

Incremento de la expresión de Bax (proapoptótico) y disminución de la expresión de Bcl-2 (antiapoptótico) en recién nacidos con enterocolitis necrosante

Increase in pro-apoptotic Bax expression and decrease in anti-apoptotic Bcl-2 expression in newborns with necrotizing enterocolitis

Dr. Ufuk Ates^a, Dra. Gulnur Gollu^a, Dra. Gonul Kucuk^a, Dra. Deniz Billur^b, Dra. Meltem Bingol-Kologlu^a, Dr. Yavuz Yilmaz^c, Dra. Hulya Ozkan-Ulu^c, Dra. Pinar Bayram^b, Dr. Emin Bagriacik^d y Dr. Huseyin Dindar^a

RESUMEN

Antecedentes/Objetivo: El objetivo de este estudio fue determinar si se producía un incremento de la expresión de Bax (proapoptótico) y una disminución de la expresión de Bcl-2A1 (antiapoptótico) en el intestino de los recién nacidos con enterocolitis necrosante.

Materiales y métodos: Comparamos a ocho pacientes recién nacidos de manera consecutiva sometidos a resección intestinal debido a enterocolitis necrosante con ocho recién nacidos sometidos a resección intestinal debido a atresia ileal. La evaluación histopatológica de la lesión tisular y la apoptosis se realizó mediante microscopía óptica y el método TUNEL. El nivel de ARNm en los genes apoptóticos (CASP3, CASP6, CASP7, Bax, BIRC2) y antiapoptóticos se evaluó con el método de matriz de RCP (PCR array). La expresión de proteínas se evaluó mediante inmunohistoquímica.

Resultados: Los puntajes de las lesiones tisulares y los puntajes medios de apoptosis fueron significativamente más altos en el grupo con enterocolitis necrosante en comparación con el grupo de referencia ($p < 0,01$). La expresión de los genes proapoptóticos aumentó significativamente en el grupo con enterocolitis necrosante frente al grupo de referencia ($p < 0,01$). La expresión del gen Bcl-2A1 (antiapoptótico) disminuyó significativamente en el grupo con enterocolitis necrosante ($p < 0,01$). La expresión de las proteínas Bax y CASP3 aumentó significativamente en el grupo con enterocolitis necrosante ($p < 0,01$).

Conclusión: Según nuestros datos, la alteración del equilibrio entre la expresión de Bax (proapoptótico) y la expresión de Bcl-2A1 (antiapoptótico) en el lugar de la lesión es un posible mecanismo de la patogenia en recién nacidos que presentan enterocolitis necrosante.

Palabras clave: apoptosis, expresión génica, enterocolitis necrosante, recién nacido.

INTRODUCCIÓN

La enterocolitis necrosante (ECN) es una afección multifactorial complicada en los recién nacidos y los lactantes prematuros, con una tasa de morbimortalidad elevada en esta población. La enterocolitis necrosante se caracteriza por apoptosis del epitelio intestinal, necrosis, hemorragia, migración incompleta de los enterocitos y proliferación, y produce una falla persistente de la barrera intestinal, que a su vez resulta en la pérdida de la integridad del epitelio, la invasión bacteriana de los intestinos seguida de una reacción inflamatoria hiperreactiva aguda y la consecuente necrosis intestinal.^{1,2}

El equilibrio entre la proliferación y la pérdida celular es necesario para conservar la homeostasis del epitelio intestinal.^{3,4} La mayor parte de la pérdida celular en el intestino normal se produce mediante apoptosis.³ El equilibrio entre las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas es fundamental para la supervivencia celular.³ La familia de proteínas Bcl-2 constituye una clase significativa de moléculas que controlan la apoptosis de los enterocitos.³ Bcl-2A1 es una proteína antiapoptótica que inhibe la liberación del citocromo *c* desde la mitocondria y revierte los efectos de la proteína Bax proapoptótica.³ Se ha demostrado que la apoptosis epitelial exagerada en el intestino produce una lesión grave por enterocolitis necrosante.^{2,3,5} En un modelo de enterocolitis necrosante en ratas, se demostró un incremento de la expresión de los genes apoptóticos simultáneo a la disminución de los genes antiapoptóticos. Además, se ha indicado que la prevención y reducción de la apoptosis en entornos de investigación reducen la incidencia de enterocolitis necrosante.⁵⁻⁷ Por lo tanto, apuntamos a descubrir si se produce un incremento de la expresión de los genes proapoptóticos y una disminución de la expresión de los genes antiapoptóticos en el intestino de los recién nacidos con enterocolitis necrosante grave y en comparación con el intestino de los recién nacidos con atresia ileal. En particular, nos centramos en la expresión de los genes

- Escuela de Medicina de Ankara Üniversitesi, Departamento de Cirugía Pediátrica, Ankara, Turquía.
- Escuela de Medicina de Ankara Üniversitesi, Departamento de Histología y Embriología, Ankara, Turquía.
- Educación para la Salud de la Mujer y Hospital de Investigación Zekai Tahir Burak, Departamento de Cirugía Pediátrica, Ankara, Turquía.
- Escuela de Medicina de Gazi Üniversitesi, Centro de Investigación en Inmunología, Ankara, Turquía.

Correspondencia: Dr. Ufuk Ates: drufukates@gmail.com

Financiamiento: Ninguno.

Conflicto de intereses: Ninguno que declarar.

Recibido: 10-12-2015

Aceptado: 24-2-2016

Bax y caspasa-3 (proapoptóticos) y Bcl -2A1 (antiapoptótico).

MATERIALES Y MÉTODOS

El comité de ética de la Escuela de Medicina de la Ankara Üniversitesi aprobó la recolección de muestras quirúrgicas con fines investigativos (protocolo número 13-271). El estudio se llevó a cabo de conformidad con la declaración de Helsinki. Se obtuvo el consentimiento informado de los padres para realizar la investigación. Comparamos a ocho pacientes recién nacidos sometidos a resección intestinal debido a enterocolitis necrosante con ocho recién nacidos sometidos a resección intestinal debido a atresia ileal. El aire libre y el gas en el sistema venoso portal observados en las radiografías directas, junto con el deterioro clínico durante el control médico óptimo fueron los criterios para la

exploración quirúrgica de los recién nacidos con enterocolitis necrosante. El diagnóstico de enterocolitis necrosante se confirmó durante la investigación patológica de rutina. Se obtuvieron segmentos de 1 cm x 1 cm de las piezas quirúrgicas durante la laparotomía, que se dividieron en dos partes. Una de las partes se ultracongeló en nitrógeno líquido a -80 °C para someterla a una reacción en cadena de la polimerasa (RCP); la otra se conservó en formaldehído para la posterior evaluación histopatológica. La evaluación histopatológica de la lesión tisular se realizó mediante microscopía óptica y asignación de un puntaje al grado de lesión tisular. La evaluación histopatológica de la apoptosis se realizó mediante el método TUNEL (marcado del extremo libre por desoxi-transferasa terminal con isotiocianato de fluoresceína).^{2,8} Los niveles de ácido ribonucleico mensajero (ARNm)

TABLA 1: Características clínicas, puntaje de lesión tisular y de apoptosis de los pacientes del grupo con enterocolitis necrosante

| NEC group Patients | Sexo | Edad gestacional (en semanas) | Edad al momento de la cirugía (en días) | Peso (en gramos) | Nivel de compromiso intestinal al momento de la cirugía | Procedimiento quirúrgico | Puntaje del grado de lesión tisular | Puntaje de apoptosis |
|--------------------|-----------|-------------------------------|---|------------------|---|-----------------------------------|-------------------------------------|----------------------|
| 1 | Masculino | 30 | 20 | 1250 | Necrosis intestinal de 15 cm | Resección del íleon e ileostomía | 3 | 3 |
| 2 | Femenino | 25 | 7 | 760 | Necrosis intestinal de 25 cm y perforación | Resección ileocólica e ileostomía | 4 | 4 |
| 3 | Femenino | 32 | 15 | 1530 | Necrosis intestinal de 30 cm y perforación | Resección ileocólica e ileostomía | 4 | 4 |
| 4 | Masculino | 27 | 17 | 850 | Necrosis intestinal de 20 cm y perforación | Resección ileocólica e ileostomía | 3 | 4 |
| 5 | Masculino | 33 | 11 | 1600 | Necrosis intestinal de 35 cm y perforación | Resección ileocólica e ileostomía | 4 | 4 |
| 6 | Masculino | 31 | 10 | 1420 | Necrosis intestinal de 10 cm | Resección del íleon e ileostomía | 2 | 3 |
| 7 | Femenino | 29 | 8 | 1050 | Necrosis intestinal de 15 cm y perforación | Resección ileocólica e ileostomía | 3 | 3 |
| 8 | Masculino | 28 | 12 | 930 | Necrosis intestinal de 15 cm y perforación | Resección del íleon e ileostomía | 2 | 3 |

cm: centímetros.

TABLA 2: Características clínicas, puntaje de lesión tisular y de apoptosis de los pacientes del grupo con atresia ileal

| Pacientes del grupo con atresia ileal | Sexo | Edad gestacional (en semanas) | Edad al momento de la cirugía (en días) | Peso (en gramos) | Hallazgos durante la cirugía y procedimiento quirúrgico | Puntaje del grado de lesión tisular | Puntaje de apoptosis |
|---------------------------------------|-----------|-------------------------------|---|------------------|---|-------------------------------------|----------------------|
| 1 | Femenino | 32 | 3 | 1600 | Atresia ileal de tipo IIIa. Anastomosis íleo-íleal | 2 | 2 |
| 2 | Masculino | 36 | 2 | 2200 | Atresia ileal de tipo II. Anastomosis íleo-íleal | 1 | 1 |
| 3 | Masculino | 38 | 2 | 3100 | Atresia ileal de tipo II. Anastomosis íleo-íleal | 1 | 1 |
| 4 | Femenino | 33 | 4 | 1540 | Atresia ileal múltiple. Dos anastomosis íleo-íleales | 3 | 3 |
| 5 | Femenino | 40 | 2 | 3300 | Atresia ileal de tipo II. Anastomosis íleo-íleal | 1 | 1 |
| 6 | Masculino | 38 | 2 | 2700 | Atresia ileal de tipo IIIa. Anastomosis íleo-íleal | 1 | 2 |
| 7 | Femenino | 37 | 2 | 2750 | Atresia ileal de tipo I. Anastomosis íleo-íleal | 1 | 1 |
| 8 | Masculino | 38 | 2 | 2930 | Atresia ileal de tipo II. Anastomosis íleo-íleal | 1 | 1 |

en los genes apoptóticos y antiapoptótico se evaluaron mediante el método de matriz de RCP (PCR array).⁹ La expresión de proteínas se evaluó con la técnica de inmunohistoquímica.¹⁰

Análisis estadístico

El puntaje apoptótico y los grados de lesión tisular se evaluaron, a nivel estadístico, con la prueba de la U de Mann-Whitney. Para los estudios de transcripción de genes y expresiones de proteínas se utilizó la prueba t de Student. Un valor de $p < 0,01$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

En las *Tablas 1 y 2* se describen las características clínicas de los grupos con enterocolitis necrosante y los que presentaban atresia ileal. Los pacientes de este grupo tuvieron un peso significativamente mayor al del grupo con enterocolitis necrosante. Todos los pacientes con enterocolitis necrosante eran prematuros; su edad gestacional media al nacer era de $29,3 \pm 2,6$ semanas y su peso medio al momento de la cirugía era de 1171 ± 321 g. La mediana de la edad en el grupo con enterocolitis necrosante era de 12,5 días (7-20), mientras que en el grupo de atresia intestinal era de 2,3 días.²⁻⁴ Dos de los pacientes de este grupo eran prematuros y la edad gestacional media fue de $36,5 \pm 2,7$ semanas, con un peso medio al momento de la cirugía de 2515 ± 666 g. Las indicaciones para la cirugía en el grupo con enterocolitis necrosante fueron neumoperitoneo ($n = 5$) y fracaso del tratamiento médico asociado con dilatación persistente de asas en la radiografía ($n = 2$) o presencia de aire en el sistema venoso portal ($n = 1$). Todos los pacientes con enterocolitis necrosante tenían necrosis intestinal significativa que requirió resección intestinal e ileostomía durante la cirugía. En todos los pacientes del otro grupo se corrigió la atresia ileal mediante anastomosis íleo-íleal.

En la microscopía óptica de las muestras teñidas con hematoxilina-eosina, en las muestras

obtenidas de seis pacientes con atresia ileal se observó separación entre el epitelio superficial y la lámina propia. En la muestra de un paciente se observó separación de la submucosa y en la de otro, separación de la submucosa y la lámina propia. Este último paciente era un recién nacido prematuro con atresia de tipo IV. En las muestras de cuatro pacientes con enterocolitis necrosante se observó separación grave de la submucosa y la lámina propia, edema en las capas submucosa y muscular y pérdida de la integridad epitelial. En los otros cuatro pacientes con enterocolitis necrosante era evidente la necrosis transparietal. En la *Tabla 3* se muestran los puntajes del grado de lesión tisular según el grupo. Los puntajes de la lesión tisular eran significativamente más altos en el grupo con enterocolitis necrosante en comparación con el grupo de referencia ($3,3 \pm 0,8$ frente a $1,5 \pm 0,8$; $p < 0,01$).

Entre los ocho pacientes con atresia ileal, se observó apoptosis leve en el epitelio superficial en siete y apoptosis que comprometía las vellosidades y las criptas en uno. En todas las muestras de los pacientes con enterocolitis necrosante se halló apoptosis que comprometía las vellosidades y las criptas ($n: 4$) o apoptosis transparietal ($n: 4$). En la *Tabla 4* se describen los resultados de los puntajes de apoptosis según el grupo. Los puntajes medios de apoptosis fueron significativamente más altos en el grupo con enterocolitis necrosante que en el grupo con atresia intestinal ($3,5 \pm 0,5$ vs. $1,6 \pm 0,5$; $p < 0,01$).

La diferencia entre la expresión de los genes apoptóticos y antiapoptóticos entre ambos grupos se describe en la *Tabla 5*. El nivel de ARNm en los genes proapoptóticos (caspasa-3, caspasa-6, caspasa-7, BIRC2 y Bax) aumentó significativamente en el grupo con enterocolitis necrosante en comparación con el grupo de referencia ($p < 0,01$). El nivel de ARNm en el gen Bcl-2A1 (antiapoptótico) disminuyó significativamente en el grupo con enterocolitis necrosante a ($p < 0,01$). Sin embargo, no se observó una diferencia estadísticamente significativa en

TABLA 3: Grados de lesión tisular según el grupo

| Grupos | Grado 0 | Grado 1 | Grado 2 | Grado 3 | Grado 4 |
|---|---------|---------|---------|---------|---------|
| Grupo con enterocolitis necrosante (n= 8) | - | - | 2 | 3 | 3 |
| Grupo de referencia (n= 8) | - | 6 | 1 | 1 | - |

TABLA 4: Puntajes de apoptosis según el grupo

| Grupos | Puntaje 0 | Puntaje 1 | Puntaje 2 | Puntaje 3 | Puntaje 4 |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Grupo con enterocolitis necrosante (n= 8) | - | - | - | 4 | 4 |
| Grupo de referencia (n= 8) | - | 5 | 2 | 1 | - |

los niveles de ARNm de caspasa-1, caspasa-2, caspasa-9, Bad, Bcl-X_L y Bcl-w entre ambos grupos.

En la *Tabla 6* se muestran los valores de expresión de las proteínas. El porcentaje medio de expresión de las proteínas Bax y caspasa-3 era significativamente más alto en el grupo con enterocolitis necrosante en comparación con el grupo con atresia ileal.

DISCUSIÓN

En este estudio se demostró el incremento de la expresión de Bax (proapoptótico) y la disminución de la expresión de Bcl-2 (antiapoptótico). En otro estudio, se observaron niveles más elevados de proteína BNIP3 en las muestras del íleon obtenidas de recién nacidos sometidos a una resección quirúrgica, y los autores propusieron que el aumento de la proteína BNIP3 relacionada con la apoptosis es un posible mecanismo asociado con la apoptosis de enterocitos observada en la enterocolitis necrosante.⁶ Más recientemente, se ha identificado el receptor inmunológico centinela, el receptor de tipo Toll 4 (TLR4); se cree que la activación de este receptor por parte del lipopolisacárido bacteriano es la responsable directa del aumento de las tasas de apoptosis y la deficiente cicatrización de la mucosa.^{11,12} En un estudio de investigación en ratones con deficiencia en la señalización de TLR4 se demostró la prevención de la apoptosis intestinal inducida por el LPS y una reducción de la incidencia de enterocolitis necrosante.¹¹ Asimismo, se ha demostrado que la glutamina reduce la expresión del receptor de tipo Toll 2 (TLR2) y del TLR4 y

protege el intestino de las ratas recién nacidas prematuras con enterocolitis necrosante.¹² Estos estudios proporcionan una justificación para investigar de qué manera se produce la regulación de la apoptosis de enterocitos dentro del intestino de los recién nacidos durante la aparición de la enterocolitis necrosante.

En este estudio, investigamos la expresión de los genes proapoptóticos y antiapoptóticos en el intestino de los recién nacidos con enterocolitis necrosante aguda. De manera coincidente con informes previos, se detectaron niveles elevados de lesión tisular y apoptosis extensa de los enterocitos de los recién nacidos con enterocolitis necrosante en comparación con los pacientes del grupo de referencia, que tenían atresia intestinal.^{2,6,7,13} En las muestras de los pacientes con atresia ileal que utilizamos como referencia se observaron cierto grado de lesión tisular leve y apoptosis. Podría argumentarse que tal vez los tejidos de los pacientes con atresia intestinal no sean normales. Sin embargo, obtuvimos las muestras de una porción intestinal de aspecto sumamente viable y para la cual se preveía un funcionamiento normal. Los cambios leves observados en los pacientes con atresia ileal tal vez sean un reflejo de la lesión mucosa, que podría ser consecuencia de la dilatación intestinal prolongada o la manipulación intestinal durante la cirugía. El aumento de los puntajes de lesión tisular y apoptosis observado en uno de los pacientes podría estar directamente relacionado con la atresia intestinal de tipo IV, un tipo más grave que en el resto, o el retraso de la cirugía, que

TABLA 5: Cambio en la expresión de los genes proapoptóticos y antiapoptóticos

| Genes | Función | Cambio en la expresión de los genes |
|-----------|---|-------------------------------------|
| Caspasa-1 | Apoptótica, cisteína peptidasa | + 0,68 ± 0,10 |
| Caspasa-2 | Apoptótica, cisteína peptidasa | + 1,15 ± 0,07 |
| Caspasa-3 | Apoptótica, cisteína peptidasa | + 6,70 ± 1,06* |
| Caspasa-6 | Apoptótica, cisteína peptidasa | + 5,33 ± 1,60* |
| Caspasa-7 | Apoptótica, cisteína peptidasa | + 10,52 ± 2,12* |
| Caspasa-9 | Apoptótica, cisteína peptidasa | + 1,21 ± 0,02 |
| BCL2A1 | Proteína A1 relacionada con BCL2, antiapoptótica | - 5,42 ± 1,32* |
| BIRC2 | Proteína que contiene dos repeticiones de IAP baculoviral, apoptótica | + 5,20 ± 1,16* |
| BAX | Proteína X asociada a Bcl-2, apoptótica | + 27,24 ± 5,16* |

n= 8, media ± SDv, *p< 0,01

TABLA 6: Expresión de Bax y caspasa-3 en el tejido intestinal

| | Grupo de referencia | | | Enterocolitis necrosante | | |
|------------------------|---------------------|--------------|--------------|--------------------------|--------------|----------------|
| | Patólogo 1 | Patólogo 2 | *Promedio | Patólogo 1 | Patólogo 2 | *Promedio |
| Expresión de caspasa-3 | 34,33 ± 4,73 | 32,67 ± 4,16 | 33,5 ± 4,44 | 93,33 ± 5,69 | 86,67 ± 7,57 | **90,00 ± 6,63 |
| Expresión de Bax | 26,02 ± 3,53 | 29,42 ± 3,24 | 27,72 ± 3,39 | 95,33 ± 6,96 | 98,71 ± 8,69 | **97,02 ± 7,66 |

* % de expresión **p< 0,01

se realizó a los 4 días de vida del paciente.

En las muestras de los tejidos de los recién nacidos con enterocolitis necrosante se detectaron un incremento de la expresión de los genes apoptóticos (caspasa-3, caspasa-6, caspasa-7, BIRC2 y Bax) y una disminución de la expresión del gen antiapoptótico (Bcl-2A1). El porcentaje medio de expresión de las proteínas Bax y caspasa-3 era significativamente más alto en el grupo con enterocolitis necrosante frente al grupo con atresia ileal. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de Bax, Bcl-xL y Bcl-w al comparar los intestinos de los pacientes con enterocolitis necrosante y con atresia ileal. Estos resultados de nuestro estudio coinciden con el estudio de investigación sobre enterocolitis necrosante neonatal previo.⁵ En conjunto, las proteínas Bcl-2 y Bax componen un reóstato celular que regula la transición celular hacia la apoptosis o que se aparta de esta.^{3,14} Nuestros datos que demuestran un aumento de la expresión de los genes caspasa-3, caspasa-6 y caspasa-7 y de la expresión de la proteína caspasa-3 coinciden con los resultados de un estudio previo, que indican que la suplementación con un inhibidor de la pancaspasa normaliza las tasas de apoptosis y conlleva a una reducción de la incidencia de enterocolitis necrosante en un modelo de ratas recién nacidas con enterocolitis necrosante.²

Las modalidades de tratamiento que podrían modular la proporción de Bax:Bcl-2 a favor de la supervivencia celular intestinal previenen el avance de la apoptosis y la aparición de enterocolitis necrosante. El factor de crecimiento epidérmico (FCE) es uno de los factores de crecimiento que se encuentra en la leche materna de manera natural. Clark y col. demostraron que, en ratas recién nacidas con enterocolitis necrosante, la suplementación de la leche con FCE redujo notablemente las proporciones de Bax:Bcl-2 en el ARNm y las proteínas y disminuyó drásticamente la apoptosis.^{5,15} En ensayos clínicos preliminares se utilizó FCE recombinante intravenoso en recién nacidos con diagnóstico de enterocolitis necrosante, que mejoró la reparación del epitelio intestinal al reducir la actividad proliferativa de las criptas.¹⁵ Los efectos beneficiosos de la suplementación con FCE en los recién nacidos podrían depender de la estimulación de la cicatrización de la barrera mucosa intestinal y la consiguiente prevención de la enterocolitis necrosante.

CONCLUSIÓN

Según nuestros datos en recién nacidos, la alteración del equilibrio entre la expresión de Bax (proapoptótico) y la expresión de Bcl-2A1

(antiapoptótico) puede ser un posible mecanismo de la patogenia de la enterocolitis necrosante. Nuestro estudio constituye la base de estudios futuros que deberán realizarse para comprender los mecanismos que causan la alteración del equilibrio entre la expresión de los genes proapoptóticos y antiapoptóticos y para diseñar futuras estrategias terapéuticas o preventivas para la enterocolitis necrosante mediante la modificación de la apoptosis. ■

REFERENCIAS

1. Dominguez KM, Moss RL. Necrotizing enterocolitis. *Clin Perinatol* 2012;39(2):387-401.
2. Jilling T, Lu J, Jackson M, Caplan MS. Intestinal Epithelial Apoptosis Initiates Gross Bowel Necrosis in an Experimental Rat Model of Neonatal Necrotizing Enterocolitis. *Pediatr Res* 2004;55(4):622-9.
3. Khailova L, Mount Patrick SK, Arganbright KM, Halpern MD, et al. Bifidobacterium bifidum reduces apoptosis in the intestinal epithelium in necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;299(5):G1118-27.
4. Maynard AA, Dvorak K, Khailova L, Dobrenen H, et al. Epidermal growth factor reduces autophagy in intestinal epithelium and in the rat model of necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;299(3):G614-22.
5. Clark JA, Lane RH, MacLennan NK, Holubec H, et al. Epidermal growth factor reduces intestinal apoptosis in an experimental model of necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288(4):G755-62.
6. Zamora R, Vodovotz Y, Betten B, Wong C, et al. Intestinal and hepatic expression of BNIP3 in necrotizing enterocolitis: regulation by nitric oxide and peroxynitrite. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;289(5):G822-30.
7. Halpern MD, Clark JA, Saunders TA, Doelle SM, et al. Reduction of experimental necrotizing enterocolitis with anti-TNF-. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290(4):G757-64.
8. Halpern MD, Weitkamp JH, Mount Patrick SK, Dobrenen HJ, et al. Apical sodium-dependent bile acid transporter upregulation is associated with necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;299(3):G623-31.
9. Bagriacik EU, Yaman M, Haznedar R, Sucak G, Delibasi T. TSH-induced gene expression involves regulation of self-renewal and differentiation-related genes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Endocrinol* 2012;212(2):169-78.
10. Charafe-Jauffret E, Tarpin C, Bardou VJ, Bertucci F, et al. Immunophenotypic analysis of inflammatory breast cancers: identification of an 'inflammatory signature'. *J Pathol* 2004; 202(3):265-73.
11. Leapheart CL, Cavallo J, Gripar SC, Cetin S, et al. A critical role for TLR4 in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis by modulating intestinal injury and repair. *J Immunol* 2007;179(7):4808-20.
12. Zhou W, Li W, Zheng XH, Rong X, Huang LG. Glutamine down regulates TLR-2 and TLR-4 expression and protects intestinal tract in preterm neonatal rats with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2014;49(7):1057-63.
13. Ford H, Watkins S, Reblock K, et al. The role of inflammatory cytokines and nitric oxide in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 1997;32(2):275-82.
14. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15(1): 49-63.
15. Coursodon CF, Dvorak B. Epidermal growth factor and necrotizing enterocolitis. *Curr Opin Pediatr* 2012;24(2):160-4