



Asfixia perinatal: Correlación entre monitorización encefálica y disfunción mitocondrial en modelo de cerdo recién nacido.

*CEINBIO Facultad de Medicina. UDELAR.
Departamento de Neonatología. Área básica.
Hospital de Clínicas “Manuel Quintela”*

Orientadoras:

Rodríguez, Marianela
Blasina, Fernanda
Vaamonde, Lucía

Grupo 48

Autoras:

Cóppola, María Alejandra

Grunert, María Noel

López, Eliana

Merino, Gimena

Rocca, María Inés

Proyecto de investigación 2016

Metodología científica II

Índice

Contenido

Resumen	3
Introducción	4
Marco teórico	4
Objetivos de la investigación	12
Objetivo general	12
Objetivos específicos	12
Metodología	13
Resultados	16
Discusión.....	21
Conclusiones	23
Perspectivas.....	23
Referencias bibliográficas	25
Agradecimientos	26

Resumen

La asfixia perinatal es un problema que involucra la salud pública a nivel global. Existen pocos elementos clínicos que permiten valorar encefalopatía y su correlación con el impacto energético neuronal. La falla energética que caracteriza a la asfixia perinatal es clave en la determinación del daño neuronal a consecuencia de un evento de hipoxia, ésta dispara mecanismos moleculares que son determinantes en la muerte celular programada, de manera que aumenta el área de daño neuronal.

Consideramos imprescindible avanzar en el conocimiento de la fisiopatología del mecanismo implicado en el daño neuronal, que determina secuelas neurológicas a largo plazo con el fin de que puedan desarrollarse posibles terapéuticas que sean capaces de disminuir las secuelas a mediano y largo plazo a través de un diagnóstico temprano.

A través de un modelo animal (cerdos recién nacidos) de asfixia perinatal, nos proponemos evaluar el efecto de episodios de hipoxia intermitente y reiterada sobre la función mitocondrial cortical, con el fin de correlacionar estos hallazgos con alteraciones ultraestructurales en la mitocondria, monitorizando concomitantemente la función cerebral mediante electroencefalograma de amplitud integrada (aEEG) y espectroscopía cercana al infrarrojo (NIRS). Dicha actividad es desarrollada en el Departamento de Neonatología, área básica, en Hospital de Clínicas “Manuel Quintela”.

Resultados y conclusiones: Se produce disfunción mitocondrial durante dos episodios consecutivos de hipoxia aguda, recuperándose la función precozmente luego de la primera hipoxia, pero reapareciendo y haciéndose permanente luego de la segunda. Estos hallazgos no se correlacionaron con los resultados obtenidos a través de la evaluación no invasiva de los efectos de la hipoxia para una muestra de 3 cerdos recién nacidos mediante el NIRS y el aEEG.

Palabras clave: asfixia perinatal, daño neuronal, secuelas neurológicas, mitocondria, aEEG, NIRS.

Introducción

La incidencia de encefalopatía hipóxico-isquémica (EHI) en los países desarrollados es aproximadamente 6/1000 nacidos vivos y 1 de cada 1000 fallece o permanece con graves secuelas neurológicas. En Uruguay causa el 10 % de la mortalidad neonatal.

La EHI es la segunda causa prevenible de discapacidad neurológica en la infancia a nivel mundial, con consecuencias psicosociales y económicas para las familias y para la sociedad. La prevención y protección del daño neurológico en la etapa de la vida perinatal es prioridad para la salud mundial.

En cuanto a la fisiopatología de la hipoxia– isquemia (HI), la disfunción mitocondrial es considerada clave en la injuria neuronal. La misma puede dividirse en diferentes estadios: falla energética primaria, fase latente y falla energética secundaria. La instalación de la encefalopatía y su gravedad, están directamente relacionadas con la severidad y duración de la hipoxia. La traducción clínica neurológica de estos trastornos son depresión de conciencia (pudiendo llegar al coma) y convulsiones.

En la clínica contamos con herramientas que permiten monitorizar la actividad encefálica: aEEG (electroencefalograma de amplitud integrada) y NIRS (near-infrared spectroscopy). El primero tiene valor diagnóstico en la encefalopatía y en su pronóstico. Por otro lado, el NIRS permite valorar la saturación de oxígeno regional a nivel cerebral.

Marco teórico

Las causas de lesión cerebral perinatal son complejas y multifactoriales, pero la HI, infección e inflamación son disparadores importantes en dicho evento. La lesión cerebral evoluciona con el tiempo en semanas o meses, y diferentes mecanismos son importantes durante las fases de establecimiento de la lesión. Todos los mecanismos de daño hasta el momento no son completamente comprendidos, pero aminoácidos excitatorios, daño mitocondrial, regulación del calcio intracelular, generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) y nitrógeno (ERNs), mecanismos apoptóticos y de necrosis, cambios en la disponibilidad de factores tróficos, y el sistema inmuno-inflamatorio están implicados en el proceso.

Existen diversas áreas de la función mitocondrial que continúan en investigación, siendo estas de fundamental implicancia en el cerebro inmaduro. Es así que la biogénesis mitocondrial, mitofagia, migración, y la morfogénesis son cruciales para el desarrollo del

cerebro y sinapsis, cumpliendo un papel importante en la recuperación neuronal luego de lesiones agudas. También se ha encontrado que la mitocondria es protagonista en la inmunidad innata, contribuyendo a la inflamación en respuesta a infecciones y daños agudos, y participando en defensas antivirales y antibacterianas. (2)

Regulación de los mecanismos del ciclo de vida mitocondrial

Las mitocondrias cuentan con un genoma separado y una gama de funciones metabólicas esenciales para la homeostasis celular. Son organelos dinámicos, con una doble membrana, que se asocian con la generación de ATP, regulación de calcio, y biosíntesis de aminoácidos, lípidos y nucleótidos. El flujo de electrones a través de la cadena de transporte de electrones genera un gradiente de protones entre la membrana mitocondrial externa e interna (MME y MMI), produciendo ATP a través de la ATP sintasa.

Varias vías altamente reguladas gobiernan la generación, función y el movimiento de las mitocondrias. Durante el desarrollo cerebral embrionario y postnatal, se forman nuevas y las que se encuentran presentes crecen rápidamente (biogénesis mitocondrial).

Estas sufren continuamente los procesos de fisión - fusión y migran en la célula a lo largo del citoesqueleto, lo que permite la distribución adecuada y la adaptación del tamaño mitocondrial, el número, la forma y la función para que sea acorde a las necesidades celulares.

Las mitocondrias también producen EROs como parte de la respiración normal, que pueden oxidar proteínas y ADN. El genoma mitocondrial se encuentra desprotegido, y el proceso de reparación del ADN es ineficiente en comparación con el que ocurre en el núcleo. Una vez dañadas pueden generar 10 veces más peróxido de hidrógeno de lo que puede una mitocondria no dañada. Las mitocondrias dañadas y disfuncionales están constantemente degradándose (mitofagia) para reducir la carga oxidativa, y son reemplazadas por una nueva. Este proceso es particularmente importante en células no proliferativas de larga vida como las neuronas. (2) (5)

Biogénesis

Es un proceso altamente regulado, siendo necesarias proteínas codificadas por ADN nuclear y mitocondrial. La clave de ese proceso es el coactivador 1 alfa proliferador activado del receptor- gamma peroxisoma (PGC-1alfa), el cual puede ser inducido por el estrés de la célula, regulando los factores de la transcripción. Estos regulan la transcripción de genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales.

Durante la diferenciación neuronal, el número de mitocondrias por célula aumenta, y la inhibición de su biogénesis perjudica el proceso de maduración neuronal. Esta diferenciación

neuronal es dependiente de la producción de ATP y de la masa mitocondrial. PGC-1alfa se expresa en altas concentraciones en células ricas en mitocondrias con altas demandas energéticas (ej. Neuronas). La sobreexpresión de PGC-1alfa en neuronas desarrolladas aumenta el número de espinas dendríticas y promueve la diferenciación sináptica mientras que deficiencias en el gen que codifica PGC-1alfa tiene el efecto opuesto. Estos datos sugieren que la biogénesis mitocondrial tiene un rol importante en la regulación sináptica y en el cerebro en desarrollo, y este proceso es dependiente de energía (2)(5).

Fusión y fisión

Este ciclo es crucial para el desarrollo embrionario y cerebral. Las mitocondrias son muy plásticas, y el ciclo fusión-fisión es importante para mantener la función del organelo, permitiendo el intercambio de proteínas y ADN entre mitocondrias y su reparación.

La fisión mitocondrial parece ser esencial para el desarrollo de dendritas y la formación de sinapsis. Este proceso utiliza energía y necesita la regulación temporal y la formación de proteínas complejas; conducidas principalmente por proteínas relacionadas con dynamin (DRP-1). Este proceso es importante para aumentar el número de mitocondrias para poder satisfacer las demandas energéticas durante la plasticidad neuronal. La incapacidad de satisfacer estas demandas tiene graves efectos en el desarrollo del SNC.

Por otro lado, la fusión depende de mitofusina-1 (MFN1) y mitofusina-2 (MFN2) que se encuentran en la MME. La interacción entre estas proteínas une a dos mitocondrias adyacentes y media la fusión de la MME. La proteína atrofica óptica 1 (OPA1) se encarga posteriormente de la fusión de la MMI. (2)(5)

Mitofagia

Su importancia en el desarrollo del cerebro es aún desconocida. Sin embargo, existe evidencia de que la delección selectiva de ciertos genes que participan en este proceso, resultan en severas anormalidades en el SNC.

Hay varios mecanismos que controlan la calidad mitocondrial a diferentes niveles. La eliminación selectiva de proteínas parece ser restringida y puede utilizarse solamente en un subconjunto de proteínas. La mitofagia incluye mecanismos generales de autofagia utilizados para el cambio de los constituyentes de las células, y procesos específicos mediante el cual la célula puede atacar selectivamente a las mitocondrias para la degradación. (2)(8)

Las mitocondrias regulan el destino celular en el cerebro inmaduro dañado

En el cerebro en desarrollo la falta de oxígeno resulta en una depleción de fosfatos de alta energía (ATP, fosfocreatinina) y falla en la respiración mitocondrial, esta es la denominada

falla energética primaria. Estos niveles pueden volver a su línea de base (fase latente) pero una segunda depleción más prolongada de reservas energéticas progresa el daño cerebral. Es en una segunda depleción o también llamada falla energética secundaria, que sucede la disminución de fosfatos de alta energía y muerte celular. La disfunción mitocondrial se considera la responsable de esta falla secundaria, y es un importante contribuyente al daño cerebral y compromiso neurológico después de sufrir HI. (7)

El mecanismo HI crea un ambiente intracelular tóxico por acumulación de EROs, ERNs y calcio intracelular luego de la lesión, mediante la activación directa de óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) y la generación de especies altamente oxidantes como el peroxinitrito (ONOO-), induciendo disfunción mitocondrial. La respiración mitocondrial es suprimida y el calcio intracelular desregulado. (7)

Dos características del cerebro inmaduro que lo hacen especialmente sensibles al daño oxidativo en relación con el cerebro maduro son: su pobre capacidad antioxidante y la alta concentración de hierro libre. Así, el sistema de regeneración para el mantenimiento de antioxidantes es dependiente del estado de energía celular, y cuando estos sistemas fallan, como en la HI, el cerebro sufre las consecuencias del daño oxidativo celular de macromoléculas y la muerte. Una teoría sostiene que existen regiones corticales más susceptibles a la HI, esto se atribuiría en parte, a la mayor densidad de receptores NMDA y células nNOS-positivos en dichas regiones. (8).

El agotamiento de las reservas energéticas que acompaña la hipoxia prolongada, o HI, resulta en la despolarización de las neuronas, la glía y la liberación de aminoácidos excitatorios (EAA) en el espacio extracelular. Los mecanismos de energía dependiente se ven en peligro, permitiendo que el glutamato se acumule hasta niveles de excitotoxicidad. La sobreactivación de los receptores de NMDA aumenta los niveles de calcio intracelular e inicia procesos que finaliza en la muerte celular. El glutamato es un importante factor trófico para los receptores de NMDA, median el normal desarrollo del cerebro mediante la promoción de la proliferación y la migración de los precursores neuronales, el desarrollo sináptico y la plasticidad (8).

La activación de receptores NMDA y AMPA luego de HI en respuesta a la liberación de EAA, lleva a un aumento intracelular de calcio. Este influjo activa numerosas vías de señalización que llevan al edema mitocondrial, deterioro de la respiración, aumentada producción de EROs, disparo de la permeabilidad mitocondrial y muerte celular dada por la activación de la proteína proapoptótica Bax. La HI también induce inflamación, lo que lleva a la

liberación de sustancias que activan receptores de muerte en neuronas y oligodendroglías, activando la apoptosis por la vía de la caspasa 8, y la necrosis por formación del necrosoma.

La mitocondria en el desarrollo cerebral es propensa a la permeabilización en respuesta a la HI. Las proteínas proapoptóticas son liberadas de la mitocondria, formándose el apoptosoma, y caspasas ejecutoras downstream (en particular la caspasa 3) que son activadas luego del daño por HI. Las vías dependientes de AIF y caspasas parecen ser más fuertemente activadas en cerebros inmaduros que en cerebros adultos, y la permeabilización mitocondrial parece marcar el punto de no retorno en la HI en el cerebro inmaduro (2).

Permeabilización mitocondrial y apoptosis

La permeabilización mitocondrial puede ocurrir ya sea a través de la apertura selectiva de la MME, permeabilidad de la MME (MOMP) o apertura del poro de transición. La permeabilidad de la MME tiene lugar en la apoptosis inducida, mientras que la apertura del poro de transición interviene en el edema mitocondrial. La ciclofilina D está implicada en la apertura del poro de transición en el cerebro adulto luego de sufrir isquemia, mientras que la permeabilidad de la MME dependiente de Bax parece ser el mecanismo predominante en el cerebro neonatal luego de HI. Altos valores de proteínas proapoptóticas en el desarrollo sugieren que predomina más la apoptosis en el cerebro inmaduro que en el adulto.

Hay evidencia de que los receptores de muerte están implicados en la lesión cerebral del neonato. La inhibición de la caspasa-8 reduce la lesión cerebral HI en el recién nacido, lo que sugiere que la activación del receptor de muerte de la vía apoptótica es importante. Recientemente, estudios realizados en ratones recién nacidos sugieren que el inicio de la necrosis en el cerebro inmaduro depende de la lesión mitocondrial (6).

Aún no se encuentra del todo claro el momento de la permeabilización mitocondrial, pero la mayoría de los estudios sugieren que sucede de 3 a 24 horas después de la HI, dando inicio durante la fase latente y procediendo en la fase secundaria de injuria- dependiendo de la severidad del daño, el modelo animal, y la región cerebral. (2)

Apoptosis y lesión cerebral HI neonatal

La inducción de MOMP en el cerebro inmaduro luego de HI depende de la familia Bcl-2. Los miembros proapoptóticos y antiapoptóticos de esta familia de proteínas son cruciales en el desencadenamiento de la permeabilización mitocondrial. (2) Bax se transloca desde el citosol a las mitocondrias y en asociación con Bak forman poros en la MME que resulta en la liberación de proteínas proapoptóticas. En el cerebro inmaduro, Bax y sus proteínas asociadas

son altamente expresadas. La inhibición farmacológica de permeabilización mitocondrial dependiente de Bax antes de HI neonatal atenúa la gravedad de la lesión cerebral.

Uno de los reguladores de la proteínas Bcl-2 es el gen supresor tumoral p53, que estimula la permeabilidad mitocondrial y apoptosis regulando de esta manera la muerte celular. Tras la activación del gen p53, éste se acumula en el núcleo y regula el incremento de genes proapoptóticos como Bax. (2)(5)(7)

Mitocondria en el precondicionamiento del cerebro inmaduro

Un estrés subletal puede inducir resistencia a un subsecuente daño potencialmente letal, evento conocido como precondicionamiento. La hipoxia y la inflamación son amenazas importantes para la mayoría de las células, y el precondicionamiento constituye probablemente a una respuesta endógena para lidiar con tal estrés. El precondicionamiento puede ser inducido en la mayoría de los órganos y parece ser particularmente fuerte en el cerebro inmaduro. En modelos experimentales dirigidos al precondicionamiento en el cerebro inmaduro, la neuroprotección fuerte se consigue normalmente si se aplica 24-48 horas antes de la agresión letal. Los mecanismos descritos en diferentes tejidos, especies y escenarios parecen ser similares, y la mitocondria resulta implicada como el principal responsable en esta adaptación. Este proceso induce cambios en la expresión de varias moléculas, incluyendo la NO sintasa, sirtuinas, quinasas de supervivencia, y transductores de señal y activadores de transcripción (Stats), resultando en una disminución en la susceptibilidad del tejido.

El fortalecimiento de las defensas antioxidantes es esencial para alcanzar resistencia tras el precondicionamiento. Paradójicamente, la moderación de la producción de EROs por la mitocondria es crucial durante la inducción de la fase de precondicionamiento. (2)

Mitofagia y biogénesis

La mitofagia de una mitocondria dañada y su reemplazo a través de la biogénesis son procesos importantes para mantener la viabilidad postmitótica de la célula. Las células con mitocondrias renovadas parecen ser más resistentes a estrés severo. Ratones expuestos al precondicionamiento hipóxico han demostrado reportar un aumento en el contenido de ADN mitocondrial, actividad PGC-1alfa y subsecuentemente la biogénesis mitocondrial.(2)

Correlación entre NIRS - aEEG y daño cerebral

Estudios confirmaron que si se realiza un diagnóstico en tiempo, y a su vez se instaura un tratamiento de protección del SNC en forma precoz (en las primeras 6hrs) frente a una situación de daño encefálico, la mortalidad y la incidencia de secuelas de discapacidad

neuroológica se reduce. Por lo tanto, la detección temprana de una oxigenación encefálica anormal es de crucial importancia para el diagnóstico precoz de injuria cerebral.

La hipoxia cerebral es la principal causa de daño cerebral en el recién nacido, por lo que la monitorización del O₂ encefálico es indispensable para intentar evitar el daño por hipoxia.

Como parámetro fundamental, la saturación regional de O₂ se define como:

$$\text{Sat.reg.O}_2 = \frac{[\text{HbO}_2]}{[\text{HbO}_2] + [\text{Hb}]}$$
, en donde la [Hb] y [HbO₂] corresponden a la concentración de Hb desoxigenada y la concentración de Hb oxigenada, respectivamente.

La saturación regional de O₂ (SRO₂) cerebral obtenida con el NIRS (espectroscopía cercana al infrarrojo), es el promedio entre la saturación de O₂ cerebral en la arteriolas, capilares y vénulas; cobrando una mayor importancia la saturación a nivel venoso dado que en el cerebro es el componente vascular predominante (alrededor de 70%). Esto es distinto a lo que ocurre en la saturimetría de pulso, en donde la saturación obtenida de la pulsioximetría corresponde principalmente a la pulsación existente a nivel arteriolar. Esto implica que en situaciones de hipotensión arterial y de baja perfusión distal, la saturimetría de pulso no será detectada, debido a que la pulsación arterial es muy débil.

El NIRS es capaz de penetrar a través de tejidos con múltiples capas, por ejemplo, puede atravesar el cuero cabelludo y el cráneo, para incidir en la corteza cerebral. La SRO₂ de O₂ informa sobre el estado de oxigenación tisular, en este caso a nivel cerebral, y el principio en el que se basa su medición es el espectro de absorción de la Hb y HbO₂, que puede ser obtenido independientemente de la pulsación arterial. Comparándolo con otras técnicas de detección cerebral de la oxigenación, el NIRS es una técnica no invasiva, cuantitativa, continua, que brinda datos en tiempo real. Actualmente, el NIRS es un método efectivo en la valoración del estado de oxigenación cerebral, y es ampliamente utilizado para monitorizar la oxigenación encefálica en neonatos, el grado de oxigenación en situaciones de injuria cerebral, permite evaluar la posibilidad de hemorragia cerebral aguda, monitorizar períodos de apnea durante el sueño, entre otras funciones. Existe evidencia de que el descenso de la SRO₂ cerebral ocurre casi al mismo tiempo que el descenso de la concentración de la FIO₂, en un intervalo entre 60 y 160 segundos antes que se detecten los primeros cambios en el aEEG. Es así, que el NIRS permite detectar hipoxia cerebral en forma más temprana que cualquier otro parámetro de monitoreo de oxigenación cerebral, por lo que cuando se comienzan a ver cambios en la SRO₂ brindada por NIRS, el resto de los parámetros aún se encuentran dentro del rango de normalidad.

Hasta el momento, no existe un parámetro estándar de oro unificado para la valoración y monitorización del grado de daño cerebral inducido por hipoxia. La determinación del valor del parámetro de SRO₂ cerebral luego de un evento de hipoxia, es de crucial importancia para la estimación clínica de injuria encefálica.

La lesión cerebral más común durante el período perinatal es la causada por HI, cuyo impacto resulta en la necrosis extensa de neuronas y en el daño de la sustancia blanca del cerebro, presencia de diferentes grados de variación de secuelas neurológicas que ocurren en la práctica clínica. Es por esto, que es fundamental la evaluación del estado de oxigenación encefálica, para detectar en forma precoz alteraciones que ameriten la toma de actitudes para evitar la instalación y desarrollo de un daño cerebral, lo cual es posible con el NIRS. Cuando se induce hipoxia cerebral, el descenso de la SRO₂ aparece en forma más temprana que la aparición de los cambios correspondientes a dicha hipoxia, detectados con EEG. Por ende, la monitorización de la SRO₂ cerebral resulta ventajosa en diagnosticar precozmente la hipoxia encefálica, para instaurar un tratamiento oportuno.

En lo que respecta al aEEG, las ondas cerebrales manifiestan la actividad neuroeléctrica cortical y subcortical, relacionadas a la capacidad funcional del cerebro; que pueden ser directamente estudiadas mediante la detección y análisis de las amplitudes de las señales eléctricas cerebrales. Consiste en un EEG de simple o doble canal que está registrado por tres a cinco electrodos colocados en el cuero cabelludo, dos activos colocados simétricamente en región parietal o temporal anterior, y el neutro que actúa suprimiendo el ruido de fondo, se coloca en la línea media. Captura continuamente la actividad cerebral en tiempo real durante un periodo prolongado. El registro puede realizarse en forma de monitoreo continuo. El registro aEEG puede objetivar la repercusión que tenga la EHI sobre la actividad electrofisiológica, y también monitorizar la aparición de descargas convulsivas (9). Se ha demostrado que saturaciones regionales <30%, en el aEEG de observación de la función cerebral, la amplitud de las ondas cerebrales desciende significativamente, lo que indica daño cerebral severo; mientras que con saturaciones regionales >30%, no se vieron cambios significativos en el aEEG.

En resumen, con saturaciones regionales de O₂ <40%, se visualizan zonas de disfunción mitocondrial y ocurre el daño cerebral, pero no se observan cambios significativos en el aEEG. Cuando la SRO₂ es <30%, la función cerebral se encuentra severamente afectada, existe una severa disparidad morfológica en las mitocondrias, aparato de Golgi y RER (3).

Objetivos de la investigación

Objetivo general

Evaluar el efecto de la hipoxia intermitente sobre la función mitocondrial cortical, y correlacionar estos hallazgos con alteraciones ultraestructurales del organelo y con la monitorización de la función cerebral mediante aEEG y NIRS.

Objetivos específicos

1 - Estudiar la respiración mitocondrial succinato-dependiente en biopsias corticales consecutivas de cerdos recién nacidos sometidos a anoxias intermitentes.

2 - Estudiar la capacidad de síntesis de ATP, mediante la medida de respiración mitocondrial succinato-dependiente con y sin ADP (RCR).

3 - Registrar la función cerebral regional mediante aEEG y NIRS durante los episodios de hipoxia.

4 - Estudiar por microscopia electrónica las biopsias corticales en condiciones basales, y post anoxias intermitentes.

Metodología

Es un estudio experimental, con un modelo animal de asfixia perinatal. Se utilizan cerdos recién nacidos entre 24 a 72 horas de vida (*Sus scrofa domestica*), con peso aproximado de 1700 g obtenidos de criadero local (n=4). La inducción anestésica se realiza con Ketamina i/m 30/mg/kg y al obtener vía venosa periférica se realiza mantenimiento anestésico con Ketamina, Midazolam y Fentanyl en infusión continua. Se realiza monitorización de función cerebral mediante aEEG, y NIRS. A continuación se realiza intubación por traqueostomía e inicio de ventilación mecánica. Se coloca un catéter en la arteria femoral izquierda para registro de presión sistémica invasiva y extracción de muestras en forma seriada. Se coloca acceso venoso en vena yugular externa o vena umbilical para administración de fármacos. Se hace pequeña ventana ósea en cráneo, para extraer las biopsias de corteza cerebral. Luego del período de estabilización, se realizan dos episodios de anoxia, mediante oclusión de la sonda endotraqueal, de 4 minutos de duración cada uno, separados por un período de 2 horas entre cada episodio. Este diseño intenta simular la situación de reiteración de episodios hipóxicos que puede ocurrir frente a una apnea o una obstrucción de sonda endotraqueal en un paciente con asistencia ventilatoria mecánica. Se extraen muestras de gasometría arterial y biopsia de corteza cerebral a diferentes tiempos para el estudio de función mitocondrial mediante medida consumo de oxígeno, a tiempo 0 (antes del inicio de las anoxias), durante las anoxias y al final de cada una de ellas. Además, se toman muestras biópsicas al inicio y final de cada experimento para evaluación mediante microscopía electrónica. Las mismas son de 2mm³ de tejido cortical y son lavadas en suero fisiológico frío y se fijan en una mezcla de buffer fosfato con paraformaldehído al 4% mezclado con glutaraldehído al 10%. Posteriormente se procesan para su análisis mediante microscopía electrónica de transmisión en Facultad de Ciencias.

Los estudios de consumo de oxígeno para evaluar actividad de la función mitocondrial se realizan en biopsias de cerebro en Oxygraph2K (Oroboros Instruments Corp.) en el laboratorio del CEINBIO, Facultad de Medicina. Luego de obtenidas las biopsias, son colocadas en un medio de respiración (sacarosa 110mM, Mops60mM, EGTA0.5mM, BSA1g/L, MgCl₂ 3mM, KH₂PO₄ 10mM, Hepes 20 mM,pH7.1). Las muestras de tejido (7 mg) son permeabilizadas durante 10 minutos con Saponina a una concentración final 50mg/k e introducidas en cámara de respiración con medio de respiración a 37 °C, en Oroboros Oxygraph 2K. La respiración mitocondrial se mide como consumo de oxígeno en la cámara de Oroboros. La pendiente del consumo de oxígeno en el tiempo, se mide como nmoles de oxígeno/mg de

tejido/minuto. Luego de la respiración basal, se mide consumo de oxígeno en presencia de succinato (10mM), y ADP (1–5 mM). Finalmente se agrega 2.5 mM de antimicina A (inhibidor del complejo III) para descartar el consumo de oxígeno que no depende de la cadena respiratoria mitocondrial. Se mide consumo de oxígeno dependiente del complejo II (succinato) y su grado de acople con la fosforilación oxidativa mediante la presencia de ADP, y finalmente el RCR (respiratory control ratio) que es la relación del consumo de oxígeno en presencia y en ausencia de ADP. Los valores de consumo de oxígeno son expresados como % del valor basal, de manera de uniformizar los datos. Se estudia en condiciones basales, las hipoxias (H1 y H2), post hipoxia (post H1 y Post H2), y prehipoxia 2 (preH2). Se realizaron tres experimentos con animales sham, es decir se abrió el cráneo, se extrajo muestras de biopsias corticales, al inicio y a las 2 horas del inicio del experimento sin someterlo a hipoxia. La medida de respiración mitocondrial por consumo de oxígeno al inicio y al final a las 2 horas (sin hipoxia) no fueron diferentes (test -t p t > 0.05), Se realiza eutanasia con KCl y pentobarbital sódico intravenosos al finalizar el experimento.

Se realizaron cuatro experimentos en los que se evaluó la respiración mitocondrial en cerdos recién nacidos sometidos a dos asfixias severas consecutivas separadas por un período de 2 horas. Concomitantemente, se evaluó la respuesta eléctrica (aEEG) y la saturación regional de oxígeno (NIRS) a nivel encefálico.

El trabajo se realiza en el área básica del Depto. de Neonatología, laboratorio en el piso 15 del Hospital de Clínicas equipado con termocuna, ventilador de neonato, monitor de función cerebral (MFC) 6000, NIRS (INVOS), saturómetro de pulso, monitor de saturación y frecuencia cardíaca, materiales para realizar intubación traqueal, biopsias, para colocación de vías periféricas y centrales.

Los preparados histológicos de las muestras corticales se realizan en Facultad de Ciencias en el Dpto. de Microscopía Electrónica para su posterior estudio por microscopía electrónica.

Materiales: 1 tanque de nitrógeno, a calefactor; 1 monitor y computadora; 1 bomba de infusión, 1 gasómetro, 1 oxímetro de pulso, 1 termómetro esofágico, ketamina, midazolam, fentanyl, heparina sódica, vitamina C, KCL, pentobarbital, gentamicina, cefradina, Los reactivos utilizados fueron obtenidos en Sigma: ácido succínico, adenosinadifosfato (ADP), albúmina bovina sérica libre de ácidos grasos (tipo V), antimicina A, ácido 3-(N-morfolino) propane sulfónico (MOPS), ácido 4-(2 hidroxietil)-1-piperazina-etansulfónico (HEPES), ácido

etilenglicol bis- β -aminoetil éter) N,N ' tetracético EGTA), sacarosa, fosfato dibásico de potasio.

Este protocolo está aprobado por la Comisión Honoraria de experimentación animal CHEA (Exp 070153-000645-15).

Análisis de los datos: Los resultados fueron expresados como la media \pm desvío estándar. El análisis estadístico para comparar 2 medias fue test de Student, con un nivel de significancia $p \leq 0.05$. Los gráficos fueron realizados con el software Prisma.

Resultados

Objetivo específico n° 1- Estudiar la respiración mitocondrial succinato-dependiente en biopsias corticales consecutivas de cerdos recién nacidos sometidos a anoxias intermitentes.

Se estudió la respiración mitocondrial dependiente del complejo II de la cadena respiratoria (succinato como sustrato), mediante la medida de consumo de oxígeno. En relación a los resultados obtenidos acerca de la respiración mitocondrial cortical succinato dependiente (complejo II), durante el primer episodio de asfixia se evidencia la caída del consumo de oxígeno succinato dependiente (complejo II), que se recupera inmediatamente posterior a la misma y previo a comenzar el segundo episodio de hipoxia. Por otra parte, al realizar el segundo episodio de hipoxia a las 2 horas del primero, se evidencia una clara caída del consumo de oxígeno succinato dependiente de manera significativa en comparación con el control (t-test, $p=0.038$). Posterior a este segundo episodio, continua la declinación funcional de la respiración mitocondrial, sin recuperación de la misma, como se observa en la Figura 1, lo cual evidencia la repercusión de ambas hipoxias en la respiración mitocondrial cortical succinato dependiente, y se sustenta con una diferencia estadísticamente significativa del control y post hipoxia 2 (test-t, $p=0.0115$).

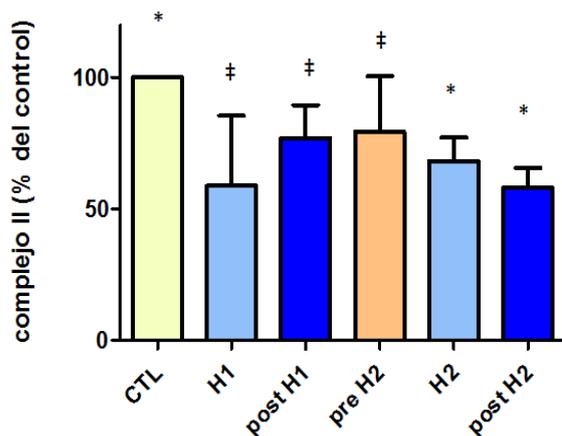


Figura 1. Consumo de oxígeno (complejo II) en biopsias de corteza cerebral durante dos episodios consecutivos de hipoxia expresados como % del control (media \pm DE). El consumo de oxígeno se midió en condiciones de hipoxia (H1 y H2), post hipoxia inmediata (post H1, y post H2), y previo a inicio de la segunda hipoxia (pre H2).

* control versus hipoxia 2 = $p < 0.05$.

* control versus post hipoxia 2 = $p < 0.05$. ‡ control versus hipoxia 1, control versus post hipoxia 1 y control versus prehipoxia 2 = $p > 0.05$. (no significativo).

Objetivo específico n° 2- Estudiar la capacidad de síntesis de ATP, mediante la medida de respiración mitocondrial succinato-dependiente con y sin ADP (RCR).

Se estudió la capacidad de síntesis de ATP por parte de la mitocondria, mediante la medida de consumo de oxígeno en presencia de succinato con y sin ADP. Se calculó el RCR (respiratory control ratio o control respiratorio) mediante la relación nmoles de O₂ consumido/mg de tejido/minuto en presencia de ADP, y nmoles de O₂ consumido/mg de tejido/minuto en ausencia de ADP. Este índice fue expresado como % del control en las diferentes condiciones experimentales (control, hipoxia 1, post-hipoxia 1, pre-hipoxia 2, hipoxia 2, y post-hipoxia 2).

En cuanto a los resultados (Figura 2), observamos que el RCR disminuye en forma significativa durante el primer episodio de asfixia en relación al control ($p < 0.05$). Esto también sucede tanto en el período previo al inicio de la segunda hipoxia, durante la segunda hipoxia, como también en el período posterior a la misma, cuando son comparadas con el control mediante el test de Student t con un $p < 0.05$. Durante el segundo episodio de asfixia se evidencia una mayor caída del RCR que resulta ser significativamente diferente que a la respuesta ante la primer hipoxia, tal como se observa en la Figura 2.

Por otro lado, al comprar el período posterior a la primer hipoxia con el control, no existen evidencias significativas de que sean diferentes entre sí, tal como se plasma en la Fig.2.

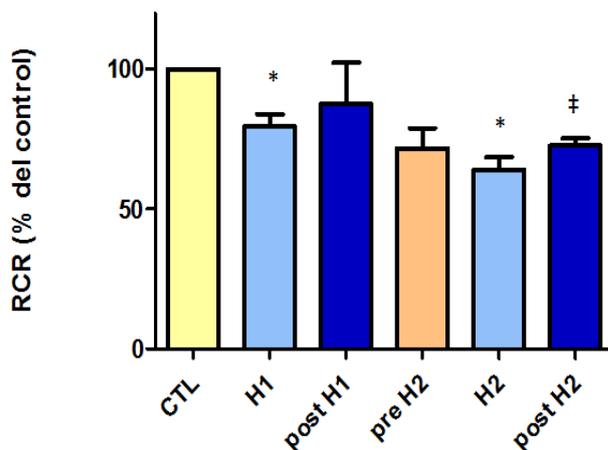


Figura 2. RCR cortical durante dos episodios consecutivos de hipoxia expresados como % del control (media \pm DE). * $p < 0.05$. RCR se midió en condiciones de hipoxia (H1 y H2), post hipoxia inmediata (post H1, y post H2), y previo a inicio de la segunda hipoxia (pre H2).

Objetivo específico n° 3- Registrar la función cerebral regional mediante aEEG y NIRS durante los episodios de hipoxia

Con respecto al aEEG, se evidencia la caída del voltaje en ambos episodios. Sin embargo el tiempo promedio de duración entre la caída inicial y el regreso al voltaje basal, fue menor en el primer episodio que en el segundo. Un ejemplo representativo de esta situación puede verse en las Figura 3A y 3B.

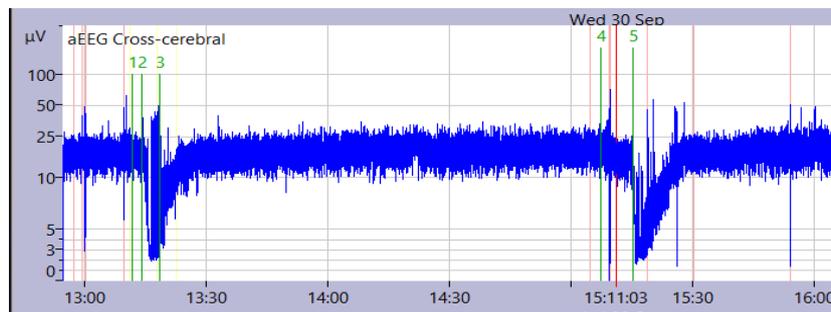


Figura 3A. Registro de aEEG global de un experimento.

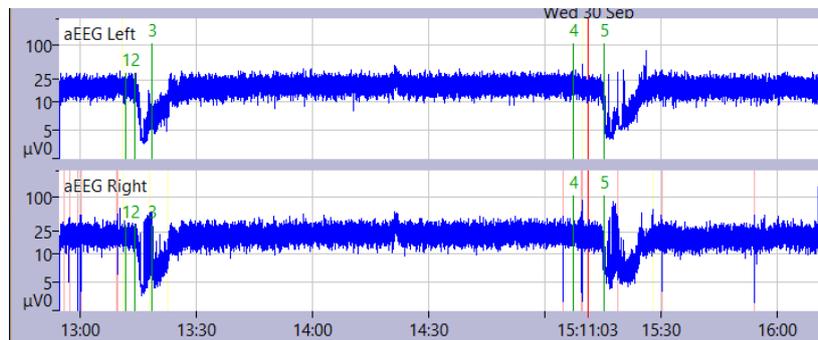


Figura 3B. Registro de aEEG izquierdo y derecho de un experimento.

Sin embargo, como se aprecia en la Figura 4, el análisis del tiempo de recuperación entre ambos episodios no es diferente de forma estadísticamente significativa. (test- t, $p > 0.05$) a pesar que existe una tendencia a ser mayor el promedio del tiempo de recuperación en el segundo episodio (no significativo por la gran variabilidad).

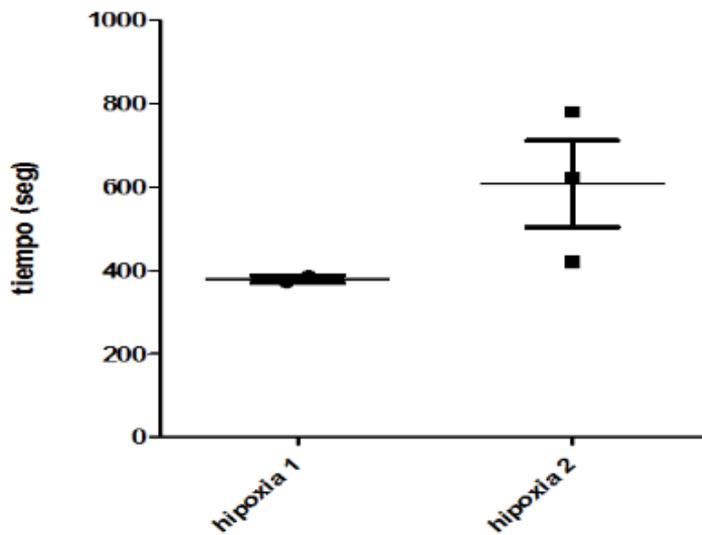


Figura 4. Monitor de función cerebral (aEEG) durante un experimento. Tiempo desde la caída del voltaje al inicio de la hipoxia, hasta la recuperación al final de la hipoxia al nivel basal. Se muestra hipoxia 1 y 2. El tiempo de recuperación no es estadísticamente diferente entre ambas hipoxias.

Al analizar la saturación regional de oxígeno (rSO₂) mediante la tecnología NIRS (Figura 5), se observa una caída de la misma durante ambos episodios de hipoxia. En cuanto al tiempo de la caída de saturación, en la primer hipoxia el tiempo es a los 12 segundos, con una media de 13 segundos y desvío estándar de 1. En la segunda, el tiempo es 14 segundos, con una media de 15 segundos y desvío estándar de 1. Es decir que se observa una caída de la rSO₂ respecto a la basal en ambas hipoxias, siendo dicha disminución de entidad similar en ambos episodios, por lo que dicha diferencia no fue estadísticamente significativa. (Figura 6). El tiempo de caída y de recuperación al basal de la segunda hipoxia fue mayor al de la primer hipoxia, pero esto no fue estadísticamente significativo (test $-t > 0.05$) (Figura 7).

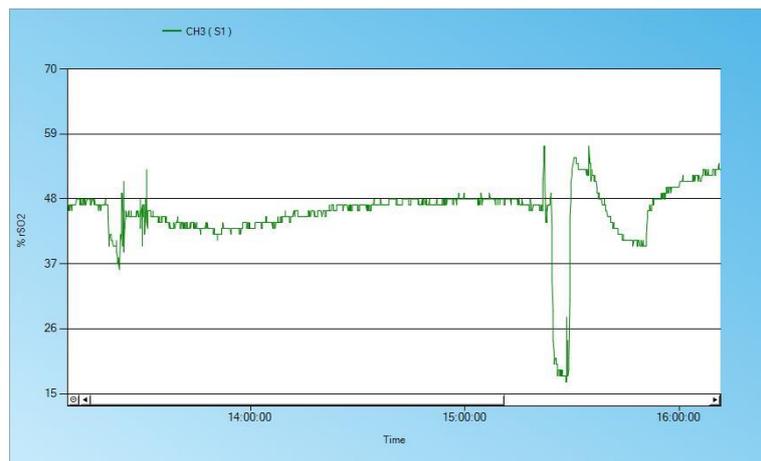


Figura 5. Registro de NIRS durante un experimento. Las 2 caídas de la saturación corresponden al momento de las hipoxias 1 y 2.

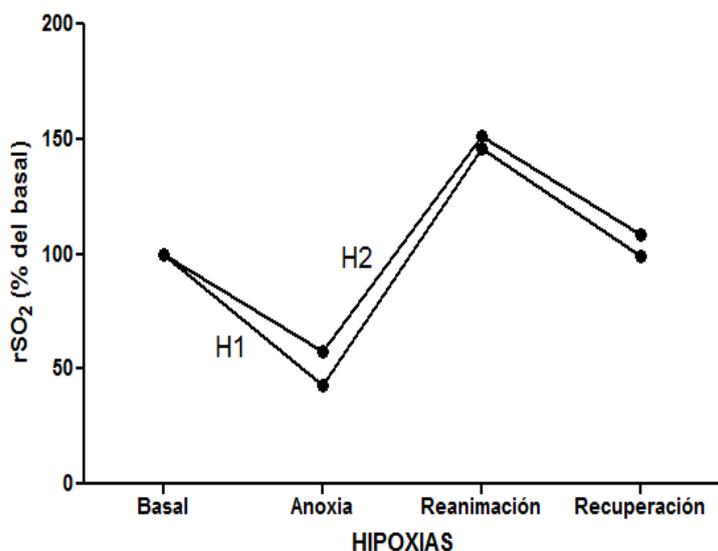


Figura 6. Se muestra la caída de la saturación regional de oxígeno (rSO₂) en cada hipoxia, y la recuperación luego de la reanimación (promedio de n=3). La magnitud de la variación de la saturación regional cerebral durante la anoxia, reanimación y recuperación entre la hipoxia 1 y la hipoxia 2 no fueron significativamente diferentes (test-t p > 0.05).

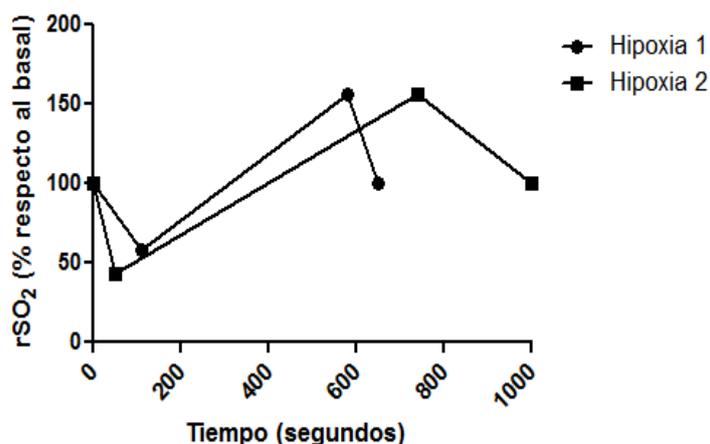


Figura 7. Variación de la saturación regional de oxígeno (rSO₂), porcentaje respecto al valor basal, en tiempo. Se grafican los promedios de cada episodio con n=3. Se observa una caída respecto al basal en la hipoxia 1 y 2. La disminución de la rSO₂ respecto al basal en

ambas hipoxias fueron similares. Y el tiempo de caída y de recuperación al basal de la hipoxia 2 fue mayor que la hipoxia 1, pero esto no fue estadísticamente significativo. (test -t > 0.05).

Objetivo específico n° 4 - Estudiar por microscopia electrónica la biopsia cortical en condiciones basales, y post anoxias intermitentes.

En relación a las micrografías electrónicas, en la muestra control se evidencia integridad de la membrana, ausencia de signos de inflamación o lesión, junto con un patrón de tinción homogénea sin cambios en la densidad. Luego de las dos horas del inicio de la primer hipoxia, se observan cambios ultraestructurales; entre ellos: hinchazón, crestas mal definidas,

disminución de la densidad de la matriz, así como la interrupción a nivel de las membranas internas y externas, con un espacio entre las crestas dilatado. (Figura 8).

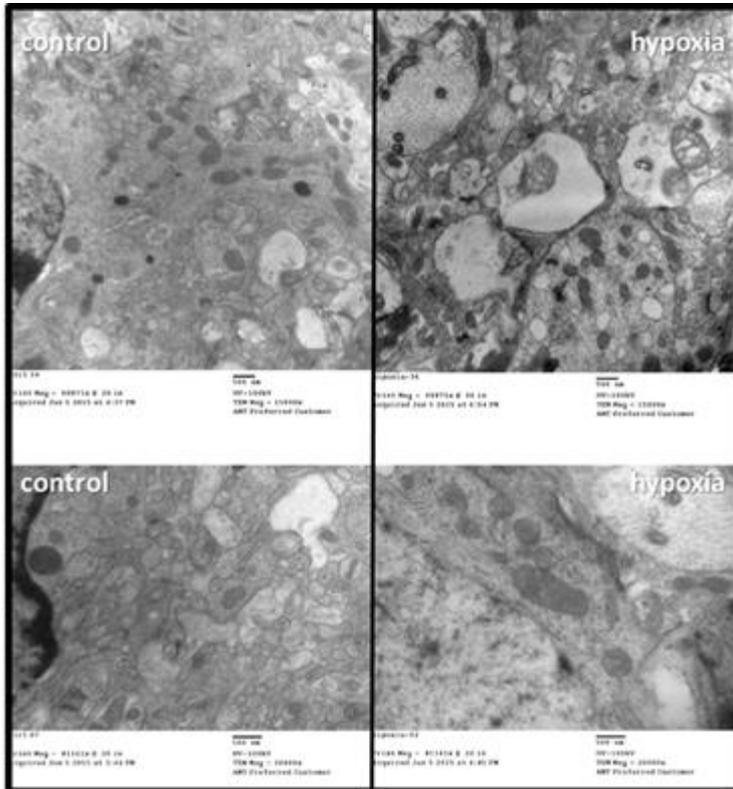


Figura 8. Microscopía electrónica de biopsias de corteza cerebral de cordero recién nacido al inicio del experimento (control), y luego de 2 horas del primer episodio hipóxico. Microfotografía (arriba) 15000x y microfotografía (abajo) 20000x.

Discusión

En nuestro trabajo encontramos que la hipoxia aguda de 4 minutos tiene una expresión en el aEEG y NIRS, y que estas alteraciones se correlacionan con la menor capacidad del tejido de corteza cerebral de producir ATP, evidenciado por la disminución del RCR. Esta disminución se observa durante ambas hipoxias, con recuperación post hipoxia inmediata en la primera, pero no así luego de la segunda hipoxia. Esta inhibición fue reversible parcialmente luego de las 2 horas posteriores a la primer hipoxia, pero no luego de un segundo insulto hipóxico agudo. La medida de consumo de oxígeno se realiza con la misma concentración de oxígeno en todas las muestras, 271 uM. por lo menos en el tiempo estudiado. Observamos que la inhibición no se revierte aumentando la concentración de oxígeno. dado que es sabido que el oxígeno es sustrato de la citocromo oxidasa, complejo IV.

Se concluye que existe disfunción mitocondrial durante la hipoxia. Esta se manifiesta mediante una recuperación funcional inmediata similar a la del control luego de la primera hipoxia, siendo esta reversible solo con el aumento del oxígeno. Sin embargo, en una segunda hipoxia se incrementa el daño y la disfunción mitocondrial, lo que se manifiesta a través de la incapacidad de recuperar su función. En suma, se puede observar una recuperación inmediata de la función mitocondrial luego de transcurridas dos horas de la primera hipoxia, mientras que la disfunción mitocondrial se torna permanente luego de la segunda hipoxia.

En lo que respecta a la succinato deshidrogenasa, se observa un comportamiento diferente entre las dos hipoxias. En la primer hipoxia no se ve afectada, sin embargo sí sucede durante la segunda, sin presentar recuperación. Esto podría demostrar un comportamiento resistente por parte de esta enzima a la hipoxia, en comparación con otros complejos. Sin embargo, se observa que la síntesis de ATP sí está afectada desde la primer hipoxia, lo que se repite, agrava y no recupera en la segunda. Por lo tanto, la caída de la síntesis de ATP durante la primer hipoxia probablemente se deba a otros factores diferentes a la succinato deshidrogenasa, no habiendo sido evaluados en este modelo.

De los resultados registrados por el NIRS se observa que el comportamiento de ambas hipoxias es similar, ya que el tiempo y la magnitud del descenso del rSO₂, así como el tiempo de recuperación entre el inicio y el valor basal, no fueron estadísticamente diferentes. Sin embargo, observando las gráficas parecería que la tendencia de la segunda hipoxia es a recuperarse más lentamente que la primera. Esto podría deberse a que el “n” de nuestra muestra (n=3) es pequeño, por lo que sería interesante incrementar la muestra, lo que permitiría convertir esta diferencia en estadísticamente significativa, de estabilizarse la tendencia. De todas formas, los registros de NIRS nos permitieron valorar la variación de rSO₂ para cada episodio de hipoxia, por lo que sería una herramienta de gran utilidad en la práctica clínica ante situaciones de asfixias aisladas, como ser por ejemplo una apnea de causa central o por obstrucción de vía aérea.

A través de la evaluación encefálica no invasiva de los efectos de la hipoxia en cerdos recién nacidos mediante el NIRS y el aEEG, se observa que no hay correlación de sus registros con el estado de la función mitocondrial real. Esto se concluye en base a que los resultados obtenidos en el NIRS y aEEG no fueron estadísticamente significativos, a diferencia de lo observado en el análisis directo de la respiración mitocondrial que sí lo fue. Es posible que no se haya encontrado significancia estadística debido al pequeño tamaño muestral utilizado, ya que la tendencia de ambos registros a simple vista, parece mostrar diferencias.

En cuanto a los resultados de las micrografías electrónicas, se concluye que luego de una segunda hipoxia consecutiva se comienzan a desarrollar cambios ultraestructurales a nivel celular, alterando las funciones generales de las células, así como las específicas de organelo (mitocondrias).

Conclusiones

Podemos concluir entonces que la caída del voltaje del aEEG durante ambas hipoxias tuvo un comportamiento similar. La saturación regional cerebral con NIRS desciende durante ambas hipoxias, con una más lenta recuperación luego de la segunda, pero este resultado no fue estadísticamente significativo.

Sin embargo, sí encontramos diferencias en la función mitocondrial, en cuanto a que el complejo II se ve más afectado en la segunda hipoxia en comparación con la primera. Y que además no se recupera totalmente luego de una hipoxia reiterada.

La falla energética en cuanto a la producción de ATP se produce en ambas hipoxias. Sin embargo es irreversible luego de hipoxias reiteradas. Esto podría tener implicancias en el daño posterior, en cuanto a que la falla energética secundaria dispara mecanismos que son responsables de las secuelas neurológicas por hipoxia.

Creemos importante destacar que este comportamiento de la falla energética relacionado a un episodio único agudo de hipoxia, diferente respecto a si es repetido y que se mantiene en el tiempo luego en el periodo de normoxia, no se correlaciona con la monitorización encefálica con NIRS y aEEG, herramientas que son usadas en la clínica para tomar conductas terapéuticas, como por ejemplo en la hipotermia controlada o en el tratamiento de convulsiones subclínicas. Por lo tanto, el aEEG y el NIRS podrían estar subestimando los efectos de la hipoxia aguda sobre la función neuronal.

Pudimos confirmar cambios ultraestructurales en la mitocondria desencadenados por hipoxia.

Perspectivas

Los fenómenos a nivel celular/molecular que son claros y diferentes entre un primer y un segundo evento asfíctico, no se reflejan tan claramente en equipos de monitoreo encefálico no invasivo, lo que requiere continuar estudiando la correlación en estos fenómenos graves y su expresión en monitores que podemos tener en los pacientes al momento de su asistencia.

En futuros trabajos quedaría por estudiar si esta falla energética en hipoxias agudas reiteradas persiste en el tiempo (en horas por ejemplo), cuál es la correlación entre la paO_2 y/o saturimetría de pulso con la falla energética y su reversibilidad en el tiempo.

Referencias bibliográficas

1. Fondo, F., & Estable, C. (2013). Datos de la propuesta, 100427, 1–34.
2. Hagberg, H., Mallard, C., Rousset, C. I., & Thornton, C. (2014). Mitochondria: Hub of injury responses in the developing brain. *The Lancet Neurology*, 13(2), 217–232. doi:10.1016/S1474-4422(13)70261-8
3. Hou, X., Ding, H., Teng, Y., Zhou, C., Tang, X., Li, S., & Ding, H. (2007). Research on the relationship between brain anoxia at different regional oxygen saturations and brain damage using near-infrared spectroscopy. *Physiological Measurement*, 28(10), 1251–65. doi:10.1088/0967-3334/28/10/010
4. Negishi, Y., Hattori, A., Takeshita, E., Sakai, C., Ando, N., Ito, T., Saitoh, S. (2014). Homoplasmy of a mitochondrial 3697G>A mutation causes Leigh syndrome. *Journal of Human Genetics*, 59(7), 405–7. doi:10.1038/jhg.2014.41
5. Rousset, C. I., Baburamani, A. a, Thornton, C., & Hagberg, H. (2012). Mitochondria and perinatal brain injury. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine : The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 25 Suppl 1(1), 35–8. doi:10.3109/14767058.2012.666398
6. Thornton, C., & Hagberg, H. (2014). Role of mitochondria in apoptotic and necroptotic cell death in the developing brain. *Clinica Chimica Acta*, 451, 35–38. doi:10.1016/j.cca.2015.01.026
7. Vannucci, R. C., Towfighi, J., & Vannucci, S. J. (2004). Secondary Energy Failure After Cerebral Hypoxia???Ischemia in the Immature Rat. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 1090–1097. doi:10.1097/01.WCB.0000133250.03953.63
8. Vannucci, S. J., & Hagberg, H. (2004). Hypoxia-ischemia in the immature brain. *The Journal of Experimental Biology*, 207(Pt 18), 3149–3154. doi:10.1242/jeb.01064
9. Medscape, *Amplitude-integrated Electroencephalography: A New Approach to Enhancing Neurologic Nursing Care in the Neonatal Intensive Care Unit. NAINR. 2011;11(3):134-140.* (Actualizado en 2011). Disponible en: <http://www.medscape.com/viewarticle/749602> . (Acceso: 28/5/2016).

Agradecimientos

El presente trabajo de investigación se realizó en el área básica del Depto. de Neonatología, laboratorio en el piso 15 del Hospital de Clínicas, bajo la supervisión de Dra. Prof. Adj. Marianela Rodríguez, Dra. Prof. Agda. Fernanda Blasina, y Prof. Adj. Lucía Vaamonde, a quienes queremos agradecer el tiempo, paciencia y dedicación para lograr la realización del estudio exitosamente. También dar las gracias al Hospital de Clínicas “Manuel Quintela” por aportar los materiales necesarios para realizar la investigación de manera adecuada, al Laboratorio del CEINBIO que nos brindaron el laboratorio y materiales para medir respiración mitocondrial, y por último al Dpto. de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias, quienes se encargaron de analizar los preparados histológicos de las muestras corticales, colaborando así con gran parte del estudio.