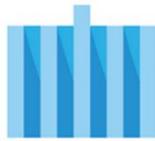




UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY



HOSPITAL DE CLINICAS
Dr.Manuel Quintela



Departamento de Neonatología, áreas básica y
clínica, Hospital de Clínicas, Montevideo

Mitocondria: Su rol en la injuria hipóxico- isquémica en el cerebro en desarrollo

Ciclo de Metodología Científica II – 2018

Grupo 26

Integrantes del Equipo:

Lucia Manzanares

José Luis Marín

Joaquín Martínez

Mauricio Márquez

Laura Más

Eliana Muñoz

Orientador: Marianela Rodríguez

Departamento de Neonatología

Hospital de Clínicas

ÍNDICE

Resumen.....	2
Introducción.....	3
Objetivo.....	4
Metodología.....	5
Marco teórico.....	6
Mitocondria.....	6
Estructura y función mitocondrial.....	6
Hipoxia y mitocondria.....	9
Cerebro inmaduro.....	11
Implicancias clínicas.....	12
Neuroprotección.....	14
Hipotermia.....	14
Otras terapias.....	18
Conclusiones y perspectivas.....	19
Bibliografía.....	19

RESUMEN

La injuria neurológica por hipoxia isquemia perinatal es causa de daño cerebral, que puede resultar en una encefalopatía hipóxica isquémica neonatal. La misma es causa de importante morbilidad neurológica como parálisis cerebral, dificultad en el aprendizaje, así como de mortalidad en los recién nacidos. El tejido nervioso es altamente dependiente del metabolismo aeróbico, por lo cual la presencia de episodios hipóxico-isquémico prolongados, genera una reducción del ATP disponible, incremento del ácido láctico a nivel celular y sistémico, aumento del estrés oxidativo e influjo de Ca^{2+} mitocondrial, disfunción de las bombas iónicas del transporte activo y a la pérdida del potencial transmembrana neuronal. La injuria neuronal por hipoxia isquemia depende de la intensidad, duración y el grado de desarrollo neurológico. A nivel neuronal, la reducción de la disponibilidad de oxígeno y de la síntesis de ATP, configura una falla energética primaria. Si la injuria inicial se perpetúa entre las 6 y las 48 horas, se produce falla energética secundaria, debido a disfunción mitocondrial, generando un estado de excitotoxicidad, inflamación y muerte neuronal por apoptosis. Luego de días o semanas de la injuria, culmina en una tercera etapa donde se acentúa la respuesta inflamatoria con reclutamiento y activación de células inmunes. La misma se continúa con una respuesta antiinflamatoria, para estimular la reparación tisular. La hipotermia es la primera terapia que demostró en humanos reducir la injuria neuronal secundaria previniendo y reduciendo el daño cerebral asociado a la agresión hipóxico-isquémico perinatal. Las nuevas terapias combinadas actuarían de manera más específica para modular el estrés oxidativo y contribuir a mejorar el pronóstico. Los efectos de la hipoxia en la mitocondria son claves en la falla energética, en la perpetuación del daño, y en el mecanismo neuroprotector de la hipotermia.

PALABRAS CLAVE: ischemic hypoxic encephalopathy, mitochondria, immature brain, perinatal hypoxia, hypothermia.

INTRODUCCIÓN:

La injuria neuronal originada por hipoxia es causa de encefalopatía hipóxico isquémica del cerebro en desarrollo. Constituye una entidad de importancia para Salud Pública en términos de morbilidad y mortalidad neonatal, así como discapacidad ulterior en el niño.

La falla energética que se exhibe luego de un episodio agudo de hipoxia, resulta clave en la determinación del daño neuronal, perpetuándose incluso ante el cese del evento hipóxico.

La mitocondria se encuentra íntimamente relacionada en la perpetuación del daño hipóxico, debido a su papel fundamental en la generación de energía metabólica en las células, siendo responsable de la producción de la mayor parte de la energía útil derivada de la descomposición de los carbohidratos y ácidos grasos, que convierte en ATP mediante el proceso de la fosforilación oxidativa. El cerebro es un órgano dependiente de su metabolismo oxidativo, necesario para cubrir sus elevadas demandas energéticas. La falla energética neuronal trae aparejada la disfunción neurológica, que se traduce desde el punto de vista clínico por la presencia aislada o combinada de retraso en el desarrollo, parálisis cerebral, trastorno neurosensorial, motor, déficit cognitivo, convulsiones. El daño hipóxico, con su consecuente falla energética, desencadena procesos celulares que llevan a la muerte celular programada (apoptosis) y/o necrosis, eventos que serán dependientes del tiempo de exposición a la injuria, suscitando secuelas a largo plazo.(1)

El manejo más efectivo para la encefalopatía hipóxico isquémica es la hipotermia terapéutica, erigiéndose como único tratamiento que ha demostrado reducir la morbilidad y mortalidad, aumentando el número de niños que sobreviven con función neurológica normal. (2-4)

OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo será revisar la evidencia actual del rol de la mitocondria en las lesiones neuronales producidas por eventos hipóxicos isquémicos en el cerebro en desarrollo y su relación con el efecto neuroprotector de la hipotermia.

METODOLOGÍA

Se realizó una búsqueda bibliográfica en Pubmed. Se seleccionaron artículos originales y de revisión, en idioma inglés, publicados en revistas arbitradas. Las palabras claves fueron: “ischemic hypoxic encephalopathy”, “mitochondria”, “immature brain”, “perinatal hypoxia”, “hypothermia”; de los artículos publicados entre enero de 1990 y abril 2018. También se seleccionan artículos de las listas de referencias de artículos relevantes.

Se seleccionaron los artículos que incluían la función mitocondrial en hipoxia cerebral y encefalopatía hipóxica isquémica. El rol de la función mitocondrial en la falla energética en hipoxia isquémica, su implicancia en la injuria y reparación en el cerebro en desarrollo; y las posibles terapias neuroprotectoras vinculadas a la función de la mitocondria.

Para la selección de la bibliografía a utilizaron dos filtros en Pubmed, el primero con las palabras: ischemic hypoxic encephalopathy, mitochondria, immature brain, en la cual se encontraron 32 artículos. En el segundo filtro las palabras utilizadas fueron: perinatal hypoxia and hypothermia and mitochondria, encontrándose 6 artículos.

MARCO TEÓRICO

1 MITOCONDRIA

A. ESTRUCTURA Y FUNCION MITOCONDRIAL

La mitocondria es uno de los orgánulos más conspicuos del citoplasma celular. Su origen, que remonta a dos mil millones de años, sería explicado mediante la teoría endosimbiótica, con la incorporación de procariotas, capaces de realizar fosforilación oxidativa, a la célula eucariota. A lo largo de la evolución, se desarrolló una asociación simbiótica entre ambos organismos, en donde ciertos genes bacterianos fueron migrando hacia el núcleo. Las mitocondrias contienen su propio sistema genético, diferente del genoma nuclear de la célula; constituido de ADN circular, que se replica cada vez que el orgánulo se divide, codificando trece proteínas implicadas en el transporte de electrones y en la fosforilación oxidativa, ARN ribosómico (ARNr) y de transferencia (ARNt). (5)

La mitocondria está presente en el citoplasma de todas las células eucariotas, excepto en los hematíes. Su tamaño y cantidad por célula es variable, fuertemente relacionado con su actividad metabólica. Se encuentra rodeada por un sistema de doble membrana semipermeable, constituido por una membrana interna y externa, que separan tres espacios bien definidos: el citosol, el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial.

La membrana externa está formada por una bicapa lipídica, donde se hallan porinas que permiten el paso de moléculas por transporte pasivo, posee enzimas para convertir los sustratos lipídicos que serán metabolizados posteriormente en la matriz, y receptores que reconocerán proteínas citosólicas destinadas a la mitocondria. El espacio intermembrana, presenta un pH ácido, resultado del bombeo de protones desde la membrana interna y compuestos involucrados en la vía apoptótica. La membrana interna contiene una relación proteína-lípido superior al resto de las bicapas lipídicas. Con un porcentaje muy bajo de colesterol y un alto contenido de cardiolipina, lo que permite la estabilización de los componentes de la cadena respiratoria. Se pliega formando crestas, con el fin de aumentar su superficie de contacto con la matriz, la cantidad de ellas es variable, soliendo ser superior en células que poseen mayor demanda metabólica. Posee tres tipos de proteínas con funciones de transporte de metabolitos, oxidación y una ATPasa.

La matriz contiene el material genético, que tiene la particularidad de ser heredado por el progenitor materno; codifica algunas de las enzimas responsables del metabolismo oxidativo. (6)

Una de las funciones cruciales de la mitocondria consiste en la respiración celular, proceso que se lleva a cabo en tres etapas, dos de ellas se realizan en la mitocondria. La primera etapa consiste en la degradación de la glucosa mediante la glucólisis, proceso que transcurre en el

citósol celular y que origina dos moléculas de piruvato. Cada piruvato viaja a la matriz mitocondrial; allí se convierte en una molécula de dos carbonos que se une a la coenzima A, originando Acetil-CoA.

Es en este momento donde comienza el ciclo de Krebs, el acetil-CoA reacciona con el oxalacetato y atraviesa un ciclo de reacciones para finalmente regenerar la molécula inicial de cuatro carbonos. En el proceso se genera ATP, NADH, FADH₂ y se libera dióxido de carbono. Todos los NADH y FADH₂ formados durante el catabolismo de carbohidratos y lípidos, Ciclo de Krebs y en la formación del Acetil-CoA, se dirigen hacia la membrana mitocondrial interna, donde ocurrirá el paso final que corresponde a la fosforilación oxidativa. En ella participan los complejos enzimáticos NADH -deshidrogenasa (complejo I), succinato-deshidrogenasa (complejo II), citocromo bC1 (complejo III), citocromo oxidasa (complejo IV) y ATP-sintasa (complejo V).

Sumado a los complejos enzimáticos, dos moléculas, la coenzima Q y el citocromo C, actúan a modo de nexo de unión o lanzadera, transportando los electrones de un complejo a otro. El transporte de electrones de un complejo a otro es producto de la mayor afinidad por los electrones que posee cada complejo subsiguiente (Figura1).

El proceso comienza por la unión de la molécula de NADH al complejo I a través de un grupo prostético, el mononucleótido de flavina, mientras que el FADH₂ se une al complejo II. Ambos donan electrones que se unen a la coenzima Q, quien los transporta a través de la membrana, hasta el complejo III. Desde él y mediante el citocromo C, son transportados al complejo IV, donde finalmente en la matriz mitocondrial, son transferidos al oxígeno, último receptor de electrones, que mediante su reducción produce agua.

A medida que los electrones van cruzando de un complejo a otro, se produce un bombeo de protones (H⁺) hacia el espacio intermembranoso, produciendo un gradiente electroquímico entre el espacio intermembranoso y la matriz mitocondrial. Esto provoca que los protones sean expulsadas a través de la ATP-sintasa y su fuerza de expulsión genera la fuerza protón-motriz utilizada en la fosforilación del ADP en ATP. (7)

En la matriz mitocondrial se llevará a cabo otra de las funciones de la mitocondria, la oxidación de los ácidos grasos, principal fuente de energía. Corresponde a un proceso catabólico, en el cual el ácido graso sufrirá remoción, mediante oxidación, de un par de átomos de carbono sucesivamente en cada ciclo del proceso. Para llevar a cabo la oxidación, es necesario que el ácido graso ingrese en la matriz mitocondrial. Aquellos ácidos grasos de catorce carbonos o más (la mayoría provenientes del tejido adiposo) primariamente en el citósol, se transformarán en Acil CoA mediante la enzima Acil Coa sintetasa. La enzima carnitina aciltransferasa I (CAT I) de la membrana mitocondrial externa, elimina la coenzima A y a la vez, la une a la carnitina, situada en el espacio intermembrana, originando acilcarnitina. Una proteína transportadora situada en la membrana mitocondrial interna, transfiere la acilcarnitina a la matriz mitocondrial.

Paralelamente, la carnitina acil transferasa II (CATII) une una molécula de CoA de la matriz al ácido graso, regenerando así acil-CoA. Luego de este proceso comienza la oxidación, que originará Acetil CoA, que podrá dirigirse al hígado donde mediante cetogénesis originará cuerpos cetónicos, o dirigirse al Ciclo de Krebs. Los NADH y FADH₂ generados, se dirigen hacia la cadena respiratoria. Para el tejido nervioso, la importancia de este proceso radica en que los cuerpos cetónicos pueden llegar a ser una fuente de energía en el caso de un deficiente aporte de glucosa.

Además de proporcionar energía a la célula, las mitocondrias están implicadas en otros procesos, como la señalización celular, diferenciación celular, apoptosis, así como el control del ciclo celular y el crecimiento. (8)

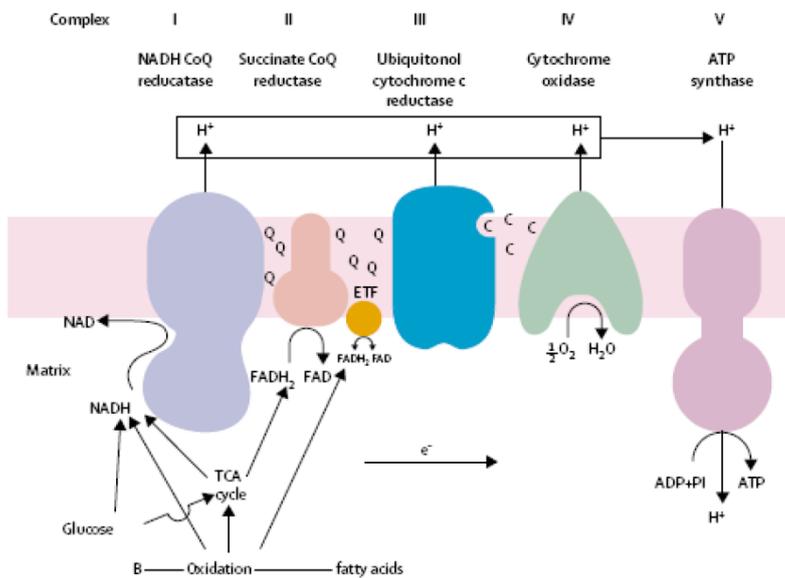


Figura1. Complejos I, II, II, IV y V de la cadera respiratoria y fosforilación oxidativa.

NADH= dinucleotido de adenina y nicotinamide forma reducida; CoQ=ubiquinona; ATP=adenosina trifosfato; NAD= dinucleotido de adenina y nicotinamide forma oxidada; TCA=ciclo de ácido tricarbóxico; FADH₂=la forma reducida de flavin adenin dinucleotido; FAD= flavin adenin dinucleotido; ETF=flavoproteina electron transfer; e⁻=electron; ADP=adenosine difosfato; Pi= fosfato inorgánico. Extraído de (9)

B. HIPOXIA Y MITOCONDRIA

La hipoxia tisular definida como la disminución de oxígeno disponible a los tejidos, se encuentra asociada a una reducción del ATP, aumento en la producción de ácido láctico a nivel celular y sistémico, incremento del estrés oxidativo y al aumento del influjo de Ca^{2+} mitocondrial.

El ácido láctico refleja con veracidad la intensidad del evento hipóxico. Durante el episodio hipóxico isquémico (HI) existe una depleción inicial de las reservas energéticas, que es seguida por una depleción secundaria más prolongada; y es en ésta última en donde se visualiza el mayor daño. (10–12)

La alteración del metabolismo energético provoca respuestas fisiopatológicas que convergen a nivel mitocondrial. Estas incluyen la liberación de aminoácidos excitatorios que activaran receptores de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA) y ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4 isoxazolepropionico (AMPA), activación de la enzima óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), incremento del calcio intracelular, así como la acumulación de especies reactivas del oxígeno. (13,14)

En el tejido neuronal, la activación de los receptores de glutamato provoca un influjo de Ca^{2+} intracelular dentro del retículo endoplásmico, núcleo y matriz mitocondrial. Esto promueve la permeabilización mitocondrial, con la consecuente liberación de agentes proapoptóticos hacia el citosol, desencadenando la apoptosis. Esta se llevará a cabo mediante dos vías, la vía caspasa dependiente y la independiente. La primera inicia con la translocación del citocromo *c* al citosol, donde se acopla a la caspasa 9 generando la activación de la caspasa 3. En la vía independiente, el factor inductor de apoptosis (AIF) se acopla a la ciclofilina A (CyA).

Tanto la caspasa 3 como el AIF/CyA, migran hacia el núcleo y su acción finaliza en la fragmentación del ADN.

En la activación de las diferentes vías, existe diferencia según el género. En el sexo femenino la vía predominante es la dependiente de caspasa, siendo para el sexo masculino la vía independiente.

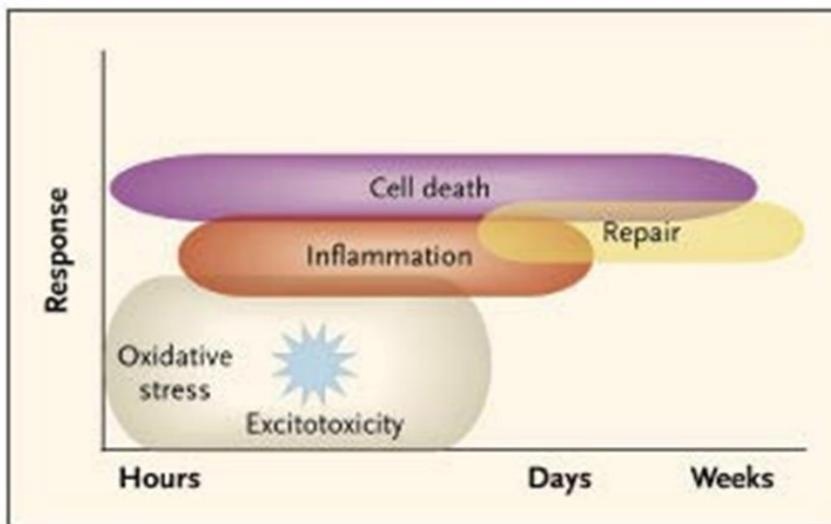


Figura 2. Mecanismos de lesión cerebral en el recién nacido a término. Tanto el estrés oxidativo como la excitotoxicidad producen, a través de señales intracelulares, inflamación y reparación. La muerte celular comienza inmediatamente y continúa durante un período de días a semanas. El fenotipo de muerte celular cambia de una morfología necrótica temprana a una anatomía patológica que recuerda a la apoptosis. Extraído de (15)

La injuria produce un incremento de especies reactivas del oxígeno como superóxido ($O_2^{\cdot -}$), óxido nítrico ($\cdot NO$) y radical hidroxilo ($\cdot OH$), dando como consecuencia peroxidación y nitrosilación proteica, y daño en el ADN. El $\cdot NO$ inhibe la cadena de transporte de electrones, favoreciendo la producción de radical superóxido. El cerebro en el neonato es más vulnerable al daño oxidativo, dado que carece de mecanismos protectores antioxidantes. (14)

Luego de la recuperación de la falla energética primaria que se produce inmediatamente luego del cese de la hipoxia, en algunas neuronas ocurre una caída de la concentración de ATP y fosfocreatina que está relacionado al daño neuronal en las siguientes horas y días. (10)

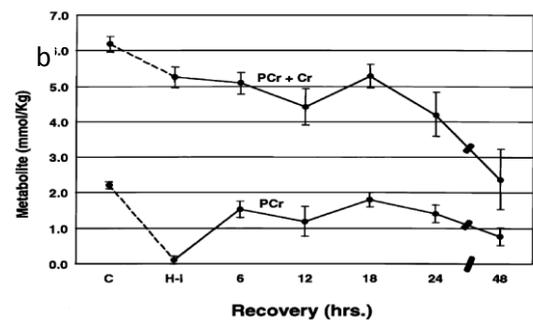
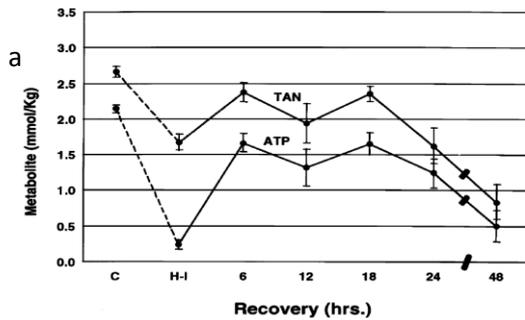


Figura 3. a. Concentraciones de ATP y de nucleótidos de adenina total (TAN); y b. fosfocreatina (Pcr), a durante y luego de episodio HI. A las 6 hs del episodio se observa una recuperación del ATP y TAN, que posteriormente luego de las 18 hs en forma espontánea vuelven a disminuir. Extraído de (16)

2. CEREBRO INMADURO

La demanda cerebral de energía durante el reposo, es de aproximadamente un 15% del total de energía que requiere el organismo. La neurona es la principal contribuyente a dicho fenómeno, siendo el tejido glial un menor consumidor. Esta energía es utilizada principalmente para mantener la electronegatividad a través de sus membranas y restablecer el potencial de membrana luego de cada potencial de acción. Para lograrlo utiliza bombas iónicas que transportan calcio y sodio al exterior y potasio al interior.

Las demandas energéticas pueden acentuarse en un 100-150% en situaciones de alta actividad neuronal. A diferencia del resto de los tejidos, el cerebro es un órgano limitado en su metabolismo anaerobio, siendo incapaz de almacenar reservas energéticas, por lo que depende de un aporte continuo de glucosa y oxígeno. Las privaciones de estos, provocan muerte celular en pocos minutos.

El cerebro inmaduro es relativamente resistente a la hipoxia comparada con el adulto, esto se debe a su capacidad de aumentar el flujo cerebral. En el prematuro menor a 32 semanas de edad gestacional, la sustancia blanca es susceptible al daño por HI lo cual es llamado leucomalacia periventricular, ésta se caracteriza por déficit motor, cognitivo, y sensorial principalmente visual. En los niños de término, el daño es predominantemente a nivel de la sustancia gris, específicamente corteza cerebral, hipocampo o ganglios basales. Regiones cerebrales con mayor actividad sináptica son más susceptibles al daño por HI como la corteza somatosensorial y los ganglios basales. (17).

En cuanto a la susceptibilidad a la hipoxia de acuerdo a la edad gestacional se ha publicado que existen diferencias. El feto con mayor madurez es más dependiente del metabolismo aeróbico, por lo que sería más sensible a la hipoxia. Por lo tanto la hipoxia produce una depleción de metabolitos de alta energía (ATP y fosfocreatina) más acentuado a mayor edad gestacional. (18)

3. IMPLICANCIAS CLINICAS

La incidencia de encefalopatía hipóxica isquémica es de 1 a 8/1000 nacidos vivos en los países desarrollados, esta cifra es mayor en los países subdesarrollados.(19). La progresión de la encefalopatía hipóxica isquémica es tiene efectos devastadores y es causa de aproximadamente el 23% de las muertes neonatales anuales global. (20)

Se denomina asfixia a la falta de adecuada oxigenación tisular; e isquemia a la circulación insuficiente hacia los tejidos, lo que conlleva a la falta de oxígeno y glucosa a la célula.

La injuria neurológica por hipoxia isquemia perinatal es causa de daño cerebral, que conlleva a una encefalopatía hipóxica isquémica neonatal. El daño neurológico depende de la intensidad, la duración de la injuria y el nivel del desarrollo cerebral en el neonato.

Durante el episodio de HI se produce disminución del flujo sanguíneo al feto, lo que causa hipotensión arterial sistémica y la pérdida de la autorregulación de la circulación cerebral. Existe una reducción de disponibilidad de la producción de ATP, que lleva un consumo rápido de las reservas de glucosa, con el consiguiente aumento del metabolismo anaeróbico y producción de ácido láctico. A nivel neuronal, la reducción de la disponibilidad de oxígeno y disminución de la síntesis de ATP, configura una falla energética primaria. (10)

Como consecuencia del fallo energético primario la isquemia cerebral produce hipoxia, con la consecuente acidosis y daño cerebral. En el metabolismo anaeróbico se suple la carencia de oxígeno, generando acidosis láctica, acumulación de sodio (Na^+), calcio (Ca^{2+}), agua, depleción de ATP e inhibición de la recaptación de neurotransmisores, con la consecuente hiperexcitabilidad neuronal. El aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular produce activación de lipasas, NO-sintasas, producción de radicales libres, disfunción mitocondrial y liberación de sustancias apoptogénicas. Esta primera fase tiene una duración de 6 horas. (21)

Clínicamente en este primer periodo hay una redistribución del oxígeno hacia los órganos nobles (cerebro, corazón y glándulas adrenales). El recién nacido se va a encontrar activo, con buen color, con mínima cianosis distal, buen tono muscular y reflejos normales. Neurológicamente las pupilas se van a encontrar dilatadas y no se observan convulsiones. En lo cardiovascular la frecuencia cardíaca se encuentra aumentada. Si no hay mejoría en la oxigenación, la presión arterial comienza a descender y la frecuencia cardíaca disminuye.

Posteriormente existe una segunda fase, denominada fase latente, en la cual se normaliza la homeostasis, los compuestos de alta energía ATP y fosfocreatina. Si la injuria inicial perpetua entre las 6 y las 48 horas se produce una falla secundaria de energía generando una interrupción de la función mitocondrial, un estado de excitotoxicidad e inflamación. (14)

La falla energética, tanto por la reducción del ATP como por la acumulación del ácido láctico, es seguida tempranamente por una alteración en el transporte iónico, mediante una inhibición de las bombas Na^+/K^+ , provocando una acumulación de Na^+ , Ca^{2+} y Cl^- intracelular. Cobra especial relevancia el calcio, ya que su acumulación intracelular lleva a la liberación de glutamato, a través de un cambio en el potencial de las membranas presinápticas, sumado a ello existe una disminución de la recaptación de esta, lo que agrava el daño. El bloqueo de los receptores de glutamato (NMDA y AMPA) han sido reportado como protectores del daño. Es en esta etapa en que se produce la mayoría de las muertes celulares, con apoptosis predominante. (11,22)

Desde el punto de vista clínico en esta etapa se caracteriza a nivel cardiovascular por una progresiva bradicardia e hipotensión. Existe una disminución en el flujo sanguíneo a los órganos vitales y la isquemia empeora la hipoxia previa. Esto genera una detención del flujo sanguíneo principalmente a nivel cerebral que provoca una congestión cerebral y un aumento de la permeabilidad vascular, causando edema cerebral, estableciéndose el síndrome de hipertensión endocraneana.

Culmina en la tercera etapa que puede durar días, semanas o meses. Luego de días o semanas de la injuria, existe una inducción de una respuesta inflamatoria, esta involucra el reclutamiento y activación de células inmunes, con el fin de remover células dañadas y lípidos. La misma se continúa con una respuesta antiinflamatoria, para estimular la reparación tisular. Esta respuesta inmune tisular, es caracterizada por la activación de la microglía, por ser las células inmunes innatas del tejido nervioso, junto a la migración de células periféricas como macrófagos, monocitos y neutrófilos dentro del sitio de la injuria. La microglía, se encuentra específicamente involucrada en contribuir a la falla energética secundaria, mediante el aumento de citoquinas proinflamatorias como IL-1B y TNF α , que mediante especies reactivas del oxígeno y la vía de la apoptosis provocan la muerte celular.(14)

La muerte celular se clasifica en apoptótica o necrótica, de acuerdo con criterios bioquímicos y morfológicos. El modo de muerte celular, luego de un insulto hipóxico isquémico, depende de la severidad del insulto, el subtipo de receptor de glutamato que ha sido estimulado, el grado de sobrecarga de Ca^{2+} celular, la madurez de la célula afectada, así como la depleción energética celular y la disfunción mitocondrial. (21)

Durante la falla secundaria, la muerte celular ocurre fundamentalmente por apoptosis. Ciertas regiones cerebrales son más vulnerables a la hipoxia y su mecanismo de muerte. La corteza

cerebral y los ganglios basales, responden con mayor número de células en apoptosis, aun luego de una semana del insulto hipóxico isquémico.(12)

A nivel fetal una hipoxia aguda y severa produce patrón de daño localizado en ganglios basales, mientras que en hipoxias más prolongadas y parciales, el daño es de tipo subcortical. La Hipotermia es el único tratamiento clínico disponible para neonatales.(19,23)

En cuanto a la clínica al estado hipóxico se le agregan cambios metabólicos con hipercapnia, acumulación de ácido láctico y acidosis metabólica. Esta etapa se caracteriza por una desmejora de la clínica presente en la fase anterior; donde el recién nacido se presenta aletargado, con hipotonía global y arreflexia, careciendo total o parcialmente del reflejo de succión, miosis, bradicardia, hipotensión. Se pueden observar a su vez convulsiones, progresando al coma terminal.

4. NEUROPROTECCIÓN

A- HIPOTERMIA

La estrategia terapéutica del recién nacido con asfixia perinatal, se ha limitado a los cuidados intensivos de sostén hemodinámico, respiratorio y metabólico así como al tratamiento de convulsiones y monitorización de la disfunción multiorgánica; no interviniendo eficazmente en la injuria hipóxico-isquémica cerebral, dado que no se contraponen a la secuencia fisiopatológica de la enfermedad.

Pocas son las intervenciones terapéuticas que tienen impacto sobre la evolución de la encefalopatía hipóxico-isquémica y el daño multiorgánico derivada de ésta. Debido a la escasez terapéutica específica, para prevenir o reducir el daño cerebral asociada a la agresión hipóxico-isquémica perinatal, la Academia Americana de Pediatría considero, en el año 2006, a la EHI como «una de las frustraciones clínicas no resueltas en la medicina neonatal contemporánea». (24)

La hipotermia controlada, ha sido propuesta como una intervención terapéutica para reducir la injuria neuronal secundaria.(25,26)

Ensayos clínicos han mostrado que la reducción de la temperatura corporal en 3-4°C (hipotermia moderada), mediante un enfriamiento corporal total o selectivo de la cabeza, antes de las 6 h de vida y mantenida durante 72 h, es una intervención eficaz para reducir la mortalidad y la discapacidad mayor en los niños que sobreviven a una agresión hipóxico-isquémica perinatal.

Estudios multicéntricos controlados de la última década, y revisiones sistemáticas independientes,(27–29) han mostrado que en niños con encefalopatía moderada a severa, la

hipotermia controlada determina una reducción significativa en la evolución combinada de muerte y alteración del neurodesarrollo.

En este contexto la recomendación de los expertos ha sido adherirse estrictamente a protocolos disponibles, que se han desarrollado para llevar adelante estudios multicéntricos.(30)

En modelos experimentales se evidencia una mayor neuroprotección cuanto antes se inicie. Cuando es iniciada precozmente y mantenida durante 72 h, mejora la recuperación electroencefalográfica y disminuye el edema citotóxico y la pérdida neuronal.(31)

La neuroprotección con hipotermia, se respalda en el concepto de la lesión secundaria al insulto hipóxico-isquémico como un proceso que se desarrolla y evoluciona en el tiempo.

El daño hipóxico-isquémico es un proceso complejo que comienza con la agresión y que continúa durante el periodo de recuperación. Recordamos que en la fase primaria del daño (falla energética primaria), un número de neuronas pueden morir por necrosis celular. Tras la reperfusión, tiene lugar una recuperación parcial del metabolismo oxidativo del cerebro (fase latente), pero tras esta, el metabolismo puede deteriorarse otra vez (fase de fracaso energético secundario). (30)

Es en la fase de fracaso energético secundario, cuando se produce la muerte por necrosis y por apoptosis de los elementos celulares neurales. La fase latente, constituye un periodo durante el cual una intervención terapéutica puede potencialmente aminorar la lesión cerebral y por ello, esta fase corresponde al periodo de «ventana terapéutica».

La duración de esta fase tras la resucitación, dependerá de numerosos factores, incluyendo la gravedad de la agresión y su duración, la presencia o concomitancia de factores de precondicionamiento o sensibilización. En modelos animales y en estudios realizados en humanos, su duración no es mayor de 6-15 h.(32,33)

El término de la fase latente y el inicio de la fase de fallo energético secundario, están marcados por el inicio de una fase de hiperperfusión cerebral, que contrasta con el fallo progresivo en el metabolismo oxidativo. La alteración en la función mitocondrial, caracteriza a la fase de fallo energético secundario. En esta fase, el deterioro del metabolismo oxidativo puede extenderse varios días y comienza entre las 6 y las 15 h post-agresión. (32)

En estudios realizados, se evidenció dosis-respuesta entre la gravedad de la agresión hipóxico-isquémica, y la magnitud de los cambios secundarios en el metabolismo energético cerebral(34), cuanto más grave es el fracaso energético secundario, más extenso es el daño histológico. En recién nacidos humanos, la magnitud del fracaso energético durante esta fase, se relaciona estrechamente con la gravedad de la discapacidad ulterior y la alteración del crecimiento cerebral al año y a los cuatro años de edad.(35,36)

En modelos animales, en los que se induce una agresión hipóxico-isquémica, esta etapa se caracteriza por la aparición de convulsiones, edema citotóxico, acumulación de

neuroaminoácidos excitatorios, génesis de radicales libres de oxígeno, alteración de la función mitocondrial y activación de mecanismos apoptóticos.(32,37)

Es en esta fase, en la que acontecen cambios en la disponibilidad de productos tróficos, y en la activación del sistema inmunoinflamatorio.(37) Se desconocen con exactitud los mecanismos que subyacen al efecto terapéutico de la hipotermia. El mecanismo principal parecería ser la disminución del metabolismo cerebral, ostentando acción múltiple, suprimiendo importantes vías de lesión que se activan en la fase latente (tabla 1).

Tabla 1. Mecanismos de neuroprotección asociados a hipotermia
Reducción de la liberación de NO y excitotoxicidad
Disminución de liberación de neurotransmisores
Disminución de producción de radicales libres
Disminución de actividad caspasa 3 <i>like</i>, disminución de apoptosis
Inhibición de liberación de glutamato

La hipotermia reduce la muerte celular programada o apoptosis, siendo esta la principal forma de muerte neuronal en el cerebro inmaduro, más que la muerte celular por necrosis. (3) Este efecto se vincula a la inhibición de la actividad de la caspasa-3. Esta proteasa es crítica en la ejecución de la apoptosis, tanto por liberación desde la mitocondria de factores proapoptóticos (vía intrínseca)(38) como en la apoptosis activada desde la cascada inflamatoria por citocinas e interleucinas (vía extrínseca). La hipotermia podría tener también un papel importante en la disminución del daño neuronal mediado por la activación de los receptores de glutamato NMDA. En modelos experimentales con animales, la hipotermia disminuye la actividad epileptiforme en la fase latente precoz, asociada a pérdida neuronal extensa en estriado e hipocampo mediada por glutamato, y reduce la amplitud, pero no la frecuencia de las crisis en la fase tardía de fallo energético secundario. (39)

El tratamiento con hipotermia se realiza en 3 fases, con el objetivo de alcanzar una temperatura determinada y sostenerla en ese nivel durante 72 h, permitiendo luego el recalentamiento en forma lenta. El objetivo es reducir la temperatura central a 33-34°C en la hipotermia corporal total, y a 34-35° C en la selectiva de la cabeza en 30- 40 minutos. El enfriamiento debe ser más lento en niños con necesidades de oxígeno mayores de 50%, o si aumentan más de 30% sobre el valor inicial debido al riesgo de hipertensión pulmonar. En la fase de mantenimiento se debe mantener la temperatura durante 72 h en forma estable. Puede ser necesario prolongar su duración según la respuesta del paciente al recalentamiento, como es el caso de la presencia de convulsiones. Es importante mantener una adecuada monitorización para el control de los

signos vitales, el electroencefalograma de amplitud integrada (aEEG), de ingresos y egresos, de laboratorio y confort del niño. La fase de recalentamiento, consiste en regresar al niño a la temperatura normal, en forma lenta y controlada. Se estima un incremento de 0,2-0,5°C por hora. Durante este período, debe controlarse la presión arterial, dado que puede producirse vasodilatación periférica, y el nivel de potasio en sangre, ya que los cambios en el potasio intracelular asociados al recalentamiento, pueden presentarse con hiperkalemia. Uno de los síntomas que deben controlarse es la presencia de convulsiones, ya que al incrementar la temperatura, aumenta el metabolismo cerebral y con este, el riesgo de convulsiones. Es en estos casos que se podrá detener o enlentecer la etapa de recalentamiento.

Se establece como candidatos a recibir tratamiento con hipotermia: (40)

- Edad gestacional ≥ 35 semanas.
- Edad posnatal ≤ 6 h de vida.
- Identificación de un evento centinela. La existencia de un patrón de frecuencia cardíaca fetal no tranquilizador u otros eventos, como desprendimiento de placenta, prolapso de cordón, rotura uterina, distocia de parto, embolia de líquido amniótico, hemorragia materna, bradicardia fetal grave y sostenida, trauma o paro cardiorrespiratorio y período expulsivo prolongado, son considerados eventos centinela.

Al nacer:

- pH de cordón o pH de sangre del bebé en la primera hora de vida ≤ 7 y/o déficit de base ≥ -12 .
- Puntaje de Apgar a los 10 min ≤ 5 .
- Reanimación con ventilación a presión positiva durante más de 10 min.
- Evidencia de encefalopatía de moderada a grave definida como convulsiones clínicas o la presencia de 1 signo en, al menos, 3 de las 6 categorías evaluadas en la clasificación de Sarnat y Sarnat (41)

Criterios de exclusión:

- Falta de evidencia de encefalopatía.
- Pacientes con peso al nacer (PN) menor de 1800 gramos.
- Pacientes cuyo estado general o condición clínica es muy grave.

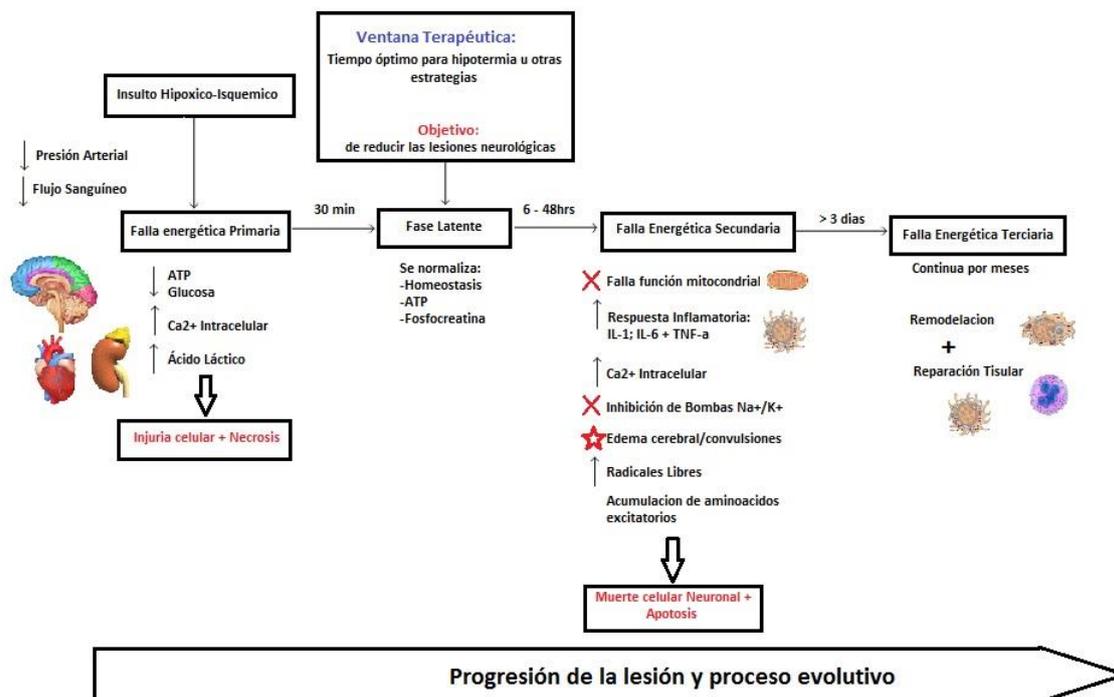


Figura 3. Fisiopatología de hipoxia - isquemia

B- OTRAS TERAPIAS:

La eritropoyetina (EPO), es una glucoproteína biológicamente activa que estimula la eritropoyesis en la médula ósea, al favorecer la proliferación y diferenciación de los precursores eritroides; también inhibe la apoptosis e inflamación producida por hipoxia en las células vasculares y neuronales, regula la angiogénesis mostrando el mismo potencial sobre las células endoteliales que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Es un activador de la biogénesis mitocondrial y dentro del SNC, parece aumentar la expresión del regulador mitocondrial PGC-1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator) en neuronas y astrocitos.

Mediante un ensayo clínico se mostró que los neonatos con encefalopatía hipóxica isquémica tratados con una combinación de EPO e hipotermia, habían mejorado los resultados neurológicos y presentando menos anomalías en la materia blanca.(42)

Otro estudio de casos y controles realizado en neonatos prematuros, que comparaba el uso de EPO con el uso de placebo, demostró una diferencia significativa en la tasa de discapacidad neurológica moderada/grave; siendo el grupo que recibió EPO el menos afectado.(43)

Se demostró que la melatonina, hormona implicada en la regulación del proceso sueño-vigilia, también funciona como antioxidante. (44)

Un estudio realizado en fetos murinos evidenció que, luego del clampeo del cordón umbilical, la melatonina reducía significativamente la fragmentación de ARN y ADN, la apoptosis celular y la inflamación tisular (45)

La terapia combinada de melatonina e hipotermia redujo la apoptosis en cerdos expuestos a daño hipóxico-isquémico (46)

5. CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS

La hipoxia – isquemia perinatal desencadena una cascada de procesos asociados a la disfunción mitocondrial. Estos procesos incluyen una fase latente, falla energética secundaria que determinan daño cerebral a corto (encefalopatía HI) y a largo plazo dejando secuelas neurológicas. La hipotermia controlada, cuando es iniciada en la fase latente, es neuroprotectora mediante la disminución de los requerimientos metabólicos, disminución de la apoptosis y disminución de excitotoxicidad. Existen otros neuroprotectores que están en fase de investigación que actúan a diferente nivel que la hipotermia que podrían coadyuvar a la acción de la hipotermia controlada. Conocer los mecanismos que disparan la falla energética secundaria y poder prevenirla nos dará una luz en el conocimiento para evitar el daño permanente del sistema nervioso central por hipoxia en el cerebro en desarrollo.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Hagberg H, Mallard C, Rousset CI, Thornton C. Mitochondria: Hub of injury responses in the developing brain. Vol. 13, *The Lancet Neurology*. 2014. p. 217–32.
2. Puka-Sundvall M, Gajkowska B, Cholewinski M, Blomgren K, Lazarewicz JW, Hagberg H. Subcellular distribution of calcium and ultrastructural changes after cerebral hypoxia-ischemia in immature rats. *Dev Brain Res* [Internet]. 2000 Dec [cited 2018 Oct 4];125(1–2):31–41. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165380600001103>
3. Blumberg RM, Cady EB, Wigglesworth JS, McKenzie JE, Edwards AD. Relation between delayed impairment of cerebral energy metabolism and infarction following transient focal hypoxia-ischaemia in the developing brain. *Exp brain Res* [Internet]. 1997 Jan [cited 2018 Oct 10];113(1):130–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9028781>
4. Gabaldón T, Huynen MA. Shaping the mitochondrial proteome. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* [Internet]. 2004 Dec [cited 2018 Oct 4];1659(2–3):212–20. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005272804002488>

5. Scheffler IE. History. Mitochondria. 1888:1–6.
6. Scheffler IE. Structure and Morphology. Integration into the cell. Mitochondria. 2007;18–55.
7. Lehninger B De. Capitulo 19 Fosforilación oxidativa. In: Principios de Bioquímica. 2010.
8. Scheffler IE. Metabolic pathways inside mitochondria. Mitochondria [Internet]. 1999;298–344. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471223891.ch6/summary>
9. Schapira AH. Mitochondrial diseases. Lancet [Internet]. 2012 May 12 [cited 2018 Oct 13];379(9828):1825–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22482939>
10. Vannucci RC. Experimental Biology of Cerebral Hypoxia-Ischemia: Relation to Perinatal Brain Damage. Pediatr Res [Internet]. 1990 Apr [cited 2018 Oct 10];27(4):317–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1971436>
11. Magistretti PJ, Pellerin L, Rothman DL, Shulman RG. Energy on demand. Science [Internet]. 1999 Jan 22 [cited 2018 Oct 10];283(5401):496–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9988650>
12. Nakajima W, Ishida A, Lange MS, Gabrielson KL, Wilson MA, Martin LJ, et al. Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat. J Neurosci [Internet]. 2000 Nov 1 [cited 2018 Oct 10];20(21):7994–8004. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11050120>
13. Gilland E, Hagberg H. NMDA Receptor–Dependent Increase of Cerebral Glucose Utilization after Hypoxia–Ischemia in the Immature Rat. J Cereb Blood Flow Metab [Internet]. 1996 Sep [cited 2018 Oct 4];16(5):1005–13. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1097/00004647-199609000-00026>
14. Rocha-Ferreira E, Hristova M. Plasticity in the neonatal brain following hypoxic-ischaemic injury. Neural Plast. 2016;2016.
15. Ferriero DM. Neonatal Brain Injury. n engl j med. 2004;35119351(4):1985–95.
16. Vannucci RC, Towfighi J, Vannucci J. Secondary Energy Failure After Cerebral Hypoxia-Ischemia in the Immature Rat. 2004 [cited 2018 Oct 13]; Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1097/01.WCB.0000133250.03953.63>
17. Johnston M V., Nakajima W, Hagberg H. Mechanisms of Hypoxic Neurodegeneration in

- the Developing Brain. *Neurosci* [Internet]. 2002 Jun 29 [cited 2018 Oct 10];8(3):212–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12061501>
18. Drury PP, Bennet L, Booth LC, Davidson JO, Wassink G, Gunn AJ. Maturation of the Mitochondrial Redox Response to Profound Asphyxia in Fetal Sheep. Frasch MG, editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 Jun 15 [cited 2018 Oct 10];7(6):e39273. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22720088>
 19. Kurinczuk JJ, White-Koning M, Badawi N. Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic–ischaemic encephalopathy. *Early Hum Dev* [Internet]. 2010 Jun [cited 2018 Oct 10];86(6):329–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20554402>
 20. Wang H, Bhutta ZA, Coates MM, Coggeshall M, Dandona L, Diallo K, et al. Global, regional, national, and selected subnational levels of stillbirths, neonatal, infant, and under-5 mortality, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* [Internet]. 2016 Oct 8 [cited 2018 Oct 13];388(10053):1725–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27733285>
 21. Northington FJ, Zelaya ME, O’Riordan DP, Blomgren K, Flock DL, Hagberg H, et al. Failure to complete apoptosis following neonatal hypoxia-ischemia manifests as “continuum” phenotype of cell death and occurs with multiple manifestations of mitochondrial dysfunction in rodent forebrain. *Neuroscience* [Internet]. 2007 Nov 23 [cited 2018 Oct 10];149(4):822–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17961929>
 22. Hagberg H, Gilland E, Diemer N-H, Andiné P. Hypoxia-Ischemia in the Neonatal Rat Brain: Histopathology after Post-Treatment with NMDA and Non NMDA Receptor Antagonists. *Neonatology* [Internet]. 1994 [cited 2018 Oct 10];66(4):205–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7865635>
 23. Sanders RD, Manning HJ, Robertson NJ, Ma D, Edwards AD, Hagberg H, et al. Preconditioning and Postinsult Therapies for Perinatal Hypoxic–Ischemic Injury at Term. *Anesthesiology* [Internet]. 2010 Jul [cited 2018 Oct 4];113(1):233–49. Available from: <http://anesthesiology.pubs.asahq.org/Article.aspx?doi=10.1097/ALN.0b013e3181dc1b84>
 24. Blackmon LR, Stark AR, American Academy of Pediatrics Committee on Fetus and Newborn. Hypothermia: A Neuroprotective Therapy for Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Pediatrics* [Internet]. 2006 Mar 1 [cited 2018 Oct 10];117(3):942–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16510680>

25. Shankaran S, Laptook AR, Ehrenkranz RA, Tyson JE, McDonald SA, Donovan EF, et al. Whole-Body Hypothermia for Neonates with Hypoxic–Ischemic Encephalopathy. *N Engl J Med* [Internet]. 2005 Oct 13 [cited 2018 Oct 10];353(15):1574–84. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMcp050929>
26. Eicher DJ, Wagner CL, Katikaneni LP, Hulsey TC, Bass WT, Kaufman DA, et al. Moderate hypothermia in neonatal encephalopathy: Safety outcomes. *Pediatr Neurol* [Internet]. 2005 Jan [cited 2018 Oct 10];32(1):18–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15607599>
27. Gluckman PD, Wyatt JS, Azzopardi D, Ballard R, Edwards AD, Ferriero DM, et al. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. *Lancet* [Internet]. 2005 Feb [cited 2018 Oct 10];365(9460):663–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15721471>
28. Azzopardi D V., Strohm B, Edwards AD, Dyet L, Halliday HL, Juszczak E, et al. Moderate Hypothermia to Treat Perinatal Asphyxial Encephalopathy. *N Engl J Med* [Internet]. 2009 Oct 10 [cited 2018 Oct 10];361(14):1349–58. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0900854>
29. Schulzke SM, Rao S, Patole SK. A systematic review of cooling for neuroprotection in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy – are we there yet? *BMC Pediatr* [Internet]. 2007 Dec 5 [cited 2018 Oct 10];7(1):30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17784966>
30. Azzopardi D, Edwards AD. Hypothermia. *Semin Fetal Neonatal Med* [Internet]. 2007 Aug 1 [cited 2018 Oct 10];12(4):303–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17392043>
31. Shah PS, Ohlsson A, Perlman M. Hypothermia to Treat Neonatal Hypoxic Ischemic Encephalopathy. *Arch Pediatr Adolesc Med* [Internet]. 2007 Oct 1 [cited 2018 Oct 10];161(10):951. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17909138>
32. Gunn AJ, Gunn TR, Gunning MI, Williams CE, Gluckman PD. Neuroprotection with prolonged head cooling started before postischemic seizures in fetal sheep. *Pediatrics* [Internet]. 1998 Nov [cited 2018 Oct 10];102(5):1098–106. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9794940>
33. Gunn AJ, Gunn TR, de Haan HH, Williams CE, Gluckman PD. Dramatic neuronal rescue with prolonged selective head cooling after ischemia in fetal lambs. *J Clin Invest* [Internet]. 1997 Jan 15 [cited 2018 Oct 10];99(2):248–56. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9005993>

34. Lorek A, Takei Y, Cady EB, Wyatt JS, Penrice J, Edwards AD, et al. Delayed ("secondary") cerebral energy failure after acute hypoxia-ischemia in the newborn piglet: continuous 48-hour studies by phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *Pediatr Res* [Internet]. 1994 Dec [cited 2018 Oct 10];36(6):699–706. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7898977>
35. Roth SC, Baudin J, Cady E, Johal K, Townsend JP, Wyatt JS, et al. Relation of deranged neonatal cerebral oxidative metabolism with neurodevelopmental outcome and head circumference at 4 years. *Dev Med Child Neurol* [Internet]. 1997 Nov [cited 2018 Oct 10];39(11):718–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9393884>
36. Hanrahan JD, Cox IJ, Azzopardi D, Cowan FM, Sargentoni J, Bell JD, et al. Relation between proton magnetic resonance spectroscopy within 18 hours of birth asphyxia and neurodevelopment at 1 year of age. *Dev Med Child Neurol* [Internet]. 1999 Feb [cited 2018 Oct 10];41(2):76–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10075092>
37. Hagberg H, Mallard C, Jacobsson B. Role of cytokines in preterm labour and brain injury. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol* [Internet]. 2005 Mar [cited 2018 Oct 10];112:16–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15715588>
38. Roelfsema V, Bennet L, George S, Wu D, Guan J, Veerman M, et al. Window of Opportunity of Cerebral Hypothermia for Postischemic White Matter Injury in the Near-Term Fetal Sheep. *J Cereb Blood Flow Metab* [Internet]. 2004 Aug 31 [cited 2018 Oct 10];24(8):877–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15362718>
39. Bennet L, Dean JM, Wassink G, Gunn AJ. Differential Effects of Hypothermia on Early and Late Epileptiform Events After Severe Hypoxia in Preterm Fetal Sheep. *J Neurophysiol* [Internet]. 2007 Jan [cited 2018 Oct 10];97(1):572–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17093117>
40. American College of Obstetricians and Gynecologists Second Edition. Neonatal encephalopathy and neurologic outcome. Task Force Neonatal Enceph [Internet]. 2014 Apr [cited 2018 Oct 10];123(4):896–901. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24785633>
41. Sarnat HB, Sarnat MS. Neonatal encephalopathy following fetal distress. A clinical and electroencephalographic study. *Arch Neurol* [Internet]. 1976 Oct [cited 2018 Oct 13];33(10):696–705. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/987769>

42. Shi Y, Pan F, Li H, Pan J, Qin S, Shen C. Role of Carbon Monoxide and Nitric Oxide in Newborn Infants With Postasphyxial Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Pediatrics*. 2000 Dec;106(6):1447–51.
43. Song J, Sun H, Xu F, Kang W, Gao L, Guo J, et al. Recombinant human erythropoietin improves neurological outcomes in very preterm infants. *Ann Neurol*. 2016 Jul;80(1):24–34.
44. Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Abe M, Pablos M, Menendez-Pelaez A, Chen L-D, et al. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int*. 1995 May;26(5):497–502.
45. Miller SL, Yan EB, Castillo-Meléndez M, Jenkin G, Walker DW. Melatonin provides neuroprotection in the late-gestation fetal sheep brain in response to umbilical cord occlusion. *Dev Neurosci*. 2005;27(2–4):200–10.
46. Robertson NJ, Faulkner S, Fleiss B, Bainbridge A, Andorka C, Price D, et al. Melatonin augments hypothermic neuroprotection in a perinatal asphyxia model. *Brain*. 2013 Jan;136(1):90–105.