



DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL Y ALTERACIONES HEMODINÁMICAS ASOCIADAS A HIPOXIA E HIPERCAPNIA EN UN MODELO PORCINO NEONATO

Estudio realizado en el Departamento de Neonatología
Hospital de Clínicas 2022

Ciclo Metodología Científica II - 2022 Grupo 84

Autores

Martínez S¹, Morales C¹, Mosteiro N¹, Udaquiola P¹, Velázquez G¹, Villas Boas E¹, Rodríguez M²,
Valez V³

1. Ciclo de Metodología Científica II 2022-Facultad de Medicina Universidad de la República,
Montevideo, Uruguay.

2. Departamento de Neonatología Hospital de Clínicas -Facultad de Medicina-Universidad de la
República, Montevideo, Uruguay.

3. Departamento de Bioquímica y Biofísica – Facultad de Odontología – Universidad de la
República, Montevideo, Uruguay.

Metodología Científica II-2022. Grupo N° 84

Índice de contenidos, tablas y figuras

RESUMEN	3
SUMMARY	4
INTRODUCCIÓN	5
OBJETIVOS	9
METODOLOGÍA	10
RESULTADO	12
Fig 1. a) Evolución del pH durante todo el experimento (120 minutos). b) Evolución de pO ₂ y pCO ₂ arterial durante todo el experimento (120 minutos).	12
Fig 2. Evolución del BE, HCO ₃ y lactato durante todo el experimento (120 minutos).	13
Fig 3. a) Evolución del pH durante todo el experimento (124 minutos) del modelo expuesto a la hipoxia. b) Evolución de pCO ₂ y pO ₂ arterial durante todo el experimento (124 minutos) del modelo expuesto a la hipoxia.	14
Fig 4. Evolución del lactato, HCO ₃ y BE durante todo el experimento del modelo expuesto a hipoxia (124 minutos).	14
Tabla 1. Parámetros hemodinámicos y de saturación en condición control.	15
Tabla 2. Parámetros hemodinámicos y de saturación en condición hipoxia.	15
Fig 5. Parámetros de consumo de oxígeno correspondiente a respiración mitocondrial frente a la adición de sustratos. Los valores son expresados en media y desvío estándar.	16
Tabla 3. Parámetros de consumo de oxígeno correspondiente a respiración mitocondrial frente a la adición de sustratos. Los valores son expresados en media y desvío estándar.	17
DISCUSIÓN	18
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	20
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
AGRADECIMIENTOS	24
ANEXO	25

RESUMEN

La asfixia perinatal es una complicación frecuente durante el parto representando una de las principales causas de mortalidad neonatal a nivel mundial [1]. Siendo la falla mitocondrial una pieza clave de la disfunción y daño cerebral, nos planteamos estudiar los efectos de la hipoxia en un cerebro inmaduro [2].

Nos proponemos evaluar la función mitocondrial en tejido cerebral y alteraciones hemodinámicas en un modelo porcino neonato expuesto a hipoxias agudas seriadas acompañadas de hipercapnia.

Utilizamos un modelo animal porcino neonato, *Sus Scrofa domestica*, de 1 a 3 días de vida. Durante el modelo experimental realizamos la monitorización continua de signos vitales, hemodinámicos y NIRS. Sometiéndose a hipoxia durante 4 minutos en 3 oportunidades con intervalos de 30 minutos de normoxia. Luego de la eutanasia se extraen muestras de biopsias cerebrales y se mide parámetros e índices respiratorios por consumo de oxígeno mediante electrodo de Clark, Oroboros Oxygraph. Expresándose los resultados en promedio y desvío estándar, realizándose test de T con significancia ($p \leq 0.05$). Estos muestran aumento de la frecuencia cardíaca en hipoxia inicial, posteriormente una bradicardia con aumento de la presión arterial compensadora en hipoxia, un aumento sostenido al lactato como respuesta al metabolismo anaerobio y disminuyendo la saturación regional cerebral en hipoxia. Evidenciamos una disfunción mitocondrial en hipoxia con hipercapnia, disminución de todos los parámetros e índices respiratorios en hipoxia, siendo significativa la reducción de la respiración máxima, la capacidad de reserva y la respiración no mitocondrial. Estos parámetros mitocondriales alterados evidencian una mitocondria comprometida en su función por la hipoxia, con una capacidad reducida de responder al aumento de las demandas metabólicas. Concluimos que la hipoxia e hipercapnia aguda severa y seriada inducen el metabolismo anaeróbico, disfunción mitocondrial con inhibición de los complejos de la cadena respiratoria e incapacidad del tejido de responder a mayores demandas energéticas.

Palabras claves: Hipoxia, neonatal, cerebral, disfunción mitocondrial.

SUMMARY

Perinatal asphyxia is a prevalent complication during the birth process, being one of the main worldwide causes of neonatal mortality. Mitochondrial failure plays a leading role in dysfunction and brain damage, we intend to study hypoxia effects on an immature brain.

The aim of this research is to evaluate the tissue's brain mitochondrial function and its haemodynamic disturbances in a neonatal pig model exposed to acute serial hypoxias combined with hypercapnia.

In order to accomplish this research, we use a neonatal pig model, *Sus Scrofa domestica*, being 1 to 3 days old. During the investigation, we have continuously monitored the vital signs, hemodynamic parameters and NIRS. It is exposed to hypoxia through the obstruction of the endotracheal tube in 3 lapses of 4 minutes with intervals of 30 minutes of normoxia. After euthanasia has been done, we take brain biopsy samples and measure through respiratory parameters and indices the oxygen consumption with a Clark electrode, Oroboros Oxygraph. The test is paramount in this research and the significance level that is used is of $p \leq 0.05$ and the results are expressed in average and standard deviation. This shows an increase in heart rate, then a bradycardia with an increase of the blood pressure compensating the hypoxia.

We prove that a mitochondrial failure in hypoxia with hypercapnia, decreased from all the respiratory parameters and indexes, taking maximum respiration, reserve capacity and non-mitochondrial respiration.

These changes in mitochondrial parameters establish a failure in its function due to hypoxia with a decrease in the capacity of response as the metabolic requirements rise. All things considered, the severe, sharp and serial hypoxia and hypercapnia cause anaerobic metabolism, mitochondrial dysfunction with inhibition of respiratory chain and tissues incapacity to respond to major energetic demands.

INTRODUCCIÓN

El cerebro humano es un órgano biológico y social que se encarga de todas las funciones y procesos relacionados con el pensamiento, imaginación, acción, escritura, emoción, conciencia, que gracias a la plasticidad entendida como la capacidad que posee el cerebro para cambiar respondiendo a las modificaciones del entorno, este puede modificar las conexiones entre neuronas, la red de capilares que les proporcionan oxígeno y nutrientes para producir nuevas neuronas.

La principal fuente de energía para las células cerebrales son el oxígeno y la glucosa, 20% de este oxígeno se va a utilizar para la producción de ATP, el cual un 50% del mismo es utilizado en movimientos iónicos y aumenta cuando se incrementa la actividad neuronal [3].

El transportador de Na^+ y K^+ a través de la membrana plasmática y la $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPasa tienen un rol fundamental para generar los gradientes iónicos los cuales son los mayores responsables del consumo de energía para generar los impulsos eléctricos [4].

Es por esto que cuando nos enfrentamos a una situación de hipoxia-isquemia y esta es lo suficientemente grave para dañar el cerebro, se va a presentar un síndrome neurológico denominado encefalopatía hipóxica isquémica (EHI) [5].

Cuando nos referimos a encefalopatía hablamos de un funcionamiento anormal del cerebro tras la injuria, que se caracteriza por trastornos de la vigilia, dificultad respiratoria, trastornos motores tanto del tono como de los reflejos y convulsiones [6].

La EHI constituye un alto riesgo de déficits neurológicos a largo plazo en los recién nacidos.

La hipoxia e isquemia suficientemente severa desencadena cascadas metabólicas que se van a dividir en distintas fases, las cuales comienzan inmediatamente tras la isquemia.

En los primeros minutos tras el daño, el descenso en la perfusión de oxígeno y de los niveles de glucosa provoca la depleción de compuestos de alta energía, principalmente trifosfato de adenosina (ATP) y fosfocreatina, necesarios para mantener el metabolismo intracelular. Este proceso desencadena un fallo energético que conlleva despolarización neuronal y fallo en las bombas de sodio (Na^+) y potasio (K^+), dependientes de ATP [7]. Después del episodio hipóxico, los niveles de ATP y fosfocreatina vuelven transitoriamente al nivel línea de base, luego existe una segunda fase de consumo de energía celular en la cual se agotan las reservas metabólicas; es durante esta que se produce el mayor daño a nivel cerebral, el cual va a estar seguido de respuestas fisiopatológicas que van a afectar las mitocondrias. Esta hipoxia va a establecer el

desacoplamiento del metabolismo oxidativo, desencadenando edema citotóxico, hipoperfusión cerebral y muerte célula [8].

La función primaria de las mitocondrias es la producción de ATP, el cual es el combustible de la mayoría de los procesos celulares. Metabolizan el acetil coenzima A mediante el ciclo enzimático del ácido cítrico, dando como productos al CO_2 y al NADH. Es el NADH el que cede electrones a una cadena de transportadores de electrones que se encuentra en la membrana mitocondrial interna.

Estos electrones pasan de un transportador a otro llegando como último paso al O_2 , reduciéndolo por 2 electrones resultando en H_2O . Este transporte de electrones se acopla al transporte de protones desde la matriz hasta el espacio intermembranoso.

Es este gradiente de protones el que permite la síntesis de ATP gracias a la ATP sintasa. La fosforilación del ADP sumado al proceso que necesita el oxígeno como aceptor final de electrones, a este proceso se le llama fosforilación oxidativa [9-12].

Cadena de transporte de electrones

La cadena de transporte de electrones está ubicada en la membrana mitocondrial interna. La misma está constituida por 4 complejos enzimáticos, denominados Complejo I al IV.

NADH-reductasa o complejo I en este complejo ocurren una serie de reacciones redox, en la que interviene una coenzima flavínica (FMN o flavina mononucleótido), y un centro ferrosulfurado en el que el átomo de hierro es el que realiza el intercambio electrónico para cederlos a la coenzima Q. El flujo de dos electrones desde el NADH hasta la coenzima Q o ubiquinona, da lugar al bombeo de cuatro H^+ a través de la membrana mitocondrial interna, desde la matriz hacia su cara citoplasmática [13,14].

El complejo II o succinato-reductasa está situado a nivel de la membrana, y uno de sus componentes es una enzima del ciclo del ácido cítrico, la succinato deshidrogenasa, que cataliza la reacción de succión a fumarato. Uno de los productos de la reacción, la coenzima reducida FADH_2 no abandona el complejo, transfiriendo los electrones en el interior del mismo a un centro Fe-S, para posteriormente ser cedidos a la coenzima Q. Esta es la única enzima del ciclo del ácido cítrico que no se encuentra libre en la solución de la matriz mitocondrial, sino que está unida fuertemente a la membrana mitocondrial interna [14].

Complejo III o citocromo-reductasa dispone de grupos prostéticos hemo, similares a los de la hemoglobina, con un átomo de Fe que se alterna entre su estado reducido o ferroso (Fe^{2+}) y el estado oxidado o férrico (Fe^{3+}). A través de la siguiente secuencia de reacciones los electrones

son transferidos hacia el citocromo c, este flujo genera un potencial suficiente para bombear 2 H⁺ hacia el lado citoplasmático. La diferencia de potencial de transferencia es menor que en el complejo I y por lo tanto la capacidad de mover hidrogeniones también es menor [14,15].

A través del último complejo la citocromo-oxidasa. La misma acepta cuatro electrones desde el citocromo c, a través de dos grupos hemo que utilizan átomos de cobre y los transfiere a una sola molécula de O₂ formando dos moléculas de H₂O.

El oxígeno molecular es un aceptor de electrones con un fuerte carácter oxidante, tiene alta tendencia a captar electrones, pero reacciona muy lentamente a menos que sea activado catalíticamente. Esta activación es realizada por este complejo, el cual también funciona como una bomba de protones, realizando un movimiento neto de 4 H⁺ hacia el espacio intermembranoso.

Resumidamente, en la cadena de transporte electrónico se produce la oxidación de las coenzimas reducidas (NADH y FADH₂), por el potencial redox del O₂/H₂O, y la reducción del oxígeno para formar agua.

Las reacciones parciales que ocurren son: A) $\frac{1}{2} \text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O}$ Eo' = 0,82 V

B) $\text{NAD}^+ + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightleftharpoons \text{NADH} + \text{H}^+$ Eo' = -0,32 V

Y sustrayendo B de A, se obtiene la reacción global siguiente, $\frac{1}{2} \text{O}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O} + \text{NAD}^+$
 $\Delta\text{Eo}' = 0,82 - (-0,32) = +1,14 \text{ V}$

La diferencia de potencial entre estos pares es grande por lo que la variación de energía libre también lo es ($\Delta\text{Go}' = -52,6 \text{ Kcal/mol}$), lo que hace de esta reacción un proceso fuertemente exergónico.

Esta diferencia de potencial constituye la fuerza directriz para el desarrollo de la cadena de transporte electrónica y de la fosforilación oxidativa. Para lograr el máximo aprovechamiento energético, el proceso de óxido-reducción no se desarrolla en una única reacción como la representada anteriormente, sino que se desarrolla en una secuencia de varias reacciones.

La hipótesis quimiosmótica o de Mitchell, permitió la teorización y posterior corroboración del mecanismo de dicho acoplamiento. El transporte de electrones y la síntesis de ATP estaban acoplados a través de un gradiente de protones, o hidrogeniones, entre ambas caras de la membrana interna. La bomba de protones, desarrollada por los diferentes complejos de la cadena de transporte de electrones, genera un aumento de concentración de H⁺ en la cara citoplasmática, y un gradiente eléctrico debido a la carga positiva movilizada por los protones hacia el exterior de la membrana.

Estos gradientes establecen una fuerza protomotriz (que mueve los protones) que conduce a los hidrogeniones hacia el interior, y utilizando esta fuerza el complejo enzimático ATP-sintasa (también denominada ATPasa mitocondrial) formaría enlaces de alta energía en forma de moléculas de ATP.

Síntesis de ATP

La ATP sintasa tiene gran tamaño, se puede observar por microscopía electrónica. Está formada por dos subunidades F₀, una porción hidrofóbica que atraviesa la integridad de la membrana mitocondrial interna, formada por cuatro cadenas polipeptídicas y que funcionalmente constituye el conducto de protones. La otra subunidad F₁ protruye en el lado interno de la membrana, y está formada por cinco clases de cadenas polipeptídicas, α ₃, β ₃, γ , δ y ϵ . Su rol fundamental es catalizar la formación de un enlace de alta energía, sintetizando ATP. El tramo intermedio que une ambas subunidades está formado por varias proteínas reguladoras.

El sistema mediante el cual funciona este complejo ha permitido observar que el ATP se forma rápidamente aún en ausencia de gradiente, pero la carencia de fuerza protomotriz no permite la separación del ATP formado el cual permanece unido a la ATP sintasa. Se estima de forma aproximada que debido al flujo de 3H⁺, se da origen a la liberación de 1 ATP. Cada par de electrones proveniente del NADH, genera un flujo neto de protones a través del complejo I, III y IV de 4, 2 y 4 protones respectivamente, lo que se traducirá en la síntesis de 3 ATPs y la entrada de electrones a través del FADH₂ genera un flujo de protones a través del complejo III y IV de 2 y 4 protones respectivamente, que permitirá la formación de 2 ATP [16].

OBJETIVOS

Objetivos generales

Evaluar la función mitocondrial basal, parámetros gasométricos, hemodinámicos y de saturación de oxígeno en un modelo porcino neonato luego de hipoxias agudas seriadas acompañadas de hipercapnia.

Objetivos específicos

- 1- Desarrollar un modelo animal de hipoxia aguda, reiterada con hipercapnia.
- 2- Monitorizar parámetros de función cerebral.
- 3- Monitorizar efectos de la hipoxia en parámetros hemodinámicos y gasométricos.
- 4- Medir función mitocondrial a partir de biopsias cerebrales.

METODOLOGÍA

Este trabajo de investigación fue realizado siguiendo las normativas nacionales vigentes y cuenta con la aprobación de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA).

Se utilizan porcinos *Sus Scrofa domestica* de 1 a 3 de vida, con un peso aproximado de 1,300 kg. Usamos este modelo animal ya que hay evidencia de que los resultados se pueden recapitular con lo que se observa en el cerebro neonato humano [17].

El modelo comienza mediante inducción anestesia con ketamina intramuscular y mantenimiento de anestesia general total con ketamina, midazolam y fentanilo, administrado por infusión continua por vía intravenosa.

Posteriormente se realiza intubación con tubo endotraqueal con la consecuente ventilación mecánica y monitorización continua de la saturometría de pulso, FC, la función cerebral por aEEG (monitorización de frecuencia cerebral) y la oxigenación general regional usando NIRS (monitorización de oxigenación cerebral regional). Dicha monitorización se realizará en un intervalo de 15 minutos, a su vez se realiza una gasometría arterial basal y cada 30 minutos en el grupo control, en el grupo hipoxia se realiza una gasometría arterial basal y 3 gasometrías arteriales durante cada hipoxia, correspondiendo las mismas antes de iniciar la hipoxia, a los 2 minutos y a los 4 minutos.

Se utilizarán 2 grupos, uno como control (4 cerdos) y otro como hipoxia (4 cerdos). La hipoxia consta de un primer episodio hipóxico durante un periodo de 4 min (aguda H1 hipoxia), reanimación con FiO₂ 0,21 (Post H1); Otra hipoxia de 4 min (H2) que repite luego de 30 minutos desde el primer episodio con iguales características; Otra hipoxia de 4 min (H3) que se repite luego de 1 hora desde el primer episodio con iguales características.

Inmediatamente obtenidos los datos gasométricos, hemodinámicos y de saturación de oxígeno necesarios se realiza la eutanasia del porcino para luego extraer una muestra mediante biopsia cortical en la que se mide el consumo de oxígeno mitocondrial mediante el uso de un electrodo de oxígeno de tipo Clark, luego la relación del control respiratorio se mide posterior a la adición de succinato más ADP, oligomicina, FCCP y antimicina A en el Oroboros Oxygraph que es un respirometro de alta resolución a 37.0 grados Celsius.

Los valores se presentan como media $\pm$ DS, para comparaciones se utilizará el T-test y prueba de ANOVA para datos paramétricos o Chi cuadrado para asociaciones de variables discontinuas. Siendo el valor de significancia $\leq$ a 0.05.

RESULTADOS

En la figura 1 podemos observar la evolución de pH, PCO₂ y PO₂ en todo el experimento en condiciones basales (control), el cual tuvo una duración de 2 horas. Observamos que no hubo cambios significativos en el pH y en la PO₂, teniendo en cuenta que se mantuvieron los parámetros ventilatorios constantes en todo el experimento. La PO₂ al inicio del experimento presenta un valor de 93.3 mmHg y posteriormente disminuye hasta 73.1 mmHg al final del experimento, debido a que al inicio del mismo se realizaron maniobras de intubación, ventilación, monitorización y colocación de vías profundas lo que afectó a la PO₂ inicial que posteriormente se estabiliza.

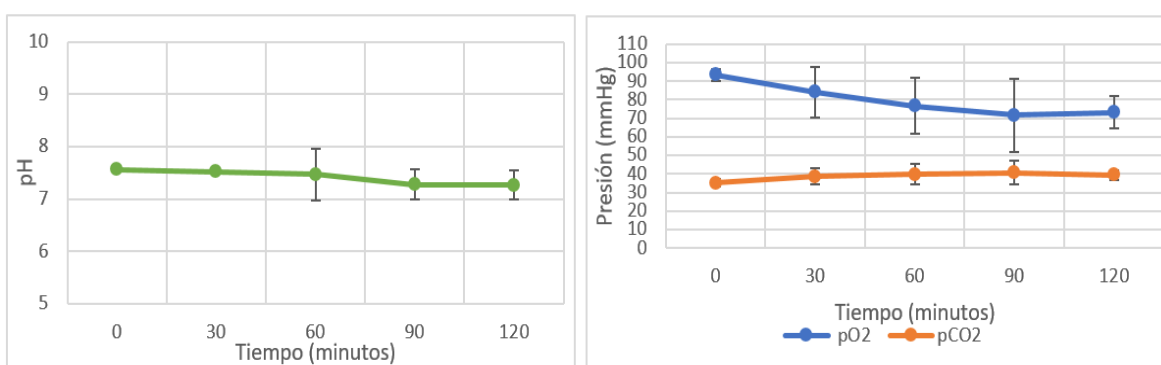


Fig 1. a) Evolución del pH durante todo el experimento (120 minutos). b) Evolución de pO₂ y pCO₂ arterial durante todo el experimento (120 minutos).

En cuanto a la evolución del metabolismo ácido-base, mediante la medida de exceso de base (BE), lactato y HCO₃ los cuales se mantienen estables en todo el experimento (figura 2).

De esta manera concluimos que una vez realizadas las maniobras de monitorización y ventilación invasiva, estas no afectaron los parámetros gasométricos y el metabolismo ácido-base del modelo.

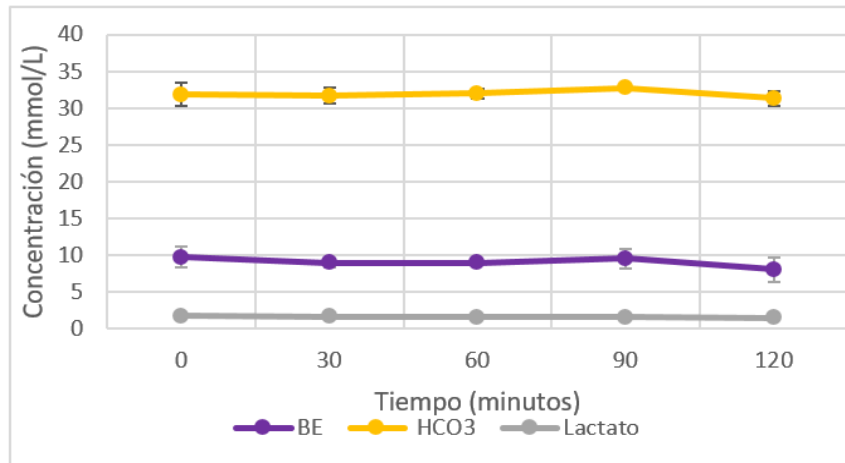


Fig 2. Evolución del BE, HCO3 y lactato durante todo el experimento (120 minutos).

Observamos que en las hipoxias agudas y reiteradas podemos observar que en la evolución el pH, PCO2 y PO2 presentaron cambios significativos. Con respecto al pH se aprecia el descenso del mismo resultando en una acidemia en los momentos donde el modelo está expuesto a hipoxia. El valor de la PCO2 se vio afectado de tal forma que tuvo un aumento considerable constituyendo una hipercapnia que se observa en los 3 episodios de hipoxia en respuesta a la hipoventilación por obstrucción del tubo endotraqueal. Durante el episodio se produce hipoxia aguda llegando a valores de PO2 por debajo de 20 mmHg (ver figura 3).

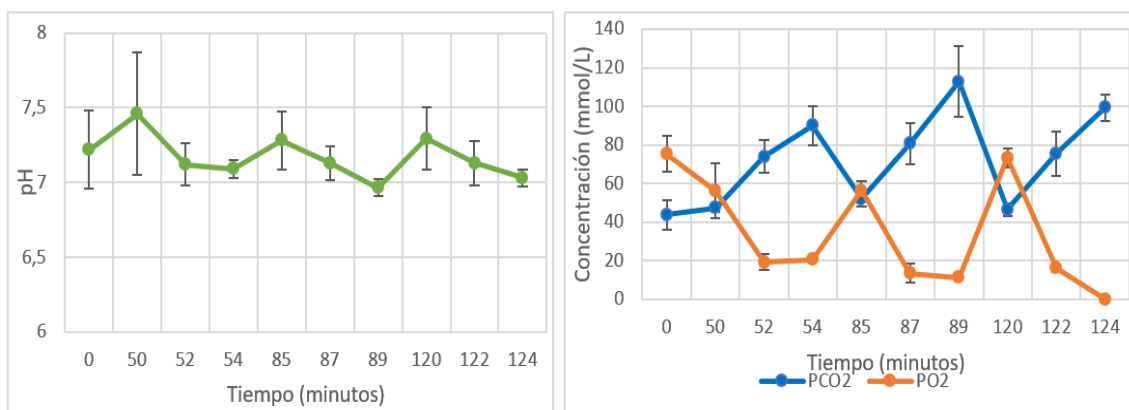


Fig 3. a) Evolución del pH durante todo el experimento (124 minutos) del modelo expuesto a la hipoxia. b) Evolución de pCO₂ y pO₂ arterial durante todo el experimento (124 minutos) del modelo expuesto a la hipoxia.

Concomitantemente con la hipoxia e hipercapnia se observa un aumento del déficit de base, que esto se acompaña con un aumento progresivo del lactato que inicia en 1.93 ± 0.45 y finaliza en 7.9 ± 3 mmol/L. Mientras que en el HCO₃ no se observan cambios significativos ya que el HCO₃ es un mecanismo de compensación renal a la acidosis mantenida en el tiempo (ver figura 4).

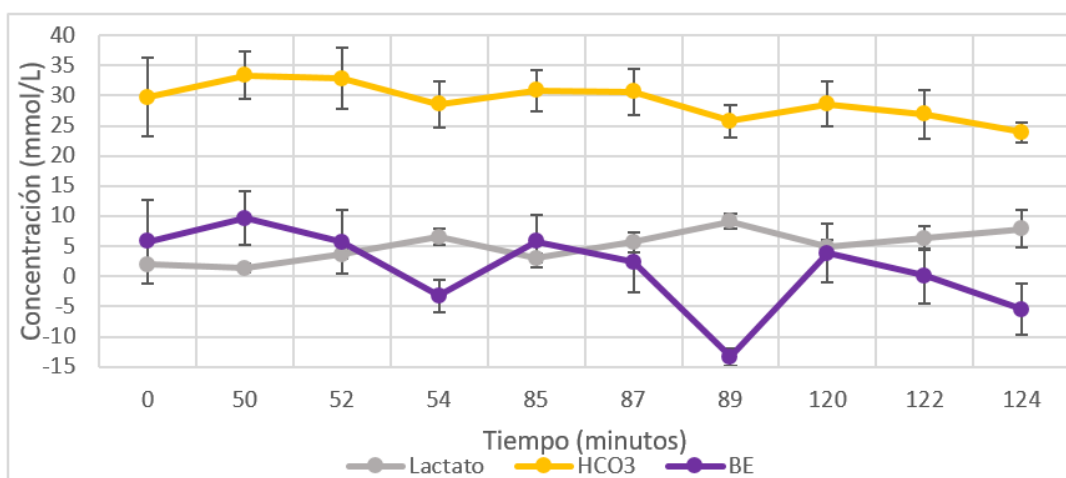


Fig 4. Evolución del lactato, HCO₃ y BE durante todo el experimento del modelo expuesto a hipoxia (124 minutos).

En la tabla 1. Se muestra la descripción de los parámetros hemodinámicos (Presión arterial sistólica (PAS), Presión arterial diastólica (PAD), presión arterial media (PAM) y frecuencia cardiaca (FC) en el modelo control. A su vez también se evaluaron parámetros de saturación de oxígeno regional, cerebral y somático (NIRS C y NIRS S) y saturación arterial (Sat O₂). En conclusión, los parámetros anteriormente mencionados se mantienen estables durante todo el experimento.

	Tiempo en minutos										
	Basal 0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150
PAS	69,5 ± 10,6	63,5 ± 10,6	67 ± 8,5	67 ± 4,2	66,5 ± 0,7	66,5 ± 2,1	65 ± 4,2	67 ± 9,8	69 ± 12,7	67 ± 14,1	72,5 ± 3,5
PAD	47,5 ± 0,7	42,5 ± 3,5	45 ± 1,4	44,5 ± 0,7	44 ± 1,4	44,5 ± 3,5	46 ± 2,8	45 ± 1,4	47 ± 4,2	47 ± 2,8	47 ± 1,4
PAM	57,5 ± 3,5	52,5 ± 6,3	55,5 ± 3,5	54,5 ± 0,7	54,5 ± 0,7	54 ± 2,8	54,5 ± 2,1	45,5 ± 17,6	47 ± 19,7	56 ± 7,1	57,5 ± 2,1
FC	126 ± 5,6	126 ± 11,3	124 ± 8,5	123 ± 4,2	125 ± 1,4	122 ± 5,6	127,5 ± 3,5	140 ± 29,7	126,5 ± 5,0	143 ± 38,2	121 ± 7,1
NIRS C	-	-	66 ± 7	65,5 ± 6,3	62 ± 0	57,5 ± 3,5	56 ± 4,2	55,5 ± 3,5	58 ± 4,2	58 ± 4,2	56 ± 5,6
NIRS S	-	79 ± 0	80 ± 0	71,5 ± 12,0	62 ± 0	72 ± 11,3	72,5 ± 14,8	68 ± 18,3	69,5 ± 17,6	69 ± 14,1	67 ± 12,7
Sat O2	98 ± 0	99,5 ± 0,7	98 ± 0	97,5 ± 3,5	98 ± 2,8	98 ± 1,4	97 ± 1,4	96 ± 4,2	97 ± 2,8	97 ± 2,8	97,5 ± 2,1

Tabla 1. Parámetros hemodinámicos y de saturación en condición control.

Los valores son expresados en media y DE. Basal corresponde al inicio del experimento. Los valores indicados con (-) son datos inexistentes.

	Tiempo en minutos											
	Basal	50	52	54	69	85	87	89	104	120	122	124
PAS (mmHg)	81,5 ± 6,6	72,3 ± 8,3	100 ± 10,9	94,3 ± 14,2	67 ± 15,3	69 ± 8,8	85,5 ± 8,2	78,5 ± 8,7	63,5 ± 11,09	65,3 ± 8,6	77,25 ± 13,4	66,5 ± 12,6
PAD (mmHg)	47,5 ± 5,2	45,8 ± 3,4	65,8 ± 13,1	55 ± 9,6	42 ± 12,4	41,8 ± 6,5	55,8 ± 13,4	47,3 ± 10,9	38 ± 5,35	40 ± 4,9	51 ± 5,7	37,5 ± 6,6
PAM (mmHg)	63 ± 4,9	59 ± 3,3	76 ± 16,1	71,8 ± 8,3	52,8 ± 31,5	53,5 ± 7	67,8 ± 10,1	58,5 ± 9,14	49,5 ± 7	54 ± 4,54	60,5 ± 9,3	48 ± 6,9
FC (lpm)	154,8 ± 18,7	138 ± 17,1	126,2 ± 13,1	139,8 ± 37,8	141 ± 30,3	154 ± 31,9	119,5 ± 41,5	97,3 ± 21,2	137,8 ± 18,7	159,5 ± 21,9	136 ± 16,8	91 ± 28,9
NIRS C (% O2)	46,5 ± 1,7	47 ± 5,7	15 ± 0	16 ± 2	41,8 ± 11,6	40,5 ± 7,3	15 ± 0	15 ± 0	41 ± 11,6	39,5 ± 10,3	15 ± 0	15 ± 0
NIRS S (% O2)	60,2 ± 4,8	55,8 ± 3,8	23,2 ± 5,6	23,8 ± 6,1	44,5 ± 7,3	42,8 ± 9,2	23 ± 6,1	22,8 ± 6	45,8 ± 9,5	48,3 ± 7,5	22,8 ± 6,1	19,5 ± 5,3
Sat O2 (% O2)	97,5 ± 2,6	96,75 ± 4,7	41 ± 47,5	#	92,5 ± 4,2	92,3 ± 3,6	59 ± 45,7	#	97,5 ± 1,7	98,5 ± 1,7	43,5 ± 38,3	#

Tabla 2. Parámetros hemodinámicos y de saturación en condición hipoxia.

Los valores son expresados en media y DE. Basal corresponde al inicio del experimento. PAS, PAD y PAM se mide en mmHg, FC en lpm, NIRS C, NIRS S y SatO2 en %O2. El minuto 50 corresponde a los valores previos al inicio de la primera hipoxia; el minuto 52 corresponde a los dos minutos de iniciada la primera hipoxia (intra hipoxia 2) y el minuto 54 corresponde al final de la primera hipoxia (intra hipoxia 4). El minuto 87 y 89 corresponde a (intra hipoxia 2) e (intra

hipoxia 4) respectivamente, de la segunda hipoxia. El minuto 122 y 124 corresponde a (intra hipoxia 2) e (intra hipoxia 4) respectivamente, de la tercera hipoxia. Los minutos 69, 85, 104, 120 corresponden a normoxia. (#) Corresponde a la saturación de pulso arterial menor a 20 mmHg límite de detección del equipo.

En la tabla 2 se describen los parámetros hemodinámicos (presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD), presión arterial media (PAM) y frecuencia cardiaca (FC)) en el modelo hipoxia. A su vez también se evaluaron parámetros de saturación de oxígeno regional, cerebral y somático (NIRS C y NIRS S) y saturación arterial (Sat O₂) en situación de hipoxia. Podemos observar que dentro de los parámetros hemodinámicos, la PA aumenta en los 3 episodios de hipoxia en relación a la normoxia previa, en la primera hipoxia el aumento es significativo (p valor= 0.02), en la segunda y tercera hipoxia hay un aumento no significativo respecto a la PA en normoxia previa. En cuanto a la FC no hay variaciones en la primera, sin embargo en hipoxias seriadas se ve una bradicardia durante la hipoxia. En el caso del NIRS-S y NIRS-C su valor desciende durante los periodos de hipoxia, recuperándose en la normoxia en concordancia con la saturación arterial.

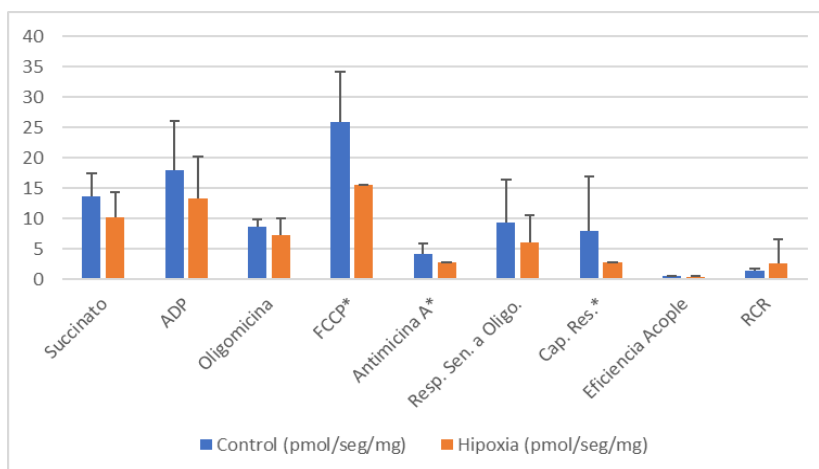


Fig 5. Parámetros de consumo de oxígeno correspondiente a respiración mitocondrial frente a la adición de sustratos. Los valores son expresados en media y desvío estándar.

Resp. Sen. Oligo. Corresponde a la respiración sensible a oligomycin. Cap. Res. es la capacidad respiratoria. Diferencia no significativa entre los valores medidos en mitocondrias control versus hipoxia ($p > 0.05$). Diferencia significativa entre los valores medidos en mitocondrias control versus hipoxia están identificados con asterisco ($*p < 0.05$). En cuanto a los resultados sobre la función mitocondrial, que corresponde al consumo de oxígeno obtenidos en biopsias de corteza cerebral. Los mismos evidencian un consumo de oxígeno inferior en el grupo sometido a hipoxias

agudas, severas y seriadas, siendo significativa frente a la adición de FCCP y Antimicina A. Resultando también significativamente menor la capacidad de reserva (ver figura 5 y tabla 3).

	Succinato	ADP	Oligomicin A	FCCF	Antimicina A	Resp. Sen. a Oligo.	Cap. Res.	Eficiencia Acople	RCR
Control (pmol/seg/mg)	13,6 ± 3,8	17,9 ± 8,2	8,6 ± 1,2	25,8 ± 8,4	4,2 ± 1,6	9,3 ± 7,1	7,9 ± 9	0,5 ± 0,1	1,3 ± 0,4
Hipoxia (pmol/seg/mg)	10,2 ± 4,2	13,3 ± 6,8	7,3 ± 2,7	15,5 ± 7,1 *	2,7 ± 0,6 *	6 ± 4,5	2,7 ± 3,4 *	0,4 ± 0,1	2,6 ± 4

Tabla 3. Parámetros de consumo de oxígeno correspondiente a respiración mitocondrial frente a la adición de sustratos. Los valores son expresados en media y desvío estándar.

Resp. Sen. Oligo. corresponde a la respiración sensible a oligomicina. Cap. Res. es la capacidad respiratoria. Diferencia no significativa entre los valores medidos en mitocondrias control versus hipoxia ($p > 0,05$). Diferencia significativa entre los valores medidos en mitocondrias control versus hipoxia están identificados con asterisco ($*p < 0,05$).

DISCUSIÓN

Podemos concluir que manteniendo estables los parámetros ventilatorios del modelo animal, las mediciones gasométricas, hemodinámicas y de saturación arterial se mantienen en rangos aproximadamente normales. No obstante, frente a hipoxias agudas, severas y seriadas evidenciamos que estos varían.

Durante el modelo hipoxia se puede observar que ante las hipoxias seriadas hay una acidemia mixta. El metabolismo anaeróbico resultante de la acidosis metabólica se visualiza a través del aumento del lactato, junto con hipercapnia por cese de la ventilación alveolar.

En normoxia el valor del pH muestra una recuperación parcial de su valor con respecto a los momentos de hipoxia. Determinando que estos valores responden frente a variaciones del $p\text{CO}_2$ y el componente metabólico, durante los 30 minutos de normoxia la $p\text{CO}_2$ se normaliza y el lactato tiende a aumentar a lo largo del experimento.

La $p\text{CO}_2$ logra difundir rápidamente a través de la membrana alveolar, es por esto que podemos evidenciar que durante los periodos de hipoxia aumenta rápidamente su valor, y frente a la normoxia dado su rápida respuesta frente a los cambios de ventilación alveolar vuelve a valores normales.

Los episodios de hipoxia determinan un metabolismo anaerobio que se observa a través del aumento del lactato siendo este más lento que los del CO_2 , con respecto al HCO_3^- no evidencia cambios significativos en el modelos de hipoxia aguda, severa y reiterada. Esto se debe a que el aumento del HCO_3^- responde frente a acidosis respiratorias mantenidas en el tiempo. A su vez como el metabolismo anaeróbico es una respuesta adaptativa progresiva, el lactato aumenta en el transcurso del experimento, notándose un aumento en las sucesivas hipoxias, esto denota un daño en el modelo.

Partiendo de la base que el NIRS depende de la saturación arterial de oxígeno y del flujo sanguíneo tisular los resultados obtenidos son los esperados tanto en anoxia como en normoxia. A su vez, evidenciamos una caída similar del NIRS durante las 3 hipoxias seriadas. Si bien la $p\text{O}_2$

y la $p\text{CO}_2$ son determinantes del flujo sanguíneo cerebral, en nuestro modelo y con nuestros datos no evidenciamos cambios importantes.

En nuestro modelo de hipoxia, el consumo de oxígeno medido a través de las biopsias de cerebro, tiene una tendencia a disminuir en todo el experimento. A su vez con estos datos podemos afirmar que hay una afectación mitocondrial importante frente a la hipoxia que no revierte frente a los periodos de normoxia realizados en el experimento. Consecuentemente, hay una afectación de los complejos de la cadena respiratoria con una disminución de la capacidad del tejido de responder a mayores demandas metabólicas. Es por esto que los tejidos tienen una menor flexibilidad bioenergética, dando como resultado una disminución significativa de la capacidad de reserva (menor habilidad de transporte de electrones en los complejos frente a mayor demanda energéticas) y respiración máxima. Además en el Oroboros oxygraph se observó una disminución significativa de la tasa respiratoria con el agregado del inhibidor antimicina A, lo cual es esperable ya que este inhibidor competitivo bloqueará de forma significativa la cadena respiratoria, impidiendo su función normal.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este modelo animal, ante la obstrucción de la ventilación mecánica, podemos confirmar la hipoxia y la hipercapnia. Observamos que el modelo monitorizado y ventilado durante 2 horas no sufre cambios hemodinámicos (presión arterial y frecuencia cardiaca), y en el metabolismo ácido base (pH, bicarbonato y lactato).

Sin embargo, la obstrucción mecánica del tubo endotraqueal produce hipoxia evidenciada y confirmada con la saturación y pO₂ arteriales, e hipercapnia asociada revirtiendo por completo en gases sanguíneos, no obstante, afectando el polo metabólico dado el aumento del lactato conduciendo al metabolismo anaerobio.

En lo hemodinámico, la frecuencia cardiaca tiene respuesta diferente en las diferentes hipoxia e hipercapnias debido a la afectación del músculo cardiaco a la hipoxia. Observamos que responde o tolera de manera peor manera las sucesivas sucesivas hipoxias

Estas alteraciones hemodinámicas y del metabolismo anaerobio, se acompañan de una afectación cerebral medidas a través de la función mitocondrial. Por lo tanto en la falla energética encontramos específicamente que el cerebro disminuye su capacidad de responder a mayor demanda metabólica en una situación de hipoxia e hipercapnia reiteradas. Además, el tejido tiene afectación en la actividad de la cadena respiratoria lo que puede aumentar el efecto de falla energética. Esto puede darnos una idea de que el tejido cerebral inmaduro es incapaz de responder a mayores demandas energéticas cuando se asocian otras patologías que habitualmente se ven en la práctica clínica, convulsiones, hipoglicemias, hipertermia, hiperglucemia. Con estos resultados planteamos que en trabajos posteriores se estudie neuroprotectores dirigidos a la mitocondria con eventual impacto en disminuir secuelas.

Perspectivas: Luego de realizado los experimentos y de analizar todos los datos podemos confirmar que se cumplieron nuestras perspectivas iniciales frente a este trabajo. Nos propusimos poder analizar los comportamientos fisiológicos, hemodinámicos y gasométricos del modelo porcino frente a la hipoxia. Todo lo anteriormente mencionado se realizó y se pudo analizar correctamente, con lo cual pudimos obtener importantes conclusiones que podrán ayudar a comprender las alteraciones sufridas durante una hipoxia para poder prevenir y/o actuar con el fin de lograr disminuir la morbimortalidad del daño hipóxico isquémico.

A su vez estos conocimientos son un pilar fundamental para nuestra formación académica y serán vitales para nuestra práctica médica, pudimos aplicar conceptos adquiridos durante la carrera y emplearlos en el modelo experimental para comprender las alteraciones fisiológicas durante la hipoxia y sacar conclusiones en base a ellas. Durante la práctica vimos la necesidad de familiarizarnos con los equipos de monitorización, como funcionan y cómo utilizar la información para tomar decisiones terapéuticas a su vez vimos de porta practica la relacion de las variables ventilatorias con los parámetros gasométricos, lo cual es de suma importancia para entender la respuesta fisiológica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Lawn JE, Blencowe H, Oza S, You D, Lee ACC, Waiswa P, Lalli M, Bhutta Z, Barros AJD, Christian P, Mathers C y Cousens SN. Every Newborn: Progress, Priorities, and Potential Beyond Survival. *Lancet* 384: 189-205, 2014
- 2- Volpe JJ. Neonatal encephalopathy: an inappropriate term for hypoxic-ischemic encephalopathy. *Ana. Neurol.* 72: 156–166, 2012.
- 3- Erecinska M, Cherian S, and Silver IA. Energy metabolism in mammalian brain during development. *Prog Neurobiol* 73: 397–445, 2004). Erecinska M and Silver IA. ATP and brain function. *J Cereb Blood Flow Metab* 9: 2–19. 1989.
- 4- Rodríguez M, Valez V, Cimarra C, Blasina F, Radi R. Hypoxic-Ischemic Encephalopathy and Mitochondrial Dysfunction: Facts, Unknowns, and Challenges. *Antioxid Redox Signal.* 33(4):247-262. 2020.
- 5- Cooper CE y Giulivi C. Nitric oxide regulation of mitochondrial oxygen consumption II: molecular mechanism and tissue physiology. *Soy J Physiol Cell Physiol* 292: 1993–2003, 2007.
- 6- Hassell KJ, Ezzati M, Alonso-Alconada D, Hausenloy DJ, and Robertson NJ. New horizons for newborn brain protection: enhancing endogenous neuroprotection. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 100: F541–F551. 2015.
- 7- Ferrero DM. Neonatal brain injury. *N Inglés J Med* 351: 1985–1995, 2004.
- 8- Vannucci RC, Towfighi J y Vannucci SJ. Secondary energy failure after cerebral hypoxia-ischemia in the immature rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 24: 1090–1097, 2004.
- 9- Chance B. The energy-linked reaction of calcium with mitochondria. *J Biol Chem.* 1965;240:2729-2748.
- 10- Vannucci RC, Towfighi J, and Vannucci SJ. Secondary energy failure after cerebral hypoxia-ischemia in the immature rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 24: 1090–1097. 2004.

- 11- Stepanova A, Konrad C, Guerrero-Castillo S, Manfredi G, Vannucci S, Arnold S, and Galkin A. Deactivation of mitochondrial complex I after hypoxia–ischemia in the immature brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 39: 1790–1802. 2019.
- 12- Stepanova A, Konrad C, Guerrero-Castillo S, Manfredi G, Vannucci S, Arnold S, and Galkin A. Deactivation of mitochondrial complex I after hypoxia–ischemia in the immature brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 39: 1790–1802. 2019.
- 13- Kim M, Stepanova A, Niatetskaya Z, Sosunov S, Arndt S, Murphy MP, Galkin A y Ten VS. Attenuation of oxidative damage by targeting mitochondrial complex I in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Free Radic Biol Med* 124: 517–524, 2018.
- 14- Chouchani ET, Methner C, Nadtochiy SM, Logan A, PellKS, Partridge L, Fearnley IM, Robinson AJ, Hartley RCS mith RAJ, Krieg T, Brookes PS y Murphy MP. Cardioprotección por S-nitrosación de un encendido de cisteína complejo mitocondrial I. *Nat Med* 19: 753-759, 2013.
- 15- Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552: 335–344, 2003
- 16- Nelson, David L., Albert L. Lehninger, and Michael M. Cox. *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan, 2008.
- 17- Hagberg H, Ichord R, Palmer C, Yager JY y Vannucci SJ. Animal Models of Developmental Brain Injury: Relevance to Human Disease: A Summary of the Third Hershey Conference on Development Panel Discussion Cerebral Blood Flow and Metabolism. *Desarrollador Neurosci* 24: 364–366, 2002.
- 18- Pesta D, Gnaiger E. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. In *Mitochondrial bioenergetics* 2012 (pp. 25-58). Humana Press.
- 19- García-Roche M, Casal A, Carriquiry M, Radi R, Quijano C, Cassina A. Respiratory analysis of coupled mitochondria in cryopreserved liver biopsies. *Redox Biol.*;17:207-212.2018

AGRADECIMIENTOS

- Departamento de Neonatología - Hospital de Clínicas.
- Unidad CTI de Neonatología- Hospital de Clínicas.
- Equipo de Laboratorio de Neonatología - Hospital de Clínicas.
- Departamento de Bioquímica y Biofísica - Facultad de Odontología.
- Departamento de Metodología Científica - Facultad de Medicina UDELAR
- Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) y Comisión nacional de experimentación animal (CNEA)

ANEXO

Tabla de parámetros e índices respiratorios		
Sustratos o inhibidores	Fórmula química	Parámetros respiratorios e índices
Succinato	C ₄ H ₆ O ₄	Respiración basal en concentraciones saturantes de succinato, sustrato del complejo 2
ADP	C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O ₁₀ P ₂	Respiración basal en concentraciones saturantes de ADP + sustrato
Oligomicina	C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O ₁₀ P ₂	Respiración resistente a oligomicina, es la respiración independiente de ATP debido a la fuga de protones o moléculas cargadas de transporte a través de la membrana mitocondrial interna
FCCP	C ₁₀ H ₅ F ₃ N ₄ O	Consumo espiratorio máximo que se obtiene luego de la adición de un desacoplante que disipa el gradiente de protones
Antimicina A	C ₂₈ H ₄₀ N ₂ O ₉	Consumo de oxígeno no mitocondrial. Debido a reacciones de oxidación mediado por especies reactivas del oxígeno u oxidasas
		Respiración sensible a oligomicina. Representa el consumo de oxígeno ligado a la fosforilación del ADP. Se calcula por la diferencia entre la respiración-succinato y la respiración-oligomicina
		Capacidad de reserva, Es la diferencia entre respiración-FCCP y Respiración-Succinato. Representa la habilidad de la cadena de transporte de electrón a responder a las

		demandas energéticas, traduce la flexibilidad bioenergética del tejidos
		RCR. Es la relación entre respiración-ADP y respiración-succinato. Representa el acople entre cadena respiratoria y fosforilación oxidativa
		Eficiencia de acople. Representa el grado de acople. Se calcula mediante la diferencia entre respiración- ADP y respiración-Oligomicina, y esta diferencia se divide por respiración-ADP

Parámetros e índices respiratorios sobre función mitocondrial de acuerdo a cada sustrato o inhibidor agregado, extraído de cita 18 y 19.