron 6 casos en el grupo control^{48, 49}. Se ha demostrado además, en modelos experimentales, la ausencia de linfocitos T durante los primeros días de vida y el progresivo incremento de su número a partir de la tercera semana ⁵⁰. Por otra parte, la leche materna ejerce un efecto protector debido al aporte de inmunoglobulinas, sobretudo la IgA, macrófagos, linfocitos B y T, factores del complemento, lactoferrina y factor de crecimiento epidérmico (EGF). En este sentido, los niños que reciben alimentación artificial presentan una incidencia de ECN 6 veces superior a la de los recién nacidos alimentados con leche materna ^{51, 52}.

Anand y cols. ⁵³ propusieron tres alteraciones de la barrera intestinal que participan en el desarrollo de ECN: disrupción en las uniones celulares epiteliales, alteraciones en el peristaltismo intestinal y alteraciones en la composición del mucus intestinal.

Pero las alteraciones en el sistema defensivo intestinal local de estos pacientes no son sólo inmunológicas. La secreción de ácido gástrico está disminuida y puede favorecer el sobrecrecimiento bacteriano ²⁵. Desde un punto de vista mecánico, la propia mucosa intestinal actúa como barrera que evita el paso de bacterias y toxinas. Esta barrera física presenta una hiperpermeabilidad en los recién nacidos prematuros que favorece el paso de macromoléculas y la translocación bacteriana (Figura 3). En este sentido, se ha demostrado un aumento significativo en la incidencia de bacteriemia en ratas de 2 días de vida tras las administración de *Escherichia Coli* por vía oral en comparación con ratas de 2 semanas ⁵⁴ La proliferación bacteriana promueve la invasión local de la pared intestinal, la producción de citoquinas inflamatorias, endotoxinas, con la subsecuente necrosis y perforación intestinal ²¹.

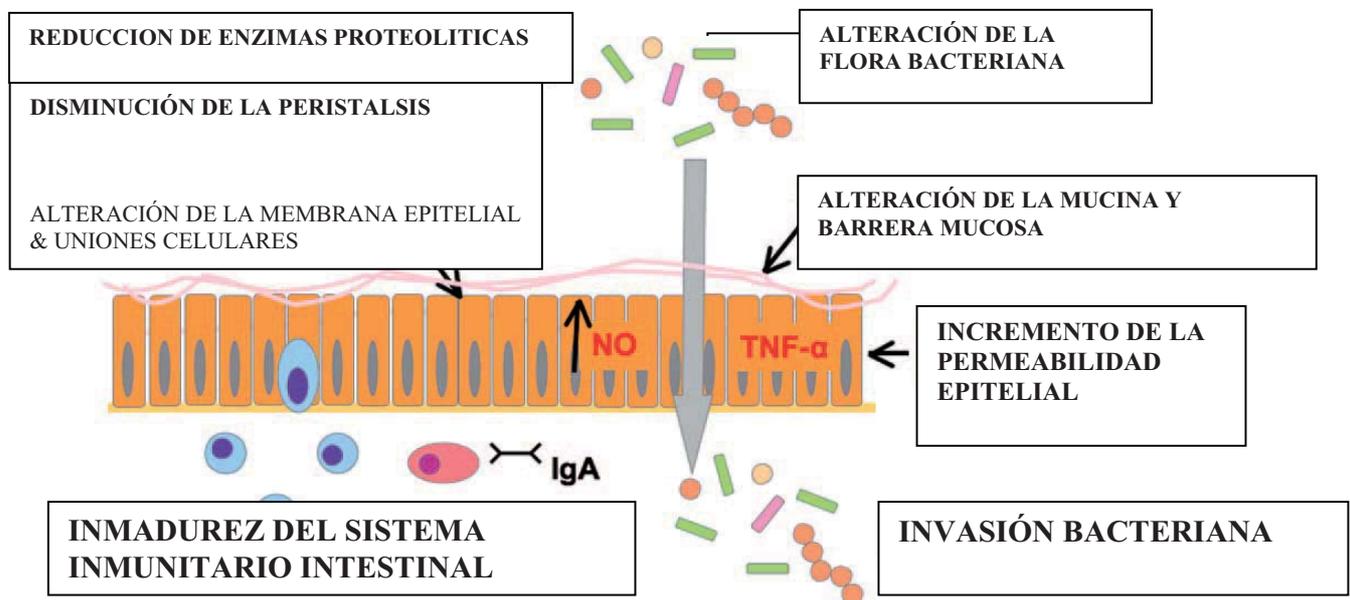


Figura 3. Inmadurez del sistema inmunitario intestinal neonatal. Invasión y colonización bacteriana. Alteración de la flora bacteriana intestinal. Producción de citoquinas pro-inflamatorias. Desequilibrio entre el sistema inmunitario. Fracaso de la barrera mucosa. ⁵⁵

2.1.3.4. Alimentación enteral:

La ECN es menos frecuente en recién nacidos que reciben únicamente leche materna ⁵⁶.

El efecto protector de la leche materna ya fue demostrado por Barlow y cols. en un modelo animal de ECN ⁵⁷. En humanos, la leche materna juega un papel fundamental en la inmunización pasiva del intestino neonatal, promoviendo el crecimiento de *Bifidobacterias* en la flora intestinal ⁵⁸. Ya hemos mencionado anteriormente que el efecto beneficioso de la leche materna se debe también al aporte de inmunoglobulinas, sobretodo la IgA, células del sistema inmunitario como macrófagos, linfocitos B y T y factores del complemento y lactoferrina. Es necesario destacar que los componentes beneficiosos de la leche humana se ven adversamente afectadas por la congelación y pasteurización ⁵⁹.

El momento en el que se inicia la alimentación enteral y el tipo de fórmula empleada pueden influir también en la aparición de la enfermedad. La administración precoz de fórmulas hiperosmolares puede dañar directamente la mucosa gastrointestinal ⁶⁰.

La alimentación enteral también puede producir una elevación del factor activador de las plaquetas (PAF), importante mediador inflamatorio que puede desencadenar el inicio de las lesiones. Se ha propuesto que el incremento de la alimentación enteral en recién nacidos sea inferior a 25ml/Kg/día ⁶¹.

2.1.3.5. Fármacos:

La teofilina y la aminofilina, derivados de las xantinas, reducen la movilidad intestinal y pueden además dañar los enterocitos mediante la formación de radicales libres de oxígeno durante su metabolismo ⁶². Sin embargo, no se ha demostrado la relación causal entre estos fármacos y la ECN ⁶³.

También la indometacina, utilizada como agente tocolítico en mujeres embarazadas y como tratamiento del conducto arterioso persistente en recién nacidos, se ha asociado con una mayor incidencia de ésta enfermedad ⁶⁴. El abuso materno de cocaína, por sus propiedades vasoconstrictoras, puede aumentar la incidencia y la gravedad de la ECN ⁶⁵.

2.1.3.6. Mediadores vasoactivos:

La lesión de la mucosa intestinal y la infección bacteriana ponen en marcha una cascada inflamatoria en la que intervienen varios mediadores vasoactivos que pueden favorecer la progresión de la lesión. Entre estas sustancias destacan el factor activador de las plaquetas (PAF) y el factor de necrosis tumoral (TNF), cuyos niveles están elevados en recién nacidos prematuros con ECN⁶⁶. El PAF es un fosfolípido endógeno mediador de la inflamación sintetizado y secretado por células endoteliales, plaquetas, monocitos, macrófagos, leucocitos, eosinófilos y basófilos. Bacterias como *Escherichia Coli* también pueden sintetizarlo. El PAF puede activar los neutrófilos y liberar radicales libres de oxígeno y enzimas de los lisosomas, además de inducir la agregación plaquetaria.

La acetil-hidrolasa es un enzima antagonista del PAF que limita su vida media. Se ha demostrado en estudios experimentales que la administración de este antagonista previene la aparición de la ECN, lo que apoya el papel de este mediador en la patogénesis

de la enfermedad. La elevación de los niveles de este antagonista en la leche materna en comparación con la leche artificial, puede ser otra de las razones que explique el efecto protector de la lactancia materna ⁶⁷. La administración de TNF también induce un estado de shock y una necrosis de la mucosa gastrointestinal. Se ha demostrado en modelos experimentales que este efecto es debido a la liberación de PAF en el tejido intestinal⁶⁸.

2.1.4 Diagnóstico

La ECN puede presentarse con una gran variedad de manifestaciones clínicas, hallazgos radiológicos y de laboratorio. Los métodos utilizados en la práctica habitual para establecer el diagnóstico de ECN no han variado en las últimas décadas. Los recién nacidos prematuros y de bajo peso, con un mayor riesgo de presentar una ECN, son controlados estrictamente para detectar precozmente la enfermedad.

La clasificación de Bell ⁶⁹ es frecuentemente utilizada en los protocolos asistenciales (Tabla 1). Valora los signos y síntomas, así como el riesgo particular de cada niño para desarrollar ECN. Recientemente se ha cuestionado la utilidad de esta clasificación por su baja especificidad y la subjetividad de algunos de los criterios que utiliza ⁷⁰. Por ello, se ha propuesto una modificación de ésta clasificación teniendo en cuenta criterios clínicos, radiológicos y factores pronósticos (Tabla 2).

<p><i>Estadio I (Sospecha diagnóstica)</i> Uno o más factores causantes de estrés perinatal. Manifestaciones sistémicas: Inestabilidad de la temperatura corporal, letargia, apneas y bradicardia. Manifestaciones gastrointestinales: Rechazo al alimento, vómitos, distensión abdominal moderada y sangre en heces. Radiografías de abdomen que muestren dilatación de asas intestinales.</p>
<p><i>Estadio II (Diagnóstico confirmado)</i> Uno o más factores de riesgo de ECN Cualquiera de los signos y síntomas anteriores más persistencia de la sangre oculta en heces o hemorragia digestiva evidente y distensión abdominal franca. Radiografías de abdomen que muestran una clara distensión intestinal con edema de pared, asas fijas, neumatosis intestinal y /o aire portal.</p>
<p><i>Estadio III (Enfermedad avanzada)</i> Uno o más de los factores de riesgo de ECN Cualquiera de los signos y síntomas descritos anteriormente más deterioro de los signos vitales, shock séptico y/o hemorragia digestiva grave. Radiografía de abdomen: Neumoperitoneo.</p>

Tabla 1. Clasificación en estadios de la ECN de acuerdo con los criterios propuestos por

Bell.

ESTADIOS CLÍNICOS DE LA ECN

ESTADIO CLÍNICO	CLÍNICA SISTÉMICA	CLÍNICA DIGESTIVA	SIGNOS RADIOLÓGICOS	TRATAMIENTO (detallado en el texto)
I-A Sospecha de ECN	Distermia Apneas Bradicardia Letargia	Retención gástrica Distensión abdominal leve Vómitos Sangre oculta en heces	Normal o Distensión de asas (íleo moderado)	Dieta absoluta Aspiración gástrica continua Antibioterapia 3 días (pte. cultivos)
I-B Sospecha de ECN	Igual a I-A.	Igual a I-A + Rectorragia	Igual a I-A	Igual a I-A
II-A ECN establecida, forma menos grave	Igual a I-A	Igual a I-A + Ausencia de ruidos intestinales Dolor abdominal +/-	Distensión de asas Íleo Neumatosis intestinal	Dieta absoluta Aspiración gástrica continua Antibioterapia 7-10 días
II-B ECN establecida, forma grave	Igual a I-A + Acidosis moderada Trombopenia mod.	Igual a II-A + Dolor abdominal ++ Eritema de pared +/- Masa en FID +/-	Igual a II-A + Neumatosis portal Ascitis +/-	Igual a II-A Tamponar la acidosis Antibioterapia 14 días Drenaje peritoneal
III-A ECN avanzada, forma muy grave, sin perforación	Igual a II-B + Shock Apneas graves Acidosis grave Neutropenia CID	Igual a II-B + Peritonitis generalizada Dolor abdominal +++ Distensión abdominal +++	Igual a II-B + Ascitis franca	Igual a II-B Líquidos EV al menos a 200 mL/Kg Inotrópicos/ventilación asistida Antibioterapia 14 días Cirugía/Drenaje peritoneal
III-B ECN avanzada, forma muy grave, con perforación	Igual a III-A	Igual a III-A	Igual a II-B + Neumoperitoneo	Igual a III-A

Tabla 2. Modificación de la clasificación en estadios de la ECN de Bell según Kliegman y Walsh ²⁶

2.1.4.1. Manifestaciones clínicas:

La distensión abdominal y la presencia de sangre en las heces son dos de los síntomas más frecuentes, habiendo sido descritos en más del 80% de los casos. En la mayoría de los recién nacidos estos síntomas van precedidos de otros más inespecíficos como letargia y labilidad de la temperatura corporal. También son frecuentes la hipoglucemia, las apneas recurrentes, bradicardia y finalmente el shock ⁷¹.

La exploración física puede mostrar distensión y dolor a la palpación abdominal, un asa fija y palpable, y en fases avanzadas crepitación y edema en la pared. La evolución de la enfermedad puede ser muy rápida y en el momento del diagnóstico el recién nacido puede presentar ya signos de irritación peritoneal local o difusa ²⁴.

2.1.4.2. Hallazgos de laboratorio:

Los datos analíticos anormales pueden hacernos sospechar el desarrollo de una ECN en recién nacidos con síntomas inespecíficos en una fase inicial. La neutropenia es un hallazgo frecuente, aunque el número total de leucocitos se puede encontrar elevado. Una cifra de neutrófilos inferior a 1500 cel/cm³ se asocia con un peor pronóstico ⁷², así como la presencia de trombocitopenia que ha sido relacionada con la infección por bacterias gram negativas ⁷³. La acidosis metabólica secundaria a la isquemia intestinal y a la sepsis es también otro hallazgo característico, junto con la hiponatremia. Otro dato característico es la elevación de la proteína C reactiva ²⁶.

Se ha propuesto también la determinación de otros factores por su posible valor no sólo en el diagnóstico sino también en el pronóstico de la enfermedad como la procalcitonina, algunas interleuquinas pro-inflamatorias y el PAF aunque estos últimos no se utilizan todavía en la práctica clínica habitual ⁷⁴.

2.1.4.3. Estudio microbiológico:

Los hemocultivos son positivos únicamente en un 30-35% de los casos y los microorganismos aislados con más frecuencia son *Escherichia Coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Sstafilococo aureus*, *Sstafilococo epidermidis*,

enterococos, *Clostridium perfringens* y *Pseudomona aeruginosa*. Los *Clostridium* son microorganismos anaerobios obligados que producen gas y toxinas altamente destructivas y a ellos se debe el característico hallazgo de la neumatosis intestinal ²⁶. Los microorganismos aislados con mayor frecuencia en los coprocultivos son *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomona aeruginosa* y *Salmonella* ⁷⁵. En los cultivos de líquido peritoneal predominan diversas especies de *Klebsiella*, *Escherichia coli* y *Enterobacter* ⁷⁶. La infección fúngica es probablemente secundaria y hasta un 5-15% de estos pacientes presentan hemocultivos positivos. La septicemia por Cándidas se asocia a una elevada mortalidad ⁷⁷.

2.1.4.4. Pruebas de imagen:

En la *radiografía* simple de abdomen se puede apreciar distintos signos característicos:

-Dilatación de asas intestinales y edema de pared intestinal: Aunque este hallazgo es inespecífico, está presente entre el 55-100% de los casos. El grado de dilatación se relaciona con la gravedad y progresión de la enfermedad ⁷⁸.

-Neumatosis intestinal: Consiste en la presencia de aire intramural secundario al metabolismo de las bacterias anaerobias. Su frecuencia es muy variable (19-98%) Aunque en el contexto clínico apropiado permite confirmar el diagnóstico de ECN, hay otros procesos que pueden cursar con neumatosis como es la enterocolitis de la enfermedad de Hirschprung, la estenosis hipertrófica de píloro, gastroenteritis graves y la intolerancia a la leche y a los carbohidratos.

-Asas intestinales fijas: Es sugestivo de una isquemia intestinal segmentaria.

-Aire en el sistema portal: Ocurre en un 9-20% de los pacientes. Se asocia con un peor pronóstico pues en la mayoría de los casos es un signo de necrosis intestinal ⁷⁹.

-Neumoperitoneo: Es un signo de perforación intestinal que está presente hasta en un 30% de los casos. Sin embargo, la perforación puede estar cubierta y este signo radiológico puede no aparecer. Al contrario, el neumoperitoneo puede ocurrir sin perforación como consecuencia de un barotrauma en niños recién nacidos sometidos a ventilación mecánica.

La *ecografía* puede ser útil para identificar la presencia de asas intestinales fijas con aire intramural, líquido libre en la cavidad peritoneal y aire en el sistema portal. Algunos autores proponen ventajas de la *ecografía* sobre la *radiografía simple*, haciendo hincapié en la visualización de la integridad de la pared intestinal y el diagnóstico temprano de ECN. Sin embargo, dado que es una técnica cuyo resultado es muy dependiente del radiólogo que la realiza, su utilización no es todavía frecuente en la práctica clínica habitual ⁸⁰.

2.1.4.5. Histopatología:

En aquellos recién nacidos que precisen una resección intestinal, el estudio histopatológico confirmará el diagnóstico clínico. La ECN puede afectar a un segmento intestinal aislado o a varios. El íleon terminal es la porción implicada con más frecuencia seguido por el colon ascendente. En un 44% de los casos existe una afectación simultánea de intestino delgado y grueso. En un 20% de los pacientes, la necrosis afecta a más del 75% del intestino y se manifiesta de forma fulminante. La perforación intestinal, única o múltiple, ha sido descrita en el 60% de los casos ⁸¹.

La observación macroscópica muestra un intestino distendido con áreas muy friables y zonas deserosadas y en ocasiones recubiertas con exudados de fibrina. La serosa aparece pálida y, cuando la isquemia ha progresado hasta la necrosis, es de color negro. Con frecuencia se aprecian colecciones subserosas de gas (neumatosis intestinal). La mucosa aparece ulcerada en algunas áreas. Se han propuesto algunas clasificaciones para estadificar la gravedad de las lesiones de acuerdo con los hallazgos macroscópicos, entre las que destaca la clasificación de Wallace ⁸².

En el análisis microscópico, la lesión inicial más común es la separación del epitelio del eje vascular de las vellosidades, seguida de la necrosis de la mucosa superficial, edema y hemorragia en la submucosa. Las vellosidades aparecen denudadas y en fases avanzadas desaparece la arquitectura tisular. En más de la mitad de los casos la necrosis es focal al igual que puede ocurrir con los hallazgos macroscópicos ⁸³. Con la aparición de soluciones de continuidad en la barrera mucosa se produce la translocación de microorganismos desde la luz intestinal. La presencia de bacterias que producen gas da lugar a la neumatosis intestinal. Ésta aparece inicialmente en la submucosa y posteriormente es también identificada en la subserosa. A pesar de la presencia de estos microorganismos, la inflamación sólo es prominente en fases más tardías durante la curación de las lesiones. La aparición de epitelio de regeneración, granulación y fibrosis son otros hallazgos en esta fase posterior. Se han propuesto algunas clasificaciones para estadificar los hallazgos microscópicos en función de su gravedad, entre las que destaca la clasificación de Chiu ⁸⁴.

2.1.5 Tratamiento médico e indicaciones de cirugía

A pesar de los avances producidos en los últimos años, no existe todavía ningún tratamiento médico específico de la ECN. En ausencia de necrosis y perforación intestinal, el tratamiento es conservador, basado fundamentalmente en reposo digestivo absoluto, nutrición parenteral total y antibióticos. Es necesario un seguimiento clínico, radiológico y analítico diario con el fin de detectar precozmente aquellos recién nacidos que presentan una mala evolución y precisarán tratamiento quirúrgico. Las principales indicaciones de cirugía son la presencia de neumoperitoneo y aire en el sistema portal y un deterioro clínico acompañado de alteraciones analíticas como una acidosis metabólica persistente, trombocitopenia o líquido peritoneal infectado.

El tratamiento quirúrgico consiste en la resección de los segmentos necróticos y perforados conservando la máxima longitud intestinal posible. En casos seleccionados se puede realizar una anastomosis primaria, pero en la mayoría de los pacientes es necesaria la realización de ostomías terminales o derivativas. En pacientes con una extensa afectación intestinal puede estar indicada una yeyunostomía proximal seguida de una revisión posterior ⁸⁵. La morbilidad del tratamiento quirúrgico es elevada alcanzando el 40% en algunas series ^{30, 86-88}. Entre las complicaciones intraabdominales más frecuentes se incluyen las dehiscencias anastomóticas, los abscesos intraabdominales y las fístulas ^{6, 89, 90}.

Una alternativa a la laparotomía es la colocación de un drenaje peritoneal, especialmente indicado en pacientes con abscesos o con una peritonitis localizada y también en aquellos niños de muy bajo peso con inestabilidad hemodinámica y alto riesgo

quirúrgico. Autores como Moss y cols.⁹¹ defienden la utilización del drenaje peritoneal, descrito por primera vez por Ein en 1977⁹². Lo proponen como primera opción en pacientes menores de 1500 grs., no encontrando diferencias significativas en el resultado final al compararlo con la laparotomía.

Una de las secuelas más comunes de la ECN es la estenosis intestinal, especialmente tras el tratamiento conservador. El lugar afectado con mayor frecuencia es el ángulo esplénico del colon (70%), seguido por el íleon terminal (15%)⁹³. Pero sin ninguna duda, la secuela más grave es el síndrome de intestino corto como consecuencia de extensas resecciones intestinales y que ocurre en aproximadamente el 10% de los casos⁶. Estos pacientes dependerán de nutrición parenteral total durante un largo período de tiempo, lo que a su vez puede ser causa de nuevas complicaciones y secuelas como la sepsis por catéter, retraso del crecimiento, colestasis, cirrosis e insuficiencia hepática. Algunos de éstos pacientes requerirán trasplante intestinal, y en algún caso se ha llegado a realizar un doble trasplante hepático e intestinal⁵⁵.

2.1.6 Prevención

La prevención de la enterocolitis necrotizante debe tener en cuenta todos aquellos factores implicados en la patogénesis de la enfermedad. Estas medidas preventivas se basan principalmente en la disminución de la colonización y sobrecrecimiento bacteriano y en el aumento de la capacidad defensiva del recién nacido.

2.1.6.1. Profilaxis antibiótica:

La administración enteral de antibióticos de amplio espectro que no se absorben en el tubo digestivo, especialmente aminoglucósidos, ha sido utilizada con frecuencia con el objetivo de prevenir la ECN al disminuir la colonización bacteriana. En un meta-análisis⁹⁴ que incluía cinco estudios aleatorizados con un total de 456 recién nacidos, la administración profiláctica de antibióticos por vía enteral disminuyó de forma estadísticamente significativa la incidencia de ECN, así como la mortalidad relacionada con la enfermedad^{95, 96}. Sin embargo, otros estudios controlados no han encontrado diferencias en la evolución clínica y en la mortalidad entre aquellos niños que han recibido antibióticos y los que no^{97, 98}. A pesar de los potenciales efectos beneficiosos de la profilaxis antibiótica en la ECN, no es ampliamente aceptada por diferentes razones entre las que destaca el incremento de las resistencias a los antibióticos en las unidades de neonatología^{42, 99}.

2.1.6.2. Inmunoglobulinas:

Dado que los recién nacidos tienen niveles bajos de inmunoglobulinas, especialmente IgA, algunos estudios clínicos y experimentales han sugerido que la administración de dichas inmunoglobulinas tiene un efecto protector en recién nacidos con factores de riesgo que no reciben lactancia materna¹⁰⁰. Sin embargo, estudios más recientes no han confirmado el efecto beneficioso de las inmunoglobulinas ni por vía oral ni intravenosa^{48, 101, 102}.

2.1.6.3. Glucocorticoides:

Se ha observado que el tratamiento prenatal con corticoides, utilizado para acelerar la maduración pulmonar, disminuye la incidencia de ECN. En este sentido, se ha sugerido que los corticoides aceleran la maduración de las células de la mucosa intestinal mediante la glicosilación de la superficie del epitelio, lo que dificultaría la adhesión bacteriana¹⁰³⁻¹⁰⁵. Sin embargo, el tratamiento postnatal con corticoides en recién nacidos con riesgo de desarrollar una ECN, no ha mostrado ningún efecto beneficioso. Tres meta-análisis han demostrado que la administración postnatal de esteroides no disminuye la incidencia de ECN^{106, 107} e incluso se asocia a un incremento de perforaciones intestinales, especialmente en combinación con indometacina^{106, 108} por lo que no es una medida de prevención que se utilice en la actualidad.

2.1.6.4. Control de la respuesta inflamatoria:

Estudios experimentales han demostrado el efecto protector de varios antagonistas del receptor del PAF como el WEB 2086 y el SRI 63441⁴⁶. Aunque no han sido publicados estudios clínicos sobre el uso de estos antagonistas en recién nacidos con ECN, la administración de antagonistas del PAF en adultos con sepsis por microorganismos gram negativos redujo la mortalidad en un 50% comparada con controles¹⁰⁹.

Otra forma de modular la respuesta inflamatoria consiste en disminuir la producción del radical superóxido bloqueando la acción del enzima xantina-oxidasa. La administración experimental de alopurinol, inhibidor de este enzima, disminuye las lesiones isquémicas intestinales en un modelo de ECN inducido mediante la administración de PAF¹¹⁰.

En algunos estudios experimentales se ha demostrado también un efecto beneficioso de la administración de nitroglicerina y L-arginina que aumentan la concentración de óxido nítrico, el cual contribuye al mantenimiento de la integridad de la mucosa intestinal ^{111, 112}.

2.1.6.5. Alimentación enteral:

Dado que la administración precoz de alimentación enteral ha sido implicada en la etiopatogenia de la ECN, se ha intentado prevenir la enfermedad modificando el inicio, el volumen y el tipo de alimentación utilizada. Sin embargo, el retraso en la introducción de la alimentación enteral no disminuye la incidencia de enterocolitis ¹¹³.

2.1.6.6. Probióticos - Bifidobacterias:

Una de las líneas más prometedoras en la prevención de la ECN es la utilización de probióticos. Las especies más estudiadas son *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus* ^{114, 115}. Las bifidobacterias son microorganismos gram positivos anaerobios que colonizan el tubo digestivo de los recién nacidos. Estas bacterias son los microorganismos predominantes en aquellos recién nacidos que reciben lactancia materna, y mucho menos prevalentes en prematuros que reciben leche artificial y que presentan un mayor riesgo de ECN. Junto con los lactobacilos, las bifidobacterias han demostrado tener un efecto beneficioso en la prevención y tratamiento de gastroenteritis y otras enfermedades gastrointestinales ^{116, 117}. Se ha atribuido su efecto beneficioso en neonatos a su capacidad para disminuir el pH intraluminal y, por lo tanto, inhibir el crecimiento de otros organismos más patogénicos como *Escherichia Coli*.

Los probióticos reducen la incidencia de ECN severa en modelos animales ^{116, 118} y también en algunos ensayos clínicos aleatorizados ^{119 114, 115}.

2.1.6.7. Péptidos trefoil:

La familia de los péptidos trefoil esta constituida por tres proteínas de pequeño tamaño denominadas TFF1, TFF2 y TFF3 y que han sido descubiertas en los últimos años y están ampliamente distribuidas en el tubo digestivo donde desempeñan una función reparadora del epitelio intestinal. En condiciones normales, los péptidos trefoil son secretados de forma específica en distintos segmentos del tubo digestivo. Así, el péptido TFF1 es secretado por el estómago y duodeno y los péptidos TFF2 y TFF3 son secretados por el intestino delgado y colon. Estos péptidos comparten una estructura terciaria, única y característica, con 3 asas dentro de la cadena de amino-ácidos que asemejan las hojas de un trébol.

Nuestro grupo ha demostrado previamente que los péptidos trefoil tienen un efecto protector y aceleran la curación de las lesiones en un modelo de enterocolitis necrotizante ¹²⁰. En dicho estudio, se utilizó un modelo de isquemia reperfusión (clampaje de los vasos mesentéricos superiores durante 60 minutos) en ratas de 18 días de vida y se administró el péptidos trefoil TFF3, en sus formas monomérica y dimerica, tanto por vía subcutánea como enteral. Se valoró tanto el efecto preventivo como terapéutico de éstas proteínas, llegando a la conclusión de que ambas formas previenen el desarrollo y promueven la curación de las lesiones por isquemia-reperfusión intestinal. No encontramos diferencias entre las dos vías de administración. En la actualidad nuestro grupo está investigando los mecanismos que median el efecto de los péptidos trefoil en este modelo experimental.

2.1.7. Modelos animales de ECN

La investigación de los mecanismos implicados en la patogénesis de la ECN así como de la eficacia de las diferentes formas de profilaxis y tratamiento ha transcurrido de forma paralela al desarrollo de diferentes modelos experimentales de la enfermedad. Estos modelos reproducen algunos de los factores etiopatogénicos que pueden estar implicados en el desarrollo de esta enfermedad entre los que destaca la lesión isquémica de la mucosa intestinal presente en la mayoría de ellos.

El modelo animal ideal de ECN sería aquel que es fácilmente reproducible, causa lesiones histológicas similares a las de la enfermedad en humanos y aparece con mayor frecuencia en animales de pocos días de vida. La lesión más frecuente debe ser la necrosis de la mucosa con afectación principal del íleon y colon. Aunque la mayoría de los modelos presentan alguna desventaja, su utilización permite estudiar los distintos factores etiopatogénicos así como nuevas formas de prevención y tratamiento.

2.1.7.1. Modelo de isquemia-reperfusión:

En uno de los primeros modelos experimentales se utilizó cerdos recién nacidos a los que se les provocó una hipoperfusión intestinal mediante asfixia. De esta forma, se consiguió inducir una ECN con sus características histológicas^{64, 65}. La gravedad de las lesiones aumenta cuando la hipoxia es combinada con otros factores como el frío o la hipercoagulabilidad causada tras esplenectomía^{121, 122}.

Otro de los modelos de isquemia-reperusión más empleados se basa en la oclusión temporal de la vascularización mesentérica. En un estudio con cerdos recién nacidos de bajo peso (700-1200 gramos), las arcadas mesentéricas correspondientes al íleon distal fueron clampadas durante 48 horas⁶⁶. Las lesiones histológicas variaron desde mínimas erosiones mucosas hasta ulceraciones y necrosis transmural con perforación y peritonitis. El mismo tiempo de oclusión vascular en cerdos de más de 1500 gramos produjo lesiones similares pero menos graves mientras que en cerdos de 3 meses de edad (35 Kg) no se produjeron lesiones destacables, lo que demuestra que en este modelo las lesiones son más frecuentes y más graves en animales recién nacidos y de bajo peso, al igual que ocurre en la ECN. El tiempo de isquemia necesario para producir cambios de enterocolitis es mucho menor en otras especies animales. En ratones, la oclusión de la arteria mesentérica superior durante 20 minutos produce lesiones isquémicas intestinales en el 50% de los animales a las 48 horas. En un estudio con ratas recién destetadas (90 gramos), la oclusión mesentérica durante sólo 1 minuto causó una mortalidad del 63%, necrosis en el 46% y perforación en el 17% de los animales en una semana⁶⁷

2.1.7.2 Modelos basados en la administración de nutrientes enterales

La administración intraluminal de caseína acidificada de bovino es otro de los modelos experimentales más empleados. Está basado en el análisis del contenido intestinal en niños con enterocolitis, en el que destacaba un pH intraluminal < 5.0 , un contenido en proteínas > 5 gr/dl y bacterias capaces de fermentar los hidratos de carbono en ácidos orgánicos⁶⁸. La administración de caseína acidificada en conejos causa una lesión en la mucosa intestinal caracterizada por denudación de las vellosidades, dilatación de los

vasos linfáticos y edema. En este modelo más del 30% de los animales presentan una necrosis hemorrágica a las 16 horas y la mortalidad es del 40% ¹²³.

En otro estudio realizado en cerdos lactantes se combinó la administración intraluminal de caseína acidificada con la creación de varias asas intestinales cerradas ⁶⁹. De esta forma se combinaban dos de los factores implicados en la patogénesis de la enfermedad: la inyección intraluminal de una sustancia que imita el contenido intestinal de los recién nacidos con ECN y la dismotilidad intestinal asociada a la inmadurez mediante la creación de asas cerradas. El examen microscópico demostró áreas de necrosis, infiltrado inflamatorio y distensión de los vasos linfáticos. Mientras que en los animales de 2 semanas de vida la lesión se limitaba a la mucosa, en animales de menos de tres días de vida la lesión era transmural. La principal ventaja de este modelo es que es fácilmente reproducible. Sin embargo, se ha cuestionado si los constituyentes del contenido intestinal en recién nacidos con enterocolitis, fundamento de este modelo, son secundarios a la necrosis y no su causa. Por otro lado, en este modelo no aparece la neumatosis intestinal, aunque esto puede ser debido a su carácter agudo ⁷⁰.

2.1.7.3 Modelo basado en la administración de mediadores de la inflamación:

La inyección intravascular del PAF en ratas adultas produce una necrosis intestinal similar a la ECN ⁷¹. Además, la administración de endotoxina bacteriana produce un aumento en la concentración intestinal de PAF y da lugar a los mismos hallazgos histológicos. Por otro lado, la administración enteral y parenteral de los antagonistas del PAF previene la aparición de estas lesiones ⁷². Este modelo ha sido utilizado únicamente en animales adultos. La principal desventaja es que las lesiones en el colon son muy poco

frecuentes. La administración de TNF- α también produce una necrosis intestinal seguida de shock séptico en la que el PAF actúa como un mediador secundario ²⁰.

2.1.7.4 Combinación de modelos:

En un estudio con ratas recién nacidas, se combinó la exposición a varios insultos diarios de hipoxia y frío con la alimentación con leche artificial y la administración de *Klebsiella* por vía oral. Todos los animales presentaron distensión abdominal, enterorragias, letargia y cianosis. El intestino aparecía dilatado, hemorrágico y en algunos casos perforado. La lactancia materna, al igual que en otros modelos, prevenía la aparición de estas lesiones ^{26, 73}. La ventaja de este modelo es la similitud con los hallazgos histológicos de la ECN en humanos, incluida la neumatosis intestinal. La principal desventaja es que las ratas recién nacidas requieren unos cuidados especiales y la mortalidad es muy elevada, por lo que no es fácilmente reproducible. Otro modelo consiste en la combinación de 60 minutos de isquemia mesentérica, en cerdos de pocos días de vida, con la perfusión intraluminal de leche artificial con un elevado contenido en grasas. La utilización de leche artificial sin grasas produce lesiones histológicas mucho menos importantes ⁷⁴.

2.2 ERITROPOYETINA

2.2.1. Efectos biológicos e indicaciones terapéuticas

La eritropoyetina (Epo), glicoproteína con un peso molecular de 30,4 kDa, es la principal hormona que induce la formación de los eritrocitos previniendo la muerte por apoptosis de los precursores eritroides y estimulando su proliferación y diferenciación (Figura 4) ¹²⁴. Estas acciones se traducen clínicamente en un aumento de los valores de hemoglobina. El principal estímulo para la síntesis de Epo es la hipoxia tisular y su principal fuente de producción en adultos es el riñón (Figura 5). En menor cantidad es sintetizada por el hígado aunque este órgano es el principal productor de Epo durante el desarrollo fetal.

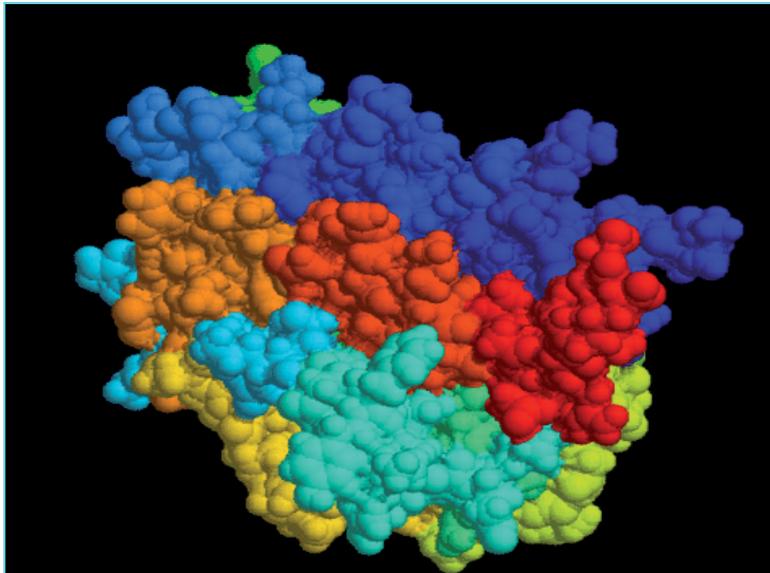


Figura 4. Foto molecular de Eritropoyetina.

Los efectos biológicos de la Epo sobre las células hematopoyéticas están mediados por la unión a un receptor (Epo-R) en la superficie celular que pone en marcha la señal intracelular Janus kinase (JAK) y la cascada del activador de la transcripción (STAT) que regula la proliferación celular y la diferenciación^{125, 126}. Además de la hipoxia, hay otros factores que modulan la producción de Epo, como la hipoglicemia, el aumento de calcio intracelular, la liberación de insulina, el estrógeno y varias citoquinas.

Los valores inapropiadamente bajos de Epo encontrados en personas con insuficiencia renal crónica constituyeron un incentivo determinante en la obtención de una fuente exógena de Epo¹²⁷. Actualmente está aceptada y ampliamente extendida la administración de Epo recombinante humana en pacientes con anemia secundaria a insuficiencia renal crónica con el objetivo de mantener los niveles de hemoglobina por encima de 11 g/dl. Tres formas de Epo recombinante humana han sido aprobadas para esta indicación: epoetin alfa, epoetin beta y darbepoetin alfa, esta última con un índice de aclaración más lento y, por tanto, con una vida media más larga¹²⁵. Posteriormente se han aceptado otras indicaciones como el tratamiento de la anemia inducida por quimioterapia en pacientes con cáncer y, de forma preventiva, en pacientes seleccionados que van a ser intervenidos de cirugía mayor ortopédica¹²⁸.

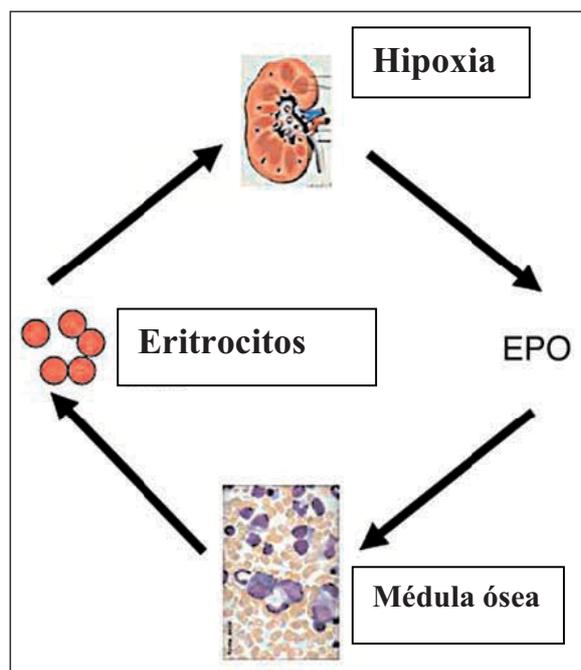


Figura 5. *El feed-back de la Epo.*

Además de las indicaciones aceptadas por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios, algunos estudios han demostrado la eficacia del tratamiento con Epo de la anemia asociada a otras patologías ¹²⁹. En este sentido, varios estudios aleatorizados ¹³⁰⁻¹³² han demostrado también que la administración de Epo recombinante humana, a una dosis variable entre 300 y 600 U/Kg por semana, es eficaz como tratamiento de la anemia del recién nacido prematuro disminuyendo de esta forma las necesidades transfusionales. Los recién nacidos prematuros presentan niveles plasmáticos bajos de Epo, lo que justificaría desde un punto de vista fisiopatológico la utilización de esta hormona para prevenir o tratar la anemia. Sin embargo, la utilización de Epo en esta indicación es todavía controvertida. En una reciente revisión sistemática de la Cochrane ¹³³ en la que se incluyeron 23 estudios con un total de 2074 recién nacidos prematuros se observó que la

administración precoz de Epo, antes del día 8 después del nacimiento, redujo el riesgo de recibir una transfusión sanguínea aunque el beneficio clínico fue limitado. Por el contrario, se observó un aumento del riesgo de retinopatía del prematuro. Por todo ello, los autores concluyeron que su administración no puede ser recomendada de forma rutinaria en recién nacidos prematuros. La misma conclusión se alcanzó cuando se analizaron aquellos estudios en los que la Epo había sido administrada de forma tardía, después del día 8 tras el nacimiento ¹³⁴.

Es interesante señalar que si bien en todos estos estudios la Epo se administró por vía subcutánea, tal y como está aceptado en la ficha técnica del producto, Ballin et al. ¹³⁵ demostraron en un estudio aleatorizado preliminar con sólo 12, recién nacidos de menos de 34 semanas y con un peso inferior a los 1800 gramos, que la administración enteral de Epo estimula también la eritropoyesis.

2.2.2. La eritropoyetina en el desarrollo fetal: su importancia como factor trófico del intestino

El hígado es la principal fuente de Epo durante el desarrollo fetal aunque no la única ¹³⁶. En un estudio realizado con fetos de 5 a 24 semanas tras la concepción se investigó, mediante técnicas de RT-PCR e inmunohistoquímica, la presencia de Epo y Epo-R en diferentes órganos. Los autores encontraron una intensa inmunorreactividad en el hígado en todas las edades gestacionales, pero también en el riñón, cerebro, retina, glándulas suprarrenales e intestino delgado, especialmente a partir del segundo trimestre. ¹³⁷.

Se ha demostrado también que la placenta sintetiza Epo en la vida fetal ¹³⁸. La amplia distribución de Epo y Epo-R en diferentes tejidos durante el desarrollo embrionario sugiere que esta hormona actúa en concierto con otros factores de crecimiento y/o como factor de diferenciación durante este periodo. Se ha demostrado además que Epo-R se expresa antes que Epo durante el desarrollo embrionario para preparar a las células para responder al estímulo del la Epo ¹³⁹.

La leche materna es rica en hormonas y péptidos como *insulin-like growth factor*, *epidermal growth factor*, *transforming growth factor-alpha* y diferentes interleuquinas. Dado que el tubo digestivo neonatal presenta una menor actividad proteolítica y es más permeable a las proteínas, muchos de estos péptidos y hormonas se absorben intactos y desempeñan un papel importante en el desarrollo del recién nacido ¹⁴⁰. Se ha demostrado que la leche materna contiene cantidades considerables de Epo, en una concentración ligeramente inferior a la del suero ⁹ y que la Epo se absorbe en diferentes segmentos del tubo digestivo. Estas observaciones sugieren que la Epo contenida en la leche materna interviene en el desarrollo y en la función del intestino neonatal. En este sentido, se ha demostrado la presencia de receptores funcionantes de Epo en las microvellosidades de los enterocitos y en el endotelio vascular de la mucosa del intestino delgado tanto fetal como postnatal ¹⁰. Además, la Epo recombinante estimula in vitro la migración de la línea de enterocitos de rata IEC-6 y disminuye la apoptosis inducida por la exposición a citoquinas ^{12, 141}. Juul et al. ¹⁴² han demostrado también que la Epo estimula el crecimiento del intestino delgado aumentando su longitud, la altura de las vellosidades y la superficie de las mismas.

2.2.3. Eritropoyetina y angiogénesis

Los resultados de varios estudios recientes sugieren que la Epo están no sólo estimula la proliferación celular e inhibe la apoptosis sino que también estimula la angiogénesis ¹⁴³⁻¹⁴⁵. La angiogénesis es un fenómeno biológico que se caracteriza por la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, a diferencia de la vasculogénesis que consiste en la formación de vasos a partir de precursores de células endoteliales. Se han propuesto 2 formas distintas de angiogénesis: *a) sprouting* (formación de brotes), y *b) non sprouting* o *intususcepción* (por inserción de tejido intersticial entre la luz del vaso preexistente) ¹⁴⁶ (Figuras 6 y 7.) Además de estos dos mecanismos, la angiogénesis puede estar también sustentada por la movilización e incorporación funcional de los precursores de las células hematopoyéticas, que se trasladarían desde la médula ósea para integrarse en los nuevos vasos formados ¹⁴⁷.

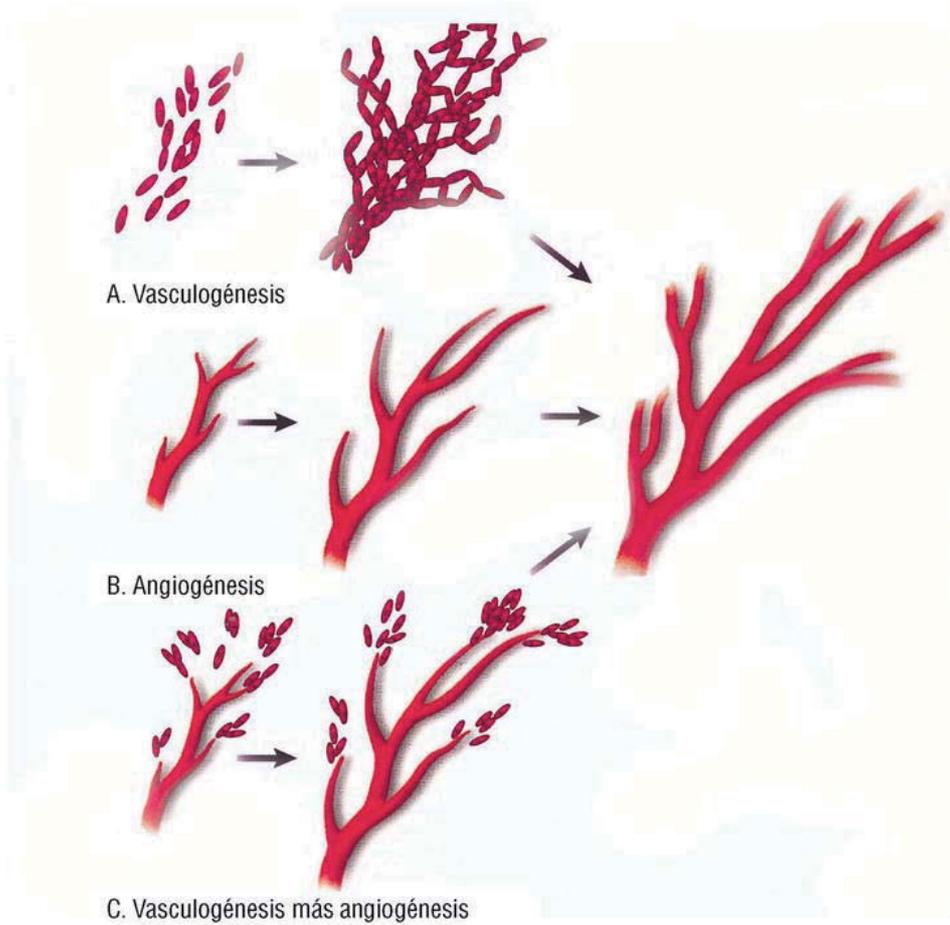


Figura 6. Mecanismos de angiogénesis y vasculogénesis, *sprouting* o tipo a .

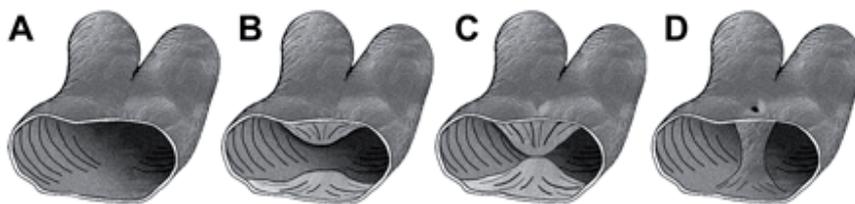


Figura 7. Mecanismo de angiogénesis mediante *invaginación vascular* o tipo b. ¹⁴⁸

En la angiogénesis participan diferentes tipos celulares así como componentes solubles y factores de la matriz extracelular y que, a excepción de determinados procesos fisiológicos como el desarrollo embrionario, la curación de las heridas y el ciclo menstrual, se encuentran en un estado quiescente. Este estado es el resultado del equilibrio entre factores inductores e inhibidores. Estos factores pueden ser circulantes o actuar localmente como factores paracrinos. El cambio en el equilibrio entre inductores e inhibidores pueden activar el denominado "angiogenic switch" o interruptor angiogénico (Figura 8) estimulando la formación de nuevos vasos ¹⁴⁹. La activación de la angiogénesis puede estar influida por factores ambientales como la hipoxia, la acidosis y la inflamación. Uno de los factores más potentes capaces de inducir la angiogénesis es el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).

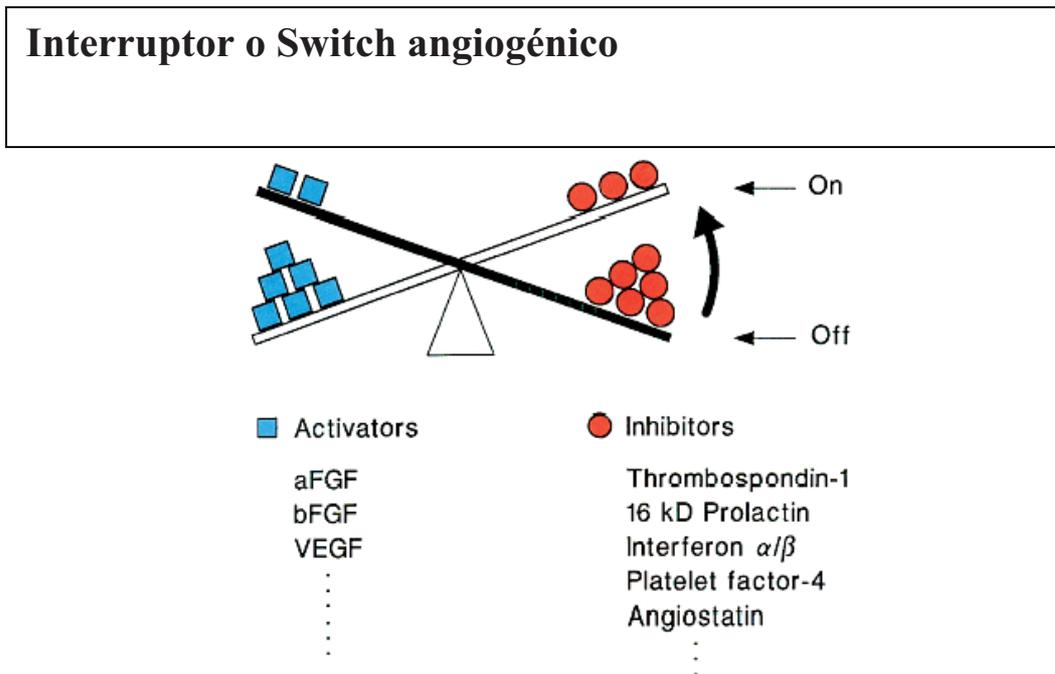


Figura 8. Hipótesis del denominado *interrupor angiogénico*: cambios en el balance de inductores e inhibidores activa o desactiva “switch”, es decir, la angiogénesis. Por dicha razón el aumento del VEGF, activaría el interrupor, con formación de nuevos vasos.

El VEGF es la molécula mejor caracterizada y más importante del proceso angiogénico. Es producida por diferentes tipos celulares entre los que destacan las plaquetas, los leucocitos y las propias células endoteliales ^{150, 151}. Hasta ahora se han descrito varias glicoproteínas que conforman la familia de VEGF: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, y VEGF-E ¹⁵². El VEGF-A corresponde al que comúnmente denominamos VEGF y fue el que se describió en primer lugar ¹⁵³. Se han descrito 6 isoformas del VEGF-A (VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆) que difieren en sus propiedades y funciones.

VEGF₁₂₁ es secretado en forma libre, mientras que las isoformas mayores (VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆) están secuestradas en la matriz extracelular y requieren la acción de las

proteasas para su activación. VEGF₁₆₅ existe tanto en la forma soluble como en la forma unida a la matriz extracelular. Esta isoforma es la predominante y está comúnmente sobreexpresada por diferentes tipos de tumores humanos sólidos.

Asimismo, se conocen tres receptores del VEGF: VEGF-R1 (Flt-1), VEGF-R2 (KDR/Flk-1) y VEGF-R3 (KDR/Flt-1). La unión del VEGF con sus receptores, de tipo tirosinquinasa, activa diversas vías de señal que intervienen en diferentes pasos en la angiogénesis. Mediante la activación de los receptores en las células endoteliales, VEGF media múltiples funciones. En primer lugar, VEGF tiene la capacidad de estimular la permeabilidad vascular a las macromoléculas circulantes, por lo que inicialmente fue denominado factor de permeabilidad vascular. De hecho, el VEGF es uno de los inductores de permeabilidad vascular más potente conocido, con una capacidad, hasta 50.000 veces superior a la histamina^{152, 153}. Otro de los efectos del VEGF es la activación de las células endoteliales que incluye cambios en su morfología, alteraciones del citoesqueleto y estímulo de la proliferación y migración.

Son muchas las evidencias que demuestran que la Epo desempeña un importante papel en la regulación de la angiogénesis. En primer lugar, se ha sugerido que las células hematopoyéticas y las células endoteliales comparten un progenitor común¹⁵⁴. Esta hipótesis se basa en la observación de que ratones deficientes en VEGF-R2 presentan defectos tanto en las células hematopoyéticas como endoteliales¹⁵⁵. Además, ambas líneas celulares expresan antígenos como CD31 y CD34¹⁵⁶. Dado que las líneas celulares hematopoyéticas y de células endoteliales comparten progenitores comunes, es razonable esperar que las citoquinas y factores de crecimiento asociados con la hematopoyesis puedan tener también un papel en la angiogénesis². En este sentido, se ha demostrado en

estudios in vitro que la Epo estimula la proliferación y migración de células endoteliales ^{157, 158}.

Ribatti et al. observaron que las células endoteliales humanas de la línea EA.hy926 expresan Epo-R y responden a la Epo diferenciándose en estructuras vasculares en una matriz de Matrigel ¹⁵⁹. La capacidad de la Epo de estimular la angiogénesis ha sido demostrada también en modelos in vivo, como el ensayo de la membrana corioalantoidea del embrión de pollo ¹⁵⁹ o en el endometrio de ratones ovariectomizados. ¹⁶⁰ Kertesz et al. ¹⁶¹ observaron que embriones de ratón transgénicos en los que se había producido una delección de los genes Epo y Epo-R presentaban una angiogénesis defectuosa mientras que la vasculogénesis permanecía relativamente normal.

El efecto angiogénico de la Epo está mediado, al menos en parte, por el VEGF y otros factores angiogénicos como la angiopoietina-1 ^{143, 159, 161-165}. Se ha observado un aumento en la expresión de VEGF en modelos in vitro y en in vivo en los que se ha administrado Epo. Sin embargo la observación de que las células endoteliales expresan Epo-R sugiere que también existe un efecto directo de Epo sobre las mismas y su potencial angiogénico es comparable al del VEGF ^{157, 165}.

2.2.4. Eritropoyetina y ECN

Se ha propuesto que la Epo no sólo desempeña un papel relevante como factor trófico en el desarrollo del intestino durante el periodo neonatal, tal y como hemos mencionado anteriormente, sino que también puede tener un efecto preventivo de las lesiones intestinales asociadas a patologías como la gastrosquisis¹⁶⁶ y, en particular, las lesiones que se producen en la ECN^{12, 167, 168}. En este sentido, hay que destacar especialmente el trabajo de Ledbetter y Juul¹². En base a estudios previos realizados por dicho grupo sobre el efecto de la Epo en el intestino inmaduro, la hipótesis de los autores proponía que la Epo recombinante administrada a los recién nacidos prematuros para prevenir o tratar la anemia tendría un efecto protector sobre el desarrollo de ECN. Para ello, realizaron un estudio retrospectivo de cohortes en el que la información se obtuvo a partir de una base de datos mantenida de forma prospectiva. Los autores incluyeron a recién nacidos prematuros con un peso ≥ 500 y ≤ 1250 gramos. Los recién nacidos que habían recibido Epo en cualquier momento antes del desarrollo de la ECN, en caso de que ésta ocurriera, fueron asignados al grupo rEpo. Aquellos que nunca recibieron Epo recombinante o la recibieron tras el diagnóstico de ECN fueron asignados al grupo control. El tratamiento con Epo se administró en algunos casos por vía intravenosa y en otros por vía subcutánea a una dosis entre 200 y 400 U/Kg/día, tres veces por semana durante dos semanas.

La variable principal del estudio fue el diagnóstico de ECN en estadio II o III de acuerdo con la clasificación de Bell. De un total de 483 recién nacidos incluidos en el análisis, 260 (54%) recibieron Epo y 223 (46%) fueron controles. Los dos grupos fueron similares en las características basales. El hallazgo más importante fue una menor incidencia de ECN, 12 de 260 (4.6%), en el grupo que recibió Epo en comparación con 24 de 223 (10.8%) recién nacidos que no recibieron Epo ($p=0.028$).

La gravedad de la ECN, de acuerdo con la clasificación de Bell, fue similar en los dos grupos. A pesar de las limitaciones metodológicas de un estudio retrospectivo no controlado, los hallazgos de este trabajo han servido de base para posteriores investigaciones sobre el papel potencial de la Epo en la prevención de la ECN.

Por un lado, se ha investigado el efecto de la Epo en dos estudios experimentales de ECN en los que se ha empleado el modelo de hipoxia-reoxigenación, aunque los resultados han sido contradictorios ^{167, 168}. Por otra parte, numerosos estudios han demostrado un efecto protector de la Epo sobre las lesiones por isquemia-reperfusión en diferentes órganos incluido el intestino, aunque en todos ellos se ha empleado ratas adultas. Hasta ahora no se ha investigado el efecto de la Epo sobre la lesión por isquemia-reperfusión en ratas recién nacidas. En todos estos trabajos se han propuesto diferentes mecanismos de acción que expliquen el efecto de la Epo, entre los que destacan la inhibición de la formación del óxido nítrico, la reducción del estrés oxidativo o la inhibición de la apoptosis.

Analizados los estudios mencionados anteriormente, el efecto beneficioso de la Epo sobre la ECN es todavía controvertido. Después del estudio de Ledbetter y Juul ¹², no se ha realizado ningún otro estudio clínico aleatorizado con el objetivo de investigar si la Epo previene la ECN en recién nacidos prematuros y/o de bajo peso. Aunque en las revisiones sistemáticas realizadas por la Cochrane Library sobre la administración de Epo para prevenir la anemia del prematuro ^{134, 169} no se observó una reducción significativa de la incidencia de ECN asociada a dicho tratamiento, hay que señalar que ninguno de los estudios incluidos se había diseñado con ese objetivo. Por todo ello creemos que, a la espera de la realización de un ensayo clínico controlado, es necesario seguir investigando en modelos experimentales el efecto de la Epo en la ECN y sus mecanismos de acción.

3. HIPÓTESIS

Hipótesis

3.1. HIPÓTESIS PRINCIPAL:

- La hipótesis principal del presente proyecto de investigación propone que la administración profiláctica de Epo tiene un efecto protector sobre las lesiones intestinales producidas en un modelo experimental de ECN.

3.2. HIPÓTESIS SECUNDARIA:

- El efecto protector de la Epo en el modelo de ECN está mediado, al menos en parte, por un aumento de la expresión de VEGF.

Hipótesis

4. OBJETIVOS

Objetivos

4.1. OBJETIVO GENERAL:

- Estudiar el efecto de la administración profiláctica de Epo sobre las lesiones intestinales por isquemia-reperfusión en un modelo experimental de ECN en ratas.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Reproducir las alteraciones morfológicas de la ECN mediante un modelo de isquemia-reperfusión en ratas neonatales.
- Realizar un análisis morfométrico del efecto preventivo de la Epo en comparación con placebo en dicho modelo de ECN.
- Comparar los niveles de VEGF en suero tras la lesión intestinal por isquemia-reperfusión entre los animales tratados con Epo y los tratados con placebo.
- Comparar el grado de expresión de VEGF en la pared intestinal entre los animales tratados con Epo y los tratados con placebo.

Objetivos

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Animales

Se han utilizado ratas de la cepa Sprague-Dawley recién destetadas que fueron criadas en el Laboratorio de Harlan Interfauna (Ibérica, S.A.) de Barcelona (Figura 9).



Figura 9. *Camada de animales recién nacidos utilizados en el estudio.*

Se colocaron en jaula y se mantuvieron en condiciones ambientales estables (20°C, humedad relativa 55%) en el estabulario del Hospital Sant Joan de Déu, de la Universidad de Barcelona. Durante 12 horas al día los animales estaban en un ambiente con luz artificial, que era apagada durante las otras 12 horas. Las ratas fueron alimentadas durante una semana con *pellet* de dieta (Beekay Feeds, Rodent Diet, B&K Universal, Humberside, England) y recibieron agua *ad libitum*. En el momento de iniciarse el estudio las ratas tenían 15 días de vida (Figura 10).



Figura 10. *Dos ejemplares de 15 días de vida.*

5.2 Modelo de ECN

Aunque el modelo de isquemia-reperfusión utilizado previamente por nuestro grupo ¹²⁰ reproducía alteraciones morfológicas similares a las de la ECN en recién nacidos prematuros, decidimos introducir animales de menos días de vida y un peso inferior (15 días de vida y un peso aproximado de 30 gramos en lugar de 18-20 días de vida y 40-45 gramos utilizados anteriormente) con el fin de que el intestino fuera más inmaduro. De esta forma pretendíamos cumplir el primer objetivo del presente estudio. Los animales (grupo ECN, n=13) fueron anestesiados con isoflurano inhalado. Se colocó cada animal en decúbito supino con fijación de las cuatro extremidades y se realizó una laparotomía media supra-infraumbilical. El intestino delgado fue exteriorizado y desplazado hacia la izquierda. Tras identificar los vasos mesentéricos superiores se realizó el clampaje de los mismos durante 45 minutos en su segmento más proximal. La oclusión vascular fue confirmada por la pérdida de pulsación en el mesenterio (Figura 11).

Durante este tiempo el intestino fue reintroducido en la cavidad abdominal y fue irrigado de forma periódica con suero fisiológico. Tras los 45 minutos de isquemia, se retiró el *clamp* vascular y se comprobó que la perfusión era efectiva. Se procedió al cierre de la cavidad abdominal en un sólo plano con monofilamento 5/0.

Tres horas después del inicio de la perfusión se realizó una nueva laparotomía para la obtención de muestras tras la cual los animales fueron sacrificados mediante la inhalación de una sobredosis de isoflurano. Este modelo fue aprobado por el Comité Etico de Experimentación Animal de la Universidad de Barcelona.

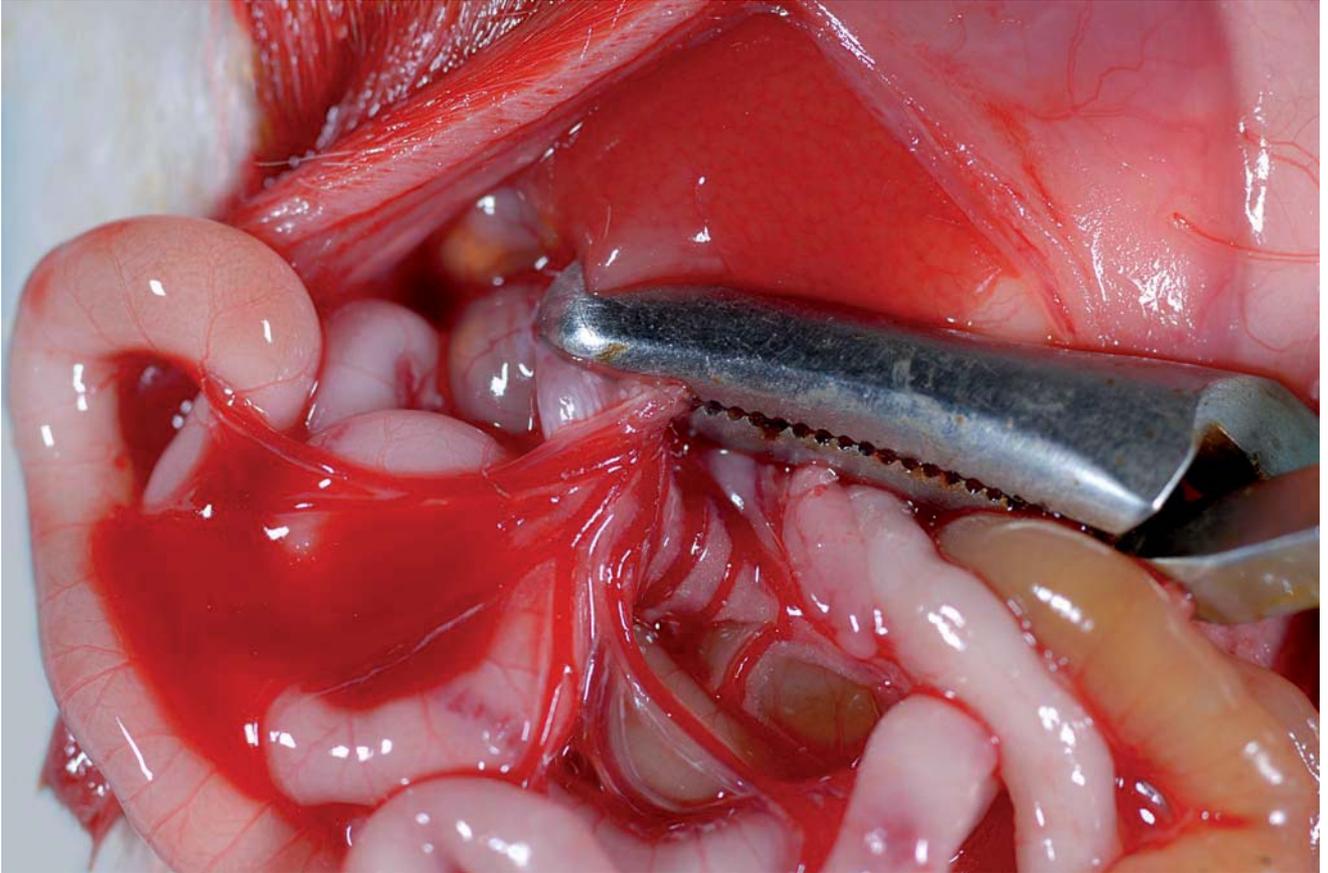


Figura 11. *Clampaje de los vasos mesentéricos superiores.*

5.3. Eritropoyetina

La hormona eritropoyética que se ha utilizado en este estudio es producida mediante técnicas de DNA recombinante y comercializada. Hemos utilizado Epo recombinante humana (rhEpo; R&D Systems) y de rata (rrEpo; R&D Systems) a dosis de 500 UI/Kg. Esta dosis es la recomendada en la ficha técnica para que la hormona tenga efecto sobre la eritropoyesis y, por lo tanto, utilizada con frecuencia en la práctica clínica habitual.

También se ha utilizado esta dosis en varios estudios experimentales en modelos de isquemia-reperfusión en otros órganos^{170, 171}. Se administró la hormona en 0,5 ml de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) de acuerdo con las recomendaciones del laboratorio.

5.4. Diseño experimental

Una vez conseguimos reproducir el modelo tras las modificaciones practicadas y mencionadas anteriormente, procedimos a realizar el estudio experimental propiamente dicho para cumplir con el resto de los objetivos. Para ello, empleamos el siguiente diseño:

Grupo Sham (n=10). Se realizó una laparotomía media y se mantuvo el abdomen abierto durante 45 minutos pero no se clamparon los vasos mesentéricos y por lo tanto no se realizó isquemia-reperfusión. No se administró ningún tratamiento. Todas las ratas fueron sacrificadas tres horas después del inicio de la perfusión. Este grupo sirvió como control del grupo ECN.

Grupo ECN (n=13). Se realizó isquemia-reperfusión tal y como se ha descrito previamente en el modelo experimental. Se administró 0,5 ml de PBS, vehículo utilizado en los grupos de tratamiento, por vía subcutánea, durante los 6 días previos a la oclusión vascular. Todas las ratas fueron sacrificadas tres horas después del inicio de la perfusión. Este grupo sirvió como control de los dos grupos de tratamiento con Epo.

Grupo rhEpo (n=10). Se realizó isquemia-reperfusión tal y como se ha descrito en el modelo experimental. Las ratas recibieron 1 dosis diaria de EPO recombinante humana (500 UI/Kg en 0,5 ml de PBS) por vía subcutánea durante los 6 días previos a la oclusión vascular. Todas las ratas fueron sacrificadas tres horas después del inicio de la perfusión.

Grupo rrEpo (n=10). Se realizó isquemia-reperfusión tal y como se ha descrito en el modelo experimental. Las ratas recibieron 1 dosis diaria de EPO recombinante de rata (500 UI/Kg en 0,5 ml de PBS) por vía subcutánea durante los 6 días previos a la oclusión vascular. Todas las ratas fueron sacrificadas tres horas después del inicio de la perfusión.

5.5. Estudio microscópico

En el momento del sacrificio se obtuvieron muestras del íleon distal y colon derecho de cada animal. Estas muestras fueron abiertas longitudinalmente, lavadas en PBS y fijadas en formol al 10% durante 24 horas. Todas las muestras fueron incluidas en parafina tras una deshidratación previa con concentraciones crecientes de alcohol y aclarado en tolueno. De cada bloque de parafina se practicaron varias secciones sucesivas de 4 μm de grosor que fueron teñidas con hematoxilina-eosina.

El estudio con microscopía óptica se inició con la aplicación del sistema de lesión microscópica descrito por Chiu (Tabla 3). Estudios previos en los que se ha utilizado este mismo modelo animal han demostrado que este sistema de puntuación es un buen indicador de lesión isquémica ⁸⁴.

Grado	Descripción
0	Vellosidades de características normales
1	Espacio subepitelial de Gruenhagen; congestión capilar
2	Separación moderada entre el epitelio y la lámina propia.
3	Separación masiva del epitelio que se extiende hacia la base de la vellosidad; algunas vellosidades aparecen denudadas.
4	Denudación de múltiples vellosidades con exposición de la lámina propia y de los capilares dilatados.
5	Digestión y desintegración de la lámina propia; hemorragia y ulceración.

Tabla 3. *Clasificación de Chiu*

El estudio microscópico continuó con el análisis morfométrico de las muestras que permite una valoración cuantitativa de las lesiones de la mucosa intestinal.

Las imágenes fueron visualizadas mediante un microscopio Olympus (Japan) BX 41, con lente WH10X/22, conectado a una videocámara en color (sistema de video MicroImage modelo 1H), y a un monitor Sony Trinitron (modelo PVM-1343MD) y posteriormente capturadas en un ordenador, donde se realizó el análisis de las mismas.

Los parámetros estudiados fueron los siguientes:

Altura media de las vellosidades (AMV): La altura de la vellosidad fue calculada dibujando una línea desde el vértice de la misma hasta su base. Esta medición fue repetida en al menos el 80% de las vellosidades de cada sección y se calculó la media (Figura 12).

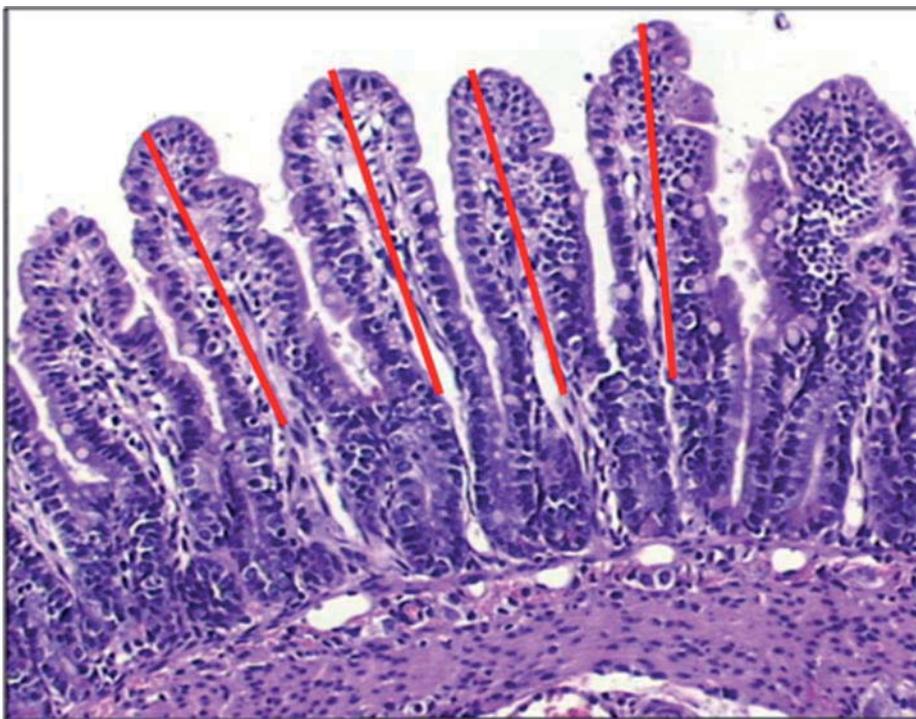


Figura 12. *Cálculo de la altura media de las vellosidades (AMV)*

Grosor medio de las vellosidades (GMV): El grosor de una vellosidad fue calculado midiendo la anchura de la vellosidad en 4 puntos. Esto fue repetido en al menos el 80% de las vellosidades en cada corte y se calculó la media (Figura 13).



Figura 13. *Cálculo del grosor medio de las vellosidades (GMV)*

Índice de Superficie (IS): La longitud de superficie fue calculada dibujando de forma manual una línea a lo largo del borde externo de las vellosidades. El índice de superficie fue entonces calculado dividiendo esta medición entre la distancia sobre la que la longitud de superficie había sido calculada (Figura 14).



Figura 14. *Indice de superficie (IS).*

Dado que no hay vellosidades en el colon, la lesión mucosa en el intestino grueso fue evaluada únicamente con el IS y con el sistema de puntuación de Chiu.

Antes de cada medición se realizó una calibración utilizando una imagen capturada de una regla milimétrica. Todas las mediciones fueron realizadas con una magnificación X100.

La AMV y la GMV fueron medidas en micras.

5.6. Obtención de muestras de sangre. Test de ELISA

Se obtuvo una muestra de 0,5 ml de sangre venosa por punción cardíaca bajo anestesia inmediatamente antes del sacrificio. La sangre fue centrifugada a 4° C, 3000 RPM durante 10 minutos y el suero recogido fue congelado a -80° C para su posterior análisis. Se determinaron los valores de VEGF mediante la técnica de ELISA con el *kit* Quantikine rat VEGF (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) según protocolo de preparación. Este proceso emplea la técnica cuantitativa del inmunoensayo enzimático en sándwich, en el que se ha fijado previamente en el fondo de un pocillo un anticuerpo monoclonal específico para el VEGF. La curva de estándares y las muestras son pipeteadas dentro de los pocillos y el VEGF presente en los mismos se fija e inmoviliza por el anticuerpo. Tras el lavado exhaustivo se eliminan las sustancias sobrenadantes y se añade un anticuerpo policlonal específico que va unido a una enzima con un colorante. Posteriormente a un nuevo lavado para eliminar el exceso de anticuerpo no unido se añade la solución sustrato a los pocillos y se obtiene una cantidad de color proporcional a la cantidad de VEGF que se ha fijado en el paso inicial. Lo que finalmente se mide es la intensidad del color.

5.7. Estudio Inmunohistoquímico

La expresión de VEGF en la pared del íleon distal se valoró utilizando técnicas inmunohistoquímicas habituales. Las preparaciones de tejido fueron incubadas durante la noche a 4° C con un anticuerpo monoclonal frente a VEGF (ab46154, Abcam Inc. 1 Kendall Square, Ste 341, Cambridge, MA, USA) a una dilución de 1:500. Se utilizó el sistema Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA) para visualizar la

reacción antígeno-anticuerpo. Se utilizaron muestras procesadas sin el anticuerpo primario como controles negativos.

Todas las valoraciones fueron realizadas por un patólogo que desconocía a que grupo pertenecía cada preparación. Estudios previos han demostrado que, en condiciones normales, el VEGF es expresado en las células epiteliales de las vellosidades, en la lámina propia y por las células endoteliales de los vasos localizados en la mucosa y en la muscular^{172, 173}. Se valoró la intensidad de la inmunorreactividad frente a VEGF en las células epiteliales de las vellosidades mediante un sistema de puntuación semicuantitativo: negativa, 0; débil, 1; moderada, 2 y fuerte, 3. Asimismo, se calculó el número de vasos que expresaban VEGF con una magnificación x 40 en 10 áreas determinadas al azar y se determinó la media para cada preparación.

5.8. Análisis estadístico

Las variables cualitativas han sido expresadas en valor absoluto y porcentaje y comparadas entre los grupos mediante el test de chi cuadrado. Las variables cuantitativas fueron expresadas como media y desviación estándar y comparadas entre los grupos mediante el test de Kruskal-Wallis dada la distribución no paramétrica de las variables en este estudio. Cuando se decidió realizar comparaciones entre dos grupos se utilizó el test de Mann-Whitney. Para valorar el grado de asociación entre variables, se calculó el coeficiente de correlación de Spearman. Una $p < 0.05$ fue considerada estadísticamente significativa. Todos los cálculos han sido realizados con SPSS, versión 12.0

6. RESULTADOS

6.1. Reproducción del modelo de ECN

Tras 45 minutos de isquemia y 3 horas de reperfusión el intestino delgado presentaba, en todos los animales del grupo ECN, un color oscuro y estaba claramente dilatado (Figura 15). Estos mismos cambios se apreciaron en el colon derecho aunque eran menos evidentes. No se encontró ascitis ni perforación intestinal en ninguna de las ratas.

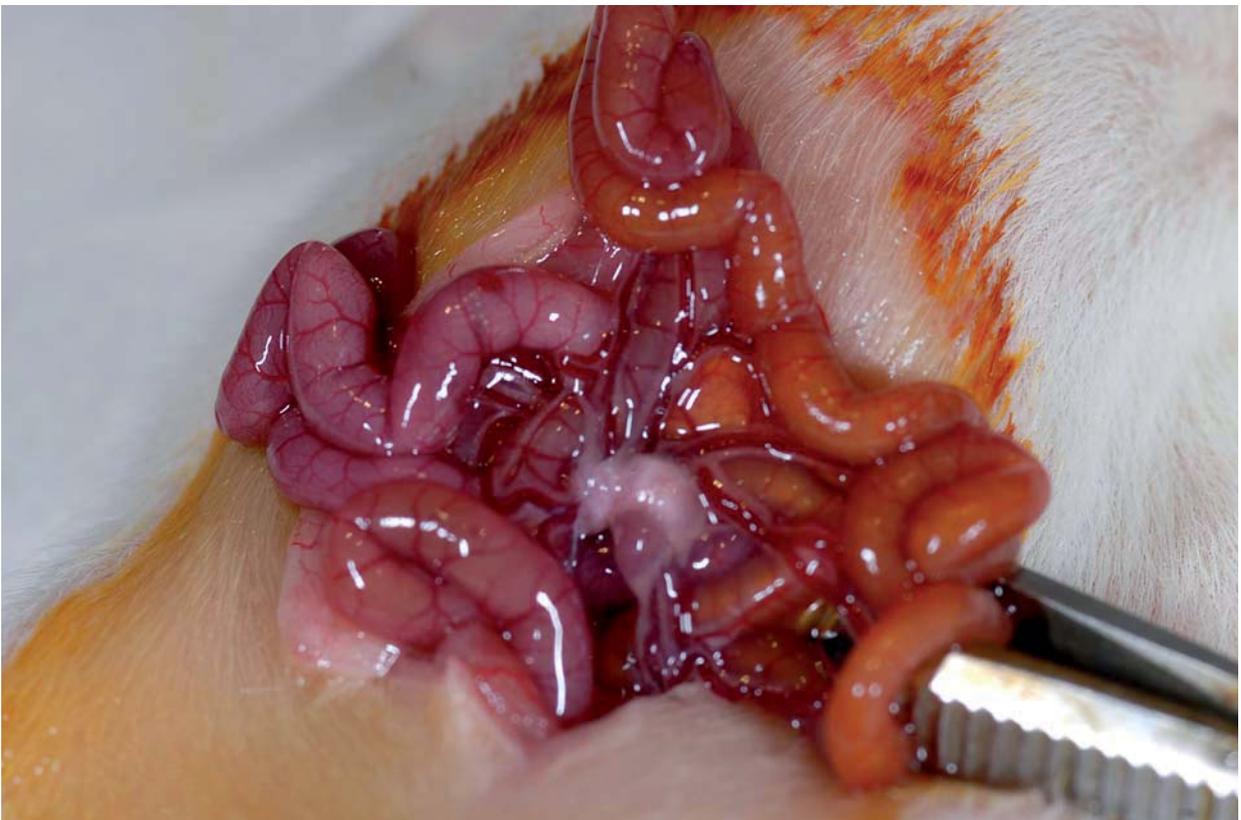


Figura 15. *Aspecto del intestino tras clampaje de vasos mesentéricos.*

El examen microscópico mostró alteraciones significativas en la mucosa del intestino delgado y colon en comparación con el grupo sham. En todos los animales a los que se les practicó isquemia-reperfusión se apreció denudación de las vellosidades, necrosis de la lámina propia y necrosis transmural focal (Figuras 16 y 17). La isquemia-reperfusión causó, en general, un acortamiento de las vellosidades y una disminución del grosor de las mismas. También observamos una disminución del índice de superficie y un aumento de la puntuación de Chiu tanto en el íleon distal como en el colon ascendente (Tabla 4).

Tabla 4.

	Íleon distal		Colon derecho	
	Sham	ECN	Sham	ECN
AMV	55 ± 5	23 ± 12 *	-----	-----
GMV	13 ± 2	9 ± 3 *	-----	-----
IS	4.2 ± 0.6	2.6 ± 1.1 *	3.6 ± 0.5	1.3 ± 0.6 *
Chiu	0.0 ± 0.0	3.5 ± 1.1 *	0.00 ± 0.00	2.1 ± 0.9 *

Los datos son expresados como media ± DE

* p < 0.001

AMV: altura media de la vellosidad

GMV: grosor medio de la vellosidad

IS: índice de superficie

Cambios en los parámetros morfométricos y en la puntuación de Chiu después de 45 minutos de isquemia y 3 horas de perfusión (ECN) comparados con los valores del grupo sham.

A



B

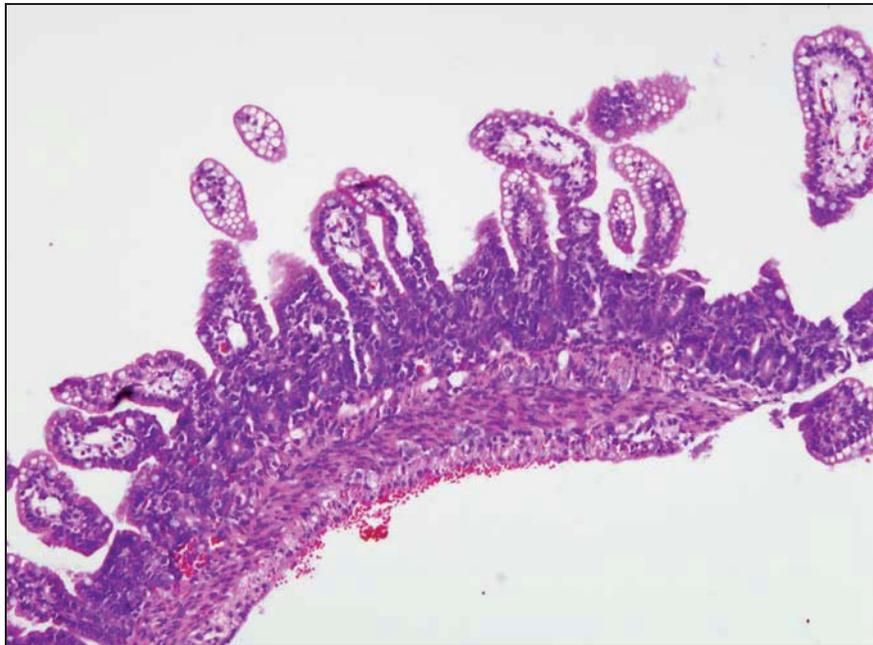
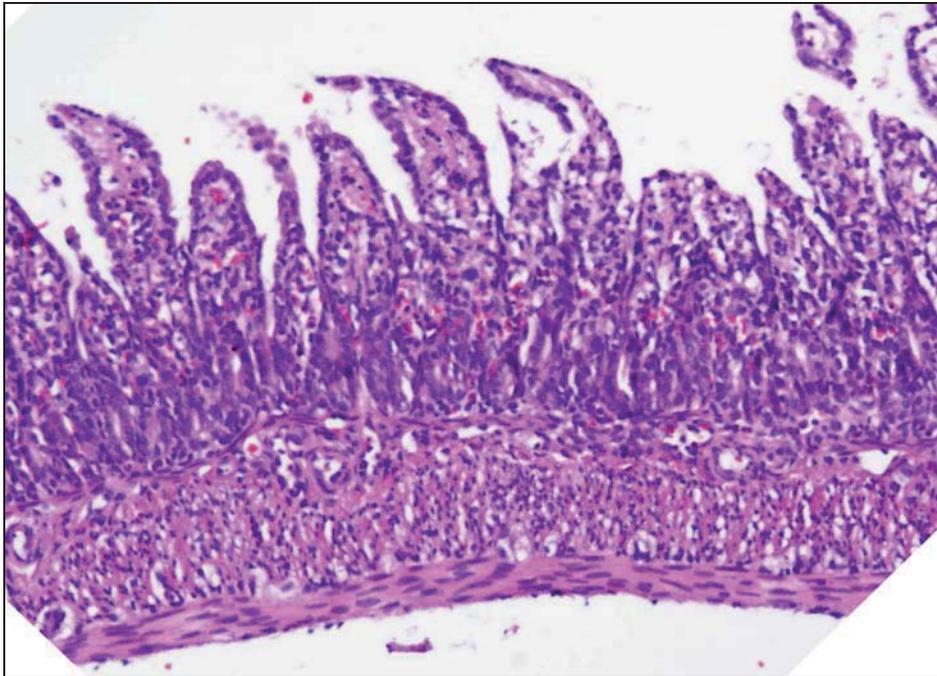


Figura 16: (A) Mucosa del íleon distal en un animal del grupo sham en la que se aprecian las microvellosidades de características normales (X 20). (B) Formación de espacios subepiteliales de Gruenhagen y destrucción de vellosidades con necrosis que alcanza la lámina propia en el íleon distal de una rata del grupo ECN (X 10). Hematoxilina-Eosina

A



B

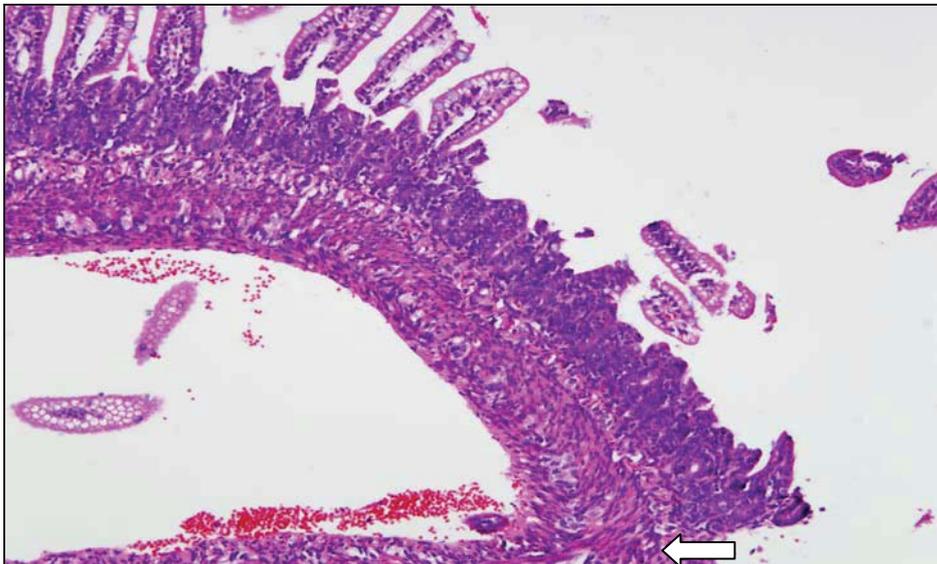


Figura 17: (A) Denudación masiva de las vellosidades en el ileon distal de una rata del grupo ECN (X 10). (B) Necrosis de la mucosa que alcanza focalmente la capa muscular (flecha) en el ileon distal de una rata del grupo ECN (X 10). Hematoxilina-Eosina

6.2. Efecto preventivo de la Epo sobre la mucosa intestinal en la ECN experimental

6.2.1. Análisis morfométrico

En conjunto, las dos formas recombinantes de Epo atenuaron significativamente la lesión intestinal cuando fueron administradas durante los 6 días previos a la isquemia-reperfusión. El examen microscópico mostró áreas con congestión capilar y espacios subepiteliales de Gruenhagen intercaladas con un despegamiento moderado del epitelio y con áreas en las que la mucosa aparecía normal (Figuras 18 y 19).

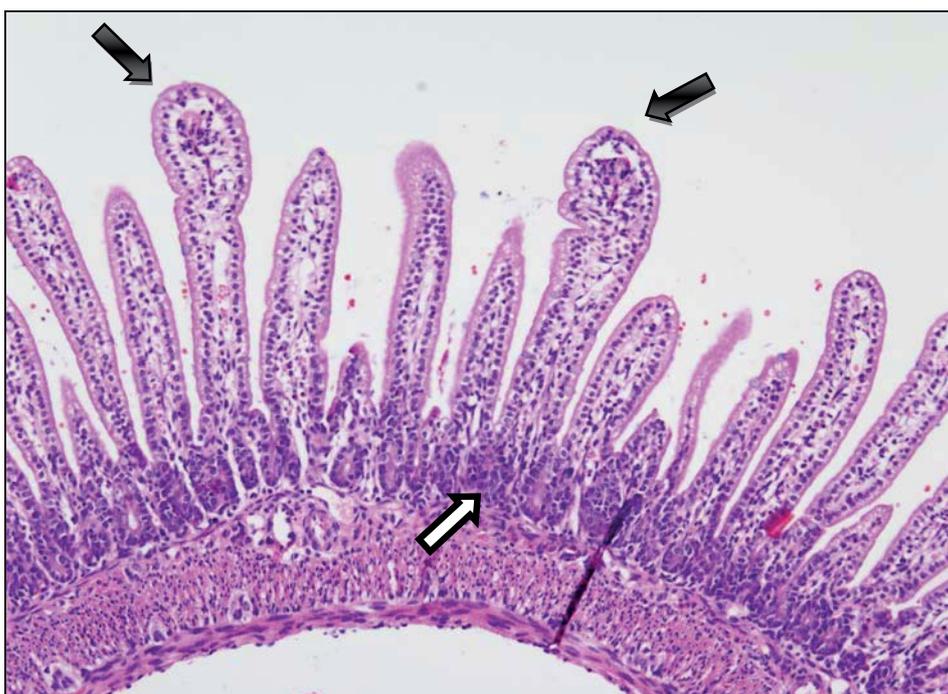
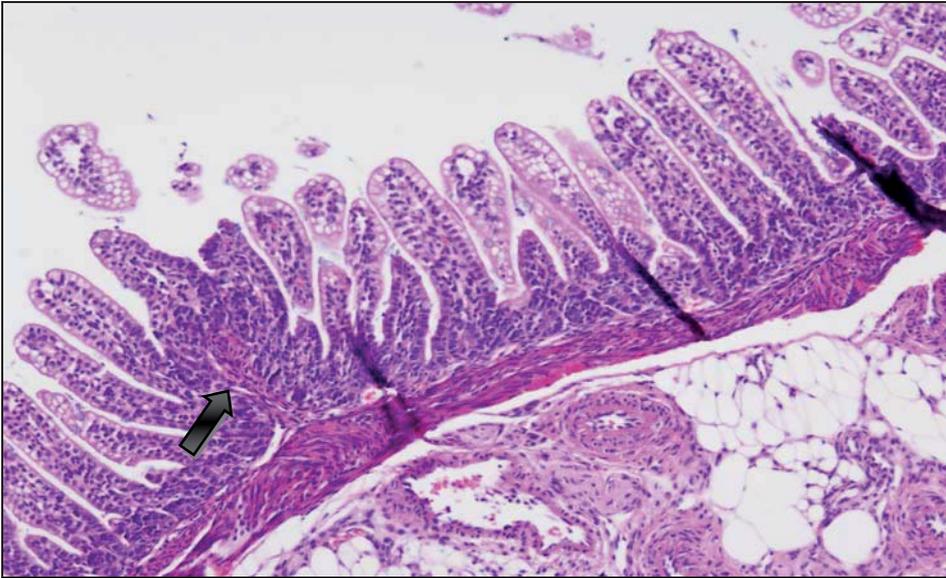


Figura 18. *Áreas de congestión capilar (flecha blanca), despegamiento del epitelio (flechas negras), y áreas en que la mucosa parece normal en una muestra del íleon distal de una ratona del grupo rhEpo. Hematoxilina-Eosina.*

A



B



Figura 19: (A) Congestión capilar (flecha) con preservación de la arquitectura de las vellosidades en el ileon distal de una rata del grupo rrEpo (X 10). (B) Espacios subepiteliales de Gruenhagen (flechas) en el ileon distal de una rata del grupo rhEpo (X 20). Hematoxilina-Eosina

La AMV en la mucosa del íleon (Figura 20) fue mayor en los dos grupos de profilaxis en comparación con el grupo ECN sin que hubiera diferencias entre los dos grupos a los que se les administró Epo antes de la isquemia-reperfusión (grupo sham: $55 \pm 5 \mu\text{m}$ vs. grupo ECN: $23 \pm 12 \mu\text{m}$ vs. grupo rhEpo: $38 \pm 10 \mu\text{m}$ vs. grupo rrEpo: $37 \pm 15 \mu\text{m}$; $p=0,005$). El IS medido en el íleon (Figura 21) también fue significativamente mayor en los dos grupos de profilaxis con Epo (grupo sham: $4,2 \pm 0,6$ vs. grupo ECN: $2,6 \pm 1,2$ vs. grupo Epo-H: $4,9 \pm 1,1$ vs. grupo Epo-R: $4,7 \pm 1,8$; $p=0,001$) en comparación con el grupo de isquemia-reperfusión. Cuando este índice fue calculado en muestras del colon derecho (Figura 22) también observamos diferencias estadísticamente significativas con valores más elevados en los dos grupos de profilaxis con Epo en comparación con el grupo ECN (grupo sham: $3,6 \pm 0,5$ vs. grupo ECN: $1,3 \pm 0,5$ vs. grupo Epo-H: $2,5 \pm 0,6$ vs. grupo Epo-R: $2,6 \pm 0,7$; $p=0,001$). No encontramos, sin embargo, diferencias estadísticamente significativas en el GMV de la mucosa del íleon distal entre el grupo ECN y los dos grupos de Epo (grupo sham: $13 \pm 2 \mu\text{m}$ vs. grupo ECN: $9 \pm 3 \mu\text{m}$ vs. grupo Epo-H: $10 \pm 1 \mu\text{m}$ vs. grupo Epo-R: $10 \pm 2 \mu\text{m}$; $p=0,3$) (Figura 23).

Por otra parte, sí que encontramos diferencias estadísticamente significativas cuando comparamos todas las variables del análisis morfométrico, AMV, GMV e IS, entre el grupo sham y los dos grupos de profilaxis con Epo (Figuras 19,20,21).

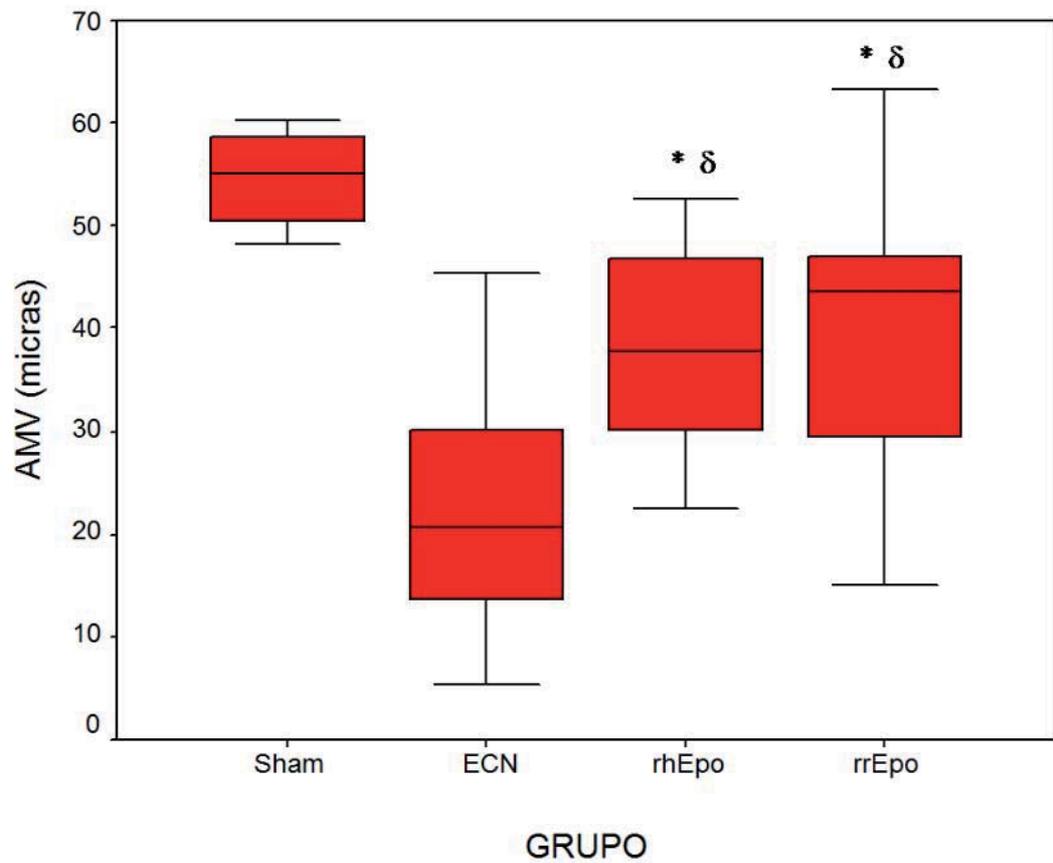


Figura 20. Comparación de la AMV entre los cuatro grupos del estudio.

* representa $p < 0,001$ comparado con el grupo ECN

δ representa $p < 0,05$ comparado con el grupo sham.

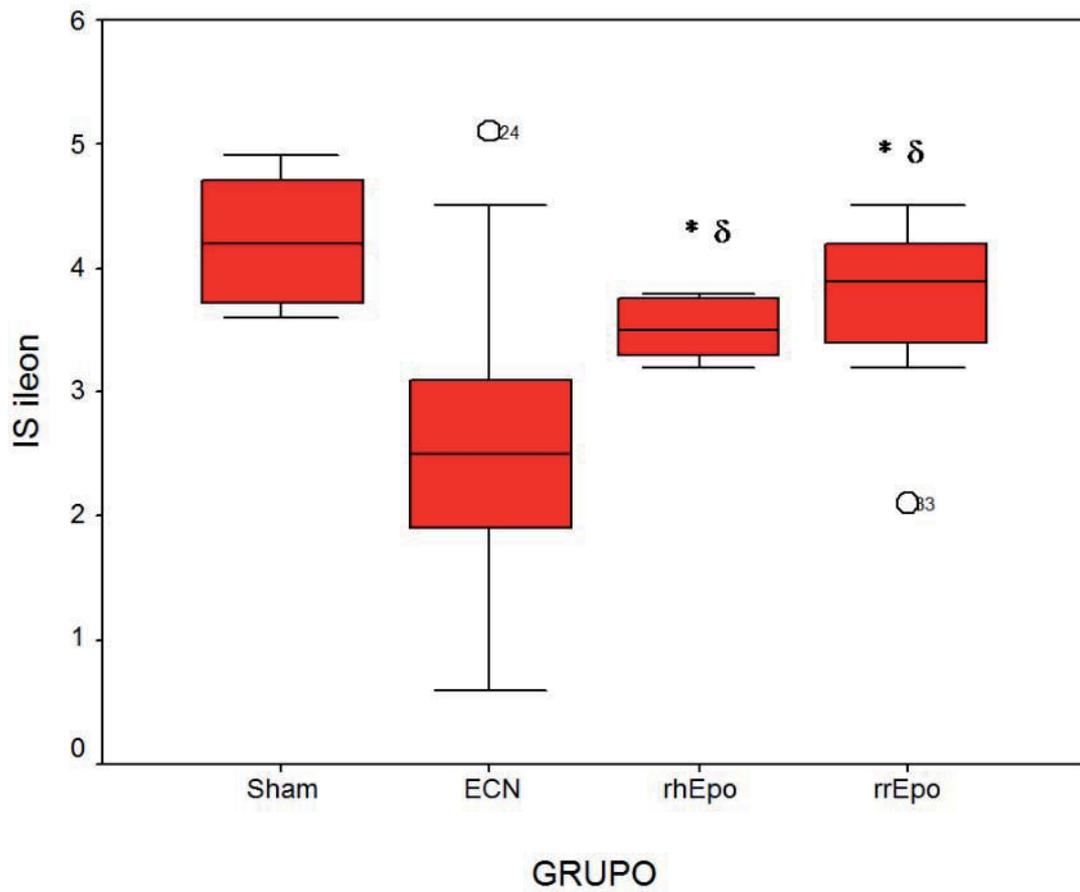


Figura 21. Comparación del IS calculado en el ileon distal entre los cuatro grupos del estudio.

* representa $p < 0,01$ comparado con el grupo ECN

δ representa $p < 0,05$ comparado con el grupo sham

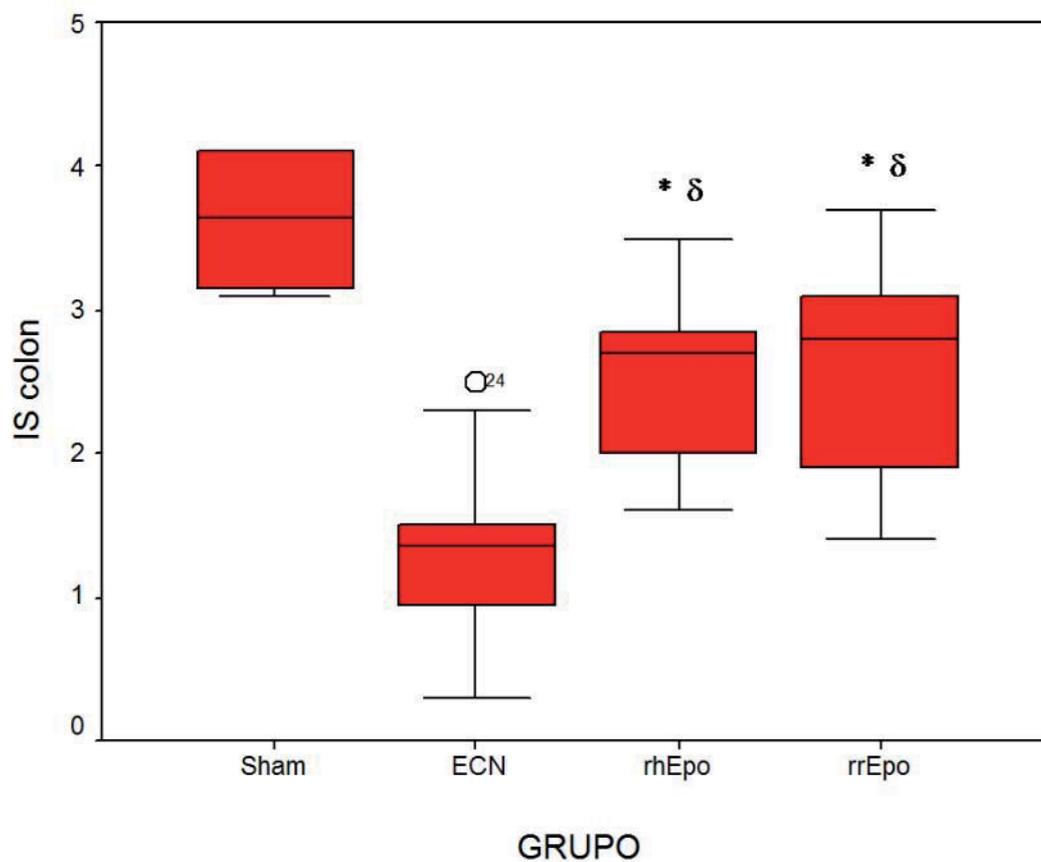


Figura 22. Comparación del IS calculado en el colon derecho entre los cuatro grupos del estudio.

* representa $p < 0,01$ comparado con el grupo ECN

δ representa $p < 0,05$ comparado con el grupo sham

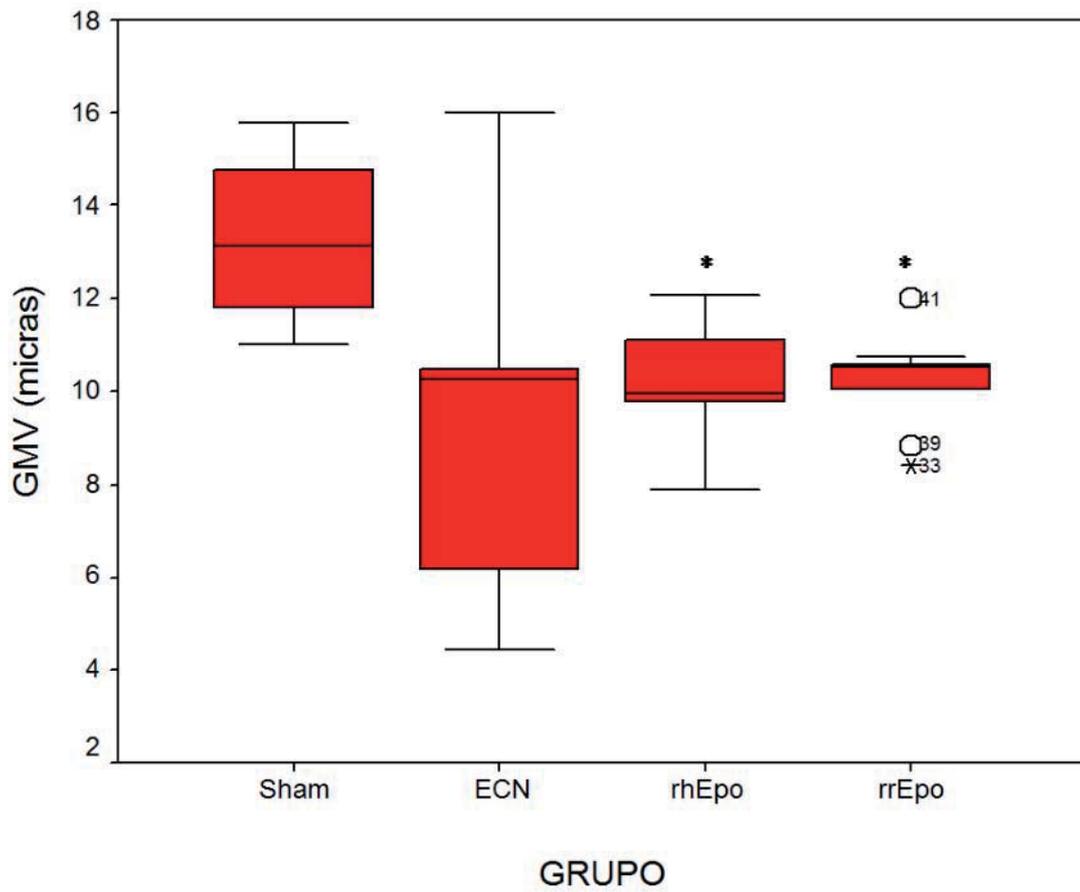


Figura 23. Comparación del GMV entre los cuatro grupos del estudio.

* representa $p < 0,05$ comparado con el grupo sham.

La figura 23 muestra la puntuación de Chiu en el intestino delgado en los cuatro grupos del estudio. Esta puntuación cualitativa, significativamente más elevada tras la isquemia-reperfusión en comparación con el grupo sham tal y como se aprecia en la tabla 4, disminuyó de forma significativa cuando la Epo fue administrada durante los 6 días previos a la isquemia-reperfusión (grupo sham: $0,0 \pm 0,0$ vs. grupo ECN: $3,5 \pm 1,4$ vs. grupo Epo-H: $1,5 \pm 1,1$ vs. grupo Epo-R: $1,7 \pm 1,2$; $p < 0,05$). No se encontraron diferencias entre los dos grupos de profilaxis.

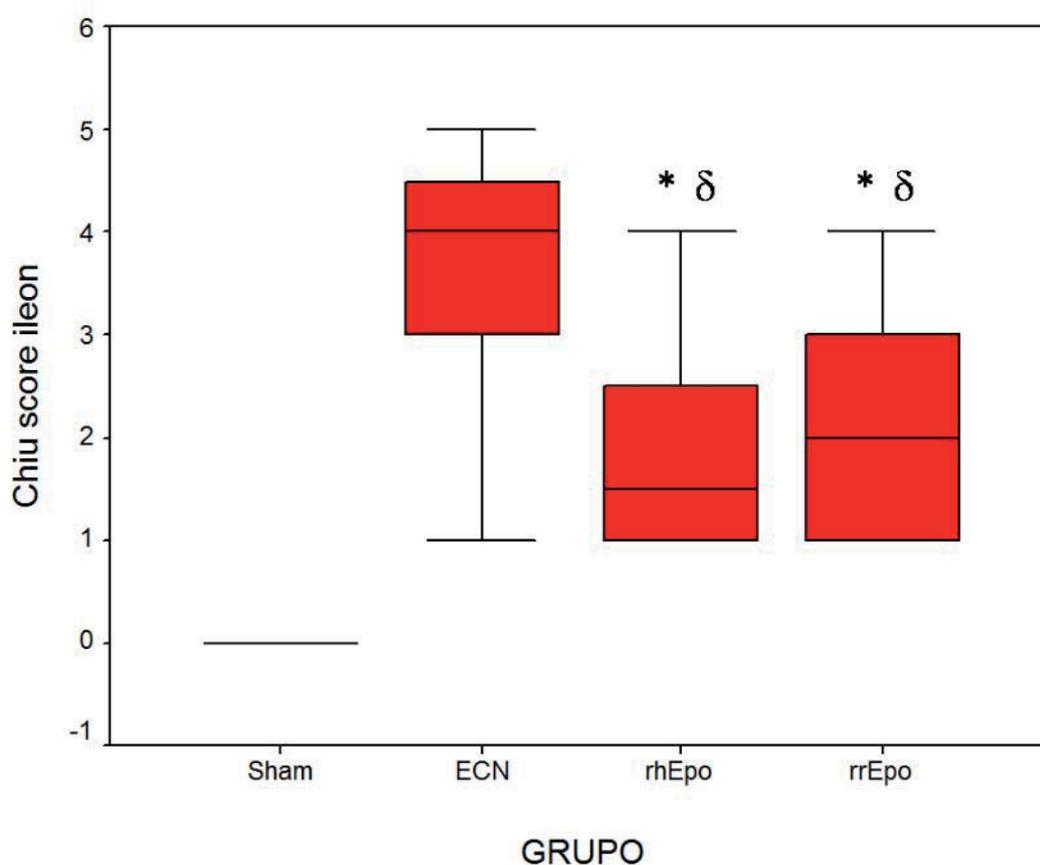


Figura 24. Comparación de la puntuación de Chiu determinada en el íleon distal entre los cuatro grupos del estudio.

* representa $p < 0,01$ comparado con el grupo ECN

δ representa $p < 0,05$ comparado con el grupo sham

La Figura 25 muestra la puntuación de Chiu en el colon ascendente en los cuatro grupos del estudio. Esta puntuación cualitativa, significativamente más elevada en el grupo ECN aen comparación con el grupo sham, tal y como muestra la tabla 4, disminuyó cuando la Epo fue administrada durante los 6 días previos a la isquemia-reperfusión (grupo sham: $0,0 \pm 0,0$ vs. grupo ECN: $2,1 \pm 0,9$ vs. grupo Epo-H: $1,1 \pm 0,8$ vs. grupo Epo-R: $1,2 \pm 0,5$; $p < 0,05$). No se encontraron diferencias entre los dos grupos de profilaxis.

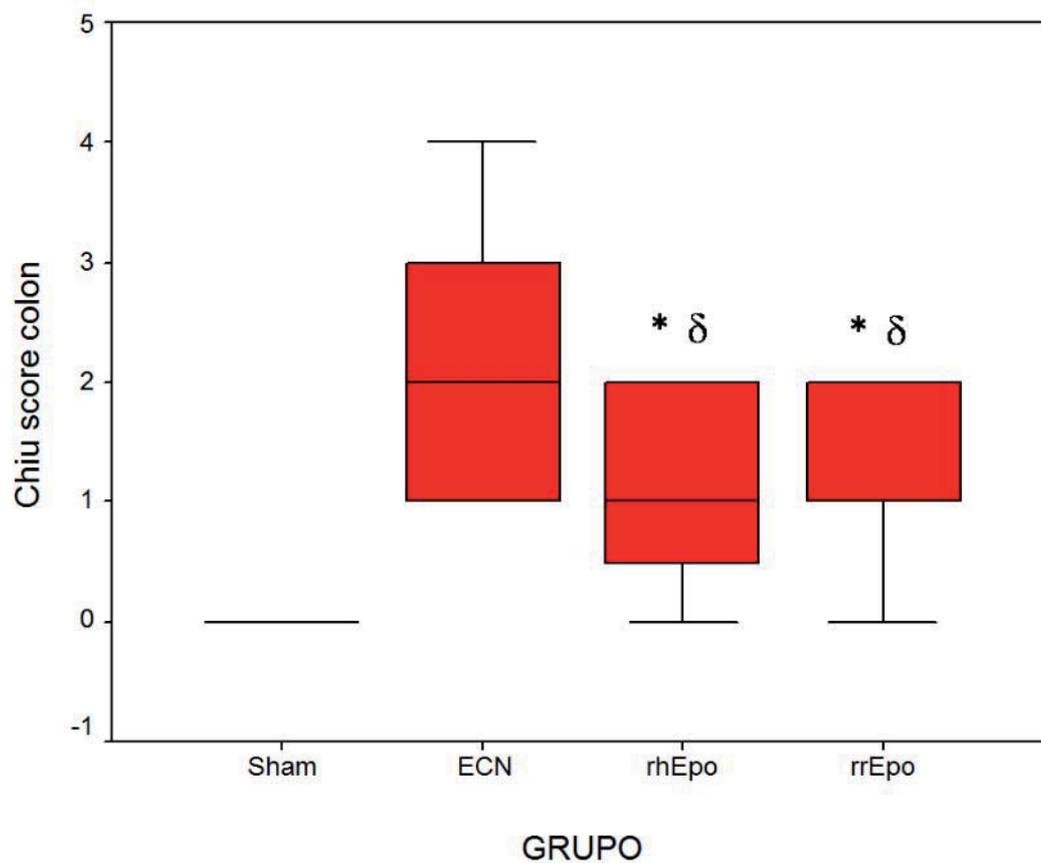


Figura 25. Comparación de la puntuación de Chiu determinada en el colon ascendente entre los cuatro grupos del estudio.

* representa $p < 0,05$ comparado con el grupo ECN

δ representa $p < 0,05$ comparado con el grupo sham

Finalmente, la AMV presentó una correlación positiva estadísticamente significativa con el IS ($r=0,7$; $p<0,001$) (Figura 26) y una correlación negativa con la puntuación de Chiu calculada en el íleon ($r: 0,6$; $p < 0,001$) (Figura 27).

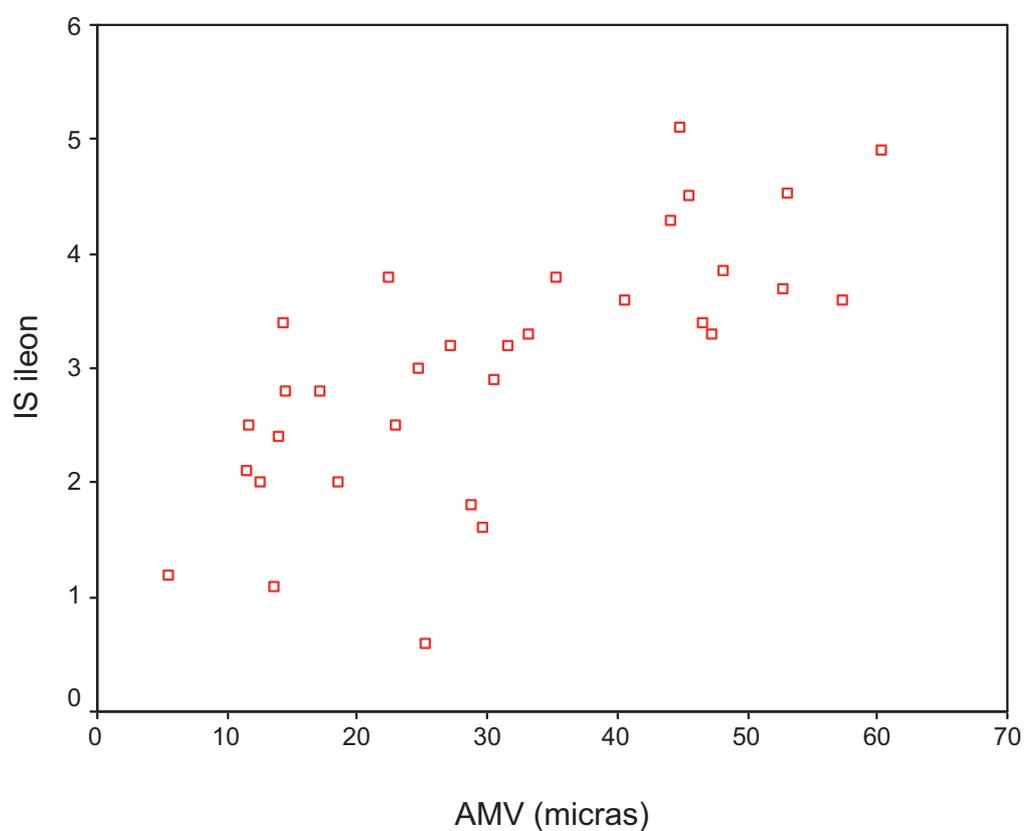


Figura 26. Diagrama de dispersión que muestra la correlación positiva entre la AMV y el IS calculado en el íleon distal ($r=0,7$; $p<0,001$; coeficiente de correlación de Spearman).

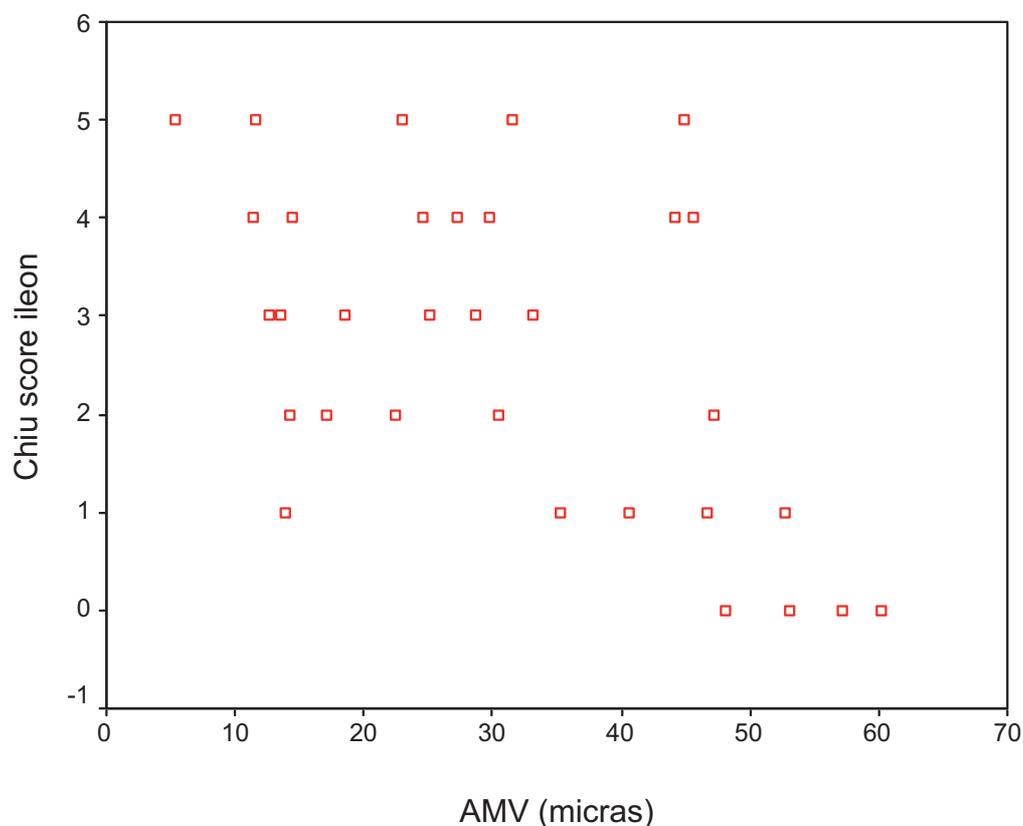


Figura 27. Diagrama de dispersión que muestra la correlación negativa entre la AMV y la puntuación de Chiu calculada en el íleon distal ($r=0,6$; $p<0,001$; coeficiente de correlación de Spearman).

6.2.2. Determinación de la concentración de VEGF en suero

La determinación de VEGF en el suero de los animales, obtenido en el momento del sacrificio tres horas después de la reperfusión, mostró valores ligeramente más elevados en el grupo ECN en comparación con el grupo sham aunque la diferencia no alcanzó la significación estadística. Sin embargo, la concentración de esta citoquina angiogénica en el suero de ratas tratadas con Epo recombinante humana fue significativamente más

elevada en comparación con el resto de los grupos del estudio (grupo sham: 7 ± 9 pg/dl vs. grupo ECN: 41 ± 35 pg/dl vs. grupo rhEpo: 389 ± 429 pg/dl vs. grupo rrEpo: 54 ± 110 pg/dl; $p < 0,05$) tal y como se puede apreciar en la figura 28.

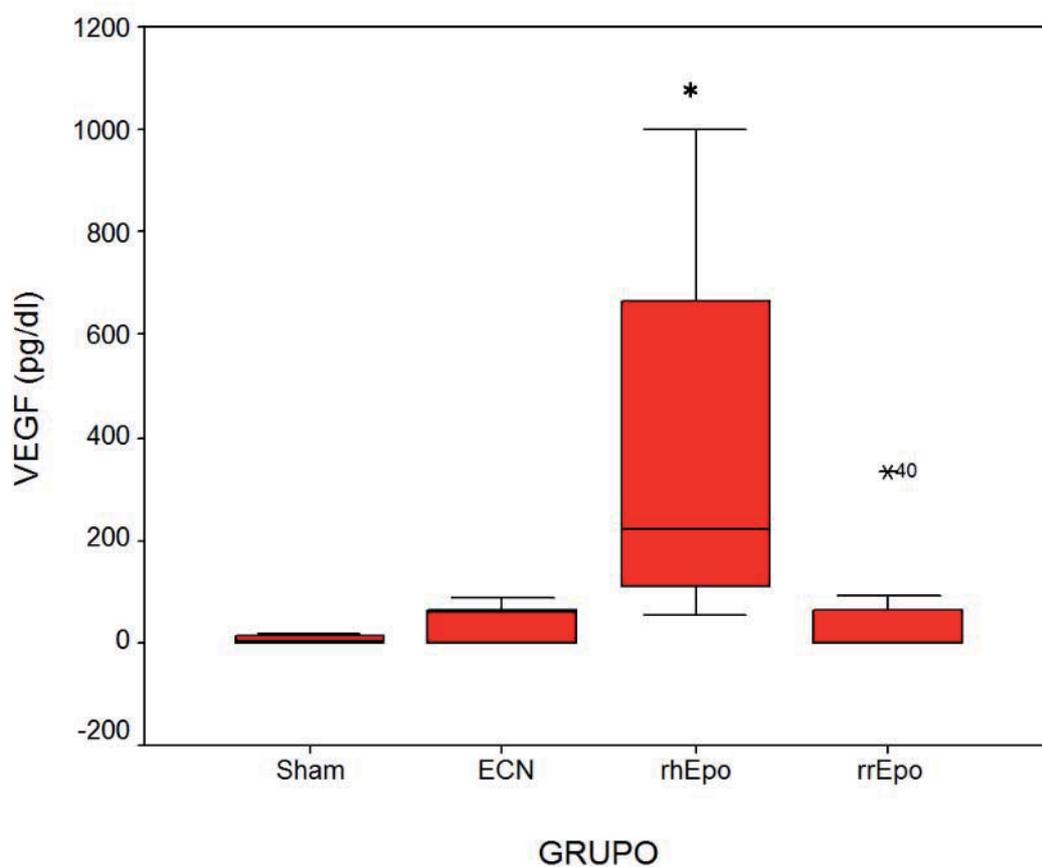


Figura 28. Concentración sérica de VEGF en el momento del sacrificio en los cuatro grupos del estudio. * $p < 0.05$

No encontramos correlación entre la concentración de VEGF en suero y ninguna de las variables del análisis morfométrico ni siquiera cuando se evaluó únicamente el grupo rhEpo (Figura 29).

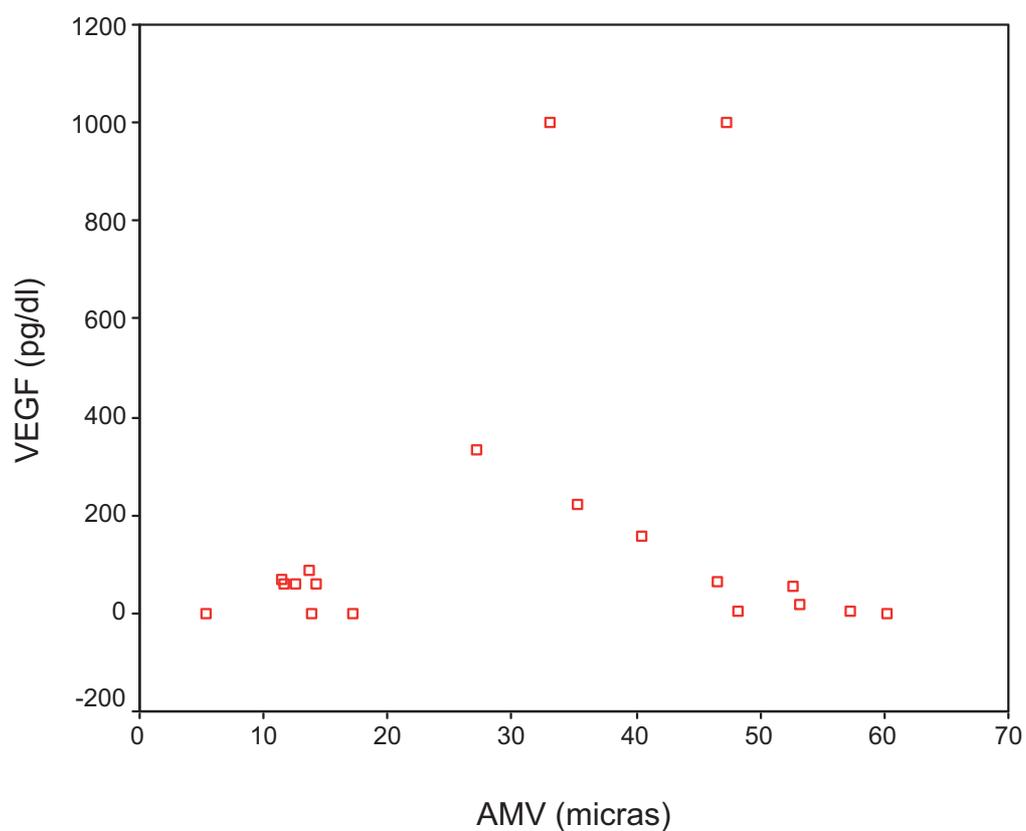


Figura 29. Diagrama de dispersión que muestra la ausencia de correlación entre la concentración de VEGF en suero y la AMV ($r=0,2$; $p=0,5$; coeficiente de correlación de Spearman).

6.2.3. Estudio inmunohistoquímico de la expresión de VEGF

El estudio inmunohistoquímico con un anticuerpo monoclonal frente al VEGF mostró una intensidad de la tinción en las células epiteliales de las vellosidades significativamente superior en los dos grupos en los que se administró Epo en comparación con el grupo ECN (grupo sham: $1,7 \pm 0,9$ vs. grupo ECN: $0,4 \pm 0,7$ vs. grupo rhEpo: $1,9 \pm 0,7$ vs. grupo rrEpo: $1,2 \pm 1,8$; $p < 0,001$) (Figuras 30 y 31). No se encontraron diferencias entre los dos grupos de profilaxis.

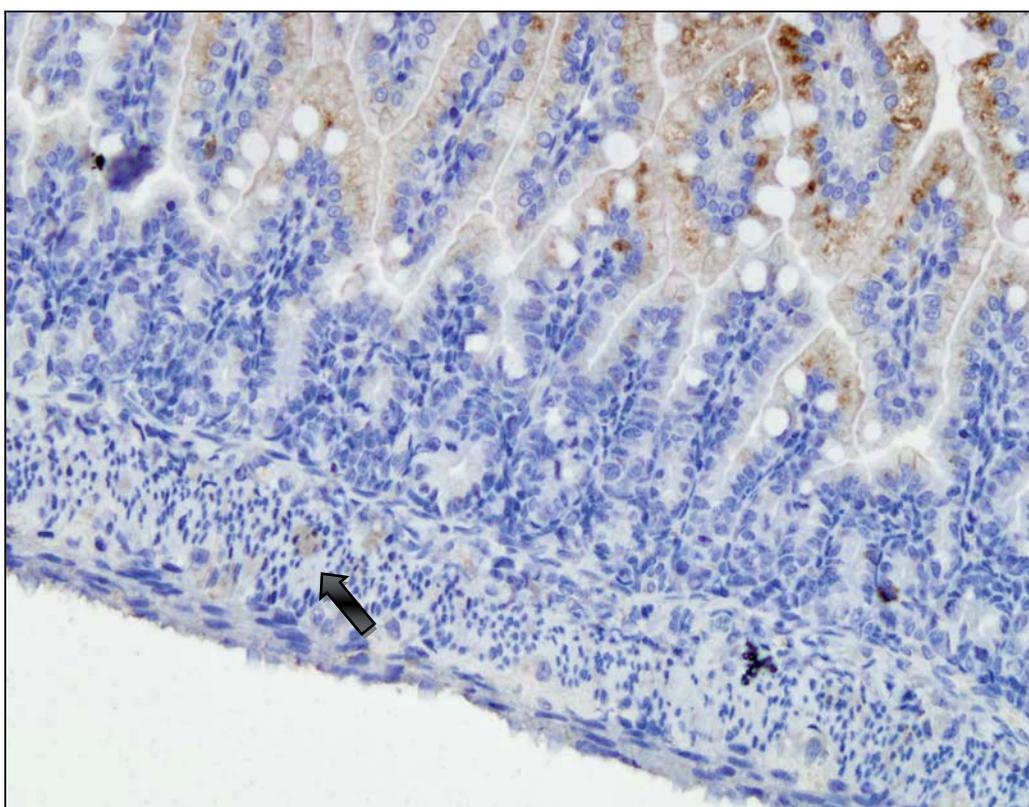


Figura 30. Tinción con anticuerpo anti-VEGF en el íleon distal de una rata del grupo ECN.

Se aprecia expresión débil-moderada de VEGF en algunas células epiteliales y muy débil en algunos vasos de la capa muscular (x40) (flechas).

Además, el número medio de vasos identificados que expresaban VEGF fue también significativamente superior en los dos grupos de profilaxis con Epo (grupo sham: $2,7 \pm 0,7$ vs. grupo ECN: $0,7 \pm 0,8$ vs. grupo rhEpo: $2,7 \pm 1,1$ vs. grupo rrEpo: $1,9 \pm 1,5$; $p < 0,001$) (Figuras 32,33,34).

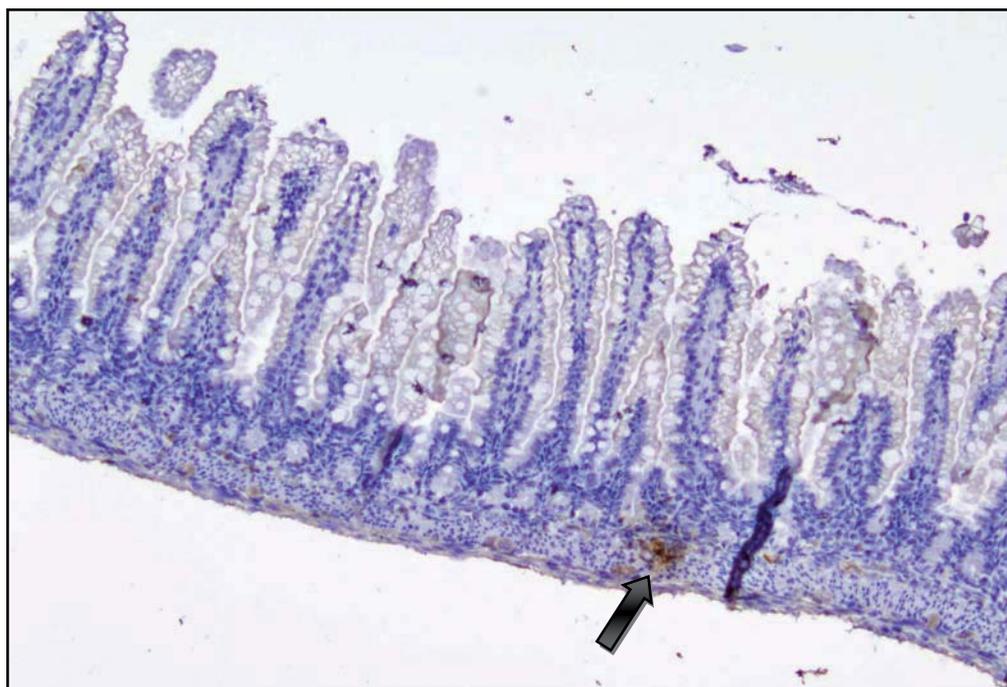
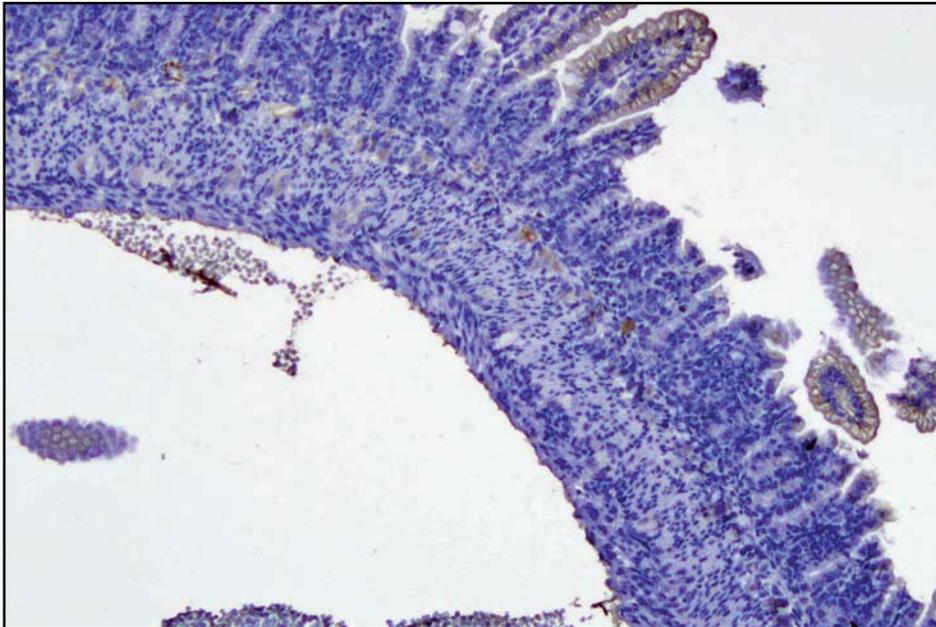


Figura 31. Tinción con anticuerpo anti-VEGF en el íleon distal de una rata del grupo ECN.

No se aprecia expresión de VEGF en las células epiteliales y sólo se tiñe algún vaso de la capa muscular (x10) (flecha).

A



B

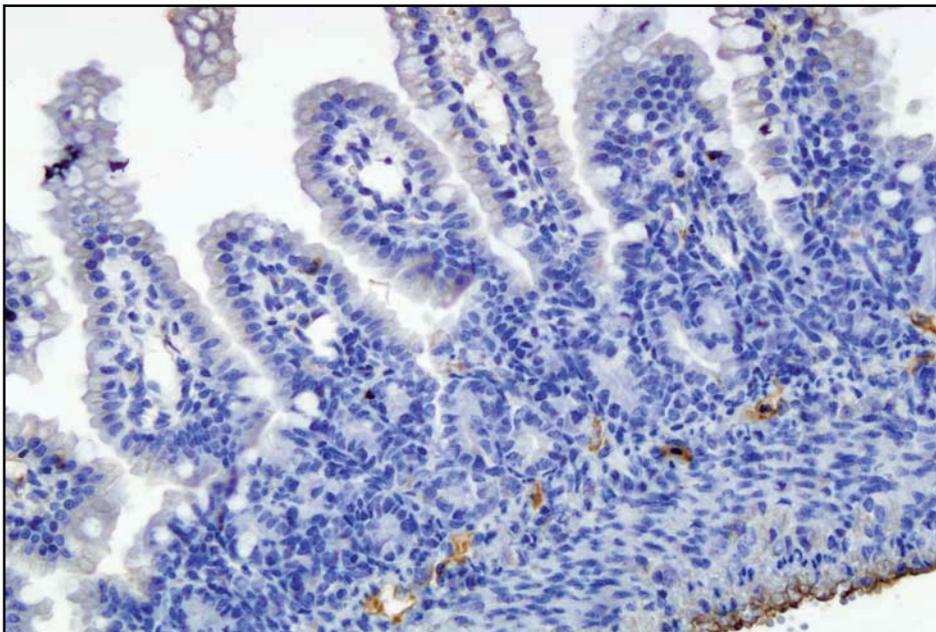
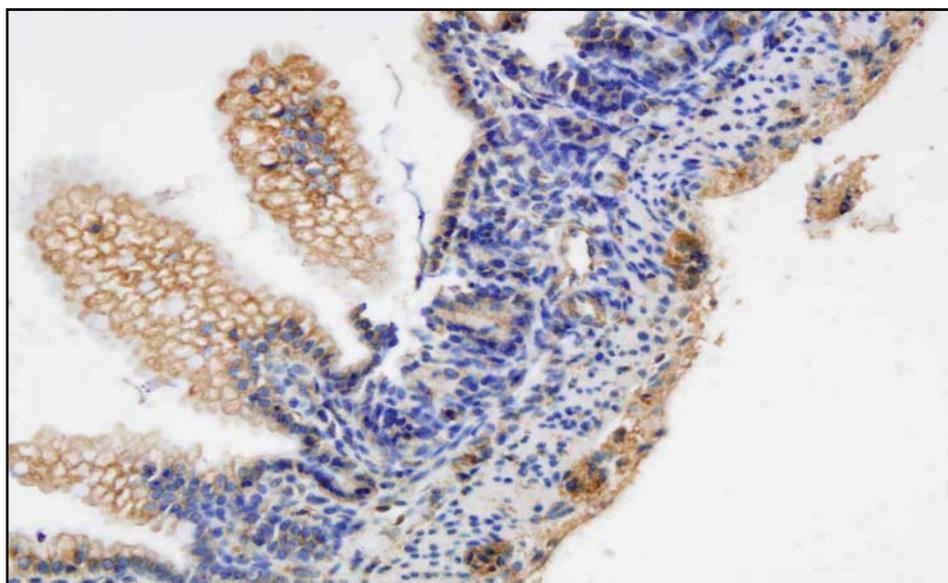


Figura 32: (A) Tinción con anti-VEGF en el ileon distal de una rata del grupo ECN (X 10). Se aprecia necrosis transmural y sólo se tiñen algunos vasos de la capa submucosa. (B) Tinción con anti-VEGF en el ileon distal de una rata del grupo ECN (X 20). Se tiñen algunos vasos de la capa submucosa pero no se aprecia expresión en las células epiteliales de las vellosidades.

A



B

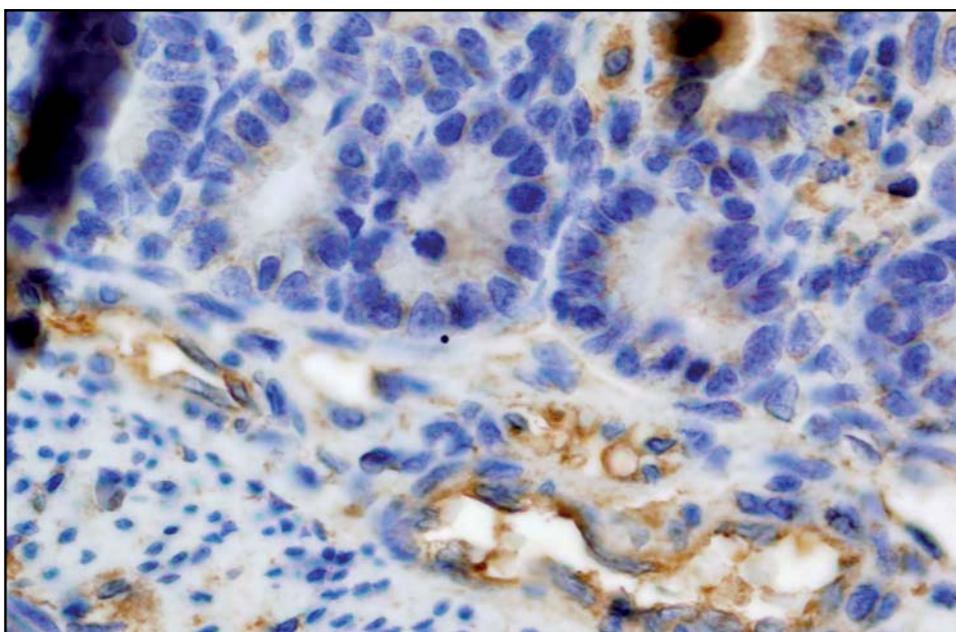


Figura 33: (A) Tinción con anti-VEGF en el ileon distal de una rata del grupo rrEpo (X 10). Se aprecia una intensa expresión en las células epiteliales así como en numerosos vasos de la capa muscular (B) Tinción con anti-VEGF en el ileon distal de una rata del grupo rhEpo (X 40). Se aprecia una intensa expresión en las células endoteliales y moderada en las criptas (x40).

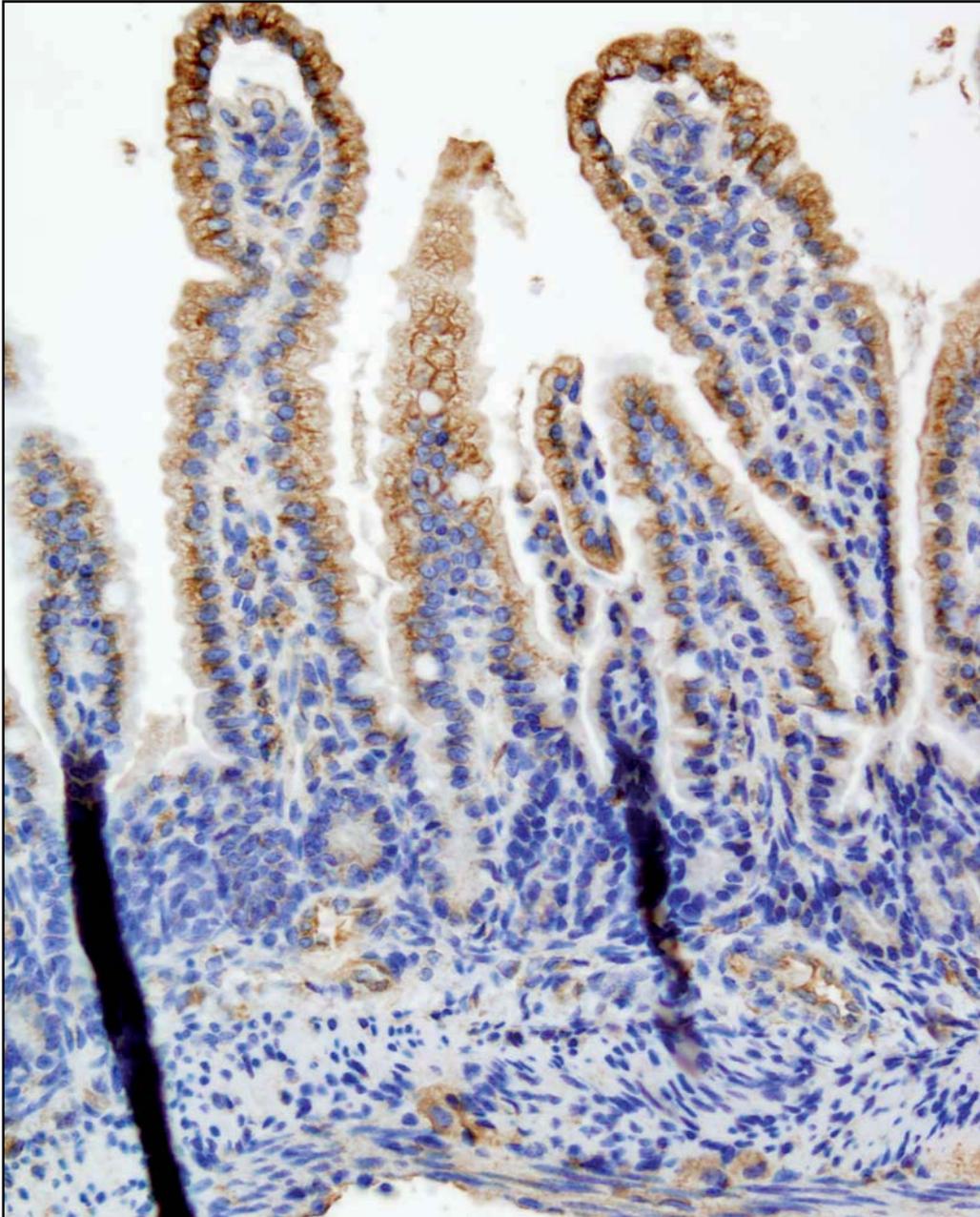


Figura 34. Tinción con anticuerpo anti-VEGF en el íleon distal de una rata del grupo rhEpo.

Se aprecia una intensa expresión de VEGF en las células epiteliales de las vellosidades así como en numerosos vasos de la submucosa y capa muscular (x20).

7. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio demuestran, en primer lugar, que la Epo tiene un efecto preventivo de las lesiones por isquemia-reperfusión en un modelo animal de ECN. Hemos observado como la administración de Epo recombinante aumenta la altura de las vellosidades y la superficie de las mismas y disminuye significativamente la puntuación de Chiu de la lesión intestinal en comparación con el grupo control. Esta investigación proporciona nuevas pruebas que sugieren un posible papel protector de esta hormona en recién nacidos con riesgo de desarrollar ECN.

Las evidencias de las que disponíamos hasta ahora sobre el efecto de la Epo en modelos experimentales de ECN no eran concluyentes. Kumral et al.¹⁶⁸ investigaron el efecto de la Epo recombinante humana administrada a una dosis de 750 U/Kg/semana mediante inyección intraperitoneal en ratas de 15 días de vida. La Epo fue administrada durante 2 semanas antes de inducir lesiones similares a las de la ECN mediante hipoxia con CO₂ y reoxigenación con O₂ al 100%. La aplicación de un sistema de puntuación de la lesión intestinal observada en el estudio microscópico mostró valores significativamente más elevados en el grupo de ECN en comparación con el grupo de animales tratados con Epo. Sin embargo, Akisu et al.¹⁶⁷ no encontraron diferencias significativas en las lesiones intestinales entre el grupo de ECN y el grupo de tratamiento con Epo en un estudio en el que emplearon el mismo modelo animal y la misma dosis que Kumral et al.¹⁶⁸.

Hay que destacar que la dosis utilizada en nuestro estudio, un total de 3000 U/Kg en 6 días, es superior a la de los dos trabajos mencionados anteriormente.

Hasta ahora no se han publicado otros trabajos en los que se haya investigado el efecto de la Epo en modelos experimentales de ECN. Sin embargo, son numerosos los estudios que han demostrado un efecto protector de la Epo sobre las lesiones por isquemia-reperfusión en diferentes órganos incluido el intestino, aunque en todos ellos se han empleado ratas adultas ^{174, 175}. A pesar de que estos modelos no incluyen la inmadurez intestinal como factor etiopatogénico, sus resultados son relevantes ya que la isquemia-reperfusión es uno de los principales factores implicados en la ECN. Guneli et al. ¹⁷⁴ investigaron el efecto de una única dosis intraperitoneal de Epo recombinante humana en ratas de 250 gr. en las que se realizó oclusión de la arteria mesentérica superior durante 30' y perfusión posterior durante 60'. La evaluación de las lesiones intestinales, realizada mediante la aplicación del sistema de puntuación de Chiu, mostró que la administración de Epo, tanto antes de la isquemia como al inicio de la perfusión, consiguió prevenir la lesión intestinal en comparación con el grupo ECN.

Mori et al. ¹⁷⁵ investigaron, también en ratas adultas sometidas a oclusión de la arteria mesentérica superior durante 60', el efecto de 3 dosis de 1000 U/Kg de Epo recombinante humana administradas por vía subcutánea. En este caso, entre las variables analizadas se incluyó no sólo el grado de lesión histológica sino también la supervivencia de los animales. La puntuación utilizada para valorar la lesión intestinal, el índice de Park, fue significativamente mayor en el grupo de isquemia-reperfusión en comparación con los grupos de Epo a las 6 y a las 12 horas. Además, mientras que la supervivencia en el grupo de isquemia-reperfusión fue inferior a 24 horas en todos los animales, en los grupos de tratamiento con Epo la supervivencia alcanzó las 72 horas en el 80% en los animales. En nuestro estudio, todos los animales fueron sacrificados a las 3 horas de la perfusión ya

que habíamos comprobado previamente en un estudio piloto que la mortalidad a las 24 horas era del 100%. La mortalidad más elevada de nuestro modelo debe ser atribuida a la utilización de ratas neonatales en comparación con las ratas adultas del estudio de Mori et al.

Muchos otros estudios han confirmado el efecto protector de la Epo sobre las lesiones experimentales por isquemia-reperfusión en el hígado ¹⁷⁶, riñón ¹⁷⁷, corazón ¹⁷⁸ y retina ¹⁷⁹. En el cerebro, Epo ha demostrado una gran capacidad para reducir el tamaño del infarto cerebral ¹⁸⁰. Algunos de estos estudios experimentales han sido seguidos de ensayos clínicos con resultados diversos. Así, Ehrenreich et al ¹⁸¹ demostraron en un estudio multicéntrico, el "Göttingen EPO-Stroke-Trial", un efecto beneficioso de la Epo sobre la extensión y gravedad del infarto cerebral así como sobre la evolución clínica de los pacientes. Liem et al. ¹⁸², sin embargo, no observaron un efecto significativo de una única dosis de Epo endovenosa en pacientes con un infarto agudo de miocardio sin elevación del ST. La realización de nuevos ensayos clínicos con un adecuado diseño proporcionará información definitiva sobre la aplicación clínica de la Epo en las lesiones por isquemia-reperfusión, entre ellas la ECN.

Los resultados de nuestro estudio demuestran, en segundo lugar, que el efecto protector de la Epo sobre la lesión por isquemia-reperfusión intestinal está mediado, al menos en parte, por un aumento de la expresión de VEGF. Hemos encontrado que la concentración de VEGF en suero en el momento del sacrificio era significativamente más elevada en el grupo de animales que habían recibido Epo recombinante humana en comparación con el grupo ECN.

Esta observación confirma la capacidad de la Epo de inducir la expresión de factores angiogénicos, además de los efectos ya conocidos sobre la eritropoyesis, el estímulo de la proliferación celular y la inhibición de la apoptosis. El VEGF es una de las principales citoquinas pro-angiogénicas y varios estudios han demostrado que la administración de Epo en diferentes modelos de isquemia-reperfusión induce un aumento en su expresión. Imamura et al.¹⁸³ observaron que el tratamiento con Epo durante 2 semanas antes de producir una oclusión de las arterias renales durante 60' inducía un marcado aumento de la concentración de VEGF. Nakano et al. investigaron¹⁸⁴ la expresión de VEGF y la activación de la angiogénesis en un modelo de isquemia-reperfusión de la extremidad inferior en ratones transgénicos que no expresaban Epo ni Epo-R. Los autores observaron que la concentración en suero de VEGF y la densidad de capilares neoformados en la extremidad isquémica, dos semanas después de la ligadura de la arteria femoral, era significativamente menor en los ratones transgénicos que no expresaban Epo en comparación con los controles *wild type*. Otros autores han demostrado también que la administración de Epo recombinante humana favorece la curación de las heridas isquémicas y que este efecto se asocia a un incremento significativo de los niveles de VEGF en las mismas^{144, 185, 186}.

Por otra parte, se ha demostrado en varios estudios experimentales que la administración exógena de VEGF, por vía subcutánea, intravenosa e intraarterial, tiene un efecto protector sobre la lesión por isquemia-reperfusión en el corazón¹⁸⁷, médula espinal¹⁸⁸, colgajos cutáneos¹⁸⁹, y testículo¹⁹⁰. Este hecho sugiere que la elevación de VEGF tras la administración de Epo recombinante humana observada en nuestro estudio y en otros mencionados anteriormente no es únicamente un testigo sino un auténtico mediador del efecto de la hormona.

Hay que señalar, sin embargo, que si bien la Epo estimula la angiogénesis mediante un aumento de la expresión de VEGF y que la formación de nuevos vasos es necesaria en la reparación del intestino lesionado, éste es un proceso que tiene lugar después de al menos una semana por lo que no es posible que el efecto protector observado en nuestro estudio, tres horas después de la reperfusión, sea debido a un aumento del número de capilares neoformados. En este sentido, el estudio realizado por Harder et al.¹⁴⁵ proporciona una explicación al efecto precoz de la Epo mediado por el VEGF. Estos autores evaluaron el efecto in vivo de dos dosis de Epo, 500 U/kg y 5000 U/Kg, en un modelo de colgajo muscular isquémico en ratones. Crearon un colgajo dorsal mal perfundido que, sin tratamiento, resultaba en una necrosis distal de aproximadamente el 50%. Se administró Epo desde 24 horas antes de la creación del colgajo hasta 3 días después de la operación y observaron que los animales que recibieron Epo presentaban en el día 10 una necrosis significativamente más limitada en comparación con el grupo control que recibió suero salino. Observaron también mediante técnicas de inmunohistoquímica que la expresión de Epo-R estaba aumentada en los ratones tratados con la hormona. Sin embargo, el estudio mediante microscopia intravital proporcionó el hallazgo más interesante. El análisis de la densidad capilar funcional, indicador ideal del grado de perfusión efectiva, mostró una disminución drástica en los animales no tratados mientras que la Epo, especialmente la dosis de 500 U/Kg, permitió mantener una perfusión capilar efectiva incluida la parte distal del colgajo. Además, mientras que la velocidad de los hematíes a través de los capilares cesó por completo en los animales no tratados, se mantuvo en aquellos que recibieron Epo. Por el contrario, no se observó formación de nuevos vasos sanguíneos en ninguno de los grupos lo cual era esperado teniendo en cuenta que es un proceso que tarda más días.

En un estudio posterior del mismo grupo en el que se empleó el mismo modelo, los autores observaron mediante la técnica de Western Blot un aumento de la concentración de VEGF en el tejido lesionado ¹⁷¹. Este factor angiogénico aumenta de forma potente la permeabilidad capilar lo que podría explicar, en parte, el efecto de la Epo sobre la microcirculación y el resultado beneficioso precoz sobre la lesión por isquemia-reperfusión independiente de la formación de nuevos vasos.

Hemos destacado que en aquellos animales que en nuestro estudio recibieron Epo humana recombinante la concentración de VEGF en suero en el momento del sacrificio fue significativamente más elevada. Sin embargo, no observamos dicho aumento en aquellos animales que recibieron Epo recombinante de rata. Este hallazgo puede ser debido a limitaciones metodológicas como el número de animales incluidos. Sin embargo, también es posible que esté relacionado con diferencias estructurales y funcionales entre las dos formas recombinantes de Epo. La Epo humana es idéntica en un 91% a la Epo del mono. Aunque se ha demostrado que la secuencia de aminoácidos es homóloga a la de rata en un 80%, es posible que las diferencias estructurales existentes sean responsables de diferencias en la función ¹⁹¹. En todos los estudios experimentales realizados en modelos de isquemia-reperfusión y publicados hasta el momento se ha administrado Epo recombinante humana por lo que no disponemos de información adicional sobre el efecto de la Epo recombinante de rata sobre el VEGF ^{143, 171, 186}.

El aumento en la concentración de VEGF en comparación con el grupo ECN no es sólo sistémico sino que también ocurre a nivel local tal y como demuestra la expresión por las células epiteliales de las vellosidades y de las criptas así como por las células endoteliales de los vasos de las capas submucosa y muscular. Esta observación coincide con los hallazgos de otros estudios en los que han investigado a expresión local de VEGF mediante otras técnicas como Western Blot ¹⁷¹. En condiciones normales se detecta expresión de VEGF mediante inmunohistoquímica en el epitelio intestinal, epitelio ductal de la glándula mamaria, músculo esquelético y cardíaco, ovario, tiroides y también en las células endoteliales ¹⁷³. Hemos comprobado como la isquemia-reperfusión causa una disminución significativa de la expresión de VEGF por las células epiteliales de las microvellosidades incluso en aquellos segmentos de pared intestinal en los que la arquitectura tisular está conservada. Sin embargo, la administración profiláctica de Epo recombinante se asoció a una capacidad conservada para expresar VEGF incluso tras un periodo prolongado de isquemia seguido de referfusión.

Por otra parte, la concentración en suero de VEGF en los animales del grupo ECN fue 6 veces más elevada en comparación con la del grupo sham, aunque la diferencia no alcanzó la significación estadística. Estos resultados son similares a los de otros estudios en los que se ha demostrado que la isquemia-reperfusión induce un aumento en la expresión de esta citoquina pro-angiogénica que debe ser entendido como parte del proceso de curación de las lesiones ¹⁹². Otros, sin embargo, consideran que la elevación de VEGF y el consiguiente aumento de la permeabilidad vascular durante la reperfusión serían responsables, en parte, del daño ocasionado por este mecanismo lesional ¹⁹³.

En cualquier caso, ya hemos mencionado anteriormente que son numerosas las evidencias que demuestran que el VEGF tiene un efecto protector sobre la lesión por isquemia-reperusión.

Es interesante destacar que en algunos estudios experimentales se ha observado que dosis bajas de Epo son mucho más efectivas que dosis 10 veces superiores. En el estudio realizado por Harder et al.¹⁴⁵, mencionado anteriormente, los animales que recibieron la dosis de 5000 U/Kg presentaron una menor supervivencia del colgajo isquémico en comparación con los que recibieron la dosis de 500 U/Kg. Kao et al.¹⁷⁰ demostraron que una única dosis de 400 U/Kg conseguía normalizar rápidamente la perfusión en el músculo esquelético en un modelo de sepsis en ratones. Por el contrario, una dosis elevada no fue muy efectiva en preservar la microcirculación y sólo consiguió reducir marginalmente la necrosis muscular. Se ha propuesto que esta diferencia se debe al efecto de las dosis más elevadas sobre la eritropoyesis¹⁴⁵. Mientras que la dosis más baja de Epo tiene un efecto limitado sobre la formación de hematíes, la dosis de 5000 U/Kg se asocia a un incremento significativo del hematocrito y a una disminución de la velocidad de los hematíes a través de los capilares con el consiguiente empeoramiento sobre la microcirculación. En este sentido, la aplicación en ensayos clínicos de la Epo por sus efectos extra-hematopoyéticos en pacientes con isquemia cerebral o cardíaca se ha asociado a efectos adversos por eventos trombóticos^{194, 195}. Por ello, la utilización de derivados de la Epo sin efecto sobre la eritropoyesis tendría especial interés para la prevención y tratamiento de la lesión por isquemia-reperusión y permitiría utilizar dosis más elevadas. La asialoEpo es una glicoproteína que presenta varias características diferenciales con la Epo entre las que destacan una vida media plasmática más corta, una eliminación más rápida de la circulación

sistémica y una mayor afinidad por el receptor Epo-R. La asialoEpo no tiene efectos hematopoyéticos y en cambio tiene efectos extra-hematopoyéticos más amplios que la Epo. En un reciente estudio experimental, la asialoEpo mostró el mismo efecto protector que la Epo en un modelo de isquemia-reperfusión en ratas adultas ¹⁹⁶.

Además del incremento del VEGF observado en el presente y en otros estudios, se ha sugerido que el efecto protector de la Epo puede estar mediado por otros mecanismos. Por una parte, la Epo puede ejercer un efecto directo sobre el endotelio vascular similar al del VEGF, ya que se ha demostrado que las células endoteliales expresan Epo-R y responden con un aumento en la proliferación y en la formación de nuevos vasos ¹⁶⁵. Por otro lado, el efecto protector puede ser debido también a su capacidad para inhibir la apoptosis ^{145, 171, 176-179}, y para aumentar la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible del óxido nítrico ^{171, 197}. Finalmente, se ha demostrado también que la Epo inhibe la peroxidación lipídica con la consiguiente disminución del daño tisular secundario a la exposición a radicales libres de oxígeno ¹⁶⁷.

Aunque los resultados de nuestro estudio confirman que la Epo tiene un efecto protector sobre la lesión por isquemia-reperfusión y que esta acción está mediada en parte por un aumento de la expresión de VEGF, creemos que el efecto trófico que esta hormona tiene sobre la mucosa intestinal inmadura también desempeña un importante papel en los resultados que hemos obtenido. Este efecto de la Epo sobre el intestino en fase de desarrollo se basa en la presencia de receptores de esta hormona en la mucosa intestinal prenatal y postnatal ¹³⁷ en la capacidad para estimular *in vitro* la migración de los enterocitos ¹⁹⁸ y para incrementar *in vivo* la longitud del intestino neonatal ¹⁴².

Recientemente, McPherson y Juul ¹⁴¹ demostraron que la administración de una única dosis subcutánea de 5000 U/Kg estimulaba la división celular en las criptas, promovía la migración de los enterocitos y detenía la apoptosis en el extremo de las vellosidades en ratas de sólo 7 días de vida.

Desde el punto de vista metodológico, varios aspectos relacionados con la administración de la Epo deben ser comentados. En primer lugar, la elección del momento en el que se administra hormona. En el presente estudio hemos investigado el efecto de la Epo antes de la isquemia-reperfusión en base a los resultados del estudio clínico de Ledbetter y Juul ¹² que sugerían que la administración de esta hormona a los recién nacidos prematuros para prevenir o tratar la anemia tiene un efecto protector sobre el desarrollo de ECN. Otros, sin embargo, han estudiado el efecto de la Epo cuando se administra después de la isquemia y antes de la perfusión o como tratamiento cuando ya se ha producido la lesión intestinal. Así, en el estudio de Guneli et al. ¹⁷⁴, en el que se utilizó un modelo de isquemia reperusión intestinal en ratas adultas, se observó que la administración de la hormona al inicio de la perfusión tenía el mismo efecto protector que cuando se administraba antes de la isquemia intestinal. En el estudio de Rezaeian et al. ¹⁷¹, sin embargo, la administración de 3 dosis de 500 U/Kg durante las 48 horas posteriores a la lesión isquémica solo tuvo un efecto parcial sobre el colgajo y no mejoró la microcirculación en comparación con el tratamiento preventivo. Se ha sugerido que los resultados podrían mejorar cuando además de antes se administra después y durante un tiempo prolongado ^{143, 199}.

En segundo lugar, varias son las vías de administración utilizadas en los diferentes estudios experimentales en los que la Epo ha demostrado un efecto protector.

Al igual que otros ^{143, 175, 186}, hemos escogido la vía subcutánea de administración tal y como se emplea en humanos aunque muchos han utilizado la vía intraperitoneal con buenos resultados ^{145, 171, 174}. Especialmente interesante es la administración de Epo por vía enteral ya que permite la acción directa de la hormona sobre los enterocitos. Juul et al. ¹⁴² observaron que la administración de Epo humana recombinante en la leche a ratas recién nacidas tenía un efecto trófico sobre el intestino en desarrollo. Sin embargo, la administración enteral de Epo en un modelo de ECN no ha sido hasta ahora estudiada.

No existe ningún modelo ideal de ECN. La elección del modelo de isquemia-reperfusión en la rata está basada, en primer lugar, en la similitud de las lesiones de la mucosa intestinal con los hallazgos histopatológicos de la ECN en humanos. El espectro de lesiones que aparecen en este modelo incluye desde un mínimo despegamiento del epitelio de la vellosidad acompañado de congestión vascular hasta una necrosis transmural completa. Estos hallazgos predominan en el intestino delgado y aparecen, en la mayoría de los casos, de forma segmentaria.

En ninguno de los animales de nuestro estudio apareció la neumatosis intestinal, una lesión característica de la ECN pero que en algunas series ha sido descrita en menos del 50% de los casos ⁴⁹. La neumatosis intestinal es atribuida a la acción de bacterias productoras de gas en fases más avanzadas de la enfermedad. La ausencia de neumatosis en nuestro modelo puede ser debida al carácter agudo de las lesiones y al sacrificio de los animales sólo tres horas después de iniciada la reperusión.

Otra de las razones en las que se basó la elección de este modelo experimental es la mayor susceptibilidad del intestino de animales de pocos días de vida a la isquemia-reperfusión. La mucosa intestinal de ratas de 15 días de vida, en fase de destete, es más vulnerable a los efectos de la isquemia-reperfusión que el intestino de ratas adultas. Estudios realizados con otras especies animales han demostrado que el tiempo de isquemia necesario para reproducir lesiones similares a las de la ECN disminuye con la utilización de animales de pocos días de vida ^{66, 201} En nuestro modelo, 30 minutos de isquemia son suficientes para producir una denudación del epitelio intestinal y necrosis focal en más del 50% de los animales. La oclusión de la arteria mesentérica superior durante 45 minutos seguida de 3 horas de perfusión ocasionó lesiones más extensas en el 100% de los animales. Entre los mecanismos por los que el intestino en fase de desarrollo es más sensible se incluye una regulación inmadura del flujo sanguíneo y de la oxigenación intestinal, una falta de desarrollo de los vasos sanguíneos colaterales especialmente en el íleon distal, y una mayor susceptibilidad a la acción de los radicales libres de oxígeno y a las proteasas lumbinales.

El análisis morfométrico de las lesiones de la mucosa intestinal proporciona una valoración cuantitativa que facilita la comparación entre grupos en el modelo de isquemia-reperfusión.

Aunque éste estudio no es un doble ciego real y el investigador conocía si estaba administrando Epo o placebo, hay que destacar que tanto el análisis morfométrico como la evaluación de la inmunohistoquímica fueron realizados por un patólogo que desconocía el grupo al que pertenecía cada animal.

Al igual que en el trabajo de Puglisi et. al ⁸⁴, la altura media de las vellosidades y el índice de superficie aparecen en nuestro estudio como unos parámetros excelentes para valorar la lesión isquémica. En el estudio previo de nuestro grupo ¹²⁰ en el que empleamos este mismo modelo no encontramos diferencias en el GMV entre el grupo sham y el grupo ECN coincidiendo con las observaciones de otros autores que consideran que este parámetro tiene escasa utilidad de este parámetro en el análisis morfométrico de estas lesiones ⁸⁴. Sin embargo, en el presente estudio sí que hemos observado una disminución del GMV tras la isquemia-reperfusión.

Por otro lado, el sistema de puntuación de Chiu proporciona una descripción cualitativa del espectro de lesiones que complementa el análisis morfométrico. Estudios previos han demostrado que este sistema de puntuación es un buen indicador de lesión isquémica y se correlaciona con la AMV y el IS ⁸⁴.

8. CONCLUSIONES

Conclusiones

El modelo de isquemia-reperfusión intestinal en la rata de 15 días de vida consigue unas lesiones morfológicamente similares a las de la enterocolitis necrotizante en el recién nacido humano.

La administración profiláctica de eritropoyetina tiene un efecto protector sobre las lesiones intestinales secundarias a la isquemia-reperfusión observadas en éste modelo.

El efecto de la eritropoyetina recombinante humana, está mediado (al menos en parte) por un aumento en la expresión local y sistémica, de la citoquina angiogénica VEGF.

Conclusiones

9. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografia

1. Kliegman R, Fanaroff A. Necrotizing enterocolitis. *N Engl J Med* 1984;**310**: 1093-1103.
2. Kliegman RM, Walker WA, Yolken RH. Necrotizing enterocolitis: research agenda for a disease of unknown etiology and pathogenesis. *Pediatric research* 1993;**34**(6): 701-708.
3. Uauy RD, Fanaroff AA, Korones SB, Phillips EA, Phillips JB, Wright LL. Necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants: biodemographic and clinical correlates. National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *J Pediatr* 1991;**119**(4): 630-638.
4. Embleton ND, Yates R. Probiotics and other preventative strategies for necrotising enterocolitis. *Semin Fetal Neonatal Med* 2008;**13**(1): 35-43.
5. Grosfeld JL, Cheu H, Schlatter M, West KW, Rescorla FJ. Changing trends in necrotizing enterocolitis. Experience with 302 cases in two decades. *Ann Surg* 1991;**214**(3): 300-306; discussion 306-307.
6. Horwitz JR, Lally KP, Cheu HW, Vazquez WD, Grosfeld JL, Ziegler MM. Complications after surgical intervention for necrotizing enterocolitis: a multicenter review. *J Pediatr Surg* 1995;**30**(7): 994-998; discussion 998-999.
7. Ricketts RR. Surgical treatment of necrotizing enterocolitis and the short bowel syndrome. *Clin Perinatol* 1994;**21**(2): 365-387.
8. Maier RF, Obladen M, Scigalla P, Linderkamp O, Duc G, Hieronimi G, Halliday HL, Versmold HT, Moriette G, Jorch G, et al. The effect of epoetin beta (recombinant human erythropoietin) on the need for transfusion in very-low-birth-weight infants. European Multicentre Erythropoietin Study Group. *N Engl J Med* 1994;**330**(17): 1173-1178.
9. Kling PJ, Sullivan TM, Roberts RA, Philipps AF, Koldovsky O. Human milk as a potential enteral source of erythropoietin. *Pediatric research* 1998;**43**(2): 216-221.

10. Juul SE, Joyce AE, Zhao Y, Ledbetter DJ. Why is erythropoietin present in human milk? Studies of erythropoietin receptors on enterocytes of human and rat neonates. *Pediatric research* 1999;**46**(3): 263-268.
11. Juul SE, Yachnis AT, Christensen RD. Tissue distribution of erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human fetus. *Early Hum Dev* 1998;**52**(3): 235-249.
12. Ledbetter DJ, Juul SE. Erythropoietin and the incidence of necrotizing enterocolitis in infants with very low birth weight. *J Pediatr Surg* 2000;**35**(2): 178-181; discussion 182.
13. Paltauf A. Dis spontane dickdarm ruptur der neugeborenen. *Virchows Arch Pathol Anat* 1888;**111**: 461.
14. Generisch A. Bauchfellentzündung beim Neugeborenen in folge von perforation des ileums. *Virchows Arch Pathol Anat* 1891;**126**: 485.
15. Agerty H, Ziserman A, Shollenberger C. A case of perforation of the ileum in a newborn infant with operation and recovery. *J Pediatr* 1943;**22**: 233.
16. Bell MJ, Kosloske AM, Benton C, Martin LW. Neonatal necrotizing enterocolitis: prevention of perforation. *J Pediatr Surg* 1973;**8**(5): 601-605.
17. Andrews DA, Sawin RS, Ledbetter DJ, Schaller RT, Hatch EI. Necrotizing enterocolitis in term neonates. *Am J Surg* 1990;**159**(5): 507-509.
18. Maayan-Metzger A, Itzhak A, Mazkereth R, Kuint J. Necrotizing enterocolitis in full-term infants: case-control study and review of the literature. *J Perinatol* 2004;**24**(8): 494-499.
19. Grave GD, Nelson SA, Walker WA, Moss RL, Dvorak B, Hamilton FA, Higgins R, Raju TN. New therapies and preventive approaches for necrotizing enterocolitis: report of a research planning workshop. *Pediatric research* 2007;**62**(4): 510-514.

20. Lin PW, Stoll BJ. Necrotising enterocolitis. *Lancet* 2006;**368**(9543): 1271-1283.
21. Panigrahi P. Necrotizing enterocolitis: a practical guide to its prevention and management. *Paediatr Drugs* 2006;**8**(3): 151-165.
22. Kliegman RM, Fanaroff AA. Neonatal necrotizing enterocolitis: a nine-year experience. *Am J Dis Child* 1981;**135**(7): 603-607.
23. Teasdale T, LeGuennec J, Bard H. Neonatal necrotizing enterocolitis: the relationship of age at the time of onset and prognosis. *Can Med Assoc J* 1980;**123**: 387-390.
24. Foglia RP. Necrotizing enterocolitis. *Curr Probl Surg* 1995;**32**(9): 757-823.
25. Kliegman RM. Neonatal necrotizing enterocolitis: bridging the basic science with the clinical disease. *J Pediatr* 1990;**117**(5): 833-835.
26. Kliegman RM, Walsh MC. Neonatal necrotizing enterocolitis: pathogenesis, classification, and spectrum of illness. *Curr Probl Pediatr* 1987;**17**(4): 213-288.
27. Kliegman RM, Walsh MC. Neonatal necrotizing enterocolitis pathogenesis, classification, and spectrum of disease. *Curr Prob Pediatr* 1987;**17** (4): 213-288.
28. Andrews D, Savin R, D L. Necrotizing enterocolitis in term neonates. *Am J Surg* 1990;**159**: 507-509.
29. Adesanya OA, O'Shea TM, Turner CS, Amoroso RM, Morgan TM, Aschner JL. Intestinal perforation in very low birth weight infants: growth and neurodevelopment at 1 year of age. *J Perinatol* 2005;**25**(9): 583-589.
30. Guthrie SO, Gordon PV, Thomas V, Thorp JA, Peabody J, Clark RH. Necrotizing enterocolitis among neonates in the United States. *J Perinatol* 2003;**23**(4): 278-285.
31. Hintz SR, Kendrick DE, Stoll BJ, Vohr BR, Fanaroff AA, Donovan EF, Poole WK, Blakely ML, Wright L, Higgins R. Neurodevelopmental and growth outcomes of extremely low birth weight infants after necrotizing enterocolitis. *Pediatrics* 2005;**115**(3): 696-703.

32. Kliegman RM. Models of the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 1990;**117**(1 Pt 2): S2-5.
33. Santulli TV, Schullinger JN, Heird WC, Gongaware RD, Wigger J, Barlow B, Blanc WA, Berdon WE. Acute necrotizing enterocolitis in infancy: a review of 64 cases. *Pediatrics* 1975;**55**(3): 376-387.
34. Coombs RC, Morgan ME, Durbin GM, Booth IW, McNeish AS. Gut blood flow velocities in the newborn: effects of patent ductus arteriosus and parenteral indomethacin. *Arch Dis Child* 1990;**65**(10 Spec No): 1067-1071.
35. Bunton GL, Durbin GM, McIntosh N, Shaw DG, Taghizadeh A, Reynolds EO, Rivers RP, Urman G. Necrotizing enterocolitis. Controlled study of 3 years' experience in a neonatal intensive care unit. *Arch Dis Child* 1977;**52**(10): 772-777.
36. Leake RD, Thanopoulos B, Nieberg R. Hyperviscosity syndrome associated with necrotizing enterocolitis. *Am J Dis Child* 1975;**129**(10): 1192-1194.
37. Coombs RC, Morgan ME, Durbin GM, Booth IW, McNeish AS. Abnormal gut blood flow velocities in neonates at risk of necrotising enterocolitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1992;**15**(1): 13-19.
38. Kempley ST, Gamsu HR. Superior mesenteric artery blood flow velocity in necrotising enterocolitis. *Arch Dis Child* 1992;**67**(7 Spec No): 793-796.
39. Nowicki PT. Ischemia and necrotizing enterocolitis: where, when, and how. *Semin Pediatr Surg* 2005;**14**(3): 152-158.
40. Henry MC, Moss RL. Current issues in the management of necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatol* 2004;**28**(3): 221-233.

41. Hsueh W, Caplan MS, Qu XW, Tan XD, De Plaen IG, Gonzalez-Crussi F. Neonatal necrotizing enterocolitis: clinical considerations and pathogenetic concepts. *Pediatr Dev Pathol* 2003;**6**(1): 6-23.
42. Thompson AM, Bizzarro MJ. Necrotizing enterocolitis in newborns: pathogenesis, prevention and management. *Drugs* 2008;**68**(9): 1227-1238.
43. Book LS, Overall JC, Jr., Herbst JJ, Britt MR, Epstein B, Jung AL. Clustering of necrotizing enterocolitis. Interruption by infection-control measures. *N Engl J Med* 1977;**297**(18): 984-986.
44. Hoy CM, Millar MR, Mackay P. Neonatal necrotising enterocolitis. An update. *Dig Dis* 1990;**8**(5): 305-312.
45. Peter CS, Feuerhahn M, Bohnhorst B, Schlaud M, Ziesing S, von der Hardt H, Poets CF. Necrotising enterocolitis: is there a relationship to specific pathogens? *Eur J Pediatr* 1999;**158**(1): 67-70.
46. Caplan MS, Kelly A, Hsueh W. Endotoxin and hypoxia-induced intestinal necrosis in rats: the role of platelet activating factor. *Pediatric research* 1992;**31**(5): 428-434.
47. Stoll BJ, Gordon T, Korones SB, Shankaran S, Tyson JE, Bauer CR, Fanaroff AA, Lemons JA, Donovan EF, Oh W, Stevenson DK, Ehrenkranz RA, Papile LA, Verter J, Wright LL. Early-onset sepsis in very low birth weight neonates: a report from the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *J Pediatr* 1996;**129**(1): 72-80.
48. Eibl MM, Wolf HM, Furnkranz H, Rosenkranz A. Prevention of necrotizing enterocolitis in low-birth-weight infants by IgA-IgG feeding. *N Engl J Med* 1988;**319**(1): 1-7.

49. Perkhio M, Savilahti E. Time of appearance of immunoglobulin-containing cells in the mucosa of neonatal intestine. *Pediatr Res* 1980;**14**: 953-955.
50. Guy-Grand D, Griscelli C, Vassalli P. The mouse gut T lymphocyte, a novel type of T cell. Nature, origin, and traffic in mice in normal and graft-versus-host conditions. *J Exp Med* 1978;**148**(6): 1661-1677.
51. Buescher ES. Host defense mechanisms of human milk and their relations to enteric infections and necrotizing enterocolitis. *Clin Perinatol* 1994;**21**(2): 247-262.
52. Lucas A, Cole TJ. Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet* 1990;**336**(8730): 1519-1523.
53. Anand RJ, Leaphart CL, Mollen KP, Hackam DJ. The role of the intestinal barrier in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Shock* 2007;**27**(2): 124-133.
54. Glode MP, Sutton A, Moxon ER, Robbins JB. Pathogenesis of neonatal Escherichia coli meningitis: induction of bacteremia and meningitis in infant rats fed E. coli K1. *Infect Immun* 1977;**16**(1): 75-80.
55. Hunter CJ, Chokshi N, Ford HR. Evidence vs experience in the surgical management of necrotizing enterocolitis and focal intestinal perforation. *J Perinatol* 2008;**28 Suppl 1**: S14-17.
56. Kosloske AM. Pathogenesis and prevention of necrotizing enterocolitis: a hypothesis based on personal observation and a review of the literature. *Pediatrics* 1984;**74**(6): 1086-1092.
57. Barlow B, Santulli TV, Heird WC, Pitt J, Blanc WA, Schullinger JN. An experimental study of acute neonatal enterocolitis--the importance of breast milk. *J Pediatr Surg* 1974;**9**(5): 587-595.

58. Beerens H, Romond C, Neut C. Influence of breast-feeding on the bifid flora of the newborn intestine. *Am J Clin Nutr* 1980;**33**(11 Suppl): 2434-2439.
59. Barrie H. Human milk banks. *Lancet* 1982;**1**(8266): 284.
60. Delemos R, Rogers J, McLaughlin G. Experimental production of necrotizing enterocolitis in newborn rats. *PediatrRes* 1974;**8**: 380.
61. Carbonell X, Esque M, Ojuel J, Ascaso C, Figueras J, Moliner E et al. Factores de riesgo y pronósticos en la enterocolitis necrotizante. *An Esp Pediatr* 1996;**45**: 398-402.
62. Williams AJ. Xanthines and necrotising enterocolitis. *Arch Dis Child* 1980;**55**(12): 973-974.
63. Davis JM, Abbasi S, Spitzer AR, Johnson L. Role of theophylline in pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 1986;**109**(2): 344-347.
64. Norton ME, Merrill J, Cooper BA, Kuller JA, Clyman RI. Neonatal complications after the administration of indomethacin for preterm labor. *N Engl J Med* 1993;**329**(22): 1602-1607.
65. Czyrko C, Del Pin CA, O'Neill JA, Jr., Peckham GJ, Ross AJ, 3rd. Maternal cocaine abuse and necrotizing enterocolitis: outcome and survival. *J Pediatr Surg* 1991;**26**(4): 414-418; discussion 419-421.
66. Caplan MS, Sun XM, Hsueh W, Hageman JR. Role of platelet activating factor and tumor necrosis factor-alpha in neonatal necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 1990;**116**(6): 960-964.
67. Caplan MS, MacKendrick W. Inflammatory mediators and intestinal injury. *Clin Perinatol* 1994;**21**(2): 235-246.
68. Sun XM, Hsueh W. Bowel necrosis induced by tumor necrosis factor in rats is mediated by platelet-activating factor. *J Clin Invest* 1988;**81**(5): 1328-1331.

69. Bell MJ, Ternberg JL, Feigin RD, Keating JP, Marshall R, Barton L, Brotherton T. Neonatal necrotizing enterocolitis. Therapeutic decisions based upon clinical staging. *Ann Surg* 1978;**187**(1): 1-7.
70. Gordon PV, Swanson JR, Attridge JT, Clark R. Emerging trends in acquired neonatal intestinal disease: is it time to abandon Bell's criteria? *J Perinatol* 2007;**27**(11): 661-671.
71. Kanto WP, Jr., Hunter JE, Stoll BJ. Recognition and medical management of necrotizing enterocolitis. *Clin Perinatol* 1994;**21**(2): 335-346.
72. Hutter JJ, Jr., Hathaway WE, Wayne ER. Hematologic abnormalities in severe neonatal necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 1976;**88**(6): 1026-1031.
73. Ververidis M, Kiely EM, Spitz L, Drake DP, Eaton S, Pierro A. The clinical significance of thrombocytopenia in neonates with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2001;**36**(5): 799-803.
74. Malik A, Hui CP, Pennie RA, Kirpalani H. Beyond the complete blood cell count and C-reactive protein: a systematic review of modern diagnostic tests for neonatal sepsis. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2003;**157**(6): 511-516.
75. Westra-Meijer CM, Degener JE, Dzoljic-Danilovic G, Michel MF, Mettau JW. Quantitative study of the aerobic and anaerobic faecal flora in neonatal necrotising enterocolitis. *Arch Dis Child* 1983;**58**(7): 523-528.
76. Mollit D. Does patient age or intestinal pathology influence the bacteria found in cases of necrotizing enterocolitis? . *South Med J* 1990;**84**: 879.
77. Smith SD, Tagge EP, Miller J, Cheu H, Sukarochana K, Rowe MI. The hidden mortality in surgically treated necrotizing enterocolitis: fungal sepsis. *J Pediatr Surg* 1990;**25**(10): 1030-1033.

78. Daneman A, Woodward S, de Silva M. The radiology of neonatal necrotizing enterocolitis (NEC). A review of 47 cases and the literature. *Pediatr Radiol* 1978;**7**(2): 70-77.
79. Kurkchubasche A, Smith S, Rowe M. Portal venous air an old sign and new operative indication for necrotizing enterocolitis.
- .
80. Epelman M, Daneman A, Navarro OM, Morag I, Moore AM, Kim JH, Faingold R, Taylor G, Gerstle JT. Necrotizing enterocolitis: review of state-of-the-art imaging findings with pathologic correlation. *Radiographics* 2007;**27**(2): 285-305.
81. Rowe MI, Reblock KK, Kurkchubasche AG, Healey PJ. Necrotizing enterocolitis in the extremely low birth weight infant. *J Pediatr Surg* 1994;**29**(8): 987-990; discussion 990-981.
82. Wallace JL, Keenan CM. An orally active inhibitor of leukotriene synthesis accelerates healing in a rat model of colitis. *Am J Physiol* 1990;**258**(4 Pt 1): G527-534.
83. Ballance WA, Dahms BB, Shenker N, Kliegman RM. Pathology of neonatal necrotizing enterocolitis: a ten-year experience. *J Pediatr* 1990;**117**(1 Pt 2): S6-13.
84. Puglisi RN, Whalen TV, Doolin EJ. Computer analyzed histology of ischemic injury to the gut. *J Pediatr Surg* 1995;**30**(6): 839-844.
85. Sugarman ID, Kiely EM. Is there a role for high jejunostomy in the management of severe necrotising enterocolitis? *Pediatr Surg Int* 2001;**17**(2-3): 122-124.
86. Luig M, Lui K. Epidemiology of necrotizing enterocolitis--Part II: Risks and susceptibility of premature infants during the surfactant era: a regional study. *J Paediatr Child Health* 2005;**41**(4): 174-179.

87. Sankaran K, Puckett B, Lee DS, Seshia M, Boulton J, Qiu Z, Lee SK. Variations in incidence of necrotizing enterocolitis in Canadian neonatal intensive care units. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;**39**(4): 366-372.
88. Sharma R, Tepas JJ, 3rd, Hudak ML, Wludyka PS, Mollitt DL, Garrison RD, Bradshaw JA, Sharma M. Portal venous gas and surgical outcome of neonatal necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2005;**40**(2): 371-376.
89. Blakely ML, Lally KP, McDonald S, Brown RL, Barnhart DC, Ricketts RR, Thompson WR, Scherer LR, Klein MD, Letton RW, Chwals WJ, Touloukian RJ, Kurkchubasche AG, Skinner MA, Moss RL, Hilfiker ML. Postoperative outcomes of extremely low birth-weight infants with necrotizing enterocolitis or isolated intestinal perforation: a prospective cohort study by the NICHD Neonatal Research Network. *Ann Surg* 2005;**241**(6): 984-989; discussion 989-994.
90. Petty JK, Ziegler MM. Operative strategies for necrotizing enterocolitis: The prevention and treatment of short-bowel syndrome. *Semin Pediatr Surg* 2005;**14**(3): 191-198.
91. Moss RL, Dimmitt RA, Henry MC, Geraghty N, Efron B. A meta-analysis of peritoneal drainage versus laparotomy for perforated necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2001;**36**(8): 1210-1213.
92. Ein SH, Marshall DG, Girvan D. Peritoneal drainage under local anesthesia for perforations from necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 1977;**12**(6): 963-967.
93. Janik JS, Ein SH, Mancor K. Intestinal stricture after necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 1981;**16**(4): 438-443.
94. Bury RG, Tudehope D. Enteral antibiotics for preventing necrotizing enterocolitis in low birthweight or preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2001(1): CD000405.

95. Egan EA, Nelson RM, Mantilla G, Eitzman DV. Additional experience with routine use of oral kanamycin prophylaxis for necrotizing enterocolitis in infants under 1,500 grams. *J Pediatr* 1977;**90**(2): 331-332.
96. Siu YK, Ng PC, Fung SC, Lee CH, Wong MY, Fok TF, So KW, Cheung KL, Wong W, Cheng AF. Double blind, randomised, placebo controlled study of oral vancomycin in prevention of necrotising enterocolitis in preterm, very low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1998;**79**(2): F105-109.
97. Mimms G. Oral gentamicin: Prevention of necrotizing enterocolitis. *Pediatric research* 1985;**19**: 354.
98. Rowley MP, Dahlenburg GW. Gentamicin in prophylaxis of neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet* 1978;**2**(8088): 532.
99. Henry MC, Moss RL. Neonatal necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg* 2008;**17**(2): 98-109.
100. Dickinson EC, Gorga JC, Garrett M, Tuncer R, Boyle P, Watkins SC, Alber SM, Parizhskaya M, Trucco M, Rowe MI, Ford HR. Immunoglobulin A supplementation abrogates bacterial translocation and preserves the architecture of the intestinal epithelium. *Surgery* 1998;**124**(2): 284-290.
101. Foster J, Cole M. Oral immunoglobulin for preventing necrotizing enterocolitis in preterm and low birth-weight neonates. *Cochrane Database Syst Rev* 2004(1): CD001816.
102. Ohlsson A, Lacy JB. Intravenous immunoglobulin for preventing infection in preterm and/or low-birth-weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2004(1): CD000361.
103. Crowley P, Chalmers I, Keirse MJ. The effects of corticosteroid administration before preterm delivery: an overview of the evidence from controlled trials. *Br J Obstet Gynaecol* 1990;**97**(1): 11-25.

104. Roberts D, Dalziel S. Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;**3**: CD004454.
105. Smith LM, Qureshi N, Chao CR. Effects of single and multiple courses of antenatal glucocorticoids in preterm newborns less than 30 weeks' gestation. *J Matern Fetal Med* 2000;**9**(2): 131-135.
106. Halliday HL, Ehrenkranz RA, Doyle LW. Early postnatal (<96 hours) corticosteroids for preventing chronic lung disease in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2003(1): CD001146.
107. Halliday HL, Ehrenkranz RA, Doyle LW. Moderately early (7-14 days) postnatal corticosteroids for preventing chronic lung disease in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2003(1): CD001144.
108. Stark AR, Carlo WA, Tyson JE, Papile LA, Wright LL, Shankaran S, Donovan EF, Oh W, Bauer CR, Saha S, Poole WK, Stoll BJ. Adverse effects of early dexamethasone in extremely-low-birth-weight infants. National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *N Engl J Med* 2001;**344**(2): 95-101.
109. Giers G, Janzarik H, Kempe ER, Mueller-Eckhardt C. PAF-acether-antagonist WEB 2086 for treatment of chronic idiopathic thrombocytopenia. *Lancet* 1990;**336**(8708): 191-192.
110. Cueva JP, Hsueh W. Role of oxygen derived free radicals in platelet activating factor induced bowel necrosis. *Gut* 1988;**29**(9): 1207-1212.
111. Di Lorenzo M, Bass J, Krantis A. An intraluminal model of necrotizing enterocolitis in the developing neonatal piglet. *J Pediatr Surg* 1995;**30**(8): 1138-1142.

112. Graf JL, VanderWall KJ, Adzick NS, Harrison MR. Nitroglycerin attenuates the bowel damage of necrotizing enterocolitis in a rabbit model. *J Pediatr Surg* 1997;**32**(2): 283-285; discussion 285-286.
113. Ostertag SG, LaGamma EF, Reisen CE, Ferrentino FL. Early enteral feeding does not affect the incidence of necrotizing enterocolitis. *Pediatrics* 1986;**77**(3): 275-280.
114. Bin-Nun A, Bromiker R, Wilschanski M, Kaplan M, Rudensky B, Caplan M, Hammerman C. Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight neonates. *J Pediatr* 2005;**147**(2): 192-196.
115. Lin HC, Su BH, Chen AC, Lin TW, Tsai CH, Yeh TF, Oh W. Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics* 2005;**115**(1): 1-4.
116. Caplan MS, Miller-Catchpole R, Kaup S, Russell T, Lickerman M, Amer M, Xiao Y, Thomson R, Jr. Bifidobacterial supplementation reduces the incidence of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Gastroenterology* 1999;**117**(3): 577-583.
117. Hoyos AB. Reduced incidence of necrotizing enterocolitis associated with enteral administration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* to neonates in an intensive care unit. *Int J Infect Dis* 1999;**3**(4): 197-202.
118. Butel MJ, Roland N, Hibert A, Popot F, Favre A, Tessedre AC, Bensaada M, Rimbault A, Szylit O. Clostridial pathogenicity in experimental necrotising enterocolitis in gnotobiotic quails and protective role of bifidobacteria. *J Med Microbiol* 1998;**47**(5): 391-399.
119. Dani C, Biadaioli R, Bertini G, Martelli E, Rubaltelli FF. Probiotics feeding in prevention of urinary tract infection, bacterial sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm infants. A prospective double-blind study. *Biol Neonate* 2002;**82**(2): 103-108.

120. Carrasco R, Pera M, May FE, Westley BR, Martinez A, Morales L. Trefoil factor family peptide 3 prevents the development and promotes healing of ischemia-reperfusion injury in weanling rats. *J Pediatr Surg* 2004;**39**(11): 1693-1700.
121. Shin CE, Falcone RA, Jr., Stuart L, Erwin CR, Warner BW. Diminished epidermal growth factor levels in infants with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2000;**35**(2): 173-176; discussion 177.
122. Warner BW, Warner BB. Role of epidermal growth factor in the pathogenesis of neonatal necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg* 2005;**14**(3): 175-180.
123. Rabinowitz SS, Dzakpasu P, Piecuch S, Leblanc P, Valencia G, Kornecki E. Platelet-activating factor in infants at risk for necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 2001;**138**(1): 81-86.
124. Hardee ME, Kirkpatrick JP, Shan S, Snyder SA, Vujaskovic Z, Rabbani ZN, Dewhirst MW, Blackwell KL. Human recombinant erythropoietin (rEpo) has no effect on tumour growth or angiogenesis. *Br J Cancer* 2005;**93**(12): 1350-1355.
125. Farrell F, Lee A. The erythropoietin receptor and its expression in tumor cells and other tissues. *Oncologist* 2004;**9 Suppl 5**: 18-30.
126. Jelkmann W. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev* 1992;**72**(2): 449-489.
127. Lappin TR, Maxwell AP, Johnston PG. EPO's alter ego: erythropoietin has multiple actions. *Stem Cells* 2002;**20**(6): 485-492.
128. Laffosse J, Minville V, Chiron P, Colombani A, Gris C, Pourrud J, Eychenne B, Fourcade O. Preoperative use of epoietin beta in total head replacement: a prospective study. *Arch Orthop Traume Surg* 2009.

129. Kosmadakis N, Messaris E, Maris A, Katsaragakis S, Leandros E, Konstadouakis M. Perioperative erythropoietin administration in patients with gastrointestinal tract cancer: prospective randomized double-blind study. *Ann Surg* 2003;**237**: 417-421.
130. Brown MS, Keith JF, 3rd. Comparison between two and five doses a week of recombinant human erythropoietin for anemia of prematurity: a randomized trial. *Pediatrics* 1999;**104**(2 Pt 1): 210-215.
131. Chen JY, Wu TS, Chanlai SP. Recombinant human erythropoietin in the treatment of anemia of prematurity. *Am J Perinatol* 1995;**12**(5): 314-318.
132. Meyer MP, Meyer JH, Commerford A, Hann FM, Sive AA, Moller G, Jacobs P, Malan AF. Recombinant human erythropoietin in the treatment of the anemia of prematurity: results of a double-blind, placebo-controlled study. *Pediatrics* 1994;**93**(6 Pt 1): 918-923.
133. Ohlsson A, SM. A. Early erythropoietin for preventing red blood cell transfusion in preterm and/or low birth weight infants. . *Cochrane Database Syst Rev* 2006(CD004863).
134. Aher S, Ohlsson A. Late erythropoietin for preventing red blood cell transfusion in preterm and/or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;**3**: CD004868.
135. Ballin A, Bilker-Reich A, Arbel E, Davidovitz Y, Kohelet D. Erythropoietin, given enterally, stimulates erythropoiesis in premature infants. *Lancet* 1999;**353**(9167): 1849.
136. Krantz SB. Erythropoietin. *Blood* 1991;**77**(3): 419-434.
137. Juul SE, Anderson DK, Li Y, Christensen RD. Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system. *Pediatric research* 1998;**43**(1): 40-49.
138. Conrad KP, Benyo DF, Westerhausen-Larsen A, Miles TM. Expression of erythropoietin by the human placenta. *Faseb J* 1996;**10**(7): 760-768.

139. Kertesz N, Wu J, Chen T, Sucov H, Wu H. The role of erythropoietin in regulating angiogenesis. *Developmental Biology* 2004;**276**: 101-110.
140. Koldovsky O. The potential physiological significance of milk-borne hormonally active substances for the neonate. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1996;**1**(3): 317-323.
141. McPherson RJ, Juul SE. High-dose erythropoietin inhibits apoptosis and stimulates proliferation in neonatal rat intestine. *Growth Horm IGF Res* 2007;**17**(5): 424-430.
142. Juul SE, Ledbetter DJ, Joyce AE, Dame C, Christensen RD, Zhao Y, DeMarco V. Erythropoietin acts as a trophic factor in neonatal rat intestine. *Gut* 2001;**49**(2): 182-189.
143. Buemi M, Galeano M, Sturiale A, Ientile R, Crisafulli C, Parisi A, Catania M, Calapai G, Impala P, Aloisi C, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A, Tuccari G, Frisina N. Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and healing of ischemic skin wounds. *Shock* 2004;**22**(2): 169-173.
144. Galeano M, Altavilla D, Cucinotta D, Russo GT, Calo M, Bitto A, Marini H, Marini R, Adamo EB, Seminara P, Minutoli L, Torre V, Squadrito F. Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic mouse. *Diabetes* 2004;**53**(9): 2509-2517.
145. Harder Y, Amon M, Schramm R, Contaldo C, Metzkow E, Matzen A, Rucker M, Vollmar B, Menger MD. Erythropoietin reduces necrosis in critically ischemic myocutaneous tissue by protecting nutritive perfusion in a dose-dependent manner. *Surgery* 2009;**145**(4): 372-383.
146. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;**407**(6801): 249-257.
147. Ribatti D. The involvement of endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2004;**8**(3): 294-300.

148. Kurz H, Burri PH, Djonov VG. Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: from form to function. *News Physiol Sci* 2003;**18**: 65-70.
149. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;**86**(3): 353-364.
150. Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* 2007;**6**(4): 273-286.
151. Salven P, Orpana A, Joensuu H. Leukocytes and platelets of patients with cancer contain high levels of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res* 1999;**5**(3): 487-491.
152. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005;**23**(5): 1011-1027.
153. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;**146**(5): 1029-1039.
154. Taviani M, Cortes F, Robin C, Schiavon V, Hallais MF, Coulombel L, Charbord P, Labastie MC, Peault B. [The hemangioblast, common precursor of endothelial and hematopoietic cells]. *Transfus Clin Biol* 2000;**7**(3): 238-241.
155. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995;**376**(6535): 62-66.
156. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997;**386**(6626): 671-674.
157. Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, Chin K, Lee ES, Kessimian N, Noguchi CT. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;**91**(9): 3974-3978.

158. Batra S, Perelman N, Luck LR, Shimada H, Malik P. Pediatric tumor cells express erythropoietin and a functional erythropoietin receptor that promotes angiogenesis and tumor cell survival. *Lab Invest* 2003;**83**(10): 1477-1487.
159. Ribatti D, Presta M, Vacca A, Ria R, Giuliani R, Dell'Era P, Nico B, Roncali L, Dammacco F. Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood* 1999;**93**(8): 2627-2636.
160. Yasuda Y, Masuda S, Chikuma M, Inoue K, Nagao M, Sasaki R. Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis. *J Biol Chem* 1998;**273**(39): 25381-25387.
161. Kertesz N, Wu J, Chen TH, Sucov HM, Wu H. The role of erythropoietin in regulating angiogenesis. *Dev Biol* 2004;**276**(1): 101-110.
162. Ashley RA, Dubuque SH, Dvorak B, Woodward SS, Williams SK, Kling PJ. Erythropoietin stimulates vasculogenesis in neonatal rat mesenteric microvascular endothelial cells. *Pediatric research* 2002;**51**(4): 472-478.
163. Carlini RG, Reyes AA, Rothstein M. Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis in vitro. *Kidney Int* 1995;**47**(3): 740-745.
164. Choi K. Hemangioblast development and regulation. *Biochem Cell Biol* 1998;**76**(6): 947-956.
165. Jaquet K, Krause K, Tawakol-Khodai M, Geidel S, Kuck KH. Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. *Microvasc Res* 2002;**64**(2): 326-333.
166. Ozdamar A, Topcu K, Gumustekin M, Gurel D, Gelal A, Ozer E, Ucan B, Temir G, Karkiner A, Karaca I, Hosgor M. Erythropoietin restores bowel damage and hypoperistalsis in gastroschisis. *J Pediatr Surg* 2006;**41**(2): 352-357.

167. Akisu M, Kullahcioglu Girgin F, Baka M, Husseyinov A, Kultursay N. The role of recombinant human erythropoietin in lipid peroxidation and platelet-activating factor generation in a rat model of necrotizing enterocolitis. *Eur J Pediatr Surg* 2001;**11**(3): 167-172.
168. Kumral A, Baskin H, Duman N, Yilmaz O, Tatli M, Ozer E, Gokmen N, Genc S, Ozkan H. Erythropoietin protects against necrotizing enterocolitis of newborn rats by the inhibiting nitric oxide formation. *Biol Neonate* 2003;**84**(4): 325-329.
169. Aher SM, Ohlsson A. Early versus late erythropoietin for preventing red blood cell transfusion in preterm and/or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;**3**: CD004865.
170. Kao R, Xenocostas A, Rui T, Yu P, Huang W, Rose J, Martin CM. Erythropoietin improves skeletal muscle microcirculation and tissue bioenergetics in a mouse sepsis model. *Crit Care* 2007;**11**(3): R58.
171. Rezaeian F, Wettstein R, Amon M, Scheuer C, Schramm R, Menger MD, Pittet B, Harder Y. Erythropoietin protects critically perfused flap tissue. *Ann Surg* 2008;**248**(6): 919-929.
172. Holmes K, Charnock Jones SD, Forhead AJ, Giussani DA, Fowden AL, Licence D, Kempster S, Smith GC. Localization and control of expression of VEGF-A and the VEGFR-2 receptor in fetal sheep intestines. *Pediatric research* 2008;**63**(2): 143-148.
173. Joory KD, Levick JR, Mortimer PS, Bates DO. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression in normal human tissues. *Lymphatic research and biology* 2006;**4**(2): 73-82.

174. Guneli E, Cavdar Z, Islekel H, Sarioglu S, Erbayraktar S, Kiray M, Sokmen S, Yilmaz O, Gokmen N. Erythropoietin protects the intestine against ischemia/ reperfusion injury in rats. *Mol Med* 2007;**13**(9-10): 509-517.
175. Mori S, Sawada T, Okada T, Kubota K. Erythropoietin and its derivative protect the intestine from severe ischemia/reperfusion injury in the rat. *Surgery* 2008;**143**(4): 556-565.
176. Schmeding M, Neumann UP, Boas-Knoop S, Spinelli A, Neuhaus P. Erythropoietin reduces ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Eur Surg Res* 2007;**39**(3): 189-197.
177. Vesey DA, Cheung C, Pat B, Endre Z, Gobe G, Johnson DW. Erythropoietin protects against ischaemic acute renal injury. *Nephrol Dial Transplant* 2004;**19**(2): 348-355.
178. Van der Meer P, Lipsic E, Henning RH, de Boer RA, Suurmeijer AJ, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH. Erythropoietin improves left ventricular function and coronary flow in an experimental model of ischemia-reperfusion injury. *Eur J Heart Fail* 2004;**6**(7): 853-859.
179. Junk AK, Mammis A, Savitz SI, Singh M, Roth S, Malhotra S, Rosenbaum PS, Cerami A, Brines M, Rosenbaum DM. Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;**99**(16): 10659-10664.
180. Marti HH. Erythropoietin and the hypoxic brain. *J Exp Biol* 2004;**207**(Pt 18): 3233-3242.
181. Ehrenreich H, Timmer W, Siren AL. A novel role for an established player: anemia drug erythropoietin for the treatment of cerebral hypoxia/ischemia. *Transfus Apher Sci* 2004;**31**(1): 39-44.
182. Liem A, van de Woestijne AP, Bruijns E, Roeters van Lennep HW, de Boo JA, van Halteren HK, van Es TP, Jukema JW, van der Laarse A, Zwinderman AH, van Veldhuisen

- DJ. Effect of EPO administration on myocardial infarct size in patients with non-STE acute coronary syndromes; results from a pilot study. *Int J Cardiol* 2009;**131**(2): 285-287.
183. Imamura R, Moriyama T, Isaka Y, Namba Y, Ichimaru N, Takahara S, Okuyama A. Erythropoietin protects the kidneys against ischemia reperfusion injury by activating hypoxia inducible factor-1alpha. *Transplantation* 2007;**83**(10): 1371-1379.
184. Nakano M, Satoh K, Fukumoto Y, Ito Y, Kagaya Y, Ishii N, Sugamura K, Shimokawa H. Important role of erythropoietin receptor to promote VEGF expression and angiogenesis in peripheral ischemia in mice. *Circulation research* 2007;**100**(5): 662-669.
185. Buemi M, Lacquaniti A, Maricchiolo G, Bolignano D, Campo S, Cernaro V, Sturiale A, Grasso G, Buemi A, Allegra A, Donato V, Genovese L. Regenerative Medicine: does Erythropoietin have a role? *Curr Pharm Des* 2009;**15**(17): 2026-2036.
186. Sayan H, Ozacmak VH, Guven A, Aktas RG, Ozacmak ID. Erythropoietin stimulates wound healing and angiogenesis in mice. *J Invest Surg* 2006;**19**(3): 163-173.
187. Guzman MJ, Crisostomo PR, Wang M, Markel TA, Wang Y, Meldrum DR. Vascular endothelial growth factor improves myocardial functional recovery following ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 2008;**150**(2): 286-292.
188. Oz Oyar E, Kardes O, Korkmaz A, Omeroglu S. Effects of vascular endothelial growth factor on ischemic spinal cord injury caused by aortic cross-clamping in rabbits. *J Surg Res* 2009;**151**(1): 94-99.
189. Pang Y, Lineaweaver WC, Lei MP, Oswald T, Shamburger S, Cai Z, Zhang F. Evaluation of the mechanism of vascular endothelial growth factor improvement of ischemic flap survival in rats. *Plast Reconstr Surg* 2003;**112**(2): 556-564.

190. Tunckiran A, Cayan S, Bozlu M, Yilmaz N, Acar D, Akbay E. Protective effect of vascular endothelial growth factor on histologic changes in testicular ischemia-reperfusion injury. *Fertil Steril* 2005;**84**(2): 468-473.
191. Wen D, Boissel JP, Tracy TE, Gruninger RH, Mulcahy LS, Czelusniak J, Goodman M, Bunn HF. Erythropoietin structure-function relationships: high degree of sequence homology among mammals. *Blood* 1993;**82**(5): 1507-1516.
192. Infanger M, Faramarzi S, Grosse J, Kurth E, Ulbrich C, Bauer J, Wehland M, Kreutz R, Kossmehl P, Paul M, Grimm D. Expression of vascular endothelial growth factor and receptor tyrosine kinases in cardiac ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol* 2007;**16**(5): 291-299.
193. von Dobschuetz E, Meyer S, Thorn D, Marme D, Hopt UT, Thomusch O. Targeting vascular endothelial growth factor pathway offers new possibilities to counteract microvascular disturbances during ischemia/reperfusion of the pancreas. *Transplantation* 2006;**82**(4): 543-549.
194. Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, Rustenbeck HH, Breiter N, Jacob S, Knerlich F, Bohn M, Poser W, Ruther E, Kochen M, Gefeller O, Gleiter C, Wessel TC, De Ryck M, Itri L, Prange H, Cerami A, Brines M, Siren AL. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* 2002;**8**(8): 495-505.
195. Minamino T, Kitakaze M. New therapeutic application of erythropoietin against ischemic heart diseases. *J Pharmacol Sci* 2006;**101**(2): 179-181.
196. Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, Xie QW, Coleman T, Kreilgaard M, Torup L, Sager T, Erbayraktar Z, Gokmen N, Yilmaz O, Ghezzi P, Villa P, Fratelli M, Casagrande S, Leist M, Helboe L, Gerwein J, Christensen S, Geist MA, Pedersen LO, Cerami-Hand C,

- Wuerth JP, Cerami A, Brines M. Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;**100**(11): 6741-6746.
197. Smith KJ, Bleyer AJ, Little WC, Sane DC. The cardiovascular effects of erythropoietin. *Cardiovasc Res* 2003;**59**(3): 538-548.
198. Juul SE. Erythropoietin in the neonate. *Curr Probl Pediatr* 1999;**29**(5): 129-149.
199. Contaldo C, Meier C, Elsherbiny A, Harder Y, Trentz O, Menger MD, Wanner GA. Human recombinant erythropoietin protects the striated muscle microcirculation of the dorsal skinfold from postischemic injury in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;**293**(1): H274-283.
200. Folkman J, Haudenschild C. Angiogenesis in vitro. *Nature* 1980;**288**(5791): 551-556.
201. Farr RS, Wardlow ML, Cox CP, Meng KE, Greene DE. Human serum acid-labile factor is an acylhydrolase that inactivates platelet-activating factor. *Fed Proc* 1983;**42**(14): 3120-3122.