



Universidad de Valencia

Departamento de Fisiología

Programa de Doctorado en Fisiología

Efecto del acondicionamiento hipóxico en la respuesta a un insulto hiperóxico en el sistema nervioso central de ratones recién nacidos

TESIS DOCTORAL presentada por:

M^o Isabel Torres Cuevas

Dirigida por: Dr. Máximo Vento Torres

Dr. Miguel A. Asensi Miralles

Dr. J. Javier Escobar Cubiella

Tutor: Dr. Juan Sastre Belloch

Julio, 2017

D. **Máximo Vento Torres**, Jefe del grupo de Perinatología del Instituto de Investigación Sanitaria la Fe.

D. **Miguel A. Asensi Miralles**, Titular del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València.

D. **Justo Javier Escobar Cubiella**, Director científico-técnico de Sabartech S.L.

CERTIFICA/N:

Que la presente memoria, titulada “**Efecto del preconditionamiento hipóxico en la respuesta a un insulto hiperóxico en el sistema nervioso central de ratones recién nacidos**”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por D/Dña. **M^º Isabel Torres Cuevas**, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Fisiología de la Universitat de València.

Y para que conste firma/n el presente certificado en Valencia, a **27** de **Julio** de **2017**.

Fdo. **Máximo Vento Torres**

Fdo. **Miguel Asensi Miralles**

Fdo. **Javier Escobar Cubiella**

AGRADECIMIENTOS

**A mis padres,
mis hermanos Quique y Carlos,
y a Kike.**

A mis directores de tesis Máximo, Miguel y Javi, gracias por vuestra ayuda, dedicación y darme la oportunidad de realizar este trabajo. Especialmente a Max, por introducirme en el mundo de la Neonatología, aconsejarme, apoyar mis ideas y apostar por mí. Has sido un referente todos estos años. Gracias por estar siempre dispuesto a ayudar.

A todos mis compañeros que me han ayudado, acompañado y animado en el proceso de realización de esta tesis: a mi grupo de investigación en Perinatología, *GIP*, a los Fisiólogos de la Facultad de Farmacia, al grupo de Neurobiología comparada del Cavanilles, al grupo de Biomedicina molecular, celular y genómica del IIS la Fe y al grupo del INSERM en París. También agradecer al personal administrativo de Fisiología de la Universidad de Valencia y a las personas que forman parte del servicio de espectrometría de masas y del animalario del SCIE.

A mis amigas que todos estos años han estado apoyándome y animándome.

A mi familia por estar siempre pendientes, gracias por vuestro apoyo. Y sobretodo a mis abuelos Conchin y Federico que tanto han confiado en mí.

A mis padres, Enrique y Maribel, soy lo que soy gracias a vosotros, por enseñarme los valores importantes de la vida y por lo que vale la pena luchar. ¡¡Habéis formado una gran familia!!

A mis hermanos Quique y Carlos les dedico en especial esta tesis, sin vosotros esto no hubiera sido posible. Por el gran equipo que formamos juntos, que siempre estamos ahí para apoyarnos, crecer y vencer.

A Kike, que decirte que no te haya dicho ya, gracias por formar parte de mi vida todos estos años. Te Quiero.

“ El futuro tiene muchos nombres. Para los débiles es lo inalcanzable. Para los temerosos, lo desconocido. Para los valientes es la oportunidad. ”

Victor Hugo

ÍNDICE

Índice

AGRADECIMIENTOS.....	5
ÍNDICE.....	13
ABREVIATURAS	29
RESUMEN.....	35
I. INTRODUCCIÓN	41
1. Metabolismo aeróbico	43
1.1 El oxígeno en la vida del ser multicelular	43
1.2 Metabolismo aeróbico y fisiología del O ₂	44
2. Especies reactivas del oxígeno y enzimas antioxidantes....	48
2.1 Formación de especies reactivas del oxígeno.....	48
2.2 Clase de especies reactivas del oxígeno.....	49
2.3 Función de las especies reactivas del oxígeno	51
2.4 Regulación Redox	53
2.5 Defensas antioxidantes	55
3. Biomarcadores de estrés oxidativo.....	58
3.1 Ratio glutatión reducido y oxidado (GSH/GSSG).....	58
3.2 Biomarcadores de oxidación proteica.....	59
3.3 Biomarcadores de oxidación al ADN	62
3.4 Biomarcadores de oxidación lipídica.....	64
4 El oxígeno en la vida fetal	66
4.1 Cambios fisiológicos en la transición fetal-neonatal (TFN)	66
4.2 El rol del oxígeno en la TFN	67

Índice

4.3 Sensores de Oxígeno	71
5. Asfixia perinatal	73
5.1 Fisiopatología de la isquemia-reperfusión	75
5.2 Fuentes de especies reactivas en la isquemia-reoxigenación..	77
5.3 Reanimación postnatal con bajo oxígeno	79
5.4 Períodos evolutivos de la encefalopatía hipóxico-isquémica (EHI).....	80
5.5 Estrategias terapéuticas de la EHI.....	81
6. Oxigenación antes y después del nacimiento.....	83
6.1 Reducción de los niveles de oxigenación durante la reoxigenación.....	83
6.2 FiO ₂ inicial en recién nacidos prematuros.....	87
II. HIPÓTESIS.....	93
III. OBJETIVOS.....	97
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	101
1. Material	103
1.1 Ainales de experimentación.	103
1.2. Cámara de oxigenación controlada	103
1.2.1 Características de la cámara de oxigenación controlada....	104
1.2.2 Diseño de la cámara de oxigenación controlada	106
1.2.3 Descripción de los elementos de la cámara.....	109
1.2.4 Descripción del software.....	113
1.2.4.1. Uso del software	117
1.2.4.2 Apagado del sistema	122
1.2.4.3 Alarmas del sistema	123
1.2.4.4 Mantenimiento de cámara	125

2. Modelo experimental	127
2.1. Estudio del metabolismo oxidativo en ratones recién nacidos sometido a una $FiO_2=0.14$ durante 8 horas.	131
3. Determinaciones Experimentales	132
3.1. Determinación de Lactato	132
3.1.1 Determinación en sangre	132
3.1.2 Determinación en tejido	133
3.2 Determinación de la actividad Lactato deshidrogenasa (LDH).....	135
3.3. Determinación de la actividad Piruvato quinasa (PK)...	137
3.4. Determinación de la actividad Hexoquinasa (HK)	140
3.5. Cuantificación de proteínas.....	142
3.6. Determinación de biomarcadores por HPLC MS/MS	143
3.6.1 Determinación de nucleótidos.....	145
3.6.2 Determinación de aminotioles.....	147
3.6.3 Determinación de derivados de la oxidación y nitración proteica (Tirosinas).....	151
3.6.4 Determinación de oxidación al ADN	155
4. Análisis de la expresión de ARNm de genes involucrados en la respuesta antioxidante, dianas de HIF, inflamación y neurotransmisión.	160
4.1 Aislamiento de ARN.....	160
4.2. Retrotranscripción-amplificación del ARN	160
4.2.1 Retrotranscripción del ARN total	161
4.2.2 Análisis del ADN complementario por PCR cuantitativa.....	162
5. Técnicas de análisis histológico	164

Índice

5.1 Preparación del tejido para histología	164
5.2 Inmunohistoquímica	164
5.3 Detección de apoptosis por método TUNEL	167
5.4 Técnicas para la observación al microscopio óptico y electrónico de transmisión (TEM)	168
6. Análisis estadístico	169
V. RESULTADOS	171
1. Cámara de hipoxia controlada	173
2. Estudio del metabolismo oxidativo en ratones P0 sometidos a preconditionamiento hipóxico.	176
2.1 Determinación de parámetros del metabolismo aeróbico en crías de ratones (P0) con $FiO_2=0.21$ versus $FiO_2=0.14$ durante un periodo de tiempo.....	176
2.1.1 Determinación de lactato en ratones P0	176
2.1.2 Determinación de las actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo aeróbico: Hexokinasa, Piruvato quinasa y Lactato deshidrogenasa.....	178
2.1.3 Determinación las principales moléculas energéticas del metabolismo aeróbico: ATP, ADP, AMP y carga energética en cerebro.	179
3. Estudio del estrés oxidativo durante la transición fetal-neonatal en cerebro bajo una atmósfera hipóxica y reanimación postnatal.....	182
3.1 Determinación de aminotioles (vía de la transulfuración).....	182
3.1.1 Par redox GSH/GSSG en ratones P1 y P7	182
3.1.2 Par redox cisteína/cistina en ratones P1 y P7	184
3.1.3 Par redox homocisteína/homocistina en ratones P1 y P7	186
4. Determinación del daño proteico por estrés oxidativo durante la transición fetal-neonatal en cerebro bajo una	

<i>atmósfera hipóxica y reanimación postnatal: Determinación de derivados de la oxidación y nitración proteica.....</i>	188
4.1 Oxidación y nitración proteica en cerebro de ratones P1.....	188
4.2 Oxidación y nitración proteica en cerebro de ratones P7.....	190
<i>5. Estudio de daño al ácido desoxirribonucleico (ADN) por estrés oxidativo durante la transición fetal-neonatal en cerebro bajo una atmósfera hipóxica y reanimación postnatal: Oxidación de la guanina en posición C8, formación de la 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG).</i>	191
5.1 Oxidación al ADN en cerebro de ratones P1 y P7	192
<i>6. Expresión de genes implicados en la defensa antioxidante en cerebros de ratones cuya transición fetal-neonatal se realiza bajo una atmósfera hipóxica y reanimación postnatal.</i>	193
<i>7. Expresión de genes diana del Factor inducible por Hipoxia (HIF-1α) a nivel cerebral en la transición fetal-neonatal se realiza bajo una atmósfera hipóxica y reanimación postnatal.</i>	196
<i>8. Análisis en cerebro de genes relacionados con la inflamación durante la transición fetal neonatal bajo una atmósfera hipóxica y el periodo de reanimación.</i>	197
<i>9. Análisis en tejido cerebral de genes relacionados con la neurotransmisión durante la transición fetal neonatal bajo una atmósfera hipóxica y el periodo de reanimación.</i>	200
<i>10. Estudio histológico de la corteza cerebral de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO₂ y reanimados.....</i>	202
Análisis morfológico de las secciones a nivel de la corteza cerebral de ratones P1	202
Estudio Inmuno-histoquímico	214

Índice

Análisis mitocondrial por microscopía electrónica.....	220
VI. DISCUSIÓN	231
1. Estudio del metabolismo oxidativo cerebral en ratones P0 sometidos a una hipoxia moderada.	235
2. Efecto del retraso en la oxigenación y del insulto hiperóxico en las crías de ratón recién nacidas (P1) y (P7), sobre el estrés oxidativo, respuesta antioxidante e inflamatoria	243
3. Estudio histológico de la corteza cerebral.....	254
VII. CONCLUSIÓN	jError! Marcador no definido.
VIII. BIBLIOGRAFÍA	jError! Marcador no definido.

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema fosforilación oxidativa	46
Figura 2. Reducciones monovalentes a partir del oxígeno que origina las ERO	50
Figura 3. Ciclo redox del glutatión	56
Figura 4. Esquema de formación de biomarcadores de daño a proteínas derivados de la tirsoina	60
Figura 5. Esquema de formación de la 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG)	63
Figura 6. Esquema de las etapas de la peroxidación lipídica	65
Figura 7. Cambio de la PaO₂ durante la transición fetal-neonatal ..	69
Figura 8. Nomograma de SpO₂ en recién nacidos prematuros	85
Figura 9. Percentiles de SpO₂ de recién nacidos de 32 a 36 semanas de gestación que no necesita nintervención médica después del nacimiento	87
Figura 10. Diseño de la cámara de oxigenación controlada	108
Figura 11. Componentes de la camara de oxigenacion controlada.	111
Figura 12. Vista general de la cámara de oxigenación controlada	113
Figura 13. Interfaz del programa.....	115

Índice

Figura 14. Pantalla principal del Software de la cámara de oxigenación controlada.....	117
Figura 15. Carpeta raíz donde se guardan las capturas de la cámara	118
Figura 16. Esquema representativo del grupo control y grupos experimentales del modelo experimental murino de transición fetal-neonatal bajo diferentes FiO_2.	127
Figura 17. Diagrama de dos grupos experimentales empleados en los estudios histológicos	129
Figura 18. Fotografías del material utilizado para la jaula del interior de la cámara.....	130
Figura 19. Reacción de conversión de lactato a piruvato..	133
Figura 20. Reacción de conversión de piruvato a lactato.	135
Figura 21. Reacción enzimática del fosfoenolpiruvato a piruvato.	138
Figura 22. Reacción enzimática de la glucosa a glucosa-6-fosfato mediante la enzima Hexoquinasa (HK).....	140
Figura 23. Esquema del funcionamiento del HPLC-MS/MS	145
Figura 24. Esquema de la vía de la transulfuración (Transulfuration pathway).....	148
Figura 25. Representación de la reacción entre el anticuerpo primario y secundario biotinilado y el complejo Avidina/Biotina con la 3,3'-Diaminobenzidina.....	166

Figura 26. Fotografías nacimiento ratones.....	175
Figura 27. Determinación de los niveles de lactato en sangre y cerebro de ratones P0 bajo condiciones normóxicas ($FiO_2=0.21$) e hipóxicas ($FiO_2=0.14$).....	177
Figura 28. Determinación de actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo aeróbico en cerebro de ratones P1 bajo condiciones hipóxicas ($FiO_2=0.14$) y normóxicas ($FiO_2=0.21$)	179
Figura 29. Determinación de los niveles de nucleótidos, ATP, ADP, AMP y carga energética (C.E.) en cerebro de ratones P1 bajo condiciones hipóxicas ($FiO_2=0.14$) y normóxicas ($FiO_2=0.21$).	181
Figura 30. Niveles del cociente GSH/GSSG en cerebro de ratones P1 y P7 nacidos bajo diferentes FiO_2: normoxia ($FiO_2=0.21$) e hipoxia ($FiO_2=0.14$) reanimados y sin reanimar ($FiO_2=1.0$).	184
Figura 31. Niveles del cociente cisteína/cistina en cerebros de ratones P1 y P7 nacidos bajo diferentes FiO_2: normoxia ($FiO_2=0.21$) e hipoxia ($FiO_2=0.14$) reanimados y sin reanimar ($FiO_2=1.0$).	186
Figura 32. Niveles del cociente homocisteína/homocistina en cerebro de ratones P1 y P7 nacidos bajo diferentes FiO_2: normoxia ($FiO_2=0.21$) e hipoxia ($FiO_2=0.14$) reanimados y sin reanimar ($FiO_2=1.0$)	187
Figura 33. Determinación de daño proteico mediante los niveles de m-tyr/Phe, o-Tyr/Phe, $3NO_2$-Tyr/p-Tyr y 3Cl-tyr/p-tyr en cerebro de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO_2: normoxia ($FiO_2=0.21$) e hipoxia ($FiO_2=0.14$) reanimados y sin reanimar ($FiO_2=1.0$)	189
Figura 34. Determinación de daño proteico mediante los niveles de m-tyr/Phe, o-Tyr/Phe, $3NO_2$-Tyr/p-Tyr y 3Cl-tyr/p-tyr en cerebro de	

Índice

ratones P7 nacidos bajo diferentes FiO_2 : normoxia ($FiO_2=0.21$) e hipoxia ($FiO_2=0.14$) reanimados y sin reanimar ($FiO_2=1.0$) 191

Figura 35. Determinación de daño oxidativo al ADN mediante el cociente 8-OHdG/2dG en cerebro de ratones P1 y P7 nacidos bajo diferentes FiO_2 : normoxia ($FiO_2=0.21$) e hipoxica ($FiO_2=0.14$) reanimados y sin reanimar ($FiO_2=1.0$). 192

Figura 36. Expresión de ARNm de *gpx*, *gr* y *gcl* en cerebro de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO_2 : normoxia ($FiO_2=0.21$) e hipoxia ($FiO_2=0.14$) reanimados y sin reanimar ($FiO_2=1.0$)..... 194

Figura 37. Expresión de ARNm de *gpx*, *gsr* y *gcl* en cerebro de ratones P7 nacidos bajo diferentes FiO_2 : normoxia ($FiO_2=0.21$) e hipoxia ($FiO_2=0.14$) reanimados y sin reanimar ($FiO_2=1.0$)..... 195

Figura 38. Expresión de ARNm de *epo* y *vegfa* en cerebro de ratones P1 y P7 nacidos bajo diferentes FiO_2 : normoxia ($FiO_2=0.21$) e hipoxia ($FiO_2=0.14$) reanimados y sin reanimar ($FiO_2=1.0$)..... 197

Figura 39. Expresión de ARNm de *il-1b*, *il-6* y *tnf-a* en cerebro de ratones P1 y P7 nacidos bajo diferentes FiO_2 : normoxia ($FiO_2=0.21$) e hipoxia ($FiO_2=0.14$) reanimados y sin reanimar ($FiO_2=1.0$) 199

Figura 40. Expresión de ARNm de *nmda* y *adora* en cerebro de ratones P1 y P7 nacidos bajo diferentes FiO_2 : normoxia ($FiO_2=0.21$) e hipoxia ($FiO_2=0.14$) reanimados y sin reanimar ($FiO_2=1.0$) 201

Figura 41. Panorámica de semifinos de 1.5 μm realizadas a 10x de la corteza cerebral de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO_2 204

Figura 42. Panorámica a mayores aumentos (100X) de la corteza cerebral de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO_2 207

Figura 43. Imágenes de la ultraestructura de la corteza cerebral de ratones P1 grupo Nx21/21/21.	212
Figura 44. Imágenes de la ultraestructura de la corteza cerebral de ratones P1 grupo Nx21/100/21	212
Figura 45. Imágenes de la ultraestructura de las diferentes capas de la corteza cerebral de ratones P1 grupos nacidos en condiciones hipóxicas	214
Figura 46. Ensayo inmunohistoquímico de la muerte celular en corteza cerebral y cuerpo calloso de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO_2	216
Figura 47. Ensayo inmunohistoquímico de la muerte celular en corteza cerebral de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO_2	217
Figura 48. Determinación de células apoptóticas positivas mediante TUNEL presentes en la corteza cerebral de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO_2	218
Figura 49. Imágenes de las células de microglia presentes en la corteza cerebral y cuerpo calloso de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO_2	219
Figura 50. Análisis de las células de microglia presentes en la corteza cerebral y cuerpo calloso de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO_2	220
Figura 51. Imágenes de mitocondrias obtenidas a 60000X de ratones P1 del grupo control, Nx21/21/21 y grupo Nx21/100/21	223

Índice

- Figura 52. Imágenes de mitocondrias obtenidas a 60000X de ratones P1 del grupo experimental Hx14/21/21 y Hx14/100/21. 224**
- Figura 53. Imágenes de mitocondrias obtenidas a 60000X de ratones P1 del grupo experimental Hx14 8H y Hx14/14/14..... 225**
- Figura 54. Determinación de parámetros de forma mitocondrial. Representación gráfica del área y circularidad de mitocondrias de la corteza cerebral de ratones P1 227**
- Figura 55. Caracterización mitocondrial de mitocondrias de la corteza cerebral de ratones P1 229**
- Figura 56. El lactato y la adenosina afectan a la señalización neurovascular en condiciones de disminución de concentración de oxígeno..... 229**
- Figura 57. Elementos de la regulación energética en el cerebro 22942**
- Figura 58. Neurogénesis y migración del neocórtex de ratón .. 22957**

Indice de Tablas

Tabla 1. Parámetros de adquisición MS/MS nucleótidos	147
Tabla 2. Parámetros de adquisición MS/MS de aminotioles	150
Tabla 3. Parámetros de adquisición MS/MS de tirosinas	154
Tabla 4. Parámetros de adquisición MS/MS de ADN	159
Tabla 5. Sondas Taqman para la cuantificación de ARNm por RT-PCR	163
Tabla 6. Listado de anticuerpos primarios utilizados en inmunohistoquímica.....	166
Tabla 7. Anticuerpo secundario utilizado en inmunohistoquímica166
Tabla 8. Comparación de los principales procesos de desarrollo a nivel cerebral entre ratones y humanos.....	254

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

3Cl-Tyr	3-clorotirosina
3NO₂-Tyr	3-nitrotirosina
8-OHdG	8-hidroxi-2-desoxiguanosina
Acetil-CoA	Acetil-coenzima A
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
adora1	Receptores de adenosina A1 purinérgicos
ADP	Adenosina 5'-difosfato
AMP	Adenosina 5'-monofosfato
AP	Asfixia perinatal
AP-1	Proteína activadora 1
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido desoxirribonucleico mensajero
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico
BDP	Broncodisplasia pulmonar
C.E	Carga energética
CAT	Catalasa
CH₃CN	Acetonitrilo
CK	Ciclo de Krebs
COX	Ciclo-oxigenasa
CREB	Proteína de unión a la respuesta de AMPc
CRN	Neuronas Cajal-Retzius
CTE	Cadena de transporte electrónico
Cys	Cisteína
Cys-Gly	Cisteinilglicina
CySS	Cistina
DNPH	4-dinitrofenilhidrazina
e⁻	Electrón
E.C	Energía de colisión
EHI	Encefalopatía hipóxico-isquémica
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
EO	Estrés oxidativo

Abreviaturas

EPO	Eritropoyetina
ERN	Especies reactivas del nitrógeno
ERO	Especies reactivas del oxígeno
ESI	Ionización por electro-spray
ET-1	Endotelina-1
F₂-IsoPs	F ₂ -isoprostanos
FAD	Flavin-adenin-dinucleótido
FiO₂	Fracción inspiratoria de oxígeno
G18	18º día de gestación
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
GC	Cromatografía de gases
GCL	Glutamil cisteína ligasa
GLUT-1	Transportador de glucosa 1
GPX1	Glutación peroxidasa 1
GS	Suero de cabra
GSH	Glutación reducido
GSR	Glutación reductasa
GSSG	Glutación oxidado
GTT	g-glutamyltranspeptidasa
H⁺	Protón
H₂O	Agua
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HETEs	Hidroxitetraanoico
HIF-1α	Factor inducible por Hipoxia
HK	Hexoquinasa
HNE	4-hidroxi-2-nonenal
HO-1	Hemo oxigenasa 1
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
ILCOR	International Liaison Committee on Resuscitation
INFβ	Interferón Beta
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IR	Isquemia/reperfusión
IU	Intraútero
L	Capa corretza cerebral

Abreviaturas

LC-MS/MS	Cromatografía líquida tandem espectrometría de Masas
LDH	Lactato deshidrogenasa
LPO	Peroxidación lipídica
m/z	Cociente masa/carga
MCTs	transportadores de monocarboxilato
MDA	Malondialdehído
MET	Microscopía electrónica de transmisión
MM	Matriz mitocondrial
MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
MPO	Mieloperoxidasa
MRM	Monitorización de múltiples reacciones
m-Tyr	meta-tirosina
MZ	Zona marginal superficial
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NEM	N-etilmaleimida
NFκB	Factor nuclear kappa B
nNOS	Óxido nítrico sintasa
NOx	NADPH oxidasa
NO·	Óxido nítrico
O₂	Oxígeno molecular
O₂^{-•}	Anión superóxido
OH•	Radical hidroxilo
ONOO•	peroxinitrito
o-Tyr	orto-tirosina
P0	recién nacidos
P1	24 horas después de nacer
P7	7 días después de nacer
P_aO₂	Presión parcial de oxígeno
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimera
PFA	Paraformaldehído
PGs	Prostaglandinas
Phe	Fenilalanina

Abreviaturas

Pi	fosfato inorgánico
PI	Patrón interno
PK	Piruvato quinasa
PPL	Capa plexiforme primordial
prxs	Peroxirredoxinas
p-Tyr	para-tirosina
ROO·	Radical peroxilo
ROP	Retinopatía del prematuro
SDR	Síndrome diestrés respiratorio
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasa
SP	Subplaca profunda
SPNs	Neuronas de la subplaca
SpO₂	Saturación de oxígeno
srnx1	Sulfiredoxina 1
TEM	Microscopio electrónico de transmisión
TGF-α	Factor de crecimiento transformante alfa
TFN	Transición fetal neonatal
trx	Tiorredoxina
trxnd1	Tioredoxina reductasa
Tyr	Tirosina
<i>vegfa</i>	Factor de crecimiento del endotelio vascular A
VZ	Zona ventricular
WM	sustancia blanca
XD	xantina deshidrogenasa
XO	xantina oxidasa
Ψ_m	Potencial de membrana mitocondrial
γ-GC	Gamma-glutamil cisteína

RESUMEN

Mammal fetal life elapses in a low oxygen environment relative to the extra uterine. Interestingly, in the human being partial pressure of oxygen increases from fetal 3.3 kPa (25–30 mmHg) to 10.5 kPa (75–85 mmHg) in the first minutes after birth in the newly born infant. This rapid and brisk increase in oxygen availability to tissue generates a physiologic oxidative stress. However, both the lungs and the antioxidant defense system do not mature until late in gestation. Therefore, preterm infants often need respiratory support and oxygen supplementation in the delivery room to achieve postnatal stabilization. The use of supplementary oxygen will cause oxidative stress and damage. In experimental studies in newborn sheep it has been shown that brief resuscitation maneuvers performed in the first minutes after birth produce lung damage and oxidative stress that can have long-lasting consequences. In human newborn infants the use of 100% oxygen instead of air for resuscitation enhances oxidative stress and increases mortality. Furthermore, the use of high oxygen inspired fractions in very preterm infants increased specific morbidities such as bronchopulmonary dysplasia.

We hypothesized that delaying oxygenation after birth would preserve reducing equivalents, enhance redox adaptation, and protect the brain against oxygen derived free radicals produced by a hyperoxic insult.

The objectives of the study were to determine oxidative stress and damage biomarkers in brain of mice pups during fetal-to-neonatal transition in a breathing atmosphere of FiO_2 of 0.14 vs. 0.21. We also studied the consequences of a hyperoxic insult with a FiO_2 of 1.0 after

Resumen

postnatal stabilization either with FiO_2 of 0.14 or 0.21. Moreover, we analyzed the expression of genes involved in the antioxidant defense system, activation of the expression HIF-1 α , inflammation, and the expression of different receptors involved in neurotransmission. Finally, we performed a histological study of different layers of the cerebral cortex to determine morphological changes, apoptosis, and inflammatory changes. Furthermore, we opted to study the effects of perinatal hypoxic preconditioning on mitochondrial morphometry.

To proof our hypothesis valid, we designed an experimental model in which we placed pregnant mice in an oxy-cage either with a reduced FiO_2 (0.14) or room air ($\text{FiO}_2=0.21$) at G18 (8 hours before delivery). 8 hours after birth, both groups were switched to room air (Hx14/21/21 and Nx21/21/21 groups) or subjected to a hyperoxic insult ($\text{FiO}_2=1.0$) (Hx14/100/21 and Nx21/100/21) and reset to $\text{FiO}_2=0.21$ after 1 hour. Pups were further evaluated either at P1 or kept in the oxy-cage with $\text{FiO}_2=0.21$ oxygen until 1 week post-partum (P7). The brains were snap-frozen and kept at -80°C until analysis.

We determined the following oxidative stress biomarkers: GSH/GSSG, cysteine/cystine, homocysteine/homocystine ratios, and metabolites of oxidative damage and inflammation such as m-tyr/Phe, o-tyr/Phe, 3NO₂-tyr/p-tyr, 3Cl-tyr/p-tyr and 8-OHdG/2dG ratios by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UPLC-MS/MS). In addition, we assessed the expression of antioxidant defense genes, response to HIF-1 α , and changes in neurotransmitter receptors by qPCR (both at P1 and P7). Finally, we determined morphology,

apoptosis, and inflammation of the different layers of the brain cortex by immunohistochemistry. The mitochondrial morphometry was performed using electron microscopy at P1 mice.

In general, we found less oxidative stress and damage to proteins and DNA in the preconditioned hypoxic group. A period of hypoxia after birth seemed to better favor the maintenance of a reducing environment thus protecting them against the switch to a hyperoxic environment. The results obtained in this group were still maintained one week thereafter. In the Hx14/100/21, we found downregulation of antioxidant defense enzymes when compared to the Nx21/100/21 at P1 and P7. Besides, we also observed an upregulation of the HIF-1 α targets in mice born under hypoxic conditions.

At a histological level, we found higher damage, increased apoptosis and a marked tendency towards inflammation in the cortex of the Nx21/100/21 group when compared to the Hx14/100/21 group. Mitochondria showed better morphology and characteristics during adaptation to re-oxygenation when birth occurred in a hypoxic atmosphere (Hx14/100/21) as opposed to normoxic conditions (Nx21/100/21).

We conclude that in mice pups performing fetal-to-neonatal transition under hypoxic conditions (hypoxic preconditioning) and smoothly transitioning to normoxia seemed to better withstand a hyperoxic insult after birth as reflected by less oxidative stress, less damage and less inflammation in brain tissue.

I. INTRODUCCIÓN

1. Metabolismo aeróbico

1.1 El oxígeno en la vida del ser multicelular

La vida tal y como la concebimos en los organismos multicelulares tiene tendencia a la entropía, es decir, al desorden molecular. Para sobrevenir esta tendencia se precisa una gran cantidad de energía (Schafer y Buettner 2001). El oxígeno molecular (O_2) es uno de los elementos claramente definidos que dan lugar a la existencia de la vida eucariota. Las fluctuaciones de los niveles de oxígeno a través del tiempo han permitido la evolución de las diversas formas de vida. El principal motivo ha sido al desarrollo de la producción eficiente de energía (fosforilación oxidativa) en organismos unicelulares que permite la evolución a organismos multicelulares y la regulación de fenotipos celulares complejos (Stamati, Mudera, y Cheema 2011).

Durante el progreso de la vida unicelular a la vida multicelular, se han aumentado las necesidades de un mayor aporte energético para poder llevar a cabo sus funciones. El desarrollo de sistemas antioxidantes que permitieron la utilización del oxígeno como aceptor de electrones en el proceso de fosforilación oxidativa permitió la especialización celular, y la creación de organismos multicelulares, y lo que es muy importante el desplazamiento en busca de nutrientes, no accesible a los organismos unicelulares. El oxígeno permite la obtención de la energía necesaria, a través del aprovechamiento óptimo de los nutrientes esenciales, para el desarrollo de la vida

Introducción

(Semenza 2009). Concretamente, las mitocondrias son los orgánulos celulares que se consideran las "fábricas energéticas" de la célula, y por tanto las responsables de proporcionar la energía necesaria para mantener las funciones vitales (reproducción, crecimiento y desarrollo)(Rossignol y Frye 2014). Las mitocondrias son especialmente importantes en áreas de alta demanda de energética, como es el cerebro, donde las células neuronales utilizan aproximadamente 4,7 millones de moléculas de adenosina 5'-trifosfato (ATP) por segundo (Siddiqui, Elwell, y Johnson 2016).

1.2 Metabolismo aeróbico y fisiología del O₂

El metabolismo aeróbico consiste en un proceso de fosforilación oxidativa, el cual tiene lugar en las mitocondrias y requiere de manera ineludible la presencia del O₂.

Los nutrientes esenciales que ingerimos como los hidratos de carbono, proteínas y lípidos, son convertidos durante la digestión en moléculas más simples dando lugar a la glucosa, aminoácidos y ácidos grasos libres. Estas moléculas a través de diferentes procesos catabólicos (glucólisis, desaminación oxidativa y β -oxidación) se convierten en intermediarios metabólicos, como son la acetil-coenzima A (Acetil-CoA), el oxalacetato y la 2-oxoglutarato. Estos intermediarios serán metabolizados y descarboxilados por las diferentes enzimas que forman parte del ciclo del ácido tricarbóxico o Ciclo de Krebs (CK) (Campbell 2017). De modo que, durante este proceso de oxidación se liberan electrones de alta energía que son

captados por transportadores específicos, nicotin-adenin-dinucleótido (NAD) o flavin-adenin-dinucleótido (FAD), que los transportan hasta la cadena de transporte electrónico (CTE) o cadena respiratoria, constituida por una serie de complejos enzimáticos (I a V) localizados en la membrana interna mitocondrial (MMI). Estos complejos enzimáticos son proteínas integrales de membrana con grupos prostéticos que aceptan y ceden electrones e intervienen de forma secuencial. Estos complejos son; el complejo I (NADH deshidrogenasa), complejo II (succinato deshidrogenasa), complejo III (citocromo C reductasa) y complejo IV (citocromo C oxidasa). Una vez los electrones se transfieren desde los equivalentes de reducción, van pasando por los transportadores de la CTE hasta llegar al complejo IV, el cual capta los electrones y se produce la reacción final que consiste en la donación de los electrones al O_2 y la conversión de $O_2 + H^+$ a H_2O .

Los electrones a lo largo de la cadena respiratoria van liberando energía y esa energía es la que permite el bombeo de protones desde la matriz mitocondrial (MM) al espacio intermembranoso de la mitocondria alcanzando una concentración de protones mayor en el espacio intermembrana que en la matriz. Este proceso crea un potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m), el cual representa una diferencia de cargas a través de la membrana mitocondrial interna.

Los protones bombeados a través de los complejos I, III y IV, atraviesan la membrana y son captados por la ATP sintasa, último componente de la cadena, para la síntesis de ATP, que produce la conversión de adenosina 5'-difosfato (ADP) + fosfato inorgánico (Pi) en ATP (Figura 1).

Introducción

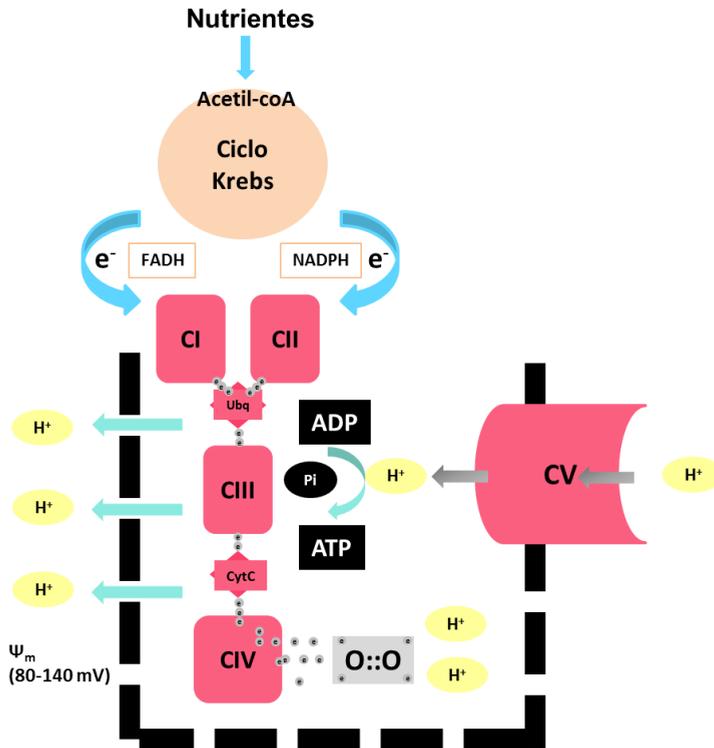


Figura 1. Esquema fosforilación oxidativa. Los nutrientes captados por la célula son convertidos a Acetil-CoA en la mitocondria para ser metabolizado en el ciclo de Krebs. Los electrones liberados son transportados a la cadena de transporte electrónico mediante el NAD y el FAD, para la posterior producción de ATP, siendo el O_2 el último receptor de electrones (Torres-Cuevas, Cernada, et al. 2016).

La eficiencia del metabolismo aeróbico es de aproximadamente de 18 a 20 veces mayor que la anaeróbica (Formentini et al. 2014). En el caso que no hubiera O_2 disponible en el medio, hablaríamos de condiciones anaerobias, se interrumpiría la CTE y por tanto la respiración aeróbica quedaría reducida al mínimo. En estas circunstancias la energía solo se podría obtener del metabolismo anaeróbico. De modo que en el metabolismo anaeróbico una molécula de glucosa produce de 2 a 4 moléculas de ATP, en el aeróbico

se producen 36 moléculas de ATP (Islam 2017). La escasa rentabilidad energética del metabolismo anaeróbica lo hace incompatible con la vida de seres multicelulares, así los mamíferos.

La proporción de hidratos de carbono, proteínas y lípidos utilizada para la síntesis de ATP es específica de cada célula y órgano. Por ejemplo, los tejidos oxireguladores (así, sistema nervioso central (SNC) o miocardio) precisan una elevada cantidad de ATP para su funcionamiento. El cerebro utiliza casi exclusivamente glucosa como fuente de energía siendo incapaz de almacenar sustratos energéticos de acción rápida como el glucógeno, por lo que en caso de déficit de O₂ (hipoxia) o riego sanguíneo (isquemia) se produce un bloqueo inmediato del funcionalismo celular (Sanderson et al. 2013a). Otro ejemplo es el corazón, que obtiene la energía necesaria para la contracción cardíaca fundamentalmente de la oxidación de ácidos grasos libres (Nath y Villadsen 2015).

La regulación de la fosforilación oxidativa depende tanto de la disponibilidad del sustrato (NADH, O₂, ADP, P_i) como de su producto final, ATP y el gradiente electroquímico de protones. En condiciones de reposo, las mitocondrias tienen la mayoría del ADP convertido en ATP, y la síntesis de ATP se ralentiza, de modo que el gradiente electroquímico aumenta e inhibe a la CTE para evitar que se produzca un bombeo de protones. Este mecanismo de retroalimentación ayuda a mantener el Ψ_m en niveles fisiológicos (80-140 mV), en los cuales la producción de ATP es eficaz, y la generación de especies reactivas de oxígeno es mínima (Sanderson et al. 2013a).

2. Especies reactivas del oxígeno y enzimas antioxidantes

2.1 Formación de especies reactivas del oxígeno.

Las especies reactivas del oxígeno (ERO) son radicales libres derivados del O₂, representan la clase más importante de radicales generados en los sistemas vivos y engloban una variedad de moléculas derivadas de la reducción incompleta del oxígeno molecular (Circu y Aw 2010).

En condiciones fisiológicas, más del 90% del O₂ sufre una reducción tetravalente dando lugar a agua (H₂O) en la CTE. Sin embargo, en condiciones fisiológicas hay un pequeño porcentaje (alrededor del 2%) de los electrones que se escapan, causando la reducción parcial del O₂. La formación de ERO depende de que el Ψ_m se encuentre dentro del rango fisiológico (80-140 mV). Una hipopolarización produciría una disminución de las reservas de ATP, bloqueo de las bombas ATP-asa con el subsecuente aumento de calcio mitocondrial, salida de potasio extracelular y acúmulo de sodio en el citoplasma, hiperexcitabilidad neuronal por la inhibición de la recaptación de los neurotransmisores llegando a producir muerte celular. Una hiperpolarización que produzca un $\Psi_m >140$ mV causará un aumento exponencial de la generación de ERO en los complejos I y III (Giordano 2005) produciendo un mayor oxidativo. La producción de ERO en condiciones fisiológicas y patológicas depende directamente de la concentración de O₂ en el tejido (Murphy 2009) lo cual, como veremos

más adelante, tiene una gran repercusión en la traslación clínica de estos conceptos, especialmente en situaciones de hipoxia-reoxigenación.

Los electrones del sistema de transporte mitocondrial de la CTE son la principal fuente de generación de ERO, el 80% de los ERO se genera a nivel mitocondrial (Srinivasan y Avadhani 2012). Otras fuentes endógenas también involucradas en su formación además de la CTE son, la enzima NADPH oxidasa (NOx) en los fagocitos como respuesta a la exposición a agentes infecciosos, sus productos derivados, o mediadores inflamatorios (Kawahara, Quinn, y Lambeth 2007). También se generan radicales libres como respuesta del sistema NOx a señales fisiológicas como la insulina, angiotensina II, factores de crecimiento etc. La reacción de Fenton-Haber-Weiss (Haber y Weiss 1932), el complejo enzimático xantina óxidoreductasa (XOR) (Vergeade et al. 2012), los peroxisomas (Fransen et al. 2012), proteínas reguladoras de hierro intracelular como la hemo-oxigenasa (Pérez et al. 2015), el sistema CYP450 y la presencia de metales de transición como cobre, zinc, selenio y manganeso, pueden producir un aumento exponencial de la generación de ERO por la reacción de Fenton (Bałasz et al. 2015).

2.2 Clase de especies reactivas del oxígeno

La reducción incompleta del O₂ más común consistente en una reducción monovalente de oxígeno que da lugar al **anión superóxido** (O₂^{-•}) poco reactivo, pero potencialmente tóxico por los intermediarios

Introducción

que puede producir. Una reducción monovalente adicional del anión superóxido da lugar a la generación de **peróxido de hidrógeno** (H_2O_2). El peróxido de hidrógeno no es un radical libre y tiene muy poca capacidad agresiva, a no ser que se transforme en radical hidroxilo y puede atravesar membranas actuando como señalizador intercelular en focos lejanos. Por ello es una molécula de señalización. Y por último, una tercera reducción monovalente del anión superóxido producirá el **radical hidroxilo** ($\text{OH}\cdot$), el cual es altamente reactivo y con semivida extremadamente corta (Figura 2). Hay también otras ERO como son el peroxilo, hidroperoxilo, y radicales alcoxi, pero estas se producen en pequeñas cantidades (M. Zhao et al. 2016).

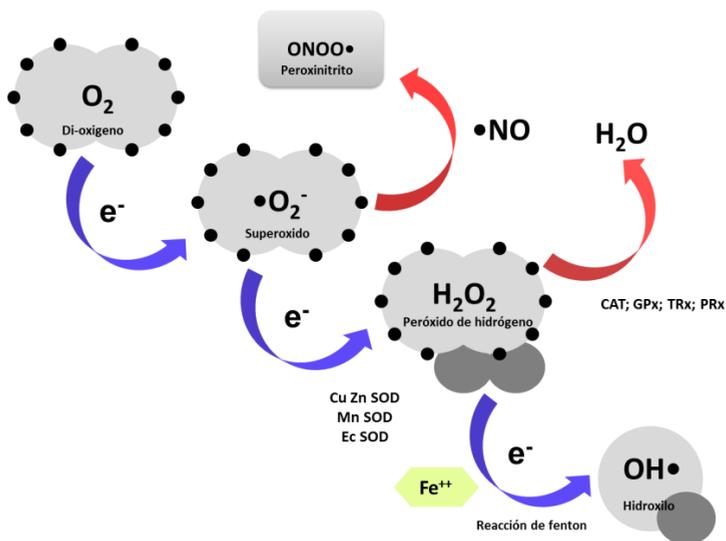


Figura 2. Reducciones monovalentes a partir del oxígeno que originan ERO. La reducción monovalente escalonada del oxígeno conduce sucesivamente a la formación del anión Superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) conocido como especies reactivas del oxígeno (ERO). Además, la combinación de óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) con superóxido dará lugar a la formación de peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot$), una especie reactiva de nitrógeno muy agresiva (ERN).

2.3 Función de las especies reactivas del oxígeno

Las ERO pueden ser extremadamente agresivas cuando actúan como radicales libres causando daño estructural y/o funcional y/o interfieren con los elementos de regulación redox esenciales. No solo las ERO sino también las especies reactivas del nitrógeno (ERN) pueden también producir daño e intervenir en diferentes funciones celulares.

Un radical libre es definido como cualquier molécula capaz de existir independientemente con uno o más electrones no apareados en su orbital más externo (Pryor 1973). Cuando reaccionan con otros radicales libres, formando enlaces covalentes, da lugar a una molécula que se descompone fácilmente produciendo productos tóxicos. Los radicales libres pueden también reaccionar con las moléculas no radicalarias causando reacciones en cadena como por ejemplo, daño al ADN, proteínas y lípidos. El daño molecular producido por los radicales libres es bastante notable y abarca, por ejemplo, la oxidación y nitración de proteínas, disminución de los grupos tioles, peroxidación y nitración lipídica, hidroxilación del ácido nucleico, rotura de las cadenas del ADN, y la formación de aductos con el ADN (Beharry et al. 2017).

Cabe destacar que, las situaciones de alto estrés como son la isquemia-reperfusión, inflamación o hipoxia, van a producir daño a las principales biomoléculas que conllevan inevitablemente a la muerte celular. Por ejemplo, la nitración o carbonilación de proteínas pueden

Introducción

alterar la estructura y función de las proteínas causando daño celular (Lafuente et al. 2016). La oxidación de los fosfolípidos de la membrana celular puede activar la esfingomielinasa y liberación de la ceramida, que activa la apoptosis. Además, el daño al ADN intenso también puede conducir a la necrosis o apoptosis (Niaudet et al. 2017).

Por otro lado, las ERO, especialmente el peróxido de hidrógeno, pueden ser moléculas relativamente estables y desempeñar un papel importante en la regulación de las vías de señalización intracelulares relacionadas con procesos biológicos cruciales como la proliferación, diferenciación celular y la respuesta inflamatoria (Knobloch y Jessberger 2017). Los efectos beneficiosos se producen a bajas concentraciones y están implicadas en una amplia variedad de respuestas celulares. Por lo tanto, las diversas acciones mediadas por las ERO pueden proteger a las células contra el estrés oxidativo (EO) y establecer o mantener la homeostasis redox.

Otro radical libre, el óxido nítrico (NO^*), es una molécula producida por la óxido nítrico sintasa a partir del átomo terminal de nitrógeno de la L-arginina en presencia de NADPH (nicotinamida-adenín-dinucleótido fosfato reducido) y oxígeno. Las diferentes formas de NO sintasa han sido clasificados de la siguiente manera: eNOS, desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis en la pared de los vasos sanguíneos (Kalinowski et al. 2016). La nNOS, neuronal se localiza en el tejido nervioso y esquelético tipo II cuya función es comunicación celular (Bradley y Steinert 2016). La iNOS, inducible, se encuentra en el sistema inmunitario y cardiovascular cuya principal función es defensa contra patógenos (Prauchner 2017). Otra

función de los ERN implica la producción regulada de NO^{*}, que influye en las vías respiratorias y la reactividad vascular. El NO^{*} puede reaccionar con el anión superóxido produciendo el peroxinitrito (ONOO^{*}) que es muy reactivo y producir la alteración de la reactividad vascular pulmonar. Más funciones son el estallido oxidativo producido como respuesta a agentes infecciosos, o la producción de ERO como elementos de detección que regulan las necesidades de oxígeno del tejido, la adhesión celular, la respuesta inmune, o la regulación de la apoptosis inducida (Valko et al. 2007).

2.4 Regulación Redox

El equilibrio redox tiene un papel crítico en el mantenimiento de los procesos biológicos en condiciones normales. Sin embargo, la alteración de ese equilibrio debido a un aumento en la producción de las ERO o disminución de la capacidad de eliminación de las ERO puede alterar las funciones celulares (Trachootham et al. 2006). Recientemente, en algunos estudios se ha observado que algunos pares redox como son el glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG) y cisteína/cistina (Cys/CySS), varían un poco entre individuos sanos, pero mantienen un desequilibrio relativo. De modo que el concepto de estrés oxidativo entendido como un desequilibrio global es incorrecto porque los dos sistemas centrales antioxidantes no están en equilibrio (D. P. Jones 2010). Los pares redox centrales que son GSH/GSSG, Cys/CySS, y tioredoxinas (Trx/TrSS), funcionan reduciendo

Introducción

el H_2O_2 y otros oxidantes para el mantenimiento del estado redox de los grupos tioles oxidables de las proteínas. Estos cambios que se producen en los grupos tioles pueden modular la actividad biológica a través de una estimulación aberrante o suprimiendo ciertas vías de señalización, a través de modificaciones directas sobre biomoléculas, especialmente las proteínas. El sistema redox puede modificar las funciones de las proteínas a través de la regulación de su expresión, modificaciones post-traduccionales y estabilidad (Bubb et al. 2017).

La cantidad de electrones implicados en las vías de señalización y el control redox es extremadamente baja en comparación con los implicados en la producción de energía en la mitocondria y el 1% del oxígeno total consumido por las células. El H_2O_2 es el oxidante mayoritario en la mayor parte de estas reacciones.

La hipótesis redox indica que los tioles oxidables son elementos comunes de control en los procesos biológicos. Estos elementos de control están organizados funcionalmente en circuitos redox, controlados por GSH/GSSG, tiorredoxinas, y otros. Estos circuitos están aislados unos de otros y son muy sensibles para condiciones redox, pueden funcionar de forma independiente en la señalización y en la regulación de los diferentes procesos biológicos. Por lo tanto, el estrés oxidativo podría ser la consecuencia de la interrupción de estos circuitos por diferentes mecanismos (D. P. Jones 2010; Dean P. Jones y Sies 2015).

2.5 Defensas antioxidantes

Puesto que la maquinaria celular está continuamente produciendo ERO y debemos mantener el estado redox celular, se necesita de sistemas de contención. Estos mecanismos de defensa son las denominadas sustancias antioxidantes. Halliwell en 1995 las definió como “cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato” (Halliwell y Gutteridge 1995). Desde el punto de vista bioquímico pueden clasificarse según sean de naturaleza enzimáticos o no enzimáticos.

Antioxidantes enzimáticos

Actúan eliminando a las ERO y protegen a las proteínas a través del uso de las chaperonas, proteínas que contienen metales (transferrina, ferritina y ceruloplasmina) y componentes de bajo peso molecular que actúan como agentes oxidantes y reductores para mantener la estabilidad intracelular redox (Vento et al. 2012).

Las superóxido dismutasas (SOD) son un conjunto de metaloproteínas ampliamente distribuidas que catalizan la dismutación del anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno. En los mamíferos se distinguen 3 formas de superóxido dismutasas en función del ion metálico de transición que encontremos en su estructura: CuZn-SOD intracelular; Mn-SOD o intramitocondrial y, extracelular o EC-SOD (Figura 2 y 3).

Introducción

La enzima catalasa (CAT) participa en la eliminación del peróxido de hidrógeno (Chance, Sies, y Boveris 1979) , al igual que la glutatión peroxidasa (GPx), diferenciándose ambas en términos de localización y afinidad por H_2O_2 , ya que CAT se encuentra fundamentalmente en los peroxisomas (Tolbert y Essner 1981) y tiene menor afinidad por el H_2O_2 que la GPx. La enzima GPx reduce la molécula de H_2O_2 mediante la oxidación de GSH a GSSG. El GSSG es reducido de nuevo a GSH por la vía de las pentosas y la glutatión reductasa (Figura 2 y 3).

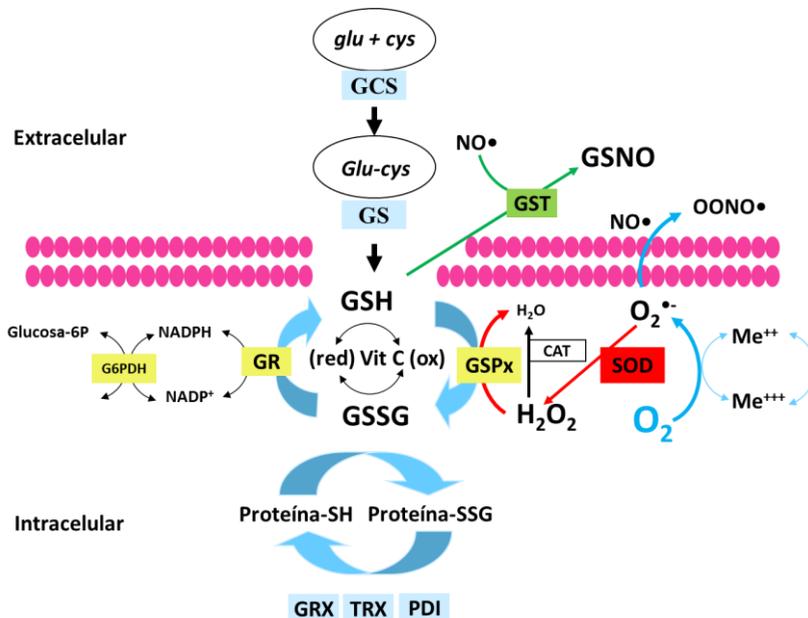


Figura 3. Ciclo redox del glutatión. El anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) producido principalmente en las mitocondrias es convertido a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la Superóxido Dismutasa (SOD). El H_2O_2 puede ser detoxificado tanto por la catalasa (CAT) como por la glutatión peroxidasa (GPx) que produce agua (H_2O). Esta reacción catalizada por GPx requiere un electrón (e^-) producido después de la oxidación de glutatión (GSH) a su forma oxidada (GSSG). GSSG se puede reducir de nuevo a GSH por glutatión reductasa (GR) utilizando un e^- proporcionado por la oxidación de nicotinamida reducida (NADPH).

Otro sistema de detoxificación del peróxido de hidrógeno en la mitocondria son las enzimas glutarredoxina, tiorredoxina, tiorredoxina reductasa y peroxirredoxinas (Figura 3).

El complejo enzimático hemo-oxigenasa (HO-1 y HO-2) con actividad antioxidante y de señalización celular cataliza la conversión del grupo hemo en biliverdina, dando lugar a Fe^{2+} y monóxido de carbono. En mamíferos, se conocen dos isoformas de esta enzima: HO-1 que se induce por numerosos estímulos y la HO-2 que es una proteína constitutiva abundante en cerebro y testículos.

Antioxidantes no enzimáticos

Son aquellas moléculas que reaccionan directamente sin que sea necesaria ninguna intervención enzimática con las especies reactivas o con los productos de reacción de éstas. Sin embargo, en ocasiones pueden participar también en procesos antioxidantes enzimáticos. Entre los antioxidantes no enzimáticos encontramos al glutatión, la vitamina C, la vitamina E, los β -carotenos y el ácido úrico (Maltepe y Saugstad 2009a; Bartz y Piantadosi 2010).

En la transición fetal-neonatal las defensas antioxidantes tanto enzimáticas como no enzimáticas se desarrollan en el ser humano en las últimas semanas de la gestación paralelas al surfactante pulmonar, con la finalidad teleológica de preparar al feto para la respiración pulmonar.

3. Biomarcadores de estrés oxidativo

En determinadas circunstancias las concentraciones elevadas de las ERO y ERN pueden causar daño estructural o funcional a estructuras celulares, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos, ADN y ARN (Valko et al. 2007). Sin embargo, dada su extremadamente corta vida media resulta casi imposible fuera del contexto experimental su determinación y su aplicabilidad médica. Sin embargo, el producto resultante del daño molecular es, en general, mucho más estable que las ERO y ERN y por ello estos metabolitos se vienen utilizando como biomarcadores del estrés oxidativo.

3.1 Ratio glutatión reducido y oxidado (GSH/GSSG)

El análisis del estado del glutatión, incluyendo la oxidación de GSH a GSSG y las reacciones de glutatiónilación proteica ($P-SH \rightarrow P-SG$), proporcionan una medida del estado celular redox (Jones et al., 2015). De modo que los niveles de GSH y GSSG son utilizados para la evaluación del estrés oxidativo mientras que el ratio de GSH a GSSG (GSH/GSSG) es un marcador que representa la capacidad antioxidante de la célula. En humanos, el estado total del glutatión puede ser determinado no sólo en plasma como GSH/GSSG, sino también en sangre total, en el cual el 0,5% del glutatión proviene del plasma y el 99,5% de los eritrocitos. Ambas son formas simples y directas para evaluar el estrés oxidativo asociado a patologías o intervenciones clínicas, así como para poner a prueba la eficacia de ciertas terapias clínicas (Escobar, Cernada, y Vento 2011)

El ratio GSH/GSSG se ha utilizado ampliamente como un marcador fiable de estrés oxidativo en neonatología, especialmente en estudios relacionados con la asfixia y reoxigenación con diferentes concentraciones de oxígeno (Vento et al. 2001, 2003, 2005, 2009; Rook et al. 2014)

3.2 Biomarcadores de oxidación proteica

Las proteínas, son consideradas como los mayores objetivos de los radicales libres (Dalle-Donne et al. 2005). Todos los aminoácidos presentes en las proteínas, contienen residuos susceptibles de ser atacados por radicales libres. Dentro de los aminoácidos la tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina, metionina y cisteína son los más susceptibles a procesos oxidativos (Davies, Delsignore, y Lin 1987).

La oxidación proteica puede ser reversible o irreversible dependiendo de las ERO y la severidad del EO. Entre los radicales libres del oxígeno, el radical hidroxilo, es de los más reactivos y puede atacar indiscriminadamente y de modo irreversible sobre moléculas biológicas, incluyendo los aminoácidos (Torres-Cuevas, Kuligowski, et al. 2016). Las modificaciones proteicas más comunes utilizadas como biomarcadores de estrés oxidativo son la oxidación y nitración de la tirosina y la carbonilación proteica.

Derivados de la oxidación y nitración de la Tirosina

Los aminoácidos oxidados son unos excelentes marcadores de estrés oxidativo ya que son fiables, específicos y estables (G. A. Molnár

Introducción

et al. 2005). Así, el aminoácido esencial Fenilalanina (Phe), se convierte, en condiciones fisiológicas, en para-tirosina (p-Tyr) por acción de la enzima Fenilalanina hidroxilasa (Matayatsuk et al. 2007). Sin embargo, tras la reacción con el radical hidroxilo, la Phe puede formar dos isómeros de la p-tirosina tales como la orto-tirosina (o-Tyr) y la meta-tirosina (m-Tyr). Además, en presencia de peroxinitrito la p-Tyr se puede convertir en 3-nitrotirosina (3NO₂-Tyr), un biomarcador específico de nitración proteica (Tsikas 2012).

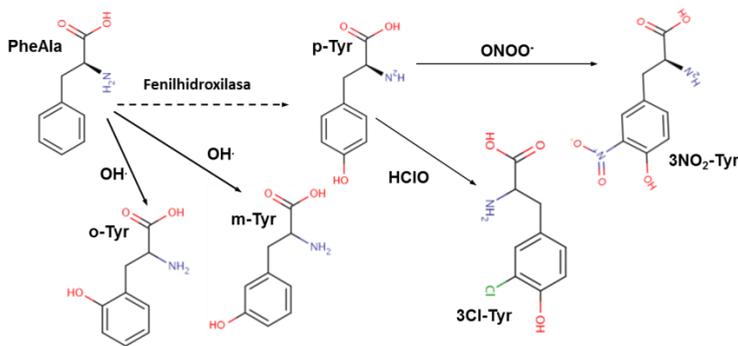


Figura 4. Esquema de formación de biomarcadores de daño a proteínas derivados de la tirosina.

La nitración proteica y las ERN tienen un papel importante en la señalización y en las funciones celulares tales como la respuesta inflamatoria y la apoptosis. Por lo tanto, el exceso de 3NO₂-Tyr se ha postulado como un marcador de inflamación, causado por condiciones patológicas. También el ataque de ácido hipocloroso (HClO) sobre la p-Tyr da lugar a la 3-Clorotirosina (3Cl-Tyr), y es utilizado como un marcador de inflamación porque esto indica activación de la enzima mieloperoxidasa (MPO) (MPO convierte el H₂O₂ a HClO) (Torres-Cuevas, Kuligowski, et al. 2016).

La determinación analítica de estos compuestos se basa en la espectrometría de masas (MS) que han sido ampliamente investigados en muestras de orina experimentales y humanas en el período neonatal, así como en el líquido amniótico de mujeres embarazadas y en tejidos en animales de experimentación (Solberg et al. 2007; Ledo et al. 2009; Vento et al. 2009; Escobar, Teramo, et al. 2013; Torres-Cuevas, Kuligowski, et al. 2016).

Carbonilación proteica

Las proteínas pueden sufrir el proceso de carbonilación cuando se produce un ataque del radical hidroxilo, con la formación de aldehídos ($RCH=O$) y cetonas ($RR'C=O$) en presencia de oxígeno (Morgan, Pattison, y Davies 2012). Las cadenas laterales de los aminoácidos lisina, arginina, prolina y treonina son los principales residuos de aminoácidos susceptibles de producir derivados de carbonilo. Debido a su estabilidad química, la carbonilación de proteínas es un marcador general y ampliamente utilizado para medir el daño oxidativo en estudios experimentales y clínicos (Breusing et al. 2010). Los grupos carbonilos pueden ser detectados en tejidos o fluidos biológicos (plasma, suero) por varias técnicas tales como la espectrofotometría, ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), o por western blot después de derivatización para 2,4- dinitrofenilhidrazona (DNP) por reacción con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (Loukovaara S. et al., 2014).

3.3 Biomarcadores de oxidación al ADN

La molécula de ADN es susceptible de ser atacada principalmente por el radical hidroxilo. La modificación se puede dar tanto en la cadena principal del fosfato de la desoxirribosa como en las bases nitrogenadas de los nucleótidos, generando una amplia variedad de modificaciones en las bases y en los azúcares. Fisiológicamente, las modificaciones oxidativas al ADN se producen continuamente, y los mecanismos enzimáticos reparadores de ADN ligados a las glicosilasas (Gao Y. et al., 2017) son esenciales para mantener un estado de equilibrio de bajo daño oxidativo al ADN (Jones et al. 2015). Por lo tanto, la oxidación del ADN puede verse agravada por el daño oxidativo a proteínas de los mecanismos de reparación. La determinación en orina de derivados del ADN oxidativo refleja el equilibrio entre el daño y reparación del ADN (Cadet y Wagner 2013; Poulsen et al. 2014).

La guanina, es la base nitrogenada más propensa a la oxidación. La interacción de $\text{OH}\cdot$ con la guanina en posición C8 conduce a la formación de la 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG) por abstracción de un electrón. La formación de 8-OHdG, es el producto del daño oxidativo al ADN y puede ser cuantificada para indicar la extensión del daño del ADN (Nishida y Kudo 2013).

La 8-OHdG es el biomarcador más utilizada de daño oxidativo al ADN y más extensamente estudiado en la actualidad. Se puede medir en la orina o directamente a partir de muestras de tejido, aislando el ADN previamente y a continuación produciendo una digestión *in vitro*

(Loft et al. 2012; Barregard et al. 2013; Kuligowski, Torres-Cuevas, et al. 2014).

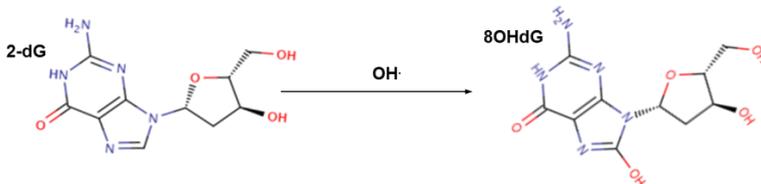


Figura 5. Esquema de formación de la 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG).

En orina ha sido utilizada para valorar el daño oxidativo al ADN en el organismo (Kuligowski, Escobar, et al. 2014). Sin embargo, la 8-OHdG puede proceder de la degradación de D-guanosina trifosfato, precursor del ADN, ácido Ribonucleico (ARN) y cofactor de reacciones enzimáticas, y no sólo de la eliminación de los residuos oxidados de guanina que derivan de los procesos de reparación del ADN. Además, existen otros productos derivados del daño del ADN (Dalle-Donne et al. 2006). De ahí, que la 8-OHdG urinario sea una medida parcial del daño al ADN. No obstante, en un estudio sobre biomarcadores de estrés oxidativo en el que se utilizó un modelo experimental de estrés oxidativo en roedores mediante el envenenamiento con tetracloruro de carbono, demuestra que la 8-OHdG en orina es un candidato potencial como biomarcador de estrés oxidativo (Kadiiska et al. 2005), hasta la fecha 8-OHdG es el biomarcador más preciso para evaluar la oxidación del ADN.

3.4 Biomarcadores de oxidación lipídica

De entre los principales tipos de biomoléculas, los lípidos y particularmente los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), son los más susceptibles al ataque por los radicales libres (Cheeseman y Slater 1993). Este proceso, se denomina *peroxidación lipídica* (LOP). Actualmente, la LOP puede ser originada por diferentes fuentes y puede ser clasificada como enzimática, no enzimática mediante peroxidación no-radicalaria y no enzimática mediante peroxidación de los radicales libres (Guéraud et al. 2010).

La LOP consiste en una reacción en cadena que comienza con la abstracción de un hidrógeno de un ácido graso que así es convertido en un radical libre (radicales alquilo, peroxilo e hidroperoxilo) y que a su vez abstrae el hidrógeno de otro ácido graso y así sucesivamente. Esto da lugar a la formación de gran número de especies activadas que atacan, sobre todo, grupos aldehído, siendo el producto de LOP más abundante el malondialdehído (MDA), marcador de EO más ampliamente utilizado como indicador de daño lipídico (Bharadwaj et al. 2017). La peroxidación de las membranas lipídicas produce alteraciones de sus propiedades biofísicas, como alteración de su grado de fluidez y puede conducir a la inactivación de los receptores de membrana que en conjunto alterarán la función celular (Cháfer-Pericás et al. 2015).

La complejidad de la LPO se origina a partir de la gran cantidad de productos que se pueden originar. Entre los PUFA, la peroxidación de los ácidos grasos como el ácido araquidónico que forma parte de los fosfolípidos de las membranas celulares y conduce mediante la acción

de la lipo-oxigenasa (LOX) a la formación de leucotrienos (LTs), ácidos derivados del Hidroxitetraenoico (HETEs), y de la ciclo-oxigenasa (COX) a la formación de prostaglandinas (PGs), y tromboxanos (TXs), respectivamente; todos ellos son conocidos por ser mediadores de la inflamación y denominados eicosanoides (Ecker et al. 2012).

Por otro lado, la peroxidación no enzimática de los PUFA mediada por los radicales libres también se ha estudiado en profundidad, y ocurre en tres etapas:

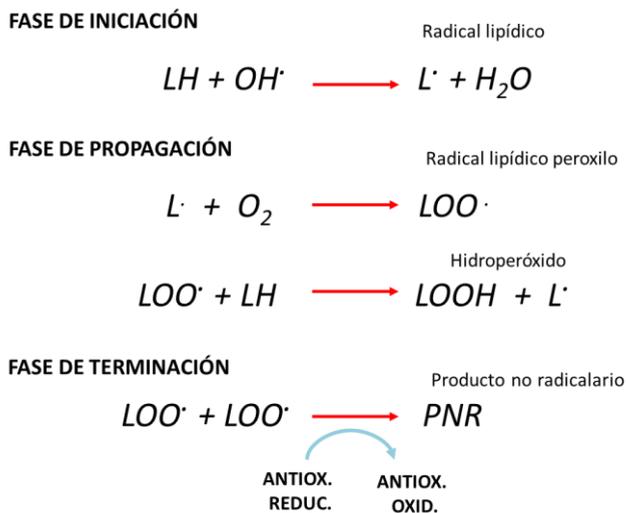


Figura 6. Esquema de las etapas de la peroxidación lipídica.

LPO mediada por radicales libres genera productos estables, que se pueden dividir en productos de hidroperóxido de lípidos primarios y secundarios, siendo estos últimos metabolitos tales como aldehídos o isoprostanos (Romano et al., 2016). El Malondialdehído (MDA), 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), y F₂-isoprostanos (F₂-IsoPs) son productos de LPO utilizados con frecuencia como biomarcadores.

Introducción

Las determinaciones de la mayoría de los biomarcadores de EO, anteriormente explicados, en diferentes matrices biológicas se realizan mediante cromatografía líquida o de gases acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS; GC-MS/MS). Es un modo sensible y preciso que permite la cuantificación simultánea de varios biomarcadores y establecer rangos típicos de estos biomarcadores en los recién nacidos (Kuligowski, Escobar, et al. 2014; Cháfer-Pericás et al. 2016; Kuligowski et al. 2015).

4 El oxígeno en la vida fetal

4.1 Cambios fisiológicos en la transición fetal-neonatal (TFN)

La TFN es uno de los momentos de gran relevancia en la vida, en el cual se producen cambios fisiológicos, rápidos y complejos. Uno de los más importantes es el intercambio gaseoso pulmonar, favorecido por una serie de acontecimientos cardiopulmonares.

Durante la vida fetal, el intercambio gaseoso entre la madre y el feto se realiza a través de la placenta. De modo que cuando se produce el pinzamiento del cordón umbilical, cesa la circulación umbilical y se inician las primeras respiraciones. A nivel pulmonar se producen cambios físicos como, la expansión pulmonar, la cual va a permitir la liberación de surfactante, seguida de una caída de resistencias vasculares pulmonares y aumento del flujo de sangre al pulmón que producen la obliteración de la vena umbilical y del conducto venoso, y

de los cortocircuitos cardiovasculares (foramen oval y ductus arterioso). Las vías por las cuales el feto mantiene un alto tono vascular pulmonar incluyen una baja tensión de oxígeno, vasoconstrictores, como endotelina-1, derivados de los leucotrienos y rho kinasas. La vasoconstricción también es promovida por una baja producción basal de vasodilatadores, como prostaciclina y NO (Steinhorn 2010).

El drenaje del líquido pulmonar fetal y la distensión rítmica de los pulmones, permiten la estabilización de la capacidad residual funcional. Los recién nacidos a término, tardan sólo unos pocos minutos en airear el pulmón casi completamente. Los principales mecanismos por los cuales se elimina el líquido pulmonar de las vías respiratorias al nacer son, la presión positiva en la vía respiratoria que favorece el rápido tránsito del líquido desde los alveolos al intersticio pulmonar (Siew et al. 2013) y la reabsorción de sodio por los canales de Na⁺ amilorida-dependientes. El transporte activo de sodio a través del epitelio pulmonar mueve el líquido del espacio alveolar al intersticio para que de ahí sea absorbido al espacio vascular (Riviere, McKinlay, y Bloomfield 2017).

4.2 El rol del oxígeno en la TFN

El feto se encuentra en una hipoxia fisiológica durante el periodo embrionario, durante el cual se produce la angiogénesis, la proliferación celular, la organogénesis, y conforme se acerca al periodo perinatal se origina la maduración de la defensa antioxidante (Vento y Teramo 2013).

Introducción

Los niveles de oxigenación en el feto varían durante la gestación y dependen de los gradientes de presión entre la sangre materna, el tejido placentario, la sangre fetal y el tejido fetal. Durante la etapa embrionaria del desarrollo, el feto es extremadamente sensible al EO, y un ambiente de bajo contenido de O₂ es necesario para un desarrollo adecuado. La hipoxia en esta etapa va a facilitar la liberación de HIF- α y la expresión de abundantes genes entre los que se encuentran principalmente los factores de crecimiento vascular (VEGF) que promueven la angiogénesis necesaria para el mantenimiento de las células madre pluripotentes. En la segunda mitad del embarazo, la placenta proporciona al feto mayores cantidades de oxígeno y nutrientes, lo que produce aumento exponencial en tamaño y peso. Los estudios realizados en fetos humanos han demostrado que la P_aO₂ antes de la 12^a semana de gestación, tiene un valor de alrededor de 18-20 mmHg (Simon et al. 2008). Sobre la 14-16^a semana de gestación se produce un pico alcanzando los 60 mmHg, que después irá disminuyendo lentamente hasta quedarse alrededor de los 45-48 mmHg en la semana 36. Inmediatamente después del nacimiento y con el inicio de la respiración espontánea, se produce un cambio drástico de la P_aO₂ que aumenta hasta los 80-90 mmHg en los primeros 5-10 minutos después del nacimiento (Kiserud 2005; Maltepe y Saugstad 2009b; Schneider et al. 2011; Yuansheng Gao y Raj 2010).

La P_aO₂ intraútero (IU) es de alrededor de unos 3.3 kPa (25 a 30 mmHg) en comparación con los 9 kPa (80 a 90 mmHg) en la madre (Yu Gao et al. 2010) (Figura 7). Curiosamente, esta situación se ve compensada por la presencia de la hemoglobina fetal, que presenta

una mayor afinidad por el oxígeno, favoreciendo el paso de oxígeno de la placenta a la sangre fetal y un aumento de la saturación parcial de oxígeno (SpO_2).

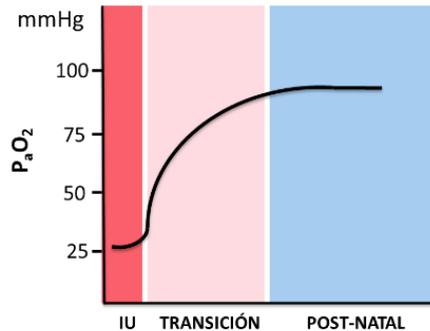


Figura 7. Cambio de la PaO_2 durante la transición fetal-neonatal (realizado con los valores expresados en Vento M et al J Pediatr 2003).

Ese incremento de la PaO_2 produce un estrés oxidativo fisiológico necesario para desencadenar la expresión de un número significativo de genes necesarios para la adaptación posnatal. Es importante resaltar que, en el último trimestre de gestación, se produce el paso de enzimas antioxidantes a través de la placenta y el aumento de la actividad propia de las enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GPx) de los fetos que lo preparan para la respiración pulmonar (Berger et al. 1998; Hooper et al. 2015). En ensayos realizados en casos de abortos humanos, se ha demostrado que las actividades de la SOD, CAT, GPx, y de la glutatión reductasa (GR) aumentan al final de la gestación. Por lo tanto, los niños prematuros nacidos son más susceptibles a los daños producidos por las ERO, especialmente en circunstancias pro-oxidantes como son la hipoxia, reoxigenación, inflamación o infección.

Introducción

Además, el paso de los antioxidantes a través de la placenta también se produce en la última fase de la gestación, al igual que las enzimas antioxidantes, como el GSH, TRx, hem-oxigenasas, vitaminas (C, E, A y carotenos) y micronutrientes (Cu, ZN, Se, etc.), no se alcanza hasta el final de la gestación (Vento et al. 2009). Curiosamente, el uso de esteroides prenatales, ha mejorado espectacularmente la morbilidad de los recién nacidos prematuros, ya que se asocia con una mejora de la actividad del sistema de defensa antioxidante lo que favorece una adaptación postnatal ante una situación de hiperoxia relativa (Vento et al. 2009). De modo que, en situaciones específicas que ocurren durante el embarazo como es la preclampsia, se altera significativamente la expresión de las enzimas antioxidante en la placenta causando una carga pro-oxidante para el feto (Burton 2009). La hipoxia fetal durante la transición fetal-neonatal puede estimular la expresión de ciertas enzimas antioxidantes como HO-1 o tiorredoxina. De hecho se ha visto que la hipoxia-reoxigenación en los bebés nacidos a término y pretérmino provoca un aumento significativo de las actividades de enzimas antioxidantes y una reducción del cociente GSH/GSSG (Vento et al. 2012).

En la TFN, la concentración de O₂ en sangre y la disponibilidad para ser cedido a los tejidos aumenta en unos pocos minutos a valores similares a los del adulto que produce el estallido respiratorio, originando una súbita generación de especies ERO que pueden actuar como moléculas señalizadoras que modulan la maduración de vías metabólicas específicas (Plank et al. 2011; Escobar, Teramo, et al. 2013).

4.3 Sensores de Oxígeno

Los sistemas fisiológicos están adaptados para detectar las necesidades y proporcionar el O₂ suficiente para el normal funcionamiento celular. Los factores de transcripción más relevantes que tenemos como sensores de O₂ son, el factor inducible por hipoxia (HIF), la proteína de unión a la respuesta de AMPc (CREB), el factor nuclear kappa B (NFkB), la proteína activadora 1 (AP-1) y p53. Estos factores regulan la expresión génica en respuesta a cambios en la concentración de O₂ y en las ERO.

Los ambientes con bajas concentraciones de O₂ favorecen el desarrollo temprano de la placenta y del feto y estimulan la angiogénesis debido a las bajas concentraciones de O₂ en los tejidos que tiene lugar por intermediación de factores de crecimiento tanto transcripcionales como post-transcripcionales, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento placentario (PGF) y las angiopoyetinas 1 y 2.

El regulador principal para las respuestas adaptativas de la célula a la hipoxia es HIF-1, un factor de transcripción heterodimérico con dos subunidades (HIF-1 α y HIF-1 β) (Semenza 2012). Ambas subunidades comparten cierta homología en sus extremos N-terminales, involucrados en la dimerización y en la unión al ADN. La translocación al núcleo de HIF-1 α y la heterodimerización con HIF-1 β son necesarias para la unión de HIF-1 a los lugares de unión de HIF-1 (HBSs) y su consiguiente activación. De manera general, el ARNm de ambas

Introducción

subunidades se expresa constitutivamente bajo cualquier condición. Sin embargo, la proteína de HIF-1 α sólo es detectable en hipoxia. En presencia de oxígeno, HIF-1 α sufre modificaciones post-traduccionales por parte de hidroxilasas, las cuales hidroxilan residuos de prolina 402/564 y de asparragina 803. Estas modificaciones permiten la unión de la proteína VHL (von Hippel Lindau) a los sitios hidroxilados de HIF-1 α , provocando así su ubiquitinación y posterior degradación. En ausencia de oxígeno, HIF-1 α es fosforilado y translocado al núcleo, donde dimeriza con HIF-1 β y se acopla a su coactivador CBP/p300, permitiendo la transactivación e inducción de genes (Z. M. Wang, Pierson, y Heymsfield 1992; Prabhakar y Semenza 2015).

La regulación de HIF-1 se atribuye fundamentalmente a las especies reactivas de oxígeno, destacando el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Esta regulación se ejerce de dos maneras distintas. En un caso, la enzima NADPH oxidasa es la responsable de la producción de ERO, que en condiciones de normoxia inducen la degradación de HIF-1 α . Una segunda situación señala que la producción de ERO en la mitocondria, en condiciones de hipoxia, induce la estabilización de HIF-1 α en el citosol (Hu, Liu, y Huang 2013).

Los genes transcritos activados por HIF-1 se pueden clasificar según la función celular que vayan a desempeñar:

1. Angiogénesis: factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y sus receptores (VEGRF).
2. Metabolismo: transportador de glucosa 1 (GLUT-1), hexoquinasa-2, enolasa-1 y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH).

3. Función vascular: óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), endotelina-1 (ET-1) y hemo oxigenasa 1 (HO-1).
4. Eritropoyesis: Eritropoyetina (EPO).
5. Motilidad: Factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α).
6. Metabolismo del hierro: Transferrina.

Los genes activados, de la respuesta de HIF son especialmente VEGF y EPO, los cuales mejoran la liberación de O₂ al tejido. La EPO no atraviesa la placenta, y no se acumula en el tejido. Por lo tanto, la concentración plasmática de EPO se determina por su velocidad de síntesis y eliminación, y los niveles de EPO de fluido amniótico se correlacionan bien a los niveles de EPO en plasma fetal y neonatal obtenidos simultáneamente en la cesárea electiva y de emergencia. En el líquido amniótico la concentración de EPO aumenta exponencialmente durante la hipoxia fetal y se correlaciona con el estrés oxidativo y nitrosativo en el feto.

La alteración de la concentración de EPO en líquido amniótico se correlaciona con complicaciones posnatales inmediatas y, por lo tanto, podrían utilizarse como un biomarcador (Escobar, Teramo, et al. 2013).

5. Asfixia perinatal

La asfixia perinatal es una de las causas más prevalentes de muerte neonatal precoz, que puede en los supervivientes evolucionar

Introducción

hacia otras patologías como la encefalopatía hipóxico-isquémica (EHI). A nivel global la incidencia es de 20 casos por 1000 nacidos vivos a término en los países de baja renta mientras que en los de alta renta se tienen cifras que oscilan de 0.5-2 casos por 1000 nacidos vivos. Un elevado porcentaje de los supervivientes sufrirán un retraso importante en su neurodesarrollo, sensorial y/o parálisis cerebral (Dixon et al. 2015; Lehtonen et al. 2017).

La asfisia perinatal puede surgir de un gran número de complicaciones tanto antes del parto como durante el nacimiento. Muchas se atribuyen a una insuficiencia placentaria, puede haber un problema fetal, respiratorio o cardiovascular, del feto o del recién nacido.

Sin embargo, también puede ser que la madre tenga alguna patología que impida la llegada de una cantidad suficiente de sangre, oxígeno y nutrientes a la placenta, como la preclamsia o la diabetes tipo I, anemias marcadas, infecciones y alteraciones de la contractilidad uterina. Cuando es excesiva afecta el flujo sanguíneo hacia la placenta (Simmons 2006; Teramo 2010). Hay causas que son debidas a la placenta, como el infarto placentario, en el que se pierde un porcentaje importante de la superficie de intercambio por la fibrosis, el desprendimiento prematuro de placenta y cuadros como el *hydrops*, que no sólo afectan al feto sino también la placenta y sus funciones de intercambio.

5.1 Fisiopatología de la isquemia-reperfusión

La asfixia perinatal es producida por una reducción del flujo sanguíneo (isquemia) y/o oxigenación (hipoxia) y muy probablemente por ambas razones (Vannucci 1990; W. K. Johnston et al. 2001). Cuando se produce una isquemia acompañada de hipoxia disminuye el aporte de oxígeno a los tejidos y se altera el metabolismo y funcionamiento celular. En función de las características metabólicas de cada tejido, la duración e intensidad de la HI va a determinar la extensión y la irreversibilidad del proceso.

En la fase inicial de la agresión hipóxico-isquémica severa se produce una alteración del metabolismo energético celular. En ausencia de oxígeno, la glucólisis se convierte en la única fuente de producción de ATP. Como el principal producto de la glucólisis anaeróbica es el lactato, sólo se generan dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa lo que provoca una disminución de las reservas de ATP y la inactivación de las bombas sodio-potasio ATP-asa dependientes. Ello conduce a una entrada masiva de Na^+ y Ca^{++} y una disminución de la concentración del K^+ intracelular con retención de agua y edema celular. La pérdida del equilibrio iónico provoca una despolarización, edema e inhibición de la recaptación de neurotransmisores en el espacio sináptico con hiperexcitabilidad neuronal. Las consecuencias de la entrada masiva de Ca^{++} intracelular son, la activación de lipasas, proteasas y nucleasas, que conducen a la alteración del citoesqueleto, la membrana celular y daño nuclear además de la activación de NO sintasa, producción de radicales libres

Introducción

y disfunción mitocondrial y muerte celular por necrosis (Hassell et al. 2015).

Tras la reanudación del flujo sanguíneo y/o el aporte de oxígeno y nutrientes se observa la reperfusión, acompañada de la producción de un exceso de ERO (McCord 1985; Odeh 1991). El daño por reperfusión especialmente la reoxigenación generará una amplificación del daño inicial en las diferentes áreas del cerebro produciendo muerte neuronal por apoptosis. Es interesante señalar que la severidad del daño por reoxigenación está en relación directa con el tiempo e intensidad de la hipoxia-isquemia y también de la concentración de oxígeno utilizada durante la reoxigenación/reperfusión (B. B. Granger et al. 2015). En estudios experimentales, en los cuales se han determinado biomarcadores de daño al ADN por EO y lesiones histológicas en periodos prolongados de hipoxia han obtenido una correlación del daño proporcional a la fracción inspiratoria utilizada durante la reoxigenación (Solberg et al. 2007).

Hoy en día se están realizando estudios metabolómicos tanto en cerebro y sangre de cordón para evaluar el estudio de nuevos biomarcadores que permitan el establecimiento de una terapia más precoz y dirigida (Solberg et al. 2007, 2013; Kuligowski, Escobar, et al. 2014; Ahearne et al. 2016; Sánchez-Illana et al. 2017).

5.2 Fuentes de especies reactivas en la isquemia-reoxigenación

Las principales fuentes de especies reactivas durante la isquemia/reperfusión (IR) son la CTE mitocondrial y el sistema de la xantina oxidasa (XO). Otras, aunque en menor medida, son el sistema NADPH oxidasa y el desacoplamiento de la NO sintasa (D. N. Granger y Kvietys 2015).

En la cadena de transporte mitocondrial la generación de radicales libres en condiciones normales es muy baja, tan solo un 2%. El Ψ_m se mantiene dentro de los límites normales y permite el bombeo de protones y la síntesis de ATP. Sin embargo, en situaciones de hipoxia la ausencia de O_2 provoca un bloqueo de los electrones en la cadena respiratoria y un descenso subsiguiente del Ψ_m . Niveles muy bajos del Ψ_m impiden la actividad eficaz de la ATP sintasa y se detiene la producción de ATP que precede a la lisis mitocondrial y en consecuencia a la muerte celular. Durante la reoxigenación se recupera el Ψ_m y se reinicia la síntesis de ATP. Sin embargo, una salida del flujo de electrones por los componentes de la cadena respiratoria va a ocasionar la generación de una elevada cantidad de ERO que pueden dañar las membranas mitocondriales provocando la liberación de proteínas pro-apoptogénicas (Bcl2, Bax, Bad, etc.) que activarán las vías de las caspasas causando la muerte celular programa (Sanderson et al. 2013b; A. J. Granger et al. 2013).

Por otro lado, el sistema enzimático de la XO en condiciones normales realiza del catabolismo de las purinas que hidroxila a ácido

Introducción

úrico para permitir su eliminación por la orina. Sin embargo, durante isquemias prolongadas se produce un catabolismo exhaustivo del ATP que se convierte en hipoxantina ya que los mecanismos mitocondriales de la resíntesis del ATP a partir de AMP o ADP están bloqueados (Saugstad et al. 2014). Debido a esto, la enzima xantina deshidrogenasa (XD), no puede transferir electrones al oxígeno molecular, sino que lo hace a la coenzima NAD⁺, reduciéndola a NADH + H⁺. En determinadas condiciones experimentales la XD puede convertirse en XO, que en lugar de reducir el NAD⁺ que puede transferir los electrones al oxígeno molecular, produciendo superóxido y peróxido de hidrógeno. Estos pueden reaccionar entre sí dando origen al radical hidroxilo o con óxido nítrico produciendo peroxinitrito.

La conversión de la XD a XO en los tejidos isquémicos es por la acción de la calpaína, una proteasa dependiente de iones Ca⁺⁺ y por procesos de oxidación de grupos tioles. Por lo tanto, aunque la reoxigenación de los tejidos es por un lado beneficiosa, por el otro ocasiona un aumento de formación de ERO, empeorando el daño causado por la isquemia.

La actividad de XO está también regulada a nivel post-traslacional por la presión parcial de oxígeno existente en los tejidos de modo que cuando menor es la tensión de oxígeno mayor es la actividad de la XO. Ello explicaría que el daño por estrés oxidativo ya se puede iniciar en la fase de hipoxemia y se ve amplificado en la de reoxigenación. Recientemente se ha demostrado la capacidad de la XO de generar NO a partir de nitritos. Esta capacidad se vería sustancialmente

incrementada en situaciones de hipoxia y de acidosis. La generación simultánea de superóxido y de óxido nítrico daría lugar a la formación peroxinitrito. Asimismo, citoquinas como IL-1, IL-6, IFN- γ o TNF- α también potencian la actividad de XO lo que explica la sinergia existente entre la patología por radicales libres y la inflamación tan presente en el SNC (Battelli et al. 2016; Cantu-Medellin y Kelley 2013).

5.3 Reanimación postnatal con bajo oxígeno

La utilización de concentraciones bajas de O₂ durante la reanimación tiene su fundamento en la disminución de la generación de radicales libres por la activación de las oxidasas (XO, NOX) durante la reoxigenación. Su utilización ha mostrado excelentes resultados clínicos significativos en relación con la disminución de la mortalidad, mejoría en la tendencia a disminuir la EHI (aunque no significativa) y en los marcadores bioquímicos indicadores de estrés y/o daño oxidativo tanto en nacidos a término como pretérmino (Vento 2014).

El uso del aire ambiente en la reanimación del recién nacido a término fue recomendado por el “International Liaison Committee on Resuscitation” (ILCOR) en 2010 y el uso de fracciones inspiratorias bajas (0.21-0.3) en el caso de prematuros extremos en la edición de ILCOR 2015 (Perlman et al. 2015).

5.4 Períodos evolutivos de la encefalopatía hipóxico-isquémica (EHI)

Desde un punto de vista fisiopatológico la evolución de la EHI se divide en 3 fases, en las que puede haber interferencias entre las mismas. La aplicación de las distintas terapias viene condicionada por las características fisiopatológicas de cada fase para optimizar su eficacia (Douglas-Escobar y Weiss 2015).

- I. La primera fase tiene una duración de 0-6 horas y se caracteriza por una disminución del flujo sanguíneo al feto por el cordón umbilical causando una hipotensión arterial sistémica y una pérdida de la autorregulación en la circulación cerebral. La isquemia cerebral produce una hipoxia, acidosis y daño cerebral secundario como consecuencia del fallo energético primario.
- II. En una fase ulterior (6-48 horas) se mantiene un estado de excitotoxicidad, un empeoramiento de la función mitocondrial y del estrés oxidativo secundario a alteraciones del potencial de membrana y reducción de la síntesis de ATP, pero en un entorno de alcalosis intracelular y adecuada oxigenación.
- III. Hay una tercera fase que puede durar días, semanas e incluso meses que se caracteriza por la presencia de una inflamación y cambios epigenéticos que conducen a alteraciones en el crecimiento axonal, neurogénesis y sinaptogénesis.

5.5 Estrategias terapéuticas de la EHI

Hoy en día, hay pocas terapias efectivas bien establecidas para la EHI neonatal. Una intervención temprana debería ser necesaria para prevenir el daño neuronal producido por ERO, que se inicia a nivel intrauterino y se reactiva durante la reanimación postnatal cuando se corrigen la baja perfusión cerebral y la hipoxemia (Juul y Ferriero 2014).

La hipotermia se considera como el tratamiento estándar de protección que se lleva a cabo en recién nacidos a término con EHI moderada/severa junto con la ventilación mecánica, monitorización fisiológica y bioquímica, neuroimagen y detección y monitorización de las convulsiones. La hipotermia moderada es el tratamiento único que ha mostrado ser eficaz para paliar las secuelas neurocognitivas y motoras en pacientes con EHI reduciendo la mortalidad y la morbilidad (Jacobs et al. 2013). Tiene una efectividad del 70% en los casos de EHI moderados y un 40% en la severa.

El mecanismo de la hipotermia, ya sea selectivo (craneal) o corporal total, conduce a una disminución del metabolismo cerebral, y por ende a un ahorro significativo en el consumo de ATP. El descenso de la actividad mitocondrial y el acoplamiento de las proteínas desacopladoras reduce la formación de ERO, se mantiene el potencial mitocondrial de transmembrana, y hay una reducción de la apoptosis. Además, también reduce la hiperexcitabilidad mediada por la activación de los receptores del glutamato y NMDA. Sin embargo,

Introducción

entre las principales problemáticas de este tratamiento son: la ventana terapéutica en la que es eficaz que son 6 horas postparto pasadas las cuales pierde significativamente la eficacia; la preparación necesaria en infraestructura y experiencia del centro sanitario; la monitorización clínica y los controles bioquímicos durante su aplicación y después en la fase de recalentamiento con el fin de controlar el tratamiento y que no produzca consecuencias adversas (Dixon et al. 2015).

Durante los últimos años, la investigación tanto en clínica neonatal como a nivel de experimentación animal han logrado enormes progresos dirigidos hacia la neuroprotección y ha establecido la hipotermia como el tratamiento estándar para la EHI neonatal. Sin embargo, todavía un porcentaje significativo (>40%) de pacientes quedan con secuelas neurológicas a largo plazo por lo que se necesita más investigación para descubrir nuevas terapias coadyuvantes que mejoren los resultados de la hipotermia (M. V. Johnston et al. 2011). Algunas de las moléculas neuroprotectoras evaluadas en estudios experimentales traslacionales después de la EHI han sido la Osteopontina (OPN), el Interferón Beta ($INF\beta$), las quinasas c-Jun N-terminales (JNKs), barbitúricos (Fenobarbital), la Melatonina y el Edaravone. Y otras moléculas neuroprotectoras evaluadas en ensayos clínicos actuales son la Eritropoyetina (EPO), Alopurinol, Xenon, Topiramato, Sulfato de Magnesio y sangre de cordón (células madre) (Accorsi et al. 2008; Robertson et al. 2013).

6. Oxigenación antes y después del nacimiento

6.1 Reducción de los niveles de oxigenación durante la reoxigenación.

El intercambio de gases alveolo-capilar requiere la resorción del fluido pulmonar, la expansión pulmonar y el establecimiento de una capacidad residual funcional antes de alcanzar una presión parcial arterial estable de oxígeno. En un recién nacido a término, se necesitan varios minutos después del inicio de la respiración espontánea para completar este proceso. La evaluación del estado metabólico y de oxigenación del feto y, su correlación con la adaptación postnatal inmediata ha sido intentada estudiar desde diferentes enfoques.

La oximetría de pulso ha proporcionado en la sala de partos una medida de la saturación del lactante y de la frecuencia cardíaca, lo que ha permitido tomar las iniciativas sobre cómo estabilizar a cada paciente. Por lo tanto, el uso de la oximetría de pulso en la sala de partos, especialmente en la estabilización de los neonatos prematuros, es necesario y está justificado (Hay, Brockway, y Eyzaguirre 1989; Hay 2000).

La información preliminar sobre la evolución de la SpO₂ en la TFN ha sido resumida por Finer y Leone en una revisión. En los bebés a término sanos, los valores obtenidos por oximetría de pulso en diferentes estudios observacionales fueron alrededor del 60% al 1 min, 70% al 2 min, 82% al 5 min y 90% a los 10 min. Además, los valores pre

Introducción

y postductal difirieron sobre un 5-10% durante los primeros minutos de vida, y los bebés nacidos por cesárea tenían valores más bajos de SpO₂ y necesitaban más tiempo para lograr una SpO₂ estable > 85% (Finer et al. 2009).

Dawson desarrolló un nomograma de saturación arterial de oxígeno, con los datos obtenidos del Royal Women Hospital (Melbourne) y la Universidad y Hospital Politécnico de La Fe (Valencia). El conjunto de datos incluidos fueron la SpO₂ preductal recuperada cada 2 seg en recién nacidos sanos y prematuros durante los primeros minutos después del nacimiento (Dawson et al. 2010) (Figura 8 y 9). Los niños del estudio no habían recibido ninguna intervención durante el período de estabilización, como la ventilación con presión positiva, ni tampoco tenían ninguna anomalía congénita que pudiera alterar la oxigenación postnatal. Del total de niños del estudio, un 8% fueron nacidos pretérmino <32 semanas de gestación, el 26% en la 32-34 semanas de gestación y 66% nacieron a término. La mediana para obtener lecturas fiables de SpO₂ fue de 65 seg (IC 5-95%: 58-85 seg). Cabe destacar que hubo diferencias entre los recién nacidos a término y prematuros minutos después del nacimiento. Por lo tanto, mientras que las medianas de lactantes a término alcanzaron SpO₂> 85% a los 4 min después del nacimiento, los neonatos prematuros necesitaron alrededor de 7-8 min. No obstante, un elevado porcentaje de recién nacidos pueden tardar unos 10-12 minutos en alcanzar la esa SpO₂ (Dawson et al. 2010).

Además, 10 min después del nacimiento, los recién nacidos a término estaban estables con 97% de SpO₂ y los prematuros al 94% (p <0,001).

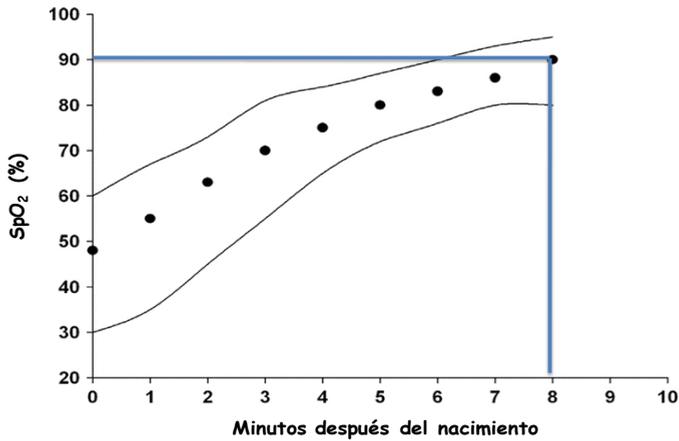
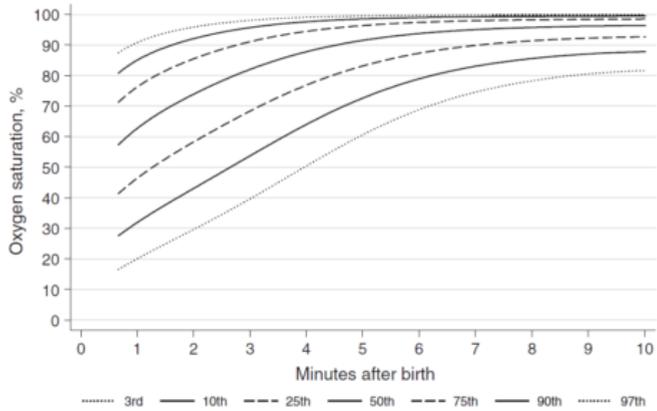


Figura 8. Nomograma de SpO₂ en recién nacidos prematuros

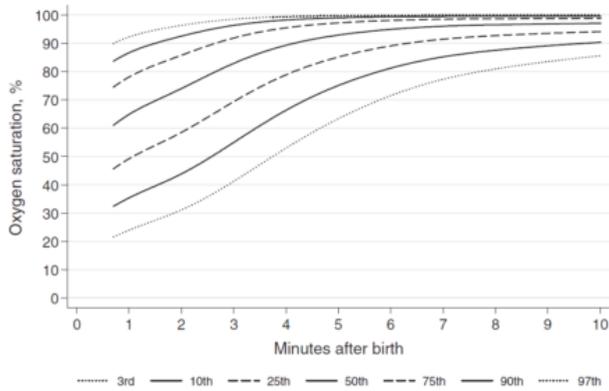
Existe una correlación inversa entre la edad gestacional y el tiempo para lograr una SpO₂ estable mayor del 85%, por lo tanto, los recién nacidos prematuros necesitan más tiempo para lograr un nivel estable de oxigenación (Tiskumara et al. 2009). El logro de una meseta de SpO₂ después del nacimiento aparentemente se correlaciona con el tiempo para eliminar el líquido de las vías respiratorias, reclutar alvéolos y expandir el pulmón, y establecer una función de la capacidad residual durante la espiración.

Introducción

Third, 10th, 25th, 50th, 75th, 90th and 97th SpO₂ percentiles for all infants with no medical intervention after birth (reprinted with permission from Pediatrics(insert reference))



Third, 10th, 25th, 50th, 75th, 90th and 97th SpO₂ percentiles for all infants ≥ 37 weeks gestation with no medical intervention after birth (reprinted with permission from Pediatrics(insert reference))



Third, 10th, 25th, 50th, 75th, 90th and 97th SpO₂ percentiles for all infants 32-36 weeks gestation with no medical intervention after birth (reprinted with permission from Pediatric s(insert reference))

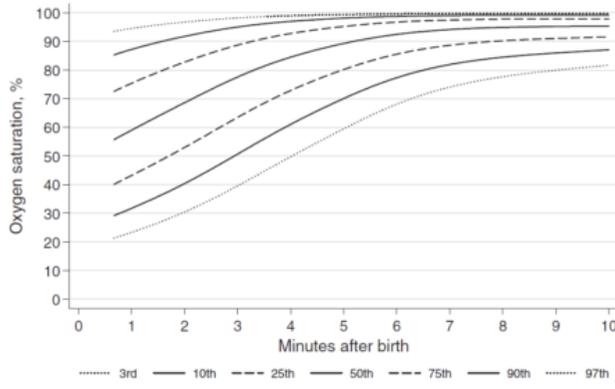


Figura 9. Percentiles de SpO₂ de recién nacidos de 32 a 36 semanas de gestación que no necesita intervención médica después del nacimiento (Dawson et al. 2010).

6.2 FiO₂ inicial en recién nacidos prematuros

Las guías de reanimación (ILCOR 2015) recomiendan que los recién nacidos prematuros se establezcan inicialmente con una fracción inspiratoria de oxígeno (FiO₂) de 0.21-0.30, con el objetivo de evitar la hiper-o-hipoxemia (Perlman et al. 2015).

Los estudios realizados en la última década han demostrado que el uso de 0.21 como FiO₂ inicial fue insuficiente para superar la hipoxemia y la bradicardia en los primeros minutos después del nacimiento, mientras que el uso de altas concentraciones de oxígeno (FiO₂= 0.9-1.0) causó hiperoxemia y estrés oxidativo. Wang, comparó el uso de 0.21 frente a 1.0 como FiO₂ inicial en neonatos prematuros

Introducción

con edad gestacional ≤ 28 semanas de gestación. Después de 2 min, el 30% de los pacientes fueron cambiados a 1.0 FiO_2 debido a la bradicardia persistente, ya los 3 min, el 60% restante necesitó también un FiO_2 de 1.0 porque no alcanzaron la SpO_2 dirigida del 70% a los 3 min (C. L. Wang et al. 2008). Sorprendentemente, Vento mostró que una FiO_2 inicial de 0.90 frente a una FiO_2 del 0.3 causaba hiperoxemia, estrés oxidativo, se determinó en sangre total el ratio GSSG/GSH el primer día y el tercero, obteniendo un aumento del ratio. También en orina se midió daño oxidativo a lípidos, proteínas y al ADN mostrando un aumento de sus niveles en FiO_2 del 0.9 que se correlacionó con un aumento de la incidencia de displasia broncopulmonar (Vento et al. 2009). Ezaki, también analizó la correlación entre la FiO_2 , estudió biomarcadores de estrés oxidativo y la capacidad antioxidante de los recién nacidos pretérmino <35 semanas de gestación. Los niños que habían recibido oxígeno puro tenían altos niveles de peróxidos y un bajo potencial redox frente a los que habían recibido niveles más bajos de oxígeno (Ezaki et al. 2009). Finalmente, Kapadia comparó biomarcadores de EO en un estudio aleatorizado con prematuros de bajo peso estabilizados inicialmente con 100% de oxígeno vs aire, y ambos grupos se valoraron de acuerdo con las lecturas de SpO_2 para alcanzar objetivos de oxigenación preestablecidos (Kapadia et al. 2013). Los resultados fueron coincidentes con el estudio de Vento (Vento et al. 2009). Por lo tanto, este estudio encontró un mayor EO en las determinaciones que se realizaron en sangre de cordón y en sangre venosa, determinando el ratio entre la capacidad antioxidante y los hidroperóxidos totales en las primeras horas después del nacimiento. Obteniendo como resultados niveles significativamente

más elevados en el grupo de prematuros empezados a ser reanimados con niveles más bajos de O₂. Disminuyendo la necesidad de más días de ventilación mecánica y menor incidencia de BDP (Kapadia et al. 2013).

Sin embargo, el uso de fracciones inspiratorias intermedias que abarcaban entre el 0.3 a 0.5 se habían generalizado sin fuerte apoyo basado en la evidencia. En dos estudios aleatorizados y enmascarados, (Rook et al. 2014 ; Aguar et al. 2014), mostraron que en recién nacidos pretérmino resucitados con una FiO₂ inicial de 0.3 vs 0.6, el ratio GSH/GSSG en sangre total y en orina los biomarcadores de EO 8-oxo/2-Dg, Orto/fenilalanina, 3-Cl y 3-nitro/tirosina, no habían diferencias estadísticas significantes. Es más no hubo diferencias clínicas entre ambos grupos en cuanto a complicaciones en el período postnatal.

Una reciente revisión actualizada y meta-análisis, se compararon 10 estudios aleatorizados que incluyeron a 321 recién nacidos que habían recibido una baja (0.21-0.30) y 356 que recibieron FiO₂ inicial alta (0.60-1.0) para el estudio de mortalidad, displasia broncopulmonar, y hemorragia intraventricular (Saugstad et al. 2014). Cabe destacar que los resultados de este meta-análisis demostraron que los bebés inicialmente reanimados con FiO₂ inferior se acercaron casi a la significación para el resultado de la reducción de la mortalidad [0,62 (IC 95%: 0,37-1,04)]. Por otra parte, no hubo asociación significativa para la displasia broncopulmonar o hemorragia intraventricular al comparar FiO₂ baja y alta (Saugstad et al. 2014). Esta información ha sido cuestionada por informes recientes de dos estudios realizados en Australia y Canadá, respectivamente (Oei et al.

Introducción

2017) en la Reunión Anual de Sociedades Académicas Pediátricas de 2015 (EE.UU.) Presentaron los resultados de un gran estudio controlado aleatorio completado hasta la fecha, que examinó los efectos de la reanimación con una FiO_2 inicial de 0.21 frente a 1.0 en 289 prematuros menores de 32 semanas de gestación. La SpO_2 objetivo se fijó en 65-95% hasta 5 min y 85-95% hasta el ingreso a la NICU. El hallazgo más relevante fue una mortalidad del 16,2% en el subgrupo de bebés <29 semanas de gestación en el grupo de 0.21 frente al 6% en el grupo de 1.0 (RR = 3,18; 1,41-7,19; p = 0,013). Esta diferencia, aunque estadísticamente marginal, enfatizó la necesidad urgente de mayores ensayos controlados aleatorios para examinar esta cuestión (Oei et al. 2017). Recientemente, la Canadian Neonatal Network publicó un estudio retrospectivo de cohorte comparando neonatos de ≤ 27 semanas de gestación antes y después de 2006, cuando la política relativa a FiO_2 inicial para pretérmino en la sala de partos cambió de 100% a <100% de oxígeno y ajuste de la fracción de oxígeno según SpO_2 . El resultado primario de una lesión neurológica grave y/o muerte fue mayor en el grupo de menor oxígeno (AOR 1,36; IC del 95%: 1,11-1,66) y en aquellos resucitados con aire (AOR 1,33; IC del 95%: 1,04- 1,69), en comparación con los reanimados con 100% de oxígeno. Es de destacar que los investigadores no tenían datos sobre la exposición al oxígeno para cada niño y, por lo tanto, podría ser engañoso atribuir resultados específicos a la FiO_2 inicial utilizada en el parto. Sin embargo, los investigadores advirtieron que una política de estabilización inicial con oxígeno más bajo podría estar relacionada con un mayor riesgo de lesión neurológica severa o muerte en neonatos prematuros en comparación con el comienzo con oxígeno al

100% (Rabi et al. 2015). Recientemente se ha publicado un metanálisis, en el cual revisan los resultados obtenidos en recién nacidos $\leq 28 + 6$ semanas de gestación que son reanimados con una $FiO_2 = 0.3$ Vs 0.6 . Los resultados indican que no existe ninguna diferencia en el riesgo de muerte u otras morbilidades en la reanimación si se inicia en el momento del parto con una FiO_2 menor (≤ 0.30) o mayor (≥ 0.6). Los resultados opuestos para los ensayos enmascarados y no enmascarados representan un error de tipo I, haciendo hincapié en la necesidad de más estudios y bien diseñados para obtener resultados más concluyentes (Oei et al. 2017).

Definir la mejor práctica para la concentración inicial de oxígeno para la transición y la reanimación del recién nacido prematuro requiere la realización de ensayos aleatorios adicionales bien diseñados y adecuadamente alimentados, tales como el PRESOX (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01773746) y el Torpido 2 que tiene como objetivo examinar los resultados de los bebés menores de 29 semanas de gestación después del inicio de la reanimación con FiO_2 0.21 o 0.6 . Con suerte, en los próximos años, cuando ambos estudios estén completos, tendremos una respuesta a estas preguntas candentes.

II. HIPÓTESIS

La hipótesis de estudio es:

El tiempo de hipoxia transcurrido desde que el pretérmino nace hasta que alcanza una oxigenación postnatal estable, le precondicionaría para una mejor adaptación del cerebro frente a una agresión oxidativa posterior.

III. OBJETIVOS

Los objetivos de la presente Tesis son:

1. Establecer un modelo experimental *in vivo* de transición fetal-neonatal que permita el estudio de los cambios en la fracción inspiratoria de oxígeno (FiO_2) en la adaptación postnatal en ratones recién nacidos.
2. Diseño y fabricación de una cámara de oxigenación controlada que permite determinar el momento del nacimiento, adaptación postnatal y respuesta a cambios en la FiO_2 durante la adaptación postnatal de una forma similar a la que ocurre en la práctica clínica.
3. Estudiar el metabolismo cerebral en ratones recién nacidos sometidos a un acondicionamiento hipóxico ($FiO_2=0.14$) durante 8 horas.
4. Estudiar los efectos del acondicionamiento hipóxico perinatal sobre el estrés oxidativo, expresión de los genes implicados en la defensa antioxidante, respuesta hipóxica e inflamación en el Sistema Nervioso Central.
5. Estudiar los efectos del acondicionamiento hipóxico perinatal sobre la morfología, apoptosis e inflamación de las diferentes capas de la corteza cerebral.
6. Estudiar los efectos del acondicionamiento hipóxico perinatal sobre la morfometría de las mitocondrias.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material

1.1 Aimaes de experimentación.

Los animales utilizados son hembras gestantes de la cepa de ratones C57BL/6, en el día de gestación 19 (G19) y los ratones recién nacidos de día 1 (P1) y día 7 (P7) postnatal.

Los animales se mantuvieron en el animalario de la Facultad de Farmacia del *Servei Central de Suport a la Investigació Experimental* (SCSIE; Universitat de València) bajo condiciones de temperatura ($23\pm 1^\circ\text{C}$), humedad relativa (60%) y ciclos de luz/oscuridad (12/12h) constantes. Se alimentaron con una dieta de laboratorio estándar y agua corriente *ad libitum*.

La manipulación de los animales y los protocolos de experimentación han sido realizados de acuerdo con las normas de experimentación animal de la Universitat de València y Consellería de Presidencia y de Agricultura, Pesca, Alimentación y Agua (Comunitat Valenciana, España) bajo el procedimiento de experimentación animal aceptado con código 2015/VSC/PEA/00106 tipo 2.

1.2. Cámara de oxigenación controlada

La cámara de “oxigenación controlada” ha sido un elemento imprescindible para el desarrollo del modelo murino de transición fetal-neonatal (TFN) con variación de la fracción inspiratoria de oxígeno (FiO_2). En estudios experimentales preliminares realizados en

Material y Métodos

colaboración con el Prof. J Belik (Respiratory Research Laboratory; University of Toronto, Canadá), se utilizaron cámaras de hipoxia comerciales (Oxycycler Salas; Biospherix®; Lacona, NY, EE.UU) para realizar los experimentos con el modelo de TFN (Escobar, Cubells, et al. 2013a), pero dadas las limitaciones para desarrollar este trabajo, el IP del Grupo de Investigación en Perinatología (Instituto de Investigación Sanitaria La Fe; Valencia), Dr. Máximo Vento decidió diseñar una cámara que cubriera todas las necesidades experimentales del proyecto y además mejorar las ya existentes en el mercado.

1.2.1 Características de la cámara de oxigenación controlada

La cámara debía tener las características específicas para poder desarrollar el modelo de TFN que se detallan a continuación:

- 1) Reducción al máximo el tiempo necesario para alcanzar la concentración de oxígeno ambiental deseado por el investigador en su interior (5 minutos para cambios extremos en la FiO_2 , así de 14% a 100%). De este modo se podrían simular las diferentes situaciones clínicas como por ejemplo la hipoxia-reoxigenación tal y como sucede en la clínica humana.
- 2) Sistema de doble entrada para los ratones, evitándose así fugas de oxígeno y descenso indeseado de la FiO_2 a la que debía transcurrir el experimento cuando por requerimientos metodológicos se tuvieran que introducir o sacar material, aparatos o animales de experimentación (ratones) en la misma.

- 3) Cámara de video de infrarrojos que nos permitiera poder grabar o hacer fotos de los acontecimientos más relevantes del modelo como es el parto, el comportamiento de la hembra gestante y las crías tanto de día como en oscuridad, debido a la nocturnidad de los ratones.
- 4) Guantes en la cámara, que permitieran manipular a los ratones en el interior sin necesidad de tener que sacarlos al exterior exponiéndolos a cambios en la FiO_2 , pudiendo trabajar con las condiciones constantes de oxígeno deseadas.
- 5) Sistema de control de temperatura, presión y humedad para que los ratones estuvieran en condiciones óptimas y los experimentos pudieran ser reproducibles.

Tanto el registro de los parámetros como las fotos realizadas durante los experimentos debían quedar almacenados en una base de datos para poder ser consultados en un momento determinado del experimento o al finalizar el mismo.

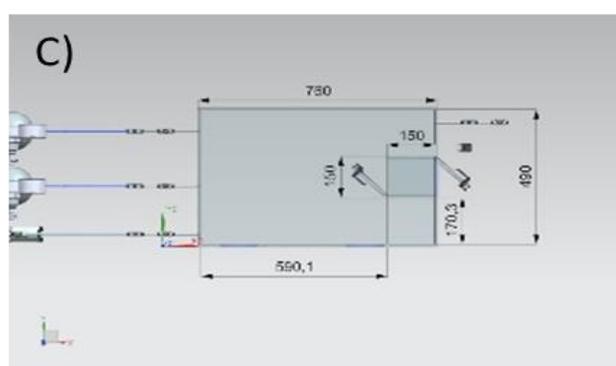
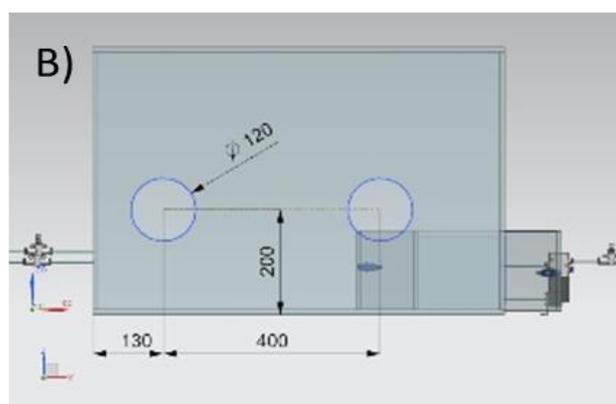
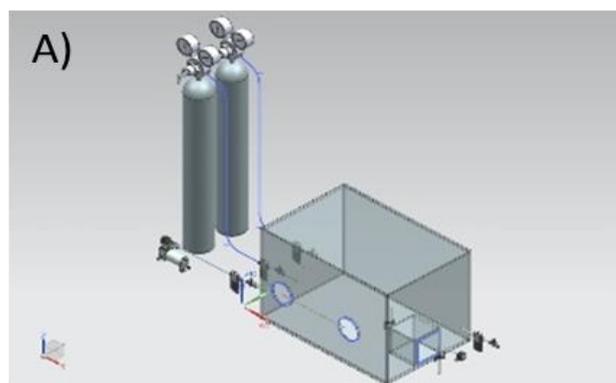
Se incorporó un sensor de oxígeno exterior para tener controlado en todo momento los niveles de oxígeno en el habitáculo donde se realizan los experimentos y así evitar posibles fugas de nitrógeno u oxígeno y que no afectaran al operador.

El material y las dimensiones de la cámara debían ser las apropiadas para que los ratones estuvieran en condiciones adecuadas, cumpliendo los requisitos de bienestar animal (Boletín Oficial del Estado, 8 de febrero de 2013).

1.2.2 Diseño de la cámara de oxigenación controlada

Para el diseño de la cámara se colaboró con Juan Francisco Blanes Noguera, director del Instituto de Automática e Informática Industrial de la Universidad Politécnica de Valencia y Adrián Estellés, alumno del Máster en Automática e informática Industrial. Por parte del grupo de Perinatología del IIS la Fe, se aportó experiencia con las cámaras comerciales de Toronto de algunos de los miembros del grupo, y con toda la información desarrollé el diseño de la cámara y la puesta a punto.

Con todas las características mencionadas en el apartado anterior, se realizó el diseño de la cámara. A continuación, se muestra el diseño final y la planta, alzado y perfil debidamente acotadas (mm) (Figura 10).



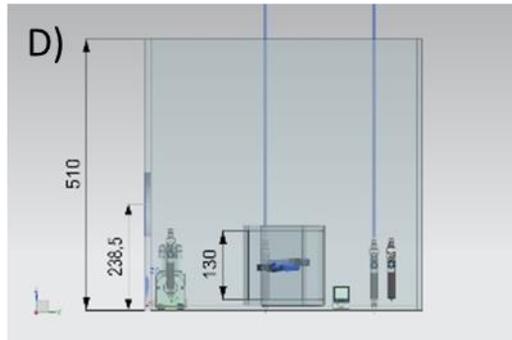


Figura 10. Diseño de la cámara de oxigenación controlada. A) Diseño final de la cámara. B) Visión frontal de la cámara. C) Visión superior de la cámara. D) Visión desde el lado derecho de la cámara.

Las dimensiones mínimas indicadas en el BOE de 2013 para trabajar con ratones eran: una altura mínima del recinto de 120 mm y la superficie del suelo por animal de 70 cm². El material utilizado para su fabricación fue metacrilato, ya que cumplía con las características para el desarrollo del modelo experimental como por ejemplo que fuera totalmente translúcida para poder ver los animales en su interior, que se pudiera esterilizar y que fuera totalmente estanca para evitar la pérdida de gases de su interior.

La cámara está fabricada con metacrilato incoloro con un espesor de 10 mm. Está dotada de una puerta frontal de 760x490 mm desmontable con burlete perimetral y cierres de tracción, así como 2 aberturas de 130 mm de diámetro a 200 mm del suelo y separadas a 400 mm entre ejes y centrados, con aro en la parte exterior para abrochar guantes. También está provista de una pequeña cámara en el lateral derecho (sistema de doble entrada) de medidas totales: 100x150x130 mm de altura, con 2 puertas con cierre hermético a

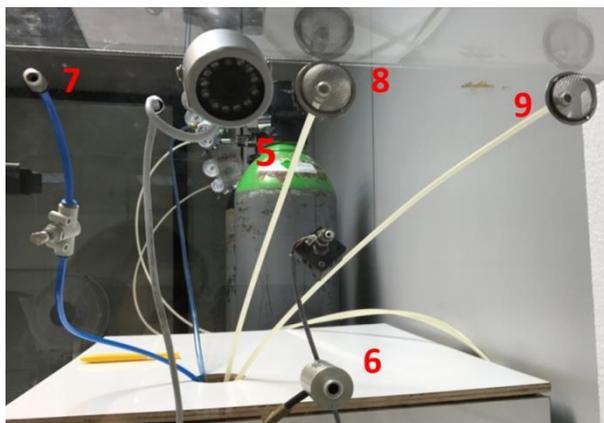
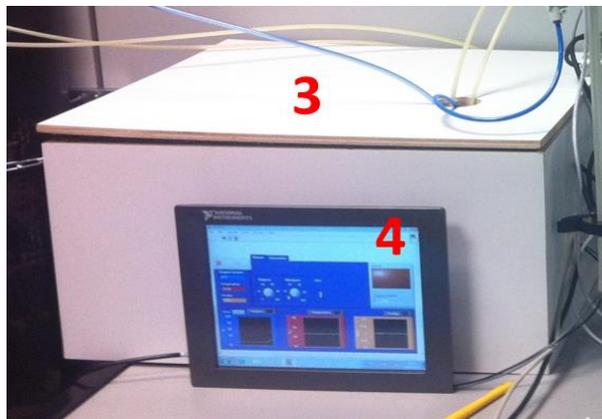
través de maneta con cierre de tracción con burlete. Las medidas exteriores de la cámara son 760x490x510 mm.

1.2.3 Descripción de los elementos de la cámara

La cámara cuenta con diferentes elementos, así: (i) el mezclador de aire/oxígeno (*blender*) en el exterior, (ii) dos sensores de oxígeno (*oxímetro*) uno en su interior y otro en el exterior, (iii) balas de oxígeno, nitrógeno y aire, (iv) válvulas que permiten la regulación del flujo de los gases para alcanzar la concentración de oxígeno deseada y (v) una aplicación informática (*software*) que integra toda la información y registra los datos de presión, temperatura, concentración de oxígeno, tiempo de exposición (variables a controlar) y que se graban en un ordenador para su volcado en una hoja de cálculo (Figura 11).

A continuación, se muestran fotografías de los elementos que forman la cámara con un número que los describe.

Material y Métodos



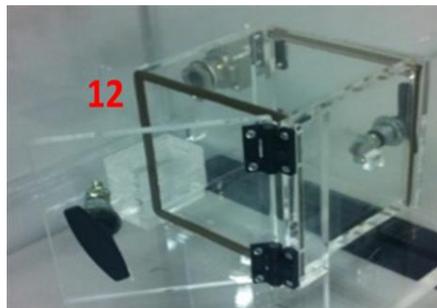


Figura 11. Componentes de la cámara de oxigenación controlada.

Material y Métodos

1. Reguladores de presión (manorreductor)
2. Válvulas de las botellas
3. Caja de control
4. Pantalla táctil
5. Sensor de Oxígeno exterior
6. Cámara con infrarrojos
7. Sensor de Oxígeno interior
8. Sensor de presión
9. Salida de aire
10. Salida de Nitrógeno
11. Salida de Oxígeno
12. Sistema de doble entrada
13. Salida de gas con compensador de presión

En la figura 12 siguiente se muestra una foto del diseño de la cámara final, con todos los elementos integrados y las características mencionadas anteriormente.

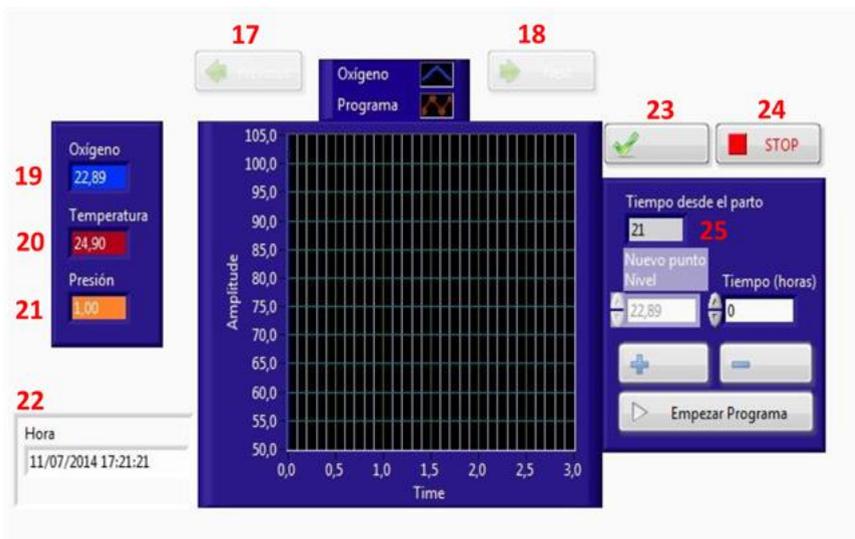
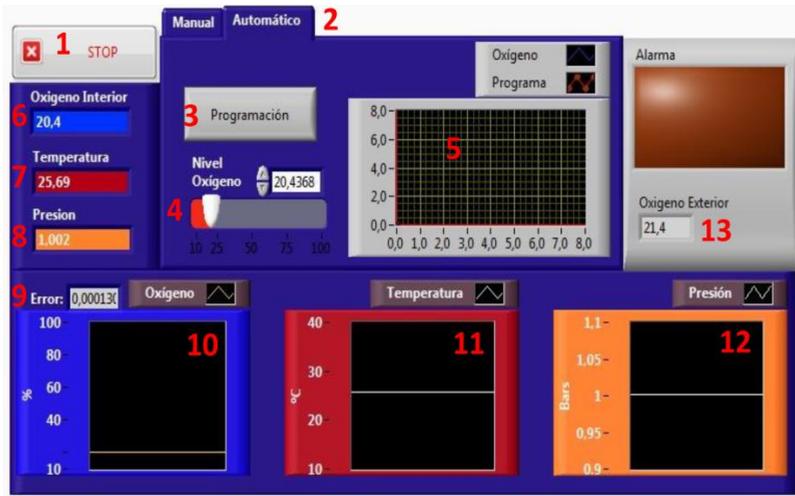


Figura 12. Vista general de la cámara de oxigenación controlada

1.2.4 Descripción del software

En primer lugar, se describen cada uno de los elementos del programa que forman la pantalla y que aparecen enumerados en la Figura 13. Estos elementos se muestran en la ventana principal en modo automático, en modo manual, la ventana de visualización y selección de las fotografías y la ventana de programación en la cual añadir o eliminar fases con la concentración de oxígeno deseada y tiempo de duración de cada una de las fases.

Material y Métodos



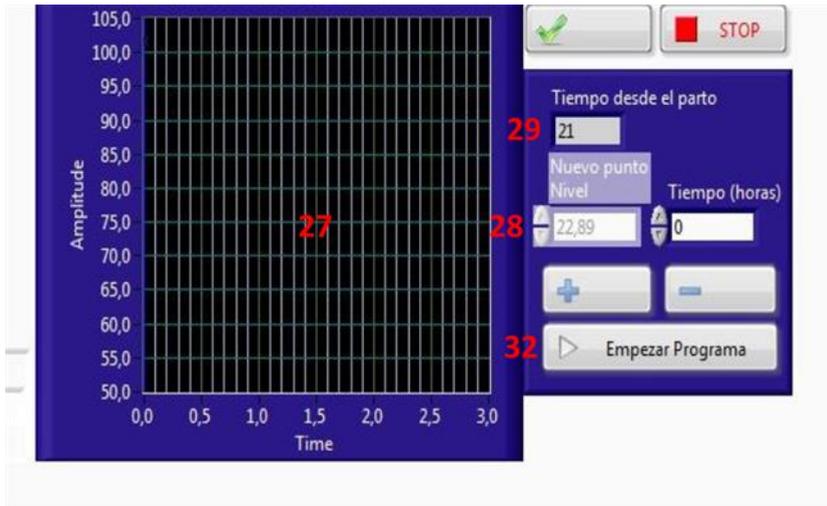


Figura 13. Interfaz del programa. A) Ventana principal en modo automático. B) Ventana principal en modo manual. C) Ventana de visualización y selección de las fotografías. D) Ventana de programación en la cual añadir o eliminar fases con la concentración de oxígeno deseada y tiempo de duración de cada una de las fases

1. Botón de Stop, detiene la aplicación.
2. Pestañas para poner el sistema en modo automático o manual.
3. Botón de acceso a la ventana de programación.
4. Deslizador para controlar la referencia del nivel de Oxígeno deseado.
5. Gráfica de seguimiento del programa.
6. Nivel de Oxígeno en el interior de la cámara (en porcentaje).
7. Temperatura en el interior de la cámara (medido en °C).
8. Presión en el interior de la cámara (medido en bares).
9. Error entre el nivel de Oxígeno en el interior de la cámara y el nivel de Oxígeno deseado.

Material y Métodos

10. Gráfica de seguimiento del nivel de Oxígeno en el interior de la cámara.
11. Gráfica de seguimiento de la temperatura en el interior de la cámara.
12. Gráfica de seguimiento de la presión en el interior de la cámara.
13. Oxígeno exterior y alarma por si supera los límites
14. Regulador manual de la apertura de la bomba de Oxígeno.
15. Regulador manual de la apertura de la bomba de Nitrógeno.
16. Interruptor de la bomba de aire.
17. Botón para avanzar a la siguiente foto.
18. Botón para retroceder a la anterior.
19. Nivel de Oxígeno en el momento que se ha tomado la foto mostrada.
20. Temperatura en el momento que se ha tomado la foto mostrada.
21. Presión en el momento que se ha tomado la foto mostrada.
22. Fecha y hora que se ha tomado la foto actual.
23. Botón para aceptar la foto mostrada como momento del parto y empezar así la programación.
24. Stop. Detiene la programación o el programa si ya se está ejecutando.
25. Tiempo transcurrido desde el momento que se ha tomado la foto hasta el momento actual.
26. Visor de Imágenes.

27. Gráfica para visualizar el programa.
28. Nivel de Oxígeno deseado para la siguiente fase.
29. Tiempo de duración de la siguiente fase.
30. Añadir una nueva fase.
31. Eliminar la última fase añadida.
32. Empezar el programa.

1.2.4.1. Uso del software

Quando se inicia el sistema el software se abre automáticamente en modo manual. En este modo se puede controlar manualmente las bombas de Oxígeno, Nitrógeno y encender o apagar la bomba de aire. Para empezar un experimento hay que poner el programa en modo automático. Para ello hay que cambiar a la pestaña “automático”.



Figura 14. Pantalla principal del Software de la cámara de oxigenacon controlada

Material y Métodos

Una vez se haya cambiado de pestaña se abrirá una ventana donde se crea o elige la carpeta y se guardarán las fotos y los datos del experimento. En el caso de crear una carpeta, con el botón derecho del ratón sobre la ventana, y luego en nuevo se clicará sobre carpeta. Una vez creada la carpeta se le pondrá un nombre a dicha carpeta. Es recomendable que cuando se quiera iniciar un nuevo experimento se haga en una carpeta vacía.

Cuando se haya elegido o creado la carpeta, hay que acceder dentro de ella y presionar el botón “**Current Folder**”. Una vez realizado esto el experimento estará iniciado.

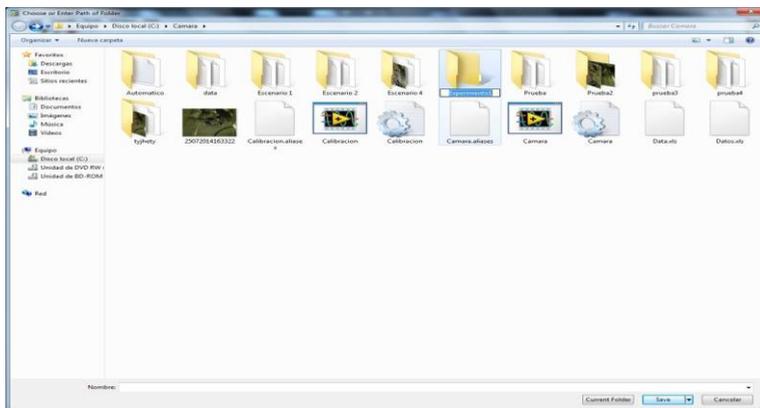


Figura 15. Carpeta raíz donde se guardan las capturas de la cámara

Dentro de la carpeta seleccionada para el experimento se guardarán las fotos que se vayan generando y 3 archivos:

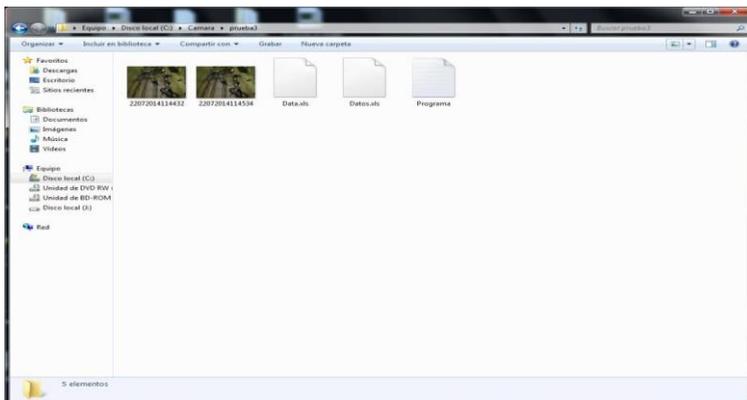
Data.xls: Es un Excel que utiliza el software para poder realizar sus funciones.

Datos.xls: Es un Excel donde se guardarán los datos del experimento. Este Excel consta de 5 columnas:

- 1º. Fecha del momento de la toma de datos
- 2º. Hora del momento de la toma de datos
- 3º. Nivel de Oxígeno en el momento de la toma de datos
- 4º. Temperatura en el momento de la toma de datos
- 5º. Presión en el momento de la toma de datos

Programa.txt: Es un archivo de texto donde se podrá ver el programa seguido en el experimento. En este archivo encontraremos una línea de pares de números, el primero es el nivel de Oxígeno de la fase y el segundo el tiempo de duración de la fase. Esto se repetirá tantas veces como fases tenga el programa.

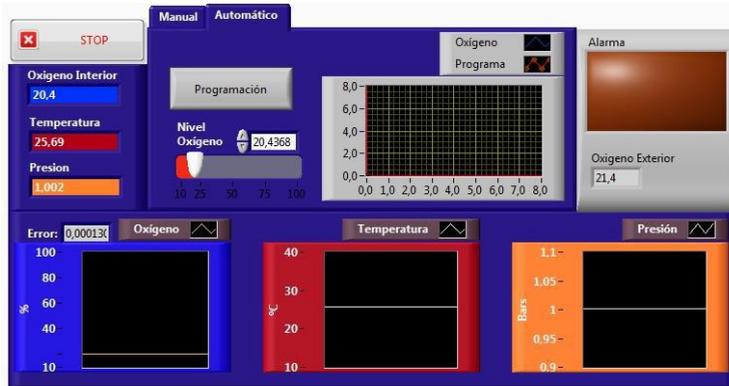
Las fotos están en formato **JPG** y el nombre de cada corresponde a la fecha y la hora que ha sido tomada la foto sin ningún tipo de separación. El formato es: **DDMMAAHHMMSS**.



Una vez seleccionada la carpeta de trabajo, en la pestaña “automático” hay un deslizador “Nivel de Oxígeno” en el cual fijaremos la referencia con la que queremos empezar el programa. Una vez modificada esta referencia el sistema ajustará la cámara con

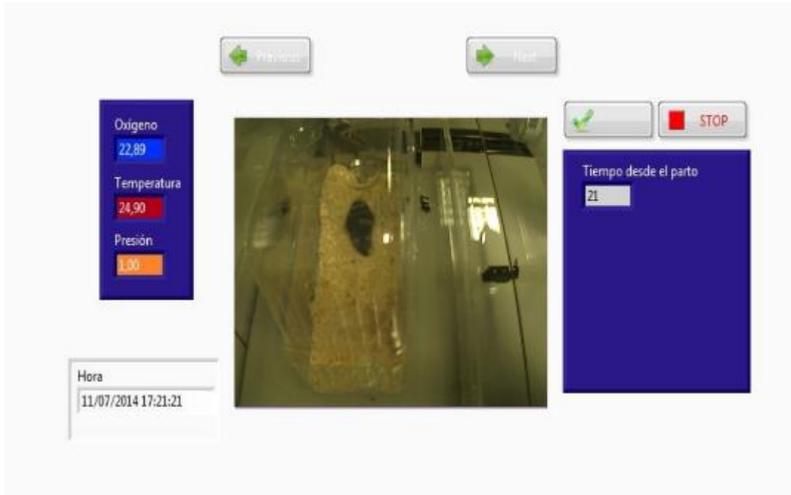
Material y Métodos

el nivel de oxígeno deseado y este será el nivel que habrá en el momento del parto.

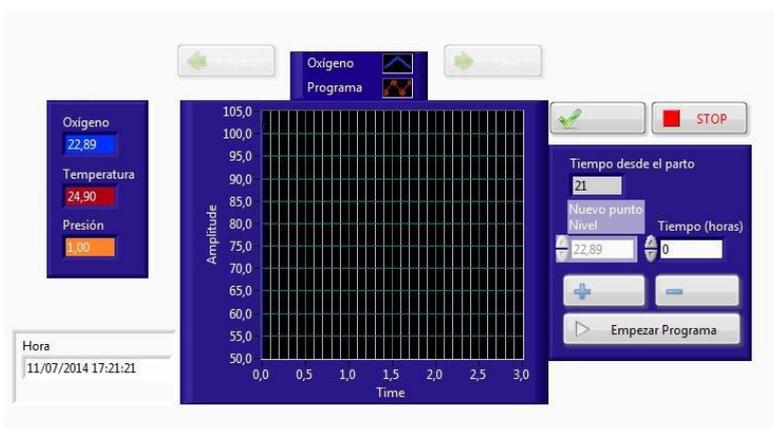


Una vez puesto el nivel de oxígeno deseado hay que esperar al momento del nacimiento. Cuando han nacido las crías, clicando sobre el botón “**Programación**” se accede a la ventana de programación, donde se crea el programa para el experimento.

En esta ventana se ven las fotos tomadas cada 5 minutos desde el inicio del experimento. Siguiendo estas fotos se sabe cuándo ha sido el momento del nacimiento. La primera foto que aparece es la primera foto tomada y con el botón “**Next**” se pasa a la siguiente foto más cercana al momento actual. Con el botón “**Previous**” se retrocede a la foto anterior. Se va avanzando foto a foto hasta encontrar la foto donde aparezcan las crías. Esta foto es la que indica el momento exacto del parto y presionando en el botón “**Aceptar**” se selecciona dicha foto y se crea el programa a partir del momento que se ha tomado la foto seleccionada.



Una vez seleccionada la foto, el visor de imágenes desaparece y aparece una gráfica donde se ven los niveles de oxígeno y tiempo de duración de cada fase que vamos introduciendo al programa. También aparecen dos espacios, uno para poner el nivel de oxígeno de la nueva fase y otro para poner el tiempo de duración (en horas), y 3 botones, uno para añadir la nueva fase, otro para eliminar la última fase añadida y un tercero para empezar el programa.



Material y Métodos

Para la primera fase, el nivel de oxígeno sale fijado al nivel de oxígeno que se encontraba la cámara en el momento de la foto (este nivel no podrá ser modificado hasta las siguientes fases) y al tiempo de duración que se ponga se le restará el tiempo que ya ha transcurrido del parto. Por ejemplo, si se pone un tiempo de duración de 6 horas, y el tiempo transcurrido del parto es de 4 horas, restarán 2 horas para que termine la primera fase. Y para añadir la fase se clicará sobre el botón "+". Hay que tener en cuenta que el software no permite poner un tiempo de duración menor al que ya ha transcurrido.

Para las siguientes fases, se pone el nivel de oxígeno deseado, la duración de la fase y se añade al programa clicando el botón "+". El software no acepta tiempo de duración igual a 0. En el caso de equivocación en alguna fase se puede eliminar clicando sobre el botón "-".

Una vez esté el programa diseñado se pone en marcha presionando **"Empezar Programa"**.

Se puede seguir la evolución del programa en la gráfica de esta venta o en la que hay en la pestaña **"Automático"**. En estas dos gráficas se puede ver el programa diseñado, la evolución real del nivel del oxígeno y un cursor que indica en qué punto del programa nos encontramos.

1.2.4.2 Apagado del sistema

Para apagar el sistema hay que seguir los siguientes pasos:

1º Asegurarse de que no hay ningún programa en funcionamiento.

2º En caso de que haya algún programa en funcionamiento, en la ventana de programación clicar sobre el botón “Stop” y cerrar la ventana.

3º Asegurarse de que las bombas de Oxígeno, Nitrógeno y aire estén completamente cerradas.

4º Cuando las bombas de Oxígeno, Nitrógeno y aire estén completamente cerradas clicar el botón “Stop” de la ventana principal y cerrarla.

5º Apagar la pantalla táctil

6º Cerrar las válvulas de las botellas de oxígeno, nitrógeno y aire. En el caso de no utilizar botella y que alguno de los gases vaya conectado a un sistema de distribución, cerrar el paso de la salida de la tubería.

7º Apagar el interruptor que hay detrás de la caja de control.

1.2.4.3 Alarmas del sistema

El sistema está provisto de un sistema de seguridad para preservar el bienestar de los ratones y que no haya ninguna fuga que pueda dañar a los usuarios que estén dentro del laboratorio donde se encuentra la cámara, para ello se controla que no exceda:

El nivel de Oxígeno exterior: Esta alarma controla que no haya ninguna fuga de alguno de los gases. Si la fuga fuera de oxígeno, el nivel de este en el exterior subiría y la alarma saltaría al llegar al 23%. En el caso de que la fuga fuera de nitrógeno, bajaría el nivel de oxígeno

Material y Métodos

en el exterior y la alarma saltaría en el momento que éste fuera inferior a un 19%.

La temperatura interior: En caso de que la temperatura suba o baje demasiado también saltaría la alarma. Los límites están en 10 °C y 40 °C.

La presión interior: La cámara dispone de una válvula de escape para controlar la presión. Esta válvula abre la apertura según la diferencia de presión entre el interior y el exterior, sin afectarle las diferencias negativas (en el caso de que haya menos presión en el interior que en el exterior no se crearía un flujo hacia el interior). Cuando mayor es esta diferencia, mayor es el flujo de salida de la válvula, permitiendo una presión máxima en el interior de la cámara (con las 3 bombas abiertas a 4 bares) de 1,02 bares. En el caso de que esta válvula se atascara y la presión pasara el umbral de 1,1 bares, la alarma se activaría.

En el caso de que saltara algunas de las alarmas se encendería el led de alarma y se apagaría las bombas de oxígeno, nitrógeno y aire en el caso de estar encendidas.

Cuando una alarma esté activa, el software sólo permitirá pasarlo a modo manual y controlar manualmente las bombas.

Cuando salte la alarma y se paren las bombas el sistema volverá a la normalidad, permitiendo esto la reanudación de todas las funciones del software.

1.2.4.4 Mantenimiento de cámara

Se ha realizado el siguiente mantenimiento para verificar que la cámara seguía funcionando correctamente:

1. Alarmas. Cada mes se comprueba que las alarmas de oxígeno exterior, interior, presión y temperatura.
2. Tiempos. Se han realizado cada mes la comprobación del tiempo que transcurre en pasar por cada uno de las FiO_2 utilizadas en el modelo de TFN. Tomando como referencia:
 - Transición del 21 al 14% de oxígeno 2 minutos.
 - Transición del 21% al 100% de oxígeno 5 minutos.
 - Transición del 14% al 100% de oxígeno 5 minutos
 - Transición 100% al 21% de oxígeno 3 minutos.
3. Calibración de los sensores. Se han realizado las calibraciones de los sensores de oxígeno interior y exterior cada tres meses, además de contar con otro oxímetro portátil para asegurarnos que los niveles de oxígeno detectados son los correctos.
4. Estanqueidad. Cada 6 meses se ha comprobado que la cámara seguía estando estanca sin fugas.

Con el diseño de esta cámara se da solución a la problemática de las cámaras que hay en el mercado para realizar la investigación e incluir sistemas novedosos que se estiman útiles consiguiendo

Material y Métodos

reproducibilidad máxima en los experimentos y control de la mayoría de variables.

Durante el proceso de fabricación se verificó el funcionamiento de los distintos elementos y se optimizó antes de iniciar los experimentos propiamente dichos. La comprobación y verificación del sistema fue llevada a cabo por el grupo de informática y automoción de la UPV y posteriormente por el departamento de Recursos Materiales del Hospital universitario la Fe de Valencia.

2. Modelo experimental

El modelo experimental murino llevado a cabo en este trabajo tiene como objetivo simular la transición de la vida fetal a la neonatal. El diagrama de flujo del experimento donde se explican las distintas etapas del grupo control y de los grupos experimentales viene reflejado en la figura 16.

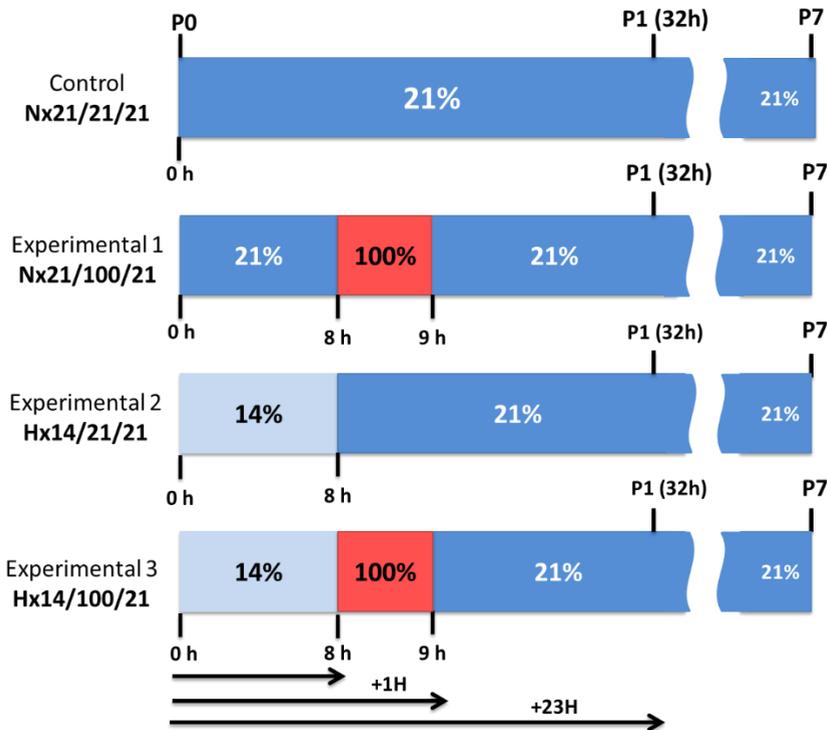


Figura 16. Esquema representativo del grupo control y grupos experimentales del modelo experimental murino de transición fetal-neonatal bajo diferentes FiO_2 .

Material y Métodos

Como se muestra en la figura 16, el modelo experimental de la transición fetal-neonatal (TFN) consta de un grupo control y tres grupos experimentales. Todos los grupos son sacrificados a las 32 horas del nacimiento (P1) y otras crías se dejan vivir seis días más (P7). A continuación, paso a detallar cada uno de los grupos:

- i. El grupo control se denomina **Nx21/21/21**, en este grupo la TFN se produce en una atmósfera con una $FiO_2=0.21$ (21% de oxígeno). Las crías se mantienen en estas condiciones 32 horas (P1) y siete días desde el nacimiento (P7) en estas condiciones.
- ii. En el primer grupo experimental denominado **Nx21/100/21**, el nacimiento se produce con una $FiO_2=0.21$, a las ocho horas del nacimiento se produce un incremento de la $FiO_2=1.0$ (100% de oxígeno) durante una hora. A continuación, vuelven a una $FiO_2=0.21$ en la cual permanecen 23 horas, en este momento se sacrifican y se corresponde con (P1), y otros se dejarán vivir hasta una semana postnatal (P7).
- iii. El segundo grupo experimental, **Hx14/21/21**, el nacimiento se produce bajo una atmósfera hipóxica con una $FiO_2=0.14$ (14% de oxígeno) permaneciendo durante las siguientes ocho horas después de nacer en estas condiciones. A continuación, se aumentan los niveles de O_2 hasta el 21% ($FiO_2=0.21$).
- iv. El tercer grupo experimental se denomina **Hx14/100/21**. En este grupo el nacimiento tiene lugar bajo una atmósfera con una $FiO_2=0.14$, después del nacimiento a las 8 horas las crías de este grupo sufrirán un insulto hiperóxico durante una hora de una

$FiO_2=1.0$. Luego volverán a una $FiO_2=0.21$ durante 23 horas, y serán sacrificados a P1 y a P7.

Una vez realizado el experimento las crías se sacrifican y los cerebros obtenidos son empleados para estudios moleculares e histológicos que veremos más adelante en este capítulo.

Para los estudios histológicos realizados en este trabajo contamos además con dos grupos más de estudio, con otros tiempos desde el nacimiento que describimos a continuación:

El primer grupo lo denominamos **Hx14 8h**, en el cual las crías nacieron con una $FiO_2=0.14$ y se sacrificaron a las 8 horas de nacer.

El segundo grupo que denominamos **Hx14/14/14**, las crías nacieron con $FiO_2=0.14$ y permanecieron 32 horas en estas condiciones hasta su sacrificio (P1) como se muestra en la figura 14.

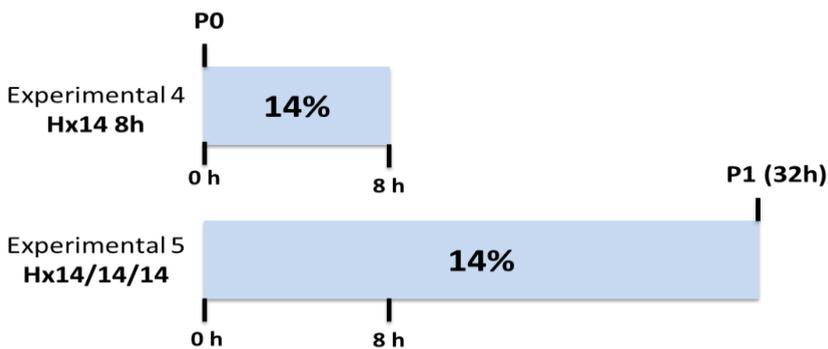


Figura 17. Diagrama de dos grupos experimentales empleados en los estudios histológicos.

En la cámara explicada anteriormente (apartado 1.2), tiene lugar el nacimiento de modo que antes de introducir a la ratona gestante, se prepara la jaula donde va a ser puesta para el nacimiento. La jaula es de plástico, con unas dimensiones 370 X 150 X 130 (mm) con una tapa,

Material y Métodos

totalmente agujereada en la superficie para permitir la entrada de gases. También se pone un fondo de serrín como tienen en sus jaulas habitualmente, un poco de pienso y agua en forma de hidrogel (Figura 18).

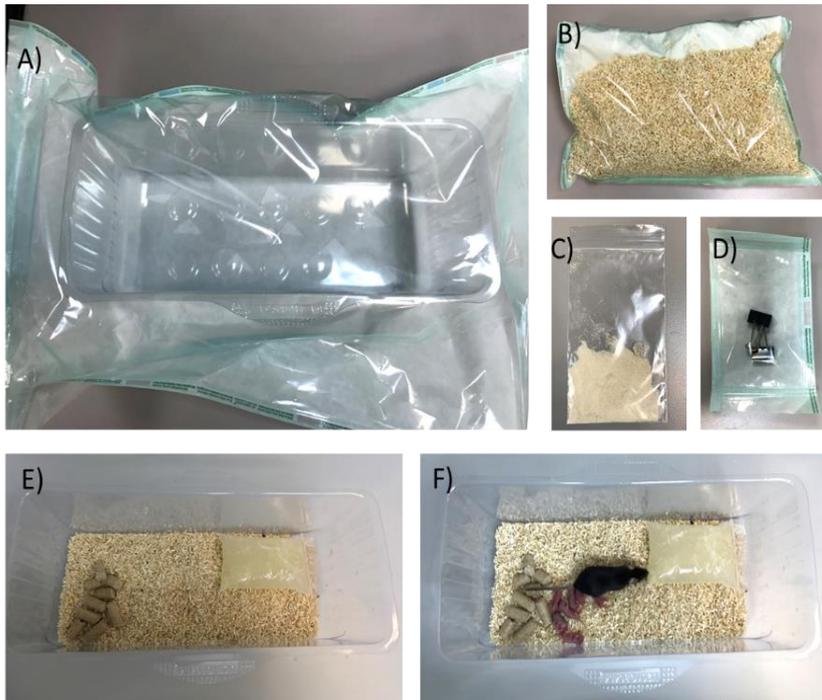


Figura 18. Fotografías del material utilizado para la jaula del interior de la cámara. A) Recipiente de plástico con 2 tapas (1 agujereada) estériles. B) Serrín estéril. C) Hidrogel en polvo. D) Pinzas estériles para cerrar la jaula. E) Jaula donde se realiza el experimento. F) Jaula con las crías recién nacidas.

La jaula debe ser totalmente transparente para que se puedan hacer las fotos en todo momento y poder saber con exactitud el momento del nacimiento.

2.1. Estudio del metabolismo oxidativo en ratones recién nacidos sometido a una $FiO_2=0.14$ durante 8 horas.

Este estudio se realizó para el análisis de parámetros del metabolismo oxidativo en crías de ratones recién nacidas (P0) las cuales son sometidas el efecto de hipoxia moderada ($FiO_2=0.14$) a diferentes tiempos durante 2, 4, 6 y 8 h.

Se utilizaron dos grupos el grupo control y el grupo experimental. En el grupo control las crías de ratón fueron mantenidas en aire ambiente ($FiO_2=0.21$) todo el tiempo hasta el momento del sacrificio. Por otro lado, el grupo experimental estaba formado por cuatro subgrupos de crías de ratón que estuvieron bajo condiciones hipóxicas ($FiO_2=0.14$) durante 2h, 4h, 6h y 8h respectivamente.

El periodo de hipoxia se realizó en la cámara de oxigenación controlada. Las crías, junto con la madre, eran trasladadas a la cámara y mantenidas a una $FiO_2=0.14$ durante el periodo de tiempo indicado. Pasado este periodo, las crías fueron sacrificadas por decapitación. El grupo control permaneció con la madre a $FiO_2=0.21$ hasta el momento del sacrificio.

3. Determinaciones Experimentales

3.1. Determinación de Lactato

3.1.1 Determinación en sangre

A. Fundamento

La determinación se llevó a cabo mediante el uso del analizador de lactato portátil Lactate Pro™ (Arkay Inc., Kyoto, Japan) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El método de detección se basa en un electrodo sensible al lactato gracias a la reacción catalizada por la enzima lactato oxidasa.

B. Preparación muestra

El método de uso consistió en poner primero una tira reactiva que calibra el aparato, va incluida en el analizador y seguidamente se coloca una nueva tira para realizar la medida. En el momento se realiza la decapitación se coloca la tira nueva sobre el cuello del ratón y por capilaridad sube la sangre hasta el sensor. Una vez la cantidad de sangre es suficiente, suele ser alrededor de 0.5 μL , se produce un ligero pitido. A los 60 segundos el aparato marca los niveles de lactato en sangre en la pantalla.

C. Cálculos

En la pantalla del analizador aparece el valor de los niveles de lactato en sangre en mmol/L .

3.1.2 Determinación en tejido

A. Fundamento

Para la determinación del lactato seguimos el método descrito por Gutman y Wahlefeld (1974) (Hoshino et al. 2015) (Kawahara, Quinn, y Lambeth 2007)(15). Este método está basado en la oxidación de lactato a piruvato, reacción catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).

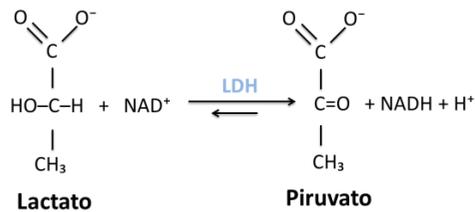


Figura 19. Reacción de conversión de lactato a piruvato. El lactato es oxidado a piruvato por la acción del enzima lactato deshidrogenasa (LDH). Como producto de la reacción se obtiene NADH más un protón (H+).

La reacción se lleva a cabo en un medio alcalino que atrapa a los protones, con exceso de LDH y un tampón que contiene hidrazina, compuesto que atrapa al piruvato formando hidrazona para que la reacción se desplace hacia la formación de piruvato. El incremento de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) se sigue mediante fluorimetría para poder cuantificar el lactato en la muestra.

B. Procedimiento

Las muestras fueron homogenizadas (Politron de Fisher Scientific, Generator FSH-G 5/085) con un volumen 10 veces mayor a su peso (dilución 1:10) en ácido perclórico (PCA) (Perchloric acid 705, Sigma-

Material y Métodos

Aldrich, Sant Louis, EEUU) al 2% de concentración final para desproteinizarlas y fueron centrifugadas a 10.000 g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido fue ajustado a pH 7 con hidróxido de potasio (KOH 3M) y ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS 0.3M) (Sigma Aldrich, Sant Louis, EEUU) y centrifugado a 10.000 g durante 5 minutos a 4°C para eliminar el perclorato potásico. La concentración de lactato se determinó en el sobrenadante.

El análisis de la muestra se llevó a cabo en una placa multipocillo donde se dispuso la mezcla reactiva junto con la muestra problema.

Mezcla reactiva:

- Hidrazina 0.4 M
- Glicina 0.5 M
- NAD⁺ 50 mM

Paralelamente se realizó un blanco, donde se sustituye la muestra problema por agua, y un control, se sustituye la muestra problema por una disolución conocida de lactato.

Una vez la placa está montada, se introdujo en el fluorímetro (Fluoroskan Ascent FL™ Microplate Fluorometer, Thermo Scientific, EEUU) excitando a una longitud de onda de 360 nm y detectando el espectro de emisión a 465 nm. Se esperó unos minutos hasta obtener un valor de absorbancia constante y se inició la reacción con la adición del enzima LDH 1250 U/mL (L-LDH rabbit muscle, Roche, UK). Se esperó 45-60 min hasta que el valor de la absorbancia se estabilizó, indicando que la reacción había terminado.

C. Cálculos

Para procesar los datos se realizó una curva de calibrado que incluye las concentraciones de lactato dentro del rango de 20 mM hasta 0.1 mM. Los valores de las muestras se obtuvieron mediante interpolación de datos usando el programa informático GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., California, EEUU).

3.2 Determinación de la actividad Lactato deshidrogenasa (LDH)

A. Fundamento

La enzima LDH cataliza la conversión de piruvato a lactato mediante la oxidación del NADH que utiliza como cofactor. La actividad de LDH se determina espectrofotométricamente siguiendo el método de Koh y Choi (Koh y Choi 1987). La disminución de la absorbancia debido a la oxidación del NADH a NAD⁺ es proporcional a la actividad de LDH (Figura 20). La tasa de disminución de la absorbancia como consecuencia de la conversión de NADH a NAD⁺, medida durante un minuto a 340 nm, es directamente proporcional a la actividad LDH.

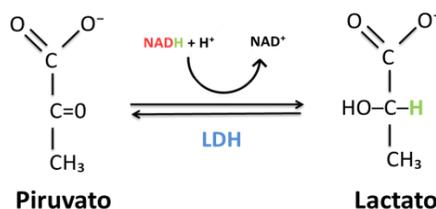


Figura 20. Reacción de conversión de piruvato a lactato. El piruvato es reducido a lactato por la acción del enzima lactato deshidrogenasa (LDH). Como producto de la reacción se obtiene NAD⁺.

Material y Métodos

B. Procedimiento

Las muestras fueron homogenizadas con un volumen 10 veces mayor a su peso (dilución 1:10) en tampón fosfato 0.1 M pH= 6,4.

Tampón Fosfato:

- K_2HPO_4 1 M
- KH_2PO_4 1 M

Se adicionó EDTA a una concentración final de 2 mM y fueron centrifugadas a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C. La actividad LDH se determinó en el sobrenadante obtenido y el *pellet* se resuspendió en tampón fosfato para la determinación de proteínas.

El análisis de la muestra se llevó a cabo en una placa multipocillo (Microplates 96 well, Greiner bio-one, Deckenhausen, Germany) donde se dispuso la mezcla reactiva (tampón fosfato, NADH 2.5 mM) junto con la muestra problema. Paralelamente se realizó un blanco, donde se sustituye la muestra problema por agua.

Una vez la placa está montada, se introdujo en el espectrofotómetro de barrido (MULTISKAN SPECTRUM® de Thermo Scientific, Waltham, EEUU) excitando a una longitud de onda de 340 nm. Se esperó unos 4 minutos hasta obtener un valor de absorbancia constante y se inició la reacción con 16.5 mM de piruvato. Se realizan mediciones cada 10 segundos durante un minuto y vamos observando cómo disminuye la absorbancia.

C. Cálculos

Para procesar los datos como no tenemos una recta de calibrado se utilizó la siguiente fórmula:

$$A = \varepsilon * c * l$$

A = Absorbancia medida espectrofotométricamente.

ε = Coeficiente de extinción del NAD⁺ = 6,22.10³ cm/M

c = Concentración.

l = Longitud del paso óptico (0,614 cm para las placas multipocillo).

La absorbancia medida es la pendiente de la curva (valores obtenidos cada 10 segundo durante un minuto que dura la reacción) menos la absorbancia del blanco.

Con los valores de concentración de proteínas y teniendo en cuenta el factor de dilución de la muestra (10x) se obtuvo la actividad enzimática en U/mg proteína.

3.3. Determinación de la actividad Piruvato quinasa (PK)

A. Fundamento

La PK, es la última enzima de la glucólisis que cataliza la reacción del grupo fosfato del fosfoenolpiruvato al adenosín 5'-difosfato (ADP), produciendo una molécula de piruvato y otra de adenosín 5'-trifosfato (ATP). Para la determinación de la actividad enzimática de la PK, el piruvato formado por PK está acoplado a la reacción catalizada por la LDH, y por lo tanto se mide la oxidación de NADH (Lai y Blass 1984) como se muestra en la figura 21.

Material y Métodos

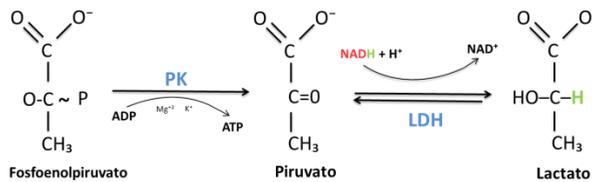


Figura 21. Reacción enzimática del fosfoenolpiruvato a piruvato mediante la piruvato quinasa (PK) y conversión del piruvato a lactato mediante la lactato deshidrogenasa (LDH).

B. Procedimiento

Las muestras fueron homogenizadas con un volumen 10 veces mayor a su peso (dilución 1:10) en tampón fosfato 0.1M a pH=7,42. Se centrifugaron a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido fue recogido para determinar la actividad PK y el *pellet* se resuspendió en tampón fosfato para medir la concentración de proteínas.

El análisis de la muestra se llevó a cabo en una placa multipocillo donde se dispuso la mezcla reactiva junto con la muestra problema.

Mezcla reactiva:

- MgCl₂ 8mM
- NADH 0.2 mM
- Fosfoenolpiruvato 1 mM
- KCl 75 mM
- Enzima L-LDH 14 U

El análisis de la muestra se llevó a cabo en una placa multipocillo donde se dispuso la mezcla reactiva, junto con la muestra problema. Paralelamente se realizó un blanco, donde se sustituye la muestra problema por agua.

Una vez la placa está montada, se introdujo en el espectrofotómetro de barrido excitando a una longitud de onda de 340 nm. Se esperó un minuto hasta obtener un valor de absorbancia constante y se inició la reacción con la adición de 1 mM de ADP. Se realizan mediciones cada 10 segundos durante 2 minutos y vamos observando cómo disminuye la absorbancia que será proporcional a la actividad de la PK.

C. Cálculos

Para procesar los datos al no tener una recta de calibrado se utilizó la siguiente fórmula:

$$A = \varepsilon * c * l$$

A = Absorbancia medida espectrofotométricamente.

ε = Coeficiente de extinción del NAD⁺ = 6,22.10³ cm/M

c = Concentración.

l = Longitud del paso óptico (0,614 cm para las placas multipocillo).

La absorbancia medida es la pendiente de la curva (valores obtenidos cada 10 segundo durante 2 minutos que dura la reacción) menos la absorbancia del blanco.

Con los valores de concentración de proteínas y teniendo en cuenta el factor de dilución de la muestra (10x) se obtuvo la actividad enzimática en U/mg proteína.

3.4. Determinación de la actividad Hexoquinasa (HK)

A. Fundamento

La HK es la primera enzima de la glucólisis. El ensayo se basa en dos reacciones, la primera es la producción de glucosa-6-fosfato mediante la reacción de glucosa con la enzima HK. A continuación, la glucosa-6-fosfato en presencia de exceso de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) produce la reducción del nicotinamida adenina dinucleótido (NADP^+) y se mide el incremento del NADPH (Lai et al. 1980; Lai y Blass 1984).



Figura 22. Reacción enzimática de la glucosa a glucosa-6-fosfato mediante la enzima Hexoquinasa (HK), seguida de la reacción de la glucosa-6-fosfato a 6 fosfogluconato por la enzima de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD).

B. Procedimiento

Las muestras fueron homogenizadas con un volumen 10 veces mayor a su peso (dilución 1:10) en tampón fosfato 0.1M a pH=7,42. Las muestras fueron centrifugadas a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C. En el sobrenadante se determinó la actividad HK y la concentración de proteínas se determinó en el *pellet* obtenido y resuspendido en el tampón fosfato.

El análisis de la muestra se llevó a cabo en una placa multipocillo donde se dispuso la mezcla reactiva junto con la muestra problema.

Mezcla reactiva:

- MgCl_2 8 mM
- NADP^+ 0.4 mM
- D-glucosa 5 mM
- Enzima Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 5 U

El análisis de la muestra se llevó a cabo en una placa multipocillo donde se dispuso la mezcla reactiva, junto con la muestra problema. Paralelamente se realizó un blanco, donde se sustituye la muestra problema por agua.

Una vez la placa montada, se introdujo en el espectrofotómetro de barrido excitando a una longitud de onda de 340 nm. Se esperó un minuto hasta obtener un valor de absorbancia constante y se inició la reacción con la adición de 1 mM de ATP. Se realizan mediciones cada 10 segundos durante 4 minutos y vamos observando cómo aumenta la absorbancia que será proporcional a la actividad de la HK.

C. Cálculos

Para procesar los datos como no tenemos una recta de calibrado se utilizó la siguiente fórmula:

$$A = \varepsilon * c * l$$

A = Absorbancia, medida espectrofotométricamente

ε = Coeficiente de extinción del NAD^+ = $6,22 \cdot 10^3$ cm/M

c = Concentración.

l = Longitud del paso óptico (0,614 cm para las placas multipocillo).

Material y Métodos

La absorbancia medida es la pendiente de la curva (valores obtenidos cada 10 segundos durante un minuto que dura la reacción) menos la absorbancia del blanco.

Con los valores de concentración de proteínas y teniendo en cuenta el factor de dilución de la muestra (10x) se obtuvo la actividad enzimática en U/mg proteína.

3.5. Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas en las muestras biológicas se empleó el Kit *Pierce BCA Protein Assay Kit*[®] (Thermo Scientific, Waltham, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

A. Fundamento

Es un método colorimétrico basado en la reducción del Cu^{+2} a Cu^{+1} , en presencia de proteínas y en medio alcalino (reacción de Biuret), y posterior reacción del ión Cu^{+1} con dos moléculas de ácido bicinconínico (BCA), dando lugar al complejo coloreado cuya absorbancia se mide en un espectrofotómetro.

B. Procedimiento

En primer lugar, se preparó la solución formada por el reactivo A y el reactivo B del kit. La proporción de volumen entre los reactivos A y B es 50:1, respectivamente. Se pipeteó en la placa de 96 pocillos un volumen de muestra de 3 μL por triplicado. Para la correcta determinación de proteínas, se preparó una recta patrón realizada con

seroalbúmina bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) en concentraciones comprendidas entre 20 y 0,3125 mg/ml. El volumen de los patrones añadido a la placa es de 3 μ L y también por triplicado. Por último, se preparó un blanco con 3 μ L agua.

Se añadieron 260 μ L de la mezcla de reactivos a la recta patrón, al blanco y a las muestras. Se incubaron durante 30 minutos a 37°C, en leve agitación y en oscuridad.

La lectura espectrofotométrica se realizó a 562 nm de longitud de onda.

C. Cálculos

Se resta a cada muestra la absorbancia del blanco. Las absorbancias obtenidas se interpolan en la recta construida con los patrones y el valor hallado se expresa como miligramos de proteína por mililitro de muestra.

3.6. Determinación de biomarcadores por HPLC MS/MS

A. Fundamento

La técnica HPLC-MS/MS, cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas, se basa en la combinación de la capacidad de separación física de la cromatografía líquida con la capacidad del análisis de masa de la espectrometría de masas. Es una técnica muy utilizada en diversas aplicaciones que tiene una elevada sensibilidad y selectividad.

Material y Métodos

El principio básico de la espectrometría de masas es la generación de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa que son separadas en base a su relación masa-carga (m/z) y posteriormente detectados por medio de un dispositivo adecuado.

Un equipo de MS/MS está constituido de seis componentes básicos:

- 1) Sistema de introducción de muestras
- 2) Fuente de ionización
- 3) Primer cuadrupolo (Q1)
- 4) Cámara o celda de colisión (Q2)
- 5) Tercer cuadrupolo (Q3)
- 6) Detector

El primero de los componentes, el sistema de introducción de muestra es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La muestra se introduce directamente por medio de una varilla metálica, que lleva en la punta un capilar conteniendo la muestra. Una vez que ha sido introducida, sufre una ionización por electro-spray (ESI) para adquirir carga. La ionización puede tener lugar en modo positivo (generación de cationes) o negativo (generación de aniones). Posteriormente pasa al Q1, el cual mantiene fija la relación m/z del ión padre. A continuación, pasa a Q2 gracias a la energía de colisión se fragmenta el ión padre y los diferentes fragmentos obtenidos (iones hijos) entran en el Q3, que está fijo a la relación m/z del fragmento mayoritario y, por tanto, solo atraviesa este cuadrupolo el fragmento

mayoritario. Por último, el detector registra la cuenta total de iones (TIC).

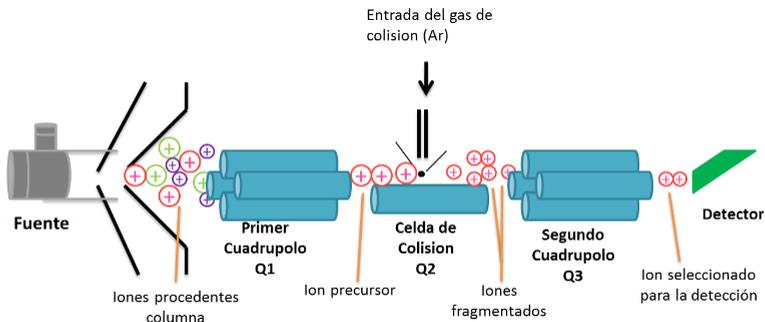


Figura 23. Esquema del funcionamiento del HPLC-MS/MS.

Las muestras que se analizan este trabajo fueron analizadas por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de espectrometría de masas (HPLC-MS/MS). El equipo constaba de un espectrómetro de masas triple cuadrupolo, Waters Acquity UPLC-XevoTQsystem (Milford, MA, EEUU) con una fuente de ionización Z-spray operando en modo positivo (ESI+). Para el manejo del equipo y el procesamiento de los datos se utilizó el programa informático MassLynx 4.1 (Waters corporation, Manchester, UK).

3.6.1 Determinación de nucleótidos

La determinación de los nucleótidos, ATP, ADP y AMP en el tejido cerebral se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un tándem de espectrometría de masas (HPLC-MS/MS). El

Material y Métodos

sistema empleado es Acquity UPLC-Xevo TQD de Waters (Milford, MA, EEUU).

El fundamento de la técnica está explicado en el apartado anterior.

B. Procedimiento

Las muestras de tejido congelado (-80°C) se homogeneizaron en agua:metanol (1:3) frío a 4°C (100 mg/ml). En este paso el metanol precipita las proteínas presentes en el homogenado y una vez precipitadas, para ser eliminadas, las muestras fueron centrifugadas durante 20 minutos a 15000 rpm a 4°C. El sobrenadante obtenido es la muestra a analizar por HPLC-MS/MS. El precipitado se resuspendió en tampón acetato amónico pH=7 para determinar la concentración de proteínas en la muestra (Explicado en el apartado 3.5).

La separación cromatográfica se realizó en gradiente utilizando como fase estacionaria una columna Acquity UPLC Kinetex C8 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 µm, Phenomenex), a 35°C. Como fase móvil se utilizó un gradiente binario 20 mmol/L de acetato amónico en agua (Fase A) y metanol:agua (80:20) (Fase B). El gradiente fue el siguiente: 0–2 minutos, 30% B; 2–6 minutos, 30–80% B; 6–6.1 minutos, 80% B; 6.1–10 minutos, 30% B. El volumen de inyección fue siempre de 5 µL.

La máxima señal analítica se obtuvo utilizando las siguientes condiciones: tensión capilar de 3.5 kilovoltios (kV), temperatura de desolvatación 400° C y el flujo del nitrógeno y de desolvatación fueron de 301 y 850 L/h respectivamente.

Para la cuantificación de los diferentes analitos se realizó la monitorización de reacción múltiple (MRM). Los parámetros optimizados fueron las transiciones de iones precursores y de los hijos

tanto de cuantificación como de confirmación, la energía del cono (V), la energía de colisión (E.C.) (eV) para cada compuesto, que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros de adquisición MS/MS nucleótidos.

ANALITO	IÓN	CONO	IONES		E.C (eV)
	PRECURSOR (M/Z)	(V)	FRAGMENTADOS (M/Z)	FRAGMENTADOS (M/Z)	
ATP	506	30	158.99	-	20
ADP	426	25	159	134.1	25
AMP	346	30	78.91	134.1	20

C. Cálculos

El procesado de los datos se realizó mediante el programa informático MassLynx 4.1 (Waters corporation, Manchester, UK). Para ello se realizó una curva de calibrado lineal con un intervalo de concentraciones de 18.75 a 300 mmol/L para el ATP, de 10 a 160 mmol/L para el ADP y de 2 a 32 mmol/L para el AMP. El resultado fue expresado en nmol/mg de proteínas.

3.6.2 Determinación de aminotioles

Las determinaciones de los aminotioles que se realizaron fueron glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG), cisteína, cistina,

Material y Métodos

homocisteína, homocistina, γ -glutamilcisteína, cistationina, metionina y S-adenosilhomocisteína (SAH) en muestras de tejido cerebral congelados rápidamente en nitrógeno líquido y posteriormente almacenado a -80°C en el momento de la extracción. La determinación se realizó mediante HPLC-MS/MS, el fundamento de la técnica y el equipo empleado es el mismo que en apartado 3.6 A.

A continuación, se muestra un esquema de la vía de la transulfuración con los diferentes pares redox, figura extraída de la publicación Escobar J. et al 2016.

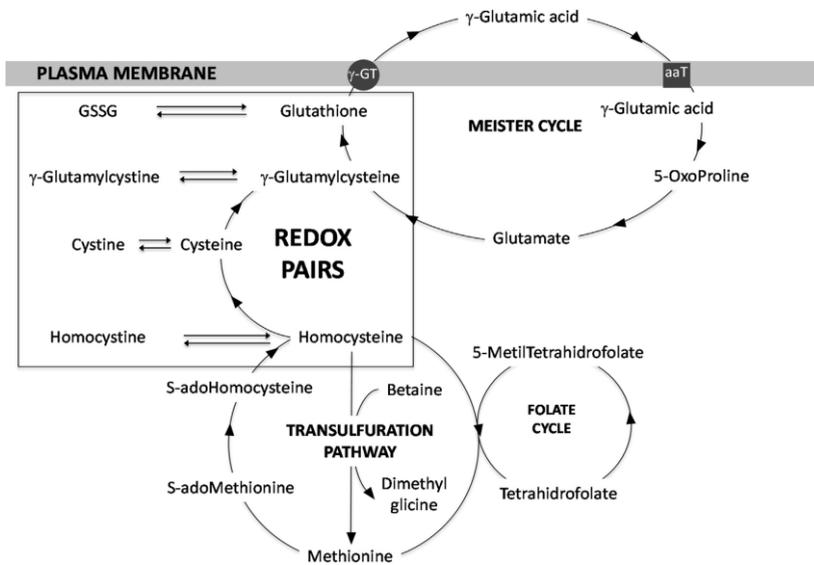


Figura 24. Esquema de la vía de la transulfuración (Transulfuration pathway) con sus metabolitos y de los diferentes pares redox. YGT = gamma-glutamyl-transpeptidasa, aaT=transportadores de aminoácidos (Escobar J. et al 2016).

B. Procedimiento

Las muestras fueron homogenizadas en tampón fosfato salino (PBS) y N-etilmaleimida (NEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) 10 mmol/L pH=7 la proporción de tejido y tampón fue 1:4. Las muestras

se desproteinizaron con ácido perclórico (PCA) a una concentración final de 4% y centrifugadas durante 15 minutos a 11000 rpm a 4°C. Las concentraciones de los diferentes aminotioles se determinaron en los sobrenadantes, para mejorar la cuantificación de estos analitos se utilizaron las señales de la cistina-D4, cisteína-D2 de Cayman Chemical Company (Ann Arbor, Michigan, EEUU), GSH-C13N15 y Metionina-D3 de Sigma-Aldrich Química SA (Madrid, Spain), el GSSG-C13N15 y Fenilalanina-D5 de Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada) como patrones internos (PI). Debido a las altas concentraciones de algunos analitos en tejidos como es el GSH, las muestras se diluyeron 1:20 en la fase móvil y para el resto de analitos las muestras se pasaron sin diluir.

En análisis de la muestra mediante espectrometría de masas, las condiciones empleadas fueron: ionización por electrospray positiva (ESI+), voltaje del capilar 3.5 kV, temperatura de la fuente 120°C, temperatura de desolvatación 300°C, el flujo del nitrógeno y de desolvatación fueron de 25 y 690 L/h, respectivamente. Se seleccionaron las condiciones de separación para lograr una retención y resolución cromatográfica apropiadas utilizando la columna kinetex UPLC C8 (2.1 x 100 mm, 1.7 μ m, Phenomenex) y una precolumna (2.1 x 5 mm). Se usó un gradiente binario en el cual la fase móvil A era acetonitrilo (CH_3CN) (0,1% v/v HCOOH): Fase móvil B era H_2O (0,1% v/v HCOOH). El flujo fue de 350 $\mu\text{L}/\text{minutos}$, la temperatura de la columna fue de 30°C y el volumen de inyección de 5 μL . El gradiente empezó con 0% fase A, de 2.5 to 4.4 minutos y el % de la fase A aumentó hasta un 65%. Las condiciones se mantuvieron 1.6 minutos para volver a las

Material y Métodos

condiciones iniciales durante 3.9 minutos y que el sistema se reequilibrara.

La detección por espectrometría de masas se llevó a cabo mediante monitorización de múltiples reacciones (MRM) empleando los parámetros de adquisición resumidos en la Tabla 2. Dos transiciones MRM fueron adquiridas por analito (cuantificación y confirmación) y para los PI se utilizó una única transición MRM, la energía del cono (V), la E.C (eV) para cada compuesto.

Tabla 2. Parámetros de adquisición MS/MS de aminotioles.

Analito	Ión precursor (m/z)	Cono (V)	Iones fragmentados (m/z)	Cuantificación		Confirmación	
				CE (eV)	CE (eV)		
GSH	433.2	30	304.3	15	201.2	15	
GSSG	613.2	30	355.3	25	231.1	25	
Cisteína	247.1	25	158.1	20	184.2	20	
Cistina	241.2	15	152.1	15	120.1	15	
Homocisteína	261.3	30	126	25	98	25	
Homocistina	269.1	35	136.1	11	90	11	
Cistina-D4	245	25	154	15	-	-	
Cisteina-D2	249	25	232	15	-	-	
Phe-D5	171.1	35	125	10	-	-	
GSH-C13N15	436.1	30	201.25	20	-	-	
GSSG-C13N15	618.1	30	361.14	15	-	-	

Tabla obtenida de la publicación (Escobar J. et al 2016).

C. Cálculos

El procesado de los datos se realizó mediante el programa informático MassLynx 4.1 (Waters Corporation, Manchester, UK). Se realizó una curva de calibrado lineal con un intervalo de concentraciones de 185.5 a 190000 nmol/L para el GSH, 9.31 a 9500 nmol/L para el GSSG y para el resto de analitos de 1.9 a 1900 nmol/L corregidos por la señal del patrón. Los resultados fueron expresados tanto por analito en nmol/mg proteína o $\mu\text{mol/mg}$ proteína o en forma de cocientes (GSH/GSSG, Homocisteína/homocistina y Cisteína/cistina).

D. Características del método analítico

El método analítico y el tratamiento de la muestra ha sido validado siguiendo las normas de la FDA (Downing et al. 2017). Las características analíticas ensayadas durante el procedimiento de validación fueron el rango de linealidad, la exactitud, la precisión, la selectividad, el límite de detección (LOD), el límite de cuantificación (LOQ), así como la estabilidad de las muestras y de los patrones y publicadas en el artículo (Escobar et al. 2016).

3.6.3 Determinación de derivados de la oxidación y nitración proteica (Tirosinas).

En la determinación de derivados de oxidación y nitración proteica hemos determinado las modificaciones en el aminoácido Tirosina (Tyr), una de las modificaciones más comunes utilizadas como biomarcadores de estrés oxidativo (EO). Los analitos determinados

Material y Métodos

son: p-tirosina (p-Tyr), orto-tirosina (o-Tyr), meta-tirosina (m-Tyr), 3-nitrotirosina (3NO₂-Tyr) y 3-clorotirosina (3Cl-Tyr) en muestras de tejido cerebral congelados rápidamente en nitrógeno líquido y posteriormente almacenados a -80°C. Se realizó mediante HPLC-MS/MS, con el mismo fundamento y equipo que en los apartados anteriores.

B. Procedimiento

Las muestras de cerebro se congelaron a -80°C rápidamente después de su extracción hasta ser homogenadas. El homogenado se realizó en tampón de lisis (100 mg/ml) sobre el hielo.

Tampón de lisis:

- Tris-HCl 20 mM (pH 7,5)
- EDTA 1 mM
- NaCl 150 mM
- SDS al 0,1%
- Igepal al 1%
- Pirofosfato sódico 30 mM
- Fluoruro sódico 50 mM
- Ortovanadato sódico 50 μM
- Cóctel inhibidor de proteasas (Sigma, Madrid, España) a una concentración de 4 μL / ml.

A continuación, las muestras son sonicadas (Sonicador *Digital* SLPe *cell disruptor* BRANSON (Danbury, USA) con 2 pulsos de 30 segundos cada vez y se precipitan las proteínas con el ácido tricloroacético (TCA) al 10% adicionando un volumen de 0.5 mL por muestra. Se centrifugan

a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C y se elimina el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en tampón acetato 50 mM pH=7.2 en el mismo volumen que el homogenado y se comprobó el pH, si era necesario se basificó con NaOH o neutralizó con el tampón Kpi hasta llegar a pH=7. Una vez alcanzadas las condiciones óptimas para la enzima se adicionó la enzima *Pronasa* (*Pronase S. griseus*, Sigma, Madrid, España) a una concentración de 20 mg/ml durante 18 horas a 50°C bajo agitación. Una vez finalizada la reacción se precipitó la enzima y el resto de proteínas que hubieran podido quedar por hidrolizar con TCA 10% y se centrifugó a 1500 rpm 5 minutos a 4°C. Para finalizar se recogió el sobrenadante obtenido y fue añadido a la placa para su determinación. En la placa se adicionó también 5 µL de PI, Fenilalanina-D5 (10 mmol/L) y 95 µL de la muestra. Las muestras estaban en un caso diluidas 1:20 en H₂O (0,1% v/v HCOOH) y otra sin diluir. La Phe y p-Tyr tienen concentraciones de varios órdenes de magnitud mayores que los niveles del resto de analitos y, por tanto, para la Phe y p-Tyr se midió en los sobrenadantes diluidos, mientras que para la o-Tyr, m-Tyr, 3NO₂-Tyr y 3Cl-Tyr en los sobrenadantes no diluidos. Luego se inyectaron en el sistema cromatográfico (HPLC-MS/MS).

Para el análisis de las muestras mediante espectrometría de masas, las condiciones empleadas fueron: ionización por electrospray positiva (ESI+), el voltaje del capilar 3.50 kV, cono 21 V, extractor 3.00 V, temperatura de la fuente 120°C, la temperatura de desolvatación 400°C, el flujo del nitrógeno y de desolvatación fueron de 50 y 750 L/h, respectivamente. Las condiciones cromatográficas fueron seleccionadas para lograr la retención cromatográfica apropiada fue

Material y Métodos

utilizando una columna Acquity UPLC BEH C18 (2.1 x 50 mm, 1.7 μ m, Waters Corporation, Manchester, UK). Se utilizó una fase móvil binaria, fase A: CH₃OH (0,05% v/v HCOOH) y fase B: H₂O (0,05% v/v HCOOH). El flujo, la temperatura de la columna y el volumen de inyección se fijaron en 0,4 mL/min, 30°C y 5 μ L, respectivamente. El gradiente empezó con 0% v/v de CH₃OH (0,05%, v/v, HCOOH) (Fase B), de 1 a 2,5 minutos. El % de la fase B aumenta a 15%, y de 2,5 a 4,5 hasta 99%. El retorno a las condiciones iniciales se alcanzó en 4.85, el sistema se mantuvo durante 3.15 minutos para el reequilibrio.

La detección se llevó a cabo mediante la monitorización de múltiples reacciones (MRM), empleando los parámetros de adquisición resumidos en la Tabla 3 (Torres-Cuevas, Kuligowski, et al. 2016).

Tabla 3. Parámetros de adquisición MS/MS de tirosinas.

ANALITO	IÓN PADRE M/Z	CONO (V)	IÓN FRAGMENTADOS M/Z	Quantification	Confirmación	EC (eV)
p-Tyr	182.1	30	136.1		119.2	15
m-Tyr	182.1	30	136.1		-	-
o-TYR	182.1	30	136.1		-	-
Phe	166.1	25	120.1		103.1	15
3NO ₂ -Tyr	227.1	25	181.2		-	-
3Cl-Tyr	216.1	25	170.1		157.1	15
Phe-D5	171.1	35	125.0		-	-

C. Cálculos

El procesado de los datos se realizó mediante el programa informático MassLynx 4.1 (Waters corporation, Manchester, Reino Unido). Se realizó una curva de calibrado lineal con un intervalo de concentraciones de 0.2 a 200 $\mu\text{mol/L}$ para la Phe y la p-Tyr, 10 a 5000 nmol/L para la m-Tyr y o-Tyr, 16 a 2000 nmol/L para la 3NO₂-Tyr y 3Cl-Tyr corregidos por la señal del patrón. Los resultados fueron expresados en forma de cocientes

D. Características del método analítico

El método analítico y el tratamiento de la muestra ha sido validado siguiendo las normas de la FDA (Downing et al. 2017). Las características analíticas ensayadas durante el procedimiento de validación fueron el rango de linealidad, la exactitud, la precisión, la selectividad, el límite de detección (LOD), el límite de cuantificación (LOQ), así como la estabilidad de las muestras y de los patrones y publicadas en el artículo (Torres-Cuevas, Kuligowski, et al. 2016).

3.6.4 Determinación de oxidación al ADN

Para el estudio del daño al ADN por EO hemos determinado la 2'desoxiguanosina (2-dG) y la 8-hidroxi-2'desoxiguanosina (8OHdG),

Material y Métodos

ya que este analito es el producto del daño oxidativo al ADN y puede ser cuantificada para indicar la extensión del daño del ADN.

B. Procedimiento

La determinación se ha realizado en muestras de cerebro, las cuales se homogeneizaron en el tampón de lisis añadiendo (100 mg/ml) en hielo.

Tampón de lisis:

- Tris-HCL 10 mM, pH 7.6
- EDTA 50 mM
- NaCl 50 mM
- SDS 0,2 %

A continuación, las muestras se incubaron con *proteínasa K* (*Proteínasa K* de *tritirachium*, Sigma, Madrid, España) 50°C toda la noche. La siguiente etapa es la fenolización, en la cual se añadió a la muestra un volumen equivalente (1:1) de fenol puro al 100% a pH 8.0 y mezclando suavemente, por inversión 40 veces, hasta que se obtuvo una emulsión homogénea. Después, las muestras se centrifugaron a 1500 rpm durante 3 minutos, recogiendo la fase superior con una punta cortada estéril y transfiriéndola a un tubo estéril. Se repitió el proceso, pero se añadió un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (1:1) en lugar de fenol, recogiendo la fase superior después de la centrifugación (15000 rpm durante 3 minutos). A continuación, el ADN de las muestras se precipitó con la adición de un 1 ml de isopropanol (frío) y se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos. Cuando el procedimiento se realiza correctamente, se aprecia una

mallita blanca (ADN precipitado). Posteriormente, el isopropanol se retiró de las muestras con precaución evitando cualquier contacto con el ADN precipitado. Las muestras de DNA se lavaron añadiendo 1 mL de etanol al 70%, centrifugando a 15000 rpm durante 10 minutos, eliminando cuidadosamente la mayor cantidad posible de etanol. Después se resuspendió el ADN en el tampón de digestión y se midió la concentración en el espectrofotómetro de micro-volúmenes Nanodrop Lite (Thermo Scientific, Waltham, EEUU). La media del cociente 260/280 para todas las muestras de ADN fue 1.6 ± 0.06 .

Tampón de digestión:

- Tris-HCl 40 mmol/L
- $MgCl_2$ 10 mmol/L, pH 7.5

Una vez hemos cuantificado el ADN, se necesitan 120 μ g de ADN para realizar la digestión enzimática siguiendo el método descrito por Crain (Crain 1990). Las muestras se incubaron durante 3 minutos a 100°C y después se colocaron sobre el hielo durante 1 minuto. Inmediatamente se adicionó 22 μ L de la enzima *Nucleasa P1* (*Nuclease P1* from *Penicillium citrinum* lyophilized power (≥ 200 units/mg protein), incubando las muestras durante 2.5 h a 45°C. A continuación, se añadió 25 μ L de la enzima *fosfodiesterasa I* (Phosphodiesterase I from *Crotalus adamanteus* venom ($\geq 0,01$ units/mg solid)) y se incubaron las muestras durante 2 horas a 37°C. Por último, se añadieron 12 μ L de *fosfatasa alcalina* (*Alkaline phosphatase* from calf intestine, 2000 units/mg protein) y se incubaron las muestras durante 1 hora más a 37°C, este procedimiento se llevó a cabo el

Material y Métodos

procedimiento en un termobloque (Biser, Mixing Block MB-102). Para comprobar el aislamiento del ADN, así como la digestión del ADN, se cargaron 3 μg de ADN, antes y después de la digestión, en un gel de agarosa al 1% y se visualizaron por luz ultravioleta después de la tinción de color GelRed. La electroforesis se realizó a 300 V, 60 W y 45°C durante 40 minutos, en un sistema de electroforesis de ADN Bio-Rad. La imagen del gel de ADN se capturó usando el ChemiDoc™ XRS (Bio-Rad). A continuación, los nucleótidos liberados se preconcentraron liofilizando los hidrolizados y se resuspendieron en 60 μL de MeOH:0,1% HCOOH 1:3. Para finalizar el procedimiento, se centrifugaron las muestras (15000 rpm durante 10 minutos) para eliminar cualquier desecho y se recogieron los sobrenadantes.

Para ser determinados, se añadió 5 μL de solución de PI 8-OHdG- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$ (10 mmol/L) a las muestras, 60 μL de dilución 1:20 en H₂O (0,1% v/v HCOOH) y sobrenadantes no diluidos. Luego se inyectaron muestras en el sistema cromatográfico (HPLC-MS/MS). La 2-dG es de varios órdenes de magnitud superior a los niveles de la 8-OHdG y por lo tanto, la 2-dG se determinó en los sobrenadantes diluidos 1:20, mientras que la 8-OHdG en los sobrenadantes no diluidos.

El sistema cromatográfico utilizado y las condiciones empleadas fueron las mismas que para la determinación oxidación tirosinas en el apartado anterior 3.6.3.

La detección por espectrometría de masas se llevó a cabo mediante monitorización de múltiples reacciones (MRM), empleando los parámetros de adquisición resumidos en la Tabla 4 (Torres-Cuevas, Parra-Llorca, et al. 2017)(Torres-Cuevas et al. 2016)(49).

Tabla 4. Parámetros de adquisición MS/MS de ADN.

ANALITO	IÓN PRECURSO (M/Z)	CONO (V)	IÓN FRAGMENTADO (M/Z)	E.C (EV)
2-dG	268.0	15	152.0	10
8-OHdG	284.1	20	168.1	15
8OHdG- ¹³ C ¹⁵ N ₂	287.0	25	171.0	10

C. Cálculos

Los datos fueron adquiridos y procesados utilizando MassLynx 4.1 y QuanLynx 4.1softwares (Waters), respectivamente. Las curvas de respuesta lineal empleadas fueron 0.1 a 500 nmol/L para la 8-OHdG y 102 a 512000 nmol/L para la 2-dG, se calcularon empleando 8-OHdG-¹³C¹⁵N₂. Los resultados son expresados en forma de ratios. Los resultados fueron expresados en forma de ratios.

D. Características del método analítico

El método analítico y el tratamiento de la muestra ha sido validado siguiendo las normas de la FDA (Downing et al. 2017). Las características analíticas ensayadas durante el procedimiento de validación fueron el rango de linealidad, la exactitud, la precisión, la selectividad, el límite de detección (LOD), el límite de cuantificación (LOQ), así como la estabilidad de las muestras y de los patrones y publicadas en el artículo (Torres-Cuevas, Parra-Llorca, et al. 2017).

4. Análisis de la expresión de ARNm de genes involucrados en la respuesta antioxidante, dianas de HIF, inflamación y neurotransmisión.

4.1 Aislamiento de ARN

Para el análisis de expresión génica se extrajo ARNm del tejido cerebral, para ello se utilizó un kit de extracción de ARN, RNeasy Mini kit 50, (Qiagen, Heildelberg, Alemania), siguiendo el protocolo del fabricante. El ARN se eluyó con 35 mL de agua libre de RNAsas y se separó una alícuota para comprobar la integridad y cuantificar el ARN. El resto fué congelado a -80°C hasta su uso. El ARN total aislado con este método puede llegar a estar prácticamente ausente de contaminaciones de ADN y proteínas. La pureza del ARN aislado se valora generalmente por espectrofotometría, midiendo la absorbancia de los ácidos nucleicos a 260 nm y del material proteico a 280 nm. El cociente entre los dos, A_{260}/A_{280} , se utiliza como índice de la contaminación de la muestra proteica. El ARN se considera puro cuando el ratio está comprendido entre 1.8 y 2 (Sambrook et al. 2010).

4.2. Retrotranscripción-amplificación del ARN

Para el estudio de la expresión de los genes de interés, una vez extraído el ARN mensajero (ARNm) total se realiza una retrotranscripción, consiste en obtener ADN complementario (ADNc) a partir ARNm. Posteriormente, mediante la reacción en cadena de la

polimera (PCR), se amplifica el ADN utilizando sondas Taqman para cada uno de los genes.

La PCR es una técnica que se desarrolla en diferentes etapas:

- ✓ Inicio → Choque térmico a altas temperaturas para activación de ADN polimerasas.
- ✓ Desnaturalización de la doble hebra de ADN → 95°C (30s)
- ✓ Hibridación *primers* → Tª óptima de unión de oligonucleótidos o temperatura de *melting*. Oscila alrededor de 60°C (30s).
- ✓ Elongación → Siempre en dirección 5' → 3' a velocidad de 1000 pb/minuto (72°C).

4.2.1 Retrotranscripción del ARN total

Para realizar la retrotranscripción del ARN a ADNc son necesarias un tipo de ADN polimerasas particulares, llamadas transcriptasas inversas o retrotranscriptasas. Las enzimas utilizadas proceden de algunos retrovirus, que son virus que presentan ARN como genoma, en vez de ADN. El kit que se utilizó *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit*[®] de Thermo Scientific (Waltham, USA) durante 50 minutos a 42°C, utilizando como cebador hexámeros aleatorios. Para inactivar la enzima se incubó la muestra durante 15 minutos a 70°C.

4.2.2 Análisis del ADN complementario por PCR cuantitativa

Posteriormente y mediante PCR se amplificó el ADNc utilizando sondas Taqman para cada uno de los genes. Todas las muestras se realizaron por triplicado y fueron tratadas de forma simultánea (transcripción y amplificación por PCR) para evitar el sesgo de lote a lote.

La expresión de los genes se cuantificó mediante el análisis por PCR en tiempo real (rtPCR) utilizando un termo-ciclador con un sistema de detección de fluorescencia *iQTM5 Multicolor Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad, California, EEUU), las curvas de fusión se construyeron mediante el programa *iQ Real Time Detection System Software* (Bio-Rad, California, USA), para asegurar que sólo se amplifica un único producto de PCR y el sistema de sondas fluorescentes con especificidad génica TaqMan[®] (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) (Tabla 5). Como gen de referencia se utilizó el Glicerinaldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*gapdh*).

Las condiciones de amplificación fueron 1 ciclo de desnaturalización de 10 minutos a 95°C y a continuación 40 ciclos de 15 segundos de desnaturalización a 95°C, 30 segundos a 60-64°C como temperatura de anillamiento, y 30 segundos de elongación a 72°C.

Tabla 5. Sondas Taqman para la cuantificación de ARNm por RT-PCR

Gen	Función	Sonda
gpx1	Defensa antioxidante	Mm00656767_g1
gr	Defensa antioxidante	Mm00439154_m1
gclc	Defensa antioxidante	Mm00802655_m1
epo	Diana de HIF	Mm01202755_m1
vegfa	Diana de HIF	Mm01202755_m1
il-1β	Inflamación	Mm00434228_m1
il-6	Inflamación	Mm00446190_m1
tnf-α	Inflamación	Mm00443258_m1
adora	Neurotransmisión	Mm01308023_m1
nmda	Neurotransmisión	Mm00433790_m1
gapdh	Housekeeping (control)	Mm99999915_g1

A. Procesado de los datos

La expresión relativa de ARNm se calcula utilizando el umbral de amplificación (CT) de cada gen empleando las siguientes fórmulas:

- ✓ $\Delta CT = CT \text{ gen problema} - CT \text{ gen control}$
- ✓ $\Delta(\Delta CT) = \Delta CT \text{ gen problema} - \Delta CT \text{ promedio de grupo control}$
- ✓ Expresión relativa = $2^{-\Delta(\Delta CT)}$

5. Técnicas de análisis histológico

5.1 Preparación del tejido para histología

Para el estudio histológico del cerebro, fue necesario realizar perfusión intracardiaca a los ratones P1. Las crías fueron anestesiadas con Ketamina/xilacina (10 mg/Kg) mediante punción intraperitoneal y posteriormente se les perfundió con solución salina al 0.9% seguido del fijador correspondiente, paraformaldehído (PFA) al 4% para inmunohistoquímica o PFA al 2% y glutaraldehído al 2.5 % para microscopía electrónica de transmisión (MET). Una vez perfundido el animal se decapitó y se extrajo el cerebro, el cual se postfijó por inmersión durante 24 h en el mismo fijador en función que sea para histoquímica o para MET.

5.2 Inmunohistoquímica

Tras la postfijación, los cerebros fueron lavados con PB 0.1M (3 lavados de 5 minutos) y puestos en sacarosa 30% durante 12-24 horas a 4°C. A continuación, los cerebros se encastraron en OCT (Mounting medium for cryotomo, VWR) para ser cortados en el criostato. Los cortes coronales fueron preparados en secciones de 14 µm, con un criostato modelo CM 1900 (LEICA) en 7 series paralelas. Para cada ensayo inmunohistoquímico se emplearon los niveles a estudiar de una serie completa. Los cortes se depositaron sobre portas supergelatinizados e inmediatamente fueron guardados a -20°C hasta su utilización.

Una vez seleccionada el área de estudio, los cortes se descongelaron y se fijaron en PFA al 4% durante 10 minutos. A continuación, fueron 2 lavados con PB 0.1M y 1 lavado con una solución de PBS 0.1M, suero de cabra (GS) 1% y Triton X-100 0.4% (GS-PBS-T). Después las muestras fueron bloqueadas con suero de cabra al 5% durante 45 minutos. Las incubaciones con los anticuerpos primarios (Tabla 6) fueron de 24 horas a 4°C. Previo lavado con PBS y la solución GS-PBS-T, se pasó a la incubación con los anticuerpos secundarios (Tabla 7) correspondientes, durante 45 minutos a temperatura ambiente. Para anticuerpos biotinilados se hizo una amplificación de la señal con el complejo Avidina/Biotina (ABC, Vector, Burlingame, CA, EEUU) y se reveló con 3,3'-Diaminobenzidina 0.05% (DAB, fast D4293, Sigma Aldrich) (Figura 25). A continuación, los cortes fueron contrateñidos con violeta de cresilo y deshidratados con concentraciones crecientes de alcohol etílico y aclarados en xileno, para finalmente ser montadas con EuKitt.

Las muestras reveladas con DAB fueron visualizadas con un microscopio óptico modelo Eclipse E200 (NIKON).

Material y Métodos

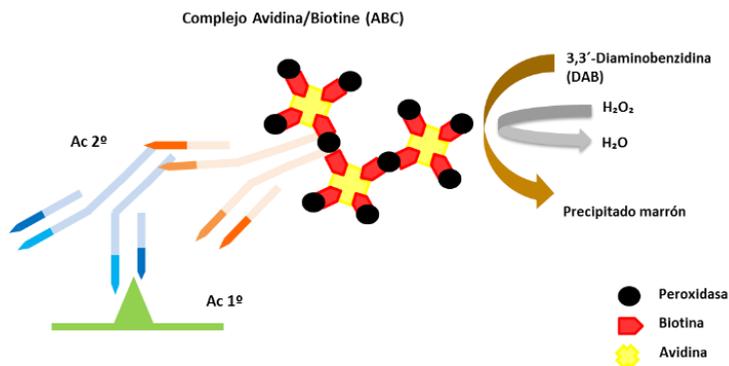


Figura 25. Representación de la reacción entre el anticuerpo primario y secundario biotinilado y el complejo Avidina/Biotina con la 3,3'-Diaminobenzidina.

Tabla 6. Listado de anticuerpos primarios utilizados en inmunohistoquímica.

ANTICUERPO	ESPECIE Y DILUCIÓN	REFERENCIA, CASA COMERCIAL	ESPECIFICIDAD
CASPASA 3 ACTIVA	Conejo policlonal, IgG (1:200)	Cell Signaling	Células apoptóticas
IBA 1	Conejo policlonal, IgG (1:300)	019-19741, Wako Chemicals (Richmond, VA, EEUU)	Células de microglía

Tabla 7. Anticuerpo secundario utilizado en inmunohistoquímica.

ANTICUERPO	ESPECIE	MARCAJE	DILUCIÓN	REFERENCIA, CASA COMERCIAL
ANTI-CONEJO, IgG	Anti-rabbit	Biotinilado	1/100	Vectastain

5.3 Detección de apoptosis por método TUNEL

A. Fundamento

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que da lugar a la ruptura o digestión del ADN nuclear, originando fragmentos de bajo peso molecular y doble hebra. Estos pequeños fragmentos pueden ser detectados mediante la adición de nucleótidos marcados con fluorescencia al extremo libre OH en 3'.

B. Procedimiento

Una vez tenemos los cortes de 14 μm del área de la corteza seleccionados se siguió el protocolo del Kit ApopTag® Red *In Situ* S7165 (Millipore, CA, EEUU).

El primer paso consistió en la fijación con PFA 1% 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, dos lavados de PBS de 5 minutos cada uno y seguidamente una post-fijación con etanol:ácido acético 2:1 de 5 minutos en frío a -20°C . Luego se eliminó el exceso de líquido y se añadió el buffer de equilibrio incubando 10 segundos. Una vez terminado el tiempo de incubación se eliminó el buffer y se adicionó la solución de trabajo con TdT enzima incubando 1 hora a 37° en la cámara húmeda. Al terminar el tiempo se adicionó una solución Stop con tampón de lavado durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces con PBS y se adicionó la Anti-digoxina conjugada (Rodamina) durante 30 minutos en una cámara húmeda sin exposición a la luz. Para finalizar se lavó 3 veces con PBS y se añadió DAPI.

Material y Métodos

Los cortes se montan con ProLong Antifade Life Technologies (P36934). Se utilizó el microscopio Leica DM4500B, con cámara Leica DFC 30FX. Para su correcta conservación, las muestras se almacenaron a -20°C.

C. Cálculos

En los cortes histológicos las células apoptóticas tiñen sus núcleos de rojo, el resto de los núcleos se tiñeron con DAPI (color azul) que es un fluoróforo universal de cromatina. Por tanto, se hizo un recuento de núcleos rojos (apoptóticos) por área de interés de la corteza cerebral. Esta determinación se ha realizado con el programa ImageJ.

5.4 Técnicas para la observación al microscopio óptico y electrónico de transmisión (TEM)

Tras la postfijación los cerebros fueron lavados con tampón fosfato (PB) al 0.1 M (pH 7.4) y cortados en secciones de 200 µm con un vibrátomo VT 1000M (LEICA, Wetzlar, Alemania). Estos cortes fueron postfijados con tetraóxido de Osmio al 2% en PB 0.1M durante 1.5 horas, lavados con agua, deshidratados en soluciones de concentración creciente de etanol y contrastados con acetato de uranilo al 2% en etanol al 70% durante 2 horas. Tras concluir la deshidratación, las secciones fueron incluidas en Araldita (Durcupan, Fluka BioChemika, Ronkokoma, NY, USA) (Codega et al. 2014). Una vez polimerizada la araldita se procedió a obtener los cortes semifino (1.5 µm), mediante una cuchilla de diamante, con un ultramicrotomo EM UC6 (Leica). Los semifinos fueron teñidos con azul de toluidina bórax

al 1% y analizados bajo un microscopio óptico modelo ECLIPSE E200 (NIKON, Tokyo, Japón).

Para los estudios de MET las mismas muestras que fueron incluidas para araldita se utilizaron para MET, pero en este caso los cortes fueron de 60-70 nm de grosor, las cuales fueron contrastadas con citrato de plomo (solución de Reynolds) y analizadas bajo un microscopio de transmisión modelo Spirit (FEI Tecnai, Hillsboro, OR, EEUU). Tanto para los estudios de semifinos como ultrafinos los estudios se realizaron sobre la corteza cerebral y se mapeó desde las regiones permielínicas del cuerpo calloso hasta la superficie del cerebro. Este estudio se realizó en niveles medios.

Por otra parte, se realizó el análisis morfométrico de las mitocondrias que permitió caracterizarlo. Los parámetros de forma utilizados fueron el área y la circularidad mitocondria. El área es, base x altura y se muestra el resultado en μm^2 y la circularidad con la siguiente fórmula; $4\pi \times [\text{Área}]/[\text{Perímetro}]^2$. Valores cercanos a 1 indican que es un círculo perfecto, cuanto más alejado del valor 1 indica forma más elongada.

6. Análisis estadístico

Todos los resultados se expresan como media y desviación estándar. Para el análisis de significación de las variables cuantitativas se utilizó el tratamiento estadístico ANOVA (*one-way analysis of variance*) seguido por Tukey's *post-hoc* test. Una *P* de 0,05 se utilizó

Material y Métodos

como límite para la aceptación de diferencias estadísticamente significativas. Para el análisis de variables cualitativas se empleó el test *Chi cuadrado*. Se utilizó una *P* de 0,05 como límite para la aceptación de diferencias estadísticamente significativas.

El manejo de los resultados se realizó con la herramienta estadística del programa informático GaphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., California, EEUU).

V. RESULTADOS

1. Cámara de hipoxia controlada

La cámara de oxigenación controlada fue diseñada con las características necesarias para la realización del modelo experimental de TFN, supliendo las carencias que tenían las cámaras comerciales.

Las principales modificaciones que se han realizado a la cámara han sido:

1. Reducción del tiempo necesario para alcanzar la FiO_2 deseada.
2. Sistema de doble entrada para los animales para evitar fugas de oxígeno
3. Cámara de video infrarrojos para establecer momento del parto con precisión
4. Incorporación de guantes en la cámara para manipulación de los animales sin fugas
5. Control de temperatura, presión y humedad.

Con todas estas modificaciones la cámara ha sido diseñada y puesta a punto para llevar a cabo los experimentos.

El tiempo que transcurre en pasar por cada uno de las FiO_2 utilizadas en el modelo de TFN ha sido un resultado espectacular comparado con las cámaras comerciales que en la mayoría de los casos no sobrepasaban el 95% de oxígeno en el interior y el tiempo en

Resultados

alcanzarlo era de varias horas. Con la nueva cámara se llega a 99% de oxígeno y el tiempo para alcanzar las concentraciones deseadas fue:

1. Transición del 21 al 14% de oxígeno 2 minutos.
2. Transición del 21% al 100% de oxígeno 5 minutos.
3. Transición del 14% al 100% de oxígeno 5 minutos
4. Transición 100% al 21% de oxígeno 3 minutos.

Con el sistema de doble entrada las pérdidas a la hora de introducir o sacar las hembras han sido mínimas y rápidamente equilibradas a la concentración deseada en el interior.

La adición de la cámara infrarroja ha permitido saber el momento exacto del nacimiento. A continuación, se muestran unas fotografías donde podemos ver el resultado de la incorporación de la cámara de infrarrojos para saber el momento exacto del nacimiento. En la figura 26 A) se observa a la hembra gestante cuando es introducida en la cámara. Fotografía B) Se ve el momento del nacimiento, en el cual la hembra lleva tiempo sin moverse de su posición y empiezan a nacer. Fotografía C) momento en el cual han nacido las crías. Fotografía D) Crías después del nacimiento.

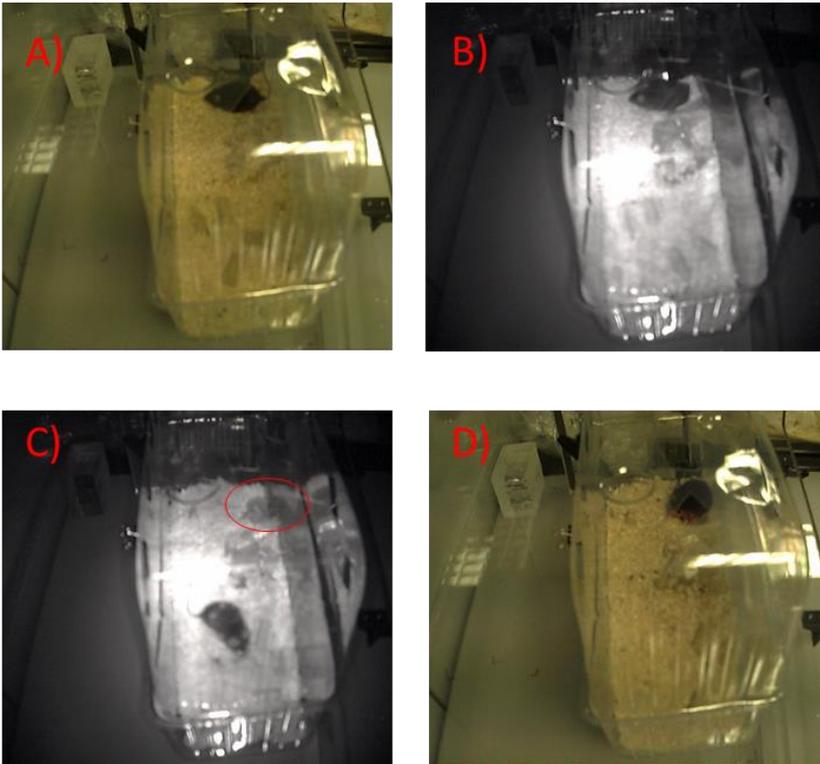


Figura 26. Fotografías nacimiento ratones. A) y B) Fotografía de la hembra gestante. C) y D) Fotografías de las crías recién nacidas (círculo rojo) con la hembra captadas mediante la cámara infrarrojos incorporada en la cámara de oxigenación controlada.

La incorporación de guantes en la cámara permitió manipular al animal en su interior en todo momento y ayudar al personal experimentador a realizar las manipulaciones oportunas de los ratones en todo momento si necesidad de abrir la cámara.

Los controles de temperatura, presión y humedad en el interior funcionaron perfectamente permitiendo en todo momento saber las condiciones en el interior de la cámara para permitir el desarrollo del modelo animal en condiciones óptimas y saludables para los ratones y sus crías.

2. Estudio del metabolismo oxidativo en ratones P0 sometidos a preconditionamiento hipóxico.

2.1 Determinación de parámetros del metabolismo aeróbico en crías de ratones (P0) con $FiO_2=0.21$ versus $FiO_2=0.14$ durante un periodo de tiempo.

2.1.1 Determinación de lactato en ratones P0

Se determinaron los niveles de lactato en sangre y cerebro de ratones nacidos P0. En el grupo control los ratones permanecieron en condiciones de normoxia ($FiO_2=0.21$) mientras que los grupos experimentales son 4, en los cuales los ratones fueron introducidos en la cámara y sometidos a una hipoxia moderada ($FiO_2=0.14$) durante 2, 4, 6 y 8 horas.

Los niveles de lactato medidos en sangre y cerebro no muestran cambios significativos durante los diferentes tiempos en hipoxia ($FiO_2=0.14$) respecto al control ($FiO_2=0.21$) (Figura 27. A y B).

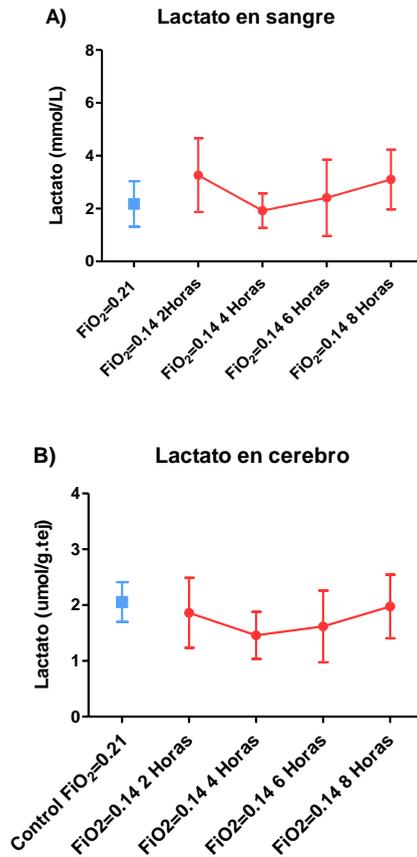


Figura 27. Determinación de los niveles de lactato en sangre y cerebro de ratones P0 bajo condiciones normóxicas ($FiO_2=0.21$) e hipóxicas ($FiO_2=0.14$). A) Lactato en sangre y B) Lactato cerebro, de ratones recién nacidos uno sometidos a hipoxia ($FiO_2=0.14$) durante 2, 4, 6 y 8 horas frente al control normóxico ($FiO_2=0.21$). Lactato en sangre; control n=23, 2horas n=12, 4horas n=8, 6horas n=17 y 8horas n=15. Lactato en cerebro; control n=10, 2horas n=10, 4horas n=8, 6horas n=11 y 8horas n=8.

Resultados

2.1.2 Determinación de las actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo aeróbico: Hexokinasa, Piruvato quinasa y Lactato deshidrogenasa

Una vez determinados los niveles de lactato se estudiaron algunas actividades enzimáticas relacionadas con la glucólisis y concentración del lactato como son la enzima Hexoquinasa (HK), Piruvato quinasa (PK) y Lactato deshidrogenasa (LDH).

Como podemos observar en la figura 28, se produce un aumento significativo para las actividades HK, PK y LDH tras 2 horas de hipoxia relativa, mientras que no hay diferencias con el control $FiO_2=0.21$ si la hipoxia se mantiene durante 4, 6 y 8 horas.

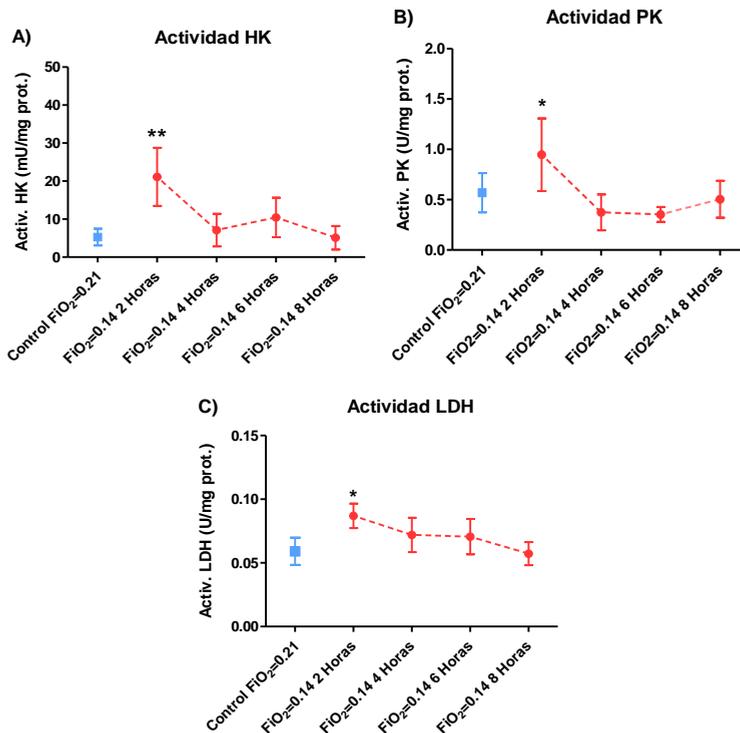


Figura 28. Determinación de actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo aeróbico en cerebro de ratones P1 bajo condiciones hipóxicas ($FiO_2=0.14$) y normóxicas ($FiO_2=0.21$). A) actividad HK, B) actividad PK y C) actividad LDH en cerebro de ratones recién nacidos sometidos a hipoxia ($FiO_2=0.14$) 2, 4, 6 y 8 horas frente al control normóxico ($FiO_2=0.21$). La diferencia estadística se indica como sigue: * <0.05 vs. control $FiO_2=0.21$ y ** <0.01 vs. control $FiO_2=0.21$. Actividad HK; control $n=10$, 2 horas $n=6$, 4 horas $n=6$, 6 horas $n=8$ y 8 horas $n=8$. Actividad PK; para todos los grupos $n=6$. Actividad LDH; para todos los grupos $n=8$.

2.1.3 Determinación las principales moléculas energéticas del metabolismo aeróbico: ATP, ADP, AMP y carga energética en cerebro.

Para finalizar los estudios sobre el metabolismo cerebral, se determinó la concentración de tres nucleótidos energéticos que son:

Resultados

adenosin 5'-trifosfato (ATP), adenosin 5'-difosfato (ADM) y adenosin 5'-monofosfato (AMP), durante los diferentes tiempos en condiciones normóxicas e hipóxicas. Además, se calculó la carga energética (C.E) en el cerebro como parámetro regulador del metabolismo (Atkinson 1968) mediante la fórmula:

$$C.E.= ([ATP]+0.5[ADP])/([ATP]+[ADP]+[AMP])$$

A) Determinación en cerebro

Se analizaron primeramente los niveles de ATP en cerebro los cuales muestran una disminución significativa a las 2 y 4 horas de estar en condiciones hipóxicas, recuperando los niveles similares al control a las 8 horas (Figura 29 A). El siguiente nucleótido determinado fue el ADP, en la gráfica se muestra cómo van poco a poco disminuyendo sus niveles hasta llegar a las 6 horas con una disminución significativa y aumenta a las 8 horas sin diferencias estadísticas con el control (Figura 29 B). Los niveles del tercer nucleótido, el AMP, sus niveles aumentan a las 2 y 4 horas de hipoxia respecto al control y a las 8 horas no muestran diferencias estadísticas con el control (Figura 29 C). Por último, para la C.E. en el cerebro se observa que a las 2 y 4 horas hay una disminución significativa respecto al control, sin embargo, se recupera y a las 6 y 8 horas no hay diferencias estadísticas (Figura 29 D).

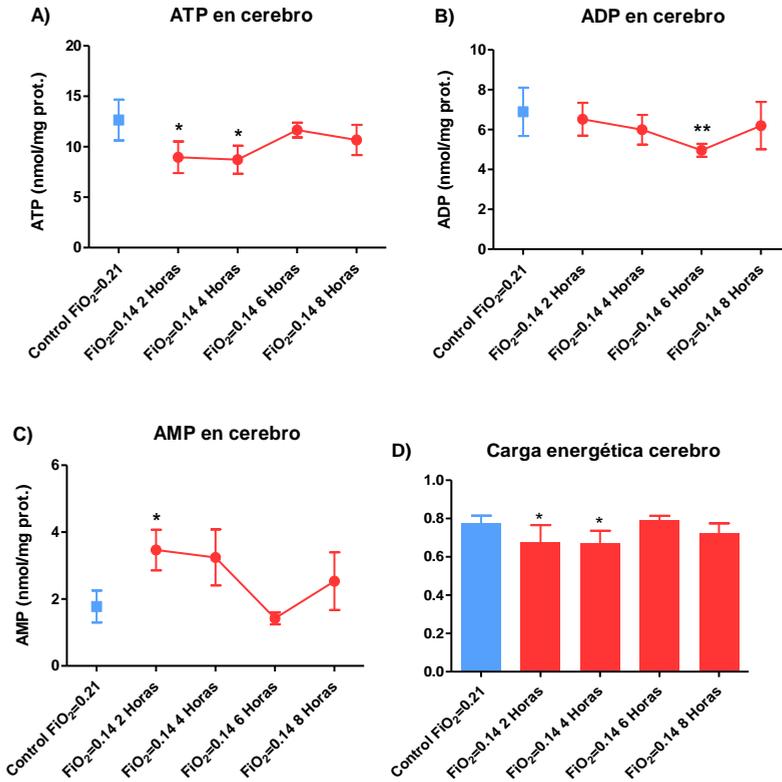


Figura 29. Determinación de los niveles de nucleótidos, ATP, ADP, AMP y carga energética (C.E.) en cerebro de ratones P1 bajo condiciones hipóxicas ($FiO_2=0.14$) y normóxicas ($FiO_2=0.21$). A) niveles de ATP, B) Niveles de ADP, C) Niveles de AMP y D) C.E. en cerebro de ratones recién nacidos sometidos a hipoxia ($FiO_2=0.14$) 2, 4, 6 y 8 horas frente al control normóxico ($FiO_2=0.21$). La diferencia estadística se indica como sigue: * <0.05 vs. control $FiO_2=0.21$. Para todos los grupos de estudio y las diferentes determinaciones la $n=8$.

3. Estudio del estrés oxidativo durante la transición fetal-neonatal en cerebro bajo una atmósfera hipóxica y reanimación postnatal.

3.1 Determinación de aminotioles (vía de la transulfuración)

El estudio del estrés oxidativo en la transición fetal-neonatal bajo diferentes fracciones inspiratorias de oxígeno se inició analizando los valores de los diferentes pares redox. Cada uno de estos pares redox está compuesto por un aminotiol reducido y otro oxidado de modo que se determinan las concentraciones de cada uno y su cociente: GSH, GSSG, Cisteína, Cistina, Homocisteína, Homocistina y sus cocientes GSH/GSSG, Cisteína/Cistina y Homocisteína/Homocistina.

La determinación de los aminotioles se realizó en muestras de cerebro de ratones nacidos bajo una $FiO_2=0.21$ (Nx21/21/21) y una $FiO_2=0.14$ (Hx14/21/21) y su posterior reanimación con una $FiO_2=1.0$. (Nx21/100/21 y Hx14/100/21). Los cerebros de los ratones analizados eran P1 y P7.

3.1.1 Par redox GSH/GSSG en ratones P1 y P7

La determinación de este cociente en muestras de cerebro de ratones P1 muestra una disminución significativa para el grupo Nx21/100/21 respecto al control y para el grupo Hx14/100/21. Por otro lado, el grupo HX14/100/21 muestra una disminución significativa

para el grupo Hx14/21/21 y para el control (Figura 30 A). Estos valores indican que los grupos reanimados con $FiO_2=1.0$ tienen un mayor estrés oxidativo frente a los grupos que no sufren el insulto hiperóxico. Sin embargo, que el nacimiento se dé en condiciones ambientales o hipóxicas no produce cambios en estado oxidativo.

Para los ratones a P7, el cociente muestra el mismo perfil para el grupo Nx21/100/21, una disminución significativa respecto al grupo control y al Hx14/21/21, pero sin cambios para el grupo Hx14/100/21 (Figura 30 B). Estos resultados muestran que el daño oxidativo sigue persistiendo en el grupo Nx21/100/21 pero en los grupos nacido bajos condiciones hipóxicas sin reanimar o reanimados no hay diferencias respecto al control ni con el resto de grupos.

Resultados

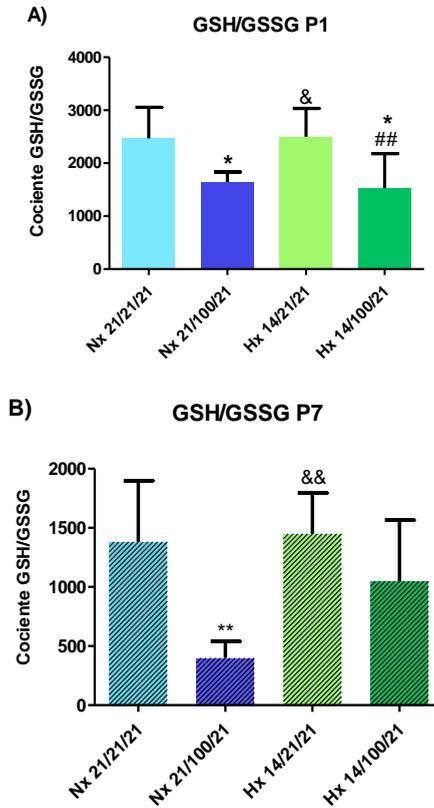


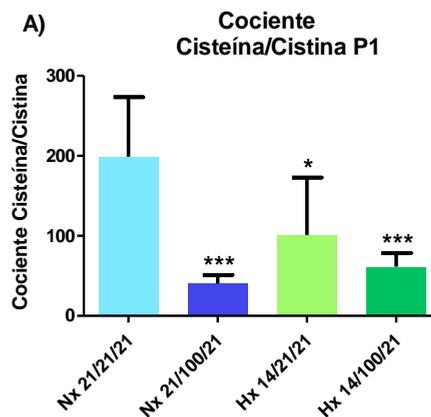
Figura 30. Niveles del cociente GSH/GSSG en cerebro de ratones P1 y P7 nacidos bajo diferentes FiO_2 : normoxia ($FiO_2=0.21$) e hipoxia ($FiO_2=0.14$) reanimados y sin reanimar ($FiO_2=1.0$). A) Cociente GSH/GSSG a P1 y B) Cociente GSH/GSSG a P7. La diferencia estadística se indica como sigue: * <0.05 vs. Nx21/21/21, ** <0.01 Vs Nx21/21/21, & <0.05 Vs Nx21/100/21, && <0.01 Vs Nx 21/100/21 y ## <0.01 Vs Hx14/21/21. Los grupos de estudio a P1 tienen una $n=8$ y los grupos a P7 $n=7$.

3.1.2 Par redox cisteína/cistina en ratones P1 y P7

Los resultados obtenidos para el siguiente par redox cisteína/cistina, los resultados obtenidos en cerebro de los ratones P1 el cociente muestra una disminución significativa del grupo Nx21/100/21 frente al control (Nx21/21/21), lo que revela que en el

grupo nacido en condiciones ambientales y sometido a una ocnncetración del 100%, el daño oxidativo sigue siendo mayor. En el resto de grupos nacidos en hipoxia (Hx14/21/21) y reanimados (HX14/100/21) no encontramos diferencias entre ellos en este par redox, pero si una disminución significativa respecto al control (Figura 31 A).

El cociente en los cerebros a P7 muestra una disminución significativa para el grupo Nx21/100/21 respecto al control como a P1, pero en este caso los grupos nacidos en hipoxia (Hx14/21/21 y Hx14/100/21) no muestran cambios significativos, con lo que no habría diferencias en cuanto a estrés oxidativo tanto si el nacimiento o reanimación es en nacimiento hipóxico (Figura 31 B).



Resultados

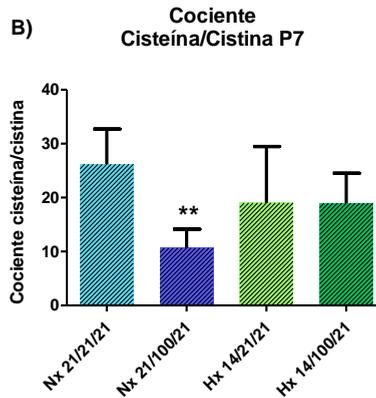


Figura 31. Niveles del cociente cisteína/cistina en cerebros de ratones P1 y P7 nacidos bajo diferentes FiO_2 : normoxia ($FiO_2=0.21$) e hipoxia ($FiO_2=0.14$) reanimados y sin reanimar ($FiO_2=1.0$). A) Cociente cisteína/cistina a P1 y B) Cociente cisteína/cistina a P7. La diferencia estadística se indica como sigue: * <0.05 vs. Nx21/21/21, ** <0.01 vs. Nx21/21/21, *** <0.001 vs. Nx21/21/21, & <0.05 Vs Nx21/100/21, && <0.01 Vs Nx21/100/21 y # <0.05 Vs Hx14/21/21. Los grupos de estudio a P1 tienen una $n=8$ y los grupos a P7 $n=6$.

3.1.3 Par redox homocisteína/homocistina en ratones P1 y P7

En los ratones P1 el cociente homocisteína/homocistina muestra un claro aumento en el grupo Hx14/21/21 respecto al resto de grupos de estudio, siendo este aumento significativo para todos ellos. Por tanto, indica una disminución del estrés oxidativo en el cerebro de los ratones nacidos en hipoxia (Hx14/21/21) respecto al resto de condiciones (Figura 32 A).

A los siete días postnatales, el perfil se mantiene, siendo significativamente más alto el grupo Hx14/21/21 respecto al grupo nacido en condiciones ambientales Nx21/21/21 (Figura 32 B).

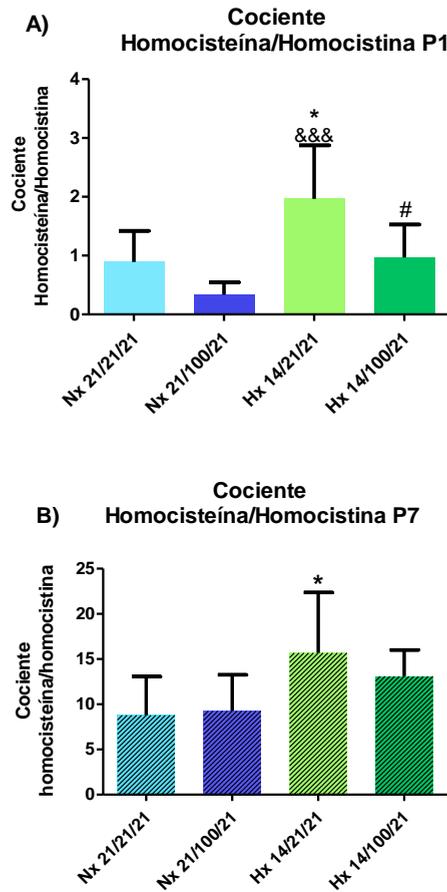


Figura 32. Niveles del cociente homocisteína/homocistina en cerebro de ratones P1 y P7 nacidos bajo diferentes FiO_2 : normoxia ($FiO_2=0.21$) e hipoxia ($FiO_2=0.14$) reanimados y sin reanimar ($FiO_2=1.0$). A) Cociente homocisteína/homocistina a P1 y B) Cociente cisteína/cistina a P7. La diferencia estadística se indica como sigue: $* < 0.05$ vs. Nx21/21/21, $* < 0.001$ vs. Nx21/21/21 y $\&\&\& < 0.001$ Vs Nx21/100/21. Los grupos de estudio a P1 tienen una $n=8$ y los grupos a P7 $n=6$.**

4. Determinación del daño proteico por estrés oxidativo durante la transición fetal-neonatal en cerebro bajo una atmósfera hipóxica y reanimación postnatal: Determinación de derivados de la oxidación y nitración proteica.

4.1 Oxidación y nitración proteica en cerebro de ratones P1

Una vez estudiados los diferentes pares redox y la vía de la transulfuración se estudió el daño a las principales biomoléculas causado por el estrés oxidativo, entre ellas el daño a proteínas. Para evaluar el daño proteico nos centramos en las modificaciones del aminoácido Tirosina (Tyr). Los principales biomarcadores de este daño son los cocientes m-Tyr/Phe y o-Tyr/Phe, 3NO₂-Tyr/p-Tyr, 3C-Tyr/p-Tyr.

El cociente m-Tyr/Phe y 3Cl-Tyr/p-Tyr muestra un aumento significativo para el grupo nacido bajo condiciones normóxicas y reoxigenado (Nx21/100/21) frente a su control (Nx21/21/21) y una disminución significativa del grupo nacido bajo condiciones hipóxicas y reoxigenado (Hx14/100/21) frente a su control normóxico (Figura 33 A y D). Lo que parece indicar que hay un mayor daño proteico causado por el EO en el Nx21/100/21 frente al resto de grupos. Para el cociente o-Tyr/Phe y 3NO₂-Tyr/p-Tyr sigue la misma estructura, pero sin ser significativos las diferencias entre grupos (Figura 33 B y C).

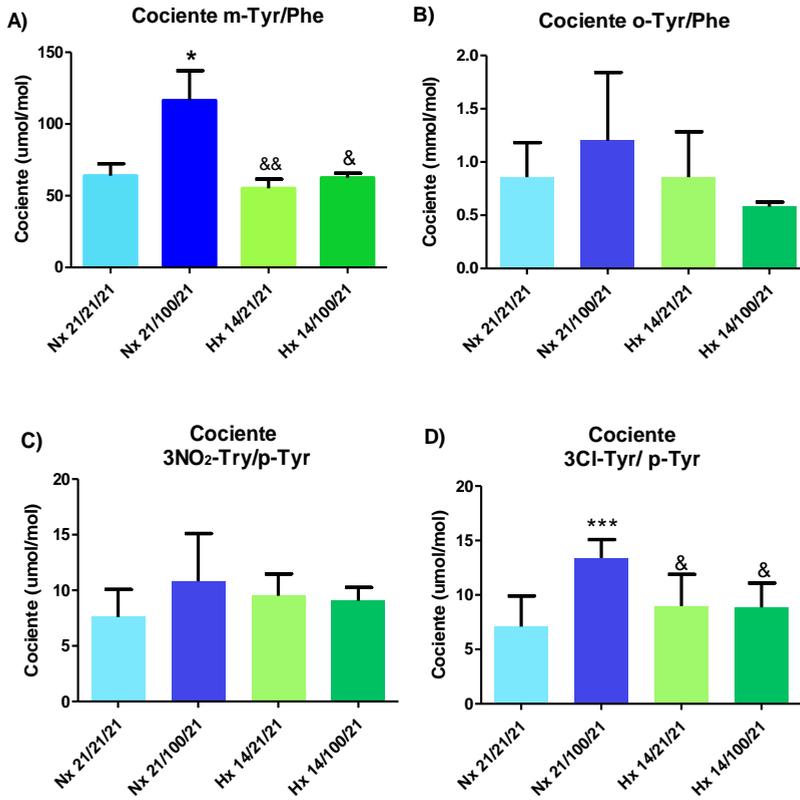
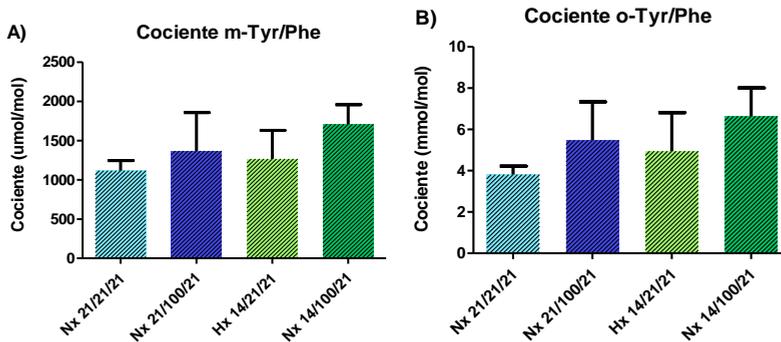


Figura 33. Determinación de daño proteico mediante los niveles de m-tyr/Phe, o-Tyr/Phe, 3NO₂-Tyr/p-Tyr y 3Cl-tyr/p-Tyr en cerebro de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO₂: normoxia (FiO₂=0.21) e hipoxia (FiO₂=0.14) reanimados y sin reanimar (FiO₂=1.0). A) Cociente m-Tyr/Phe, B) cociente m-Tyr/Phe, C) cociente 3NO₂-Tyr/p-Tyr y D) cociente 3Cl-Tyr/p-Tyr en cerebro de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO₂. La diferencia estadística se indica como sigue: * < 0.05 vs. Nx21/21/21, *** < 0.001 vs. Nx21/21/21, & < 0.05 vs. Nx21/100/21 y && < 0.01 vs. Nx21/100/21. Todos los grupos tienen n=8, excepto Hx14/100/21 n=6.

Resultados

4.2 Oxidación y nitración proteica en cerebro de ratones P7

El cociente en los ratones P7 muestran para el m-Tyr/Phe, o-Tyr/Phe y 3Cl-Tyr/p-Tyr no se muestran diferencias estadísticas para ninguno de los grupos tanto si han nacido en condiciones ambientales o hipóxicas (Fig 34 A, B y D) Sin embargo, para el cociente 3NO₂-Tyr/p-Tyr se muestra un aumento significativo para el grupo nacido bajo condiciones normóxicas y reoxigenado (Nx 21/100/21) frente a su control (Nx21/21/21) y una disminución significativa del grupo nacido bajo condiciones hipóxicas y reoxigenado (Hx14/100/21) frente a su control normóxico (Figura 34 C). Lo que indicaría una mayor inflamación y EO en este grupo Nx21/100/21.



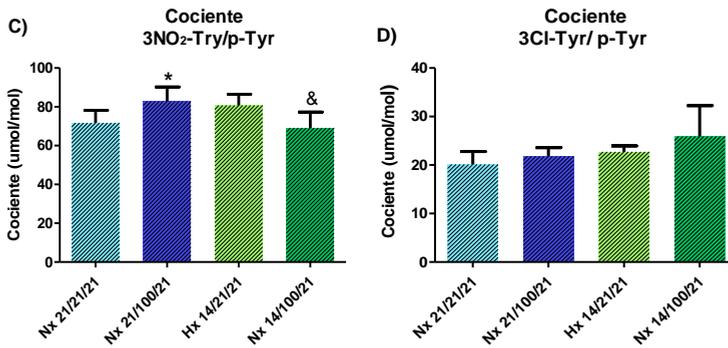


Figura 34. Determinación de daño proteico mediante los niveles de m-tyr/Phe, o-Tyr/Phe, 3NO₂-Tyr/p-Tyr y 3Cl-tyr/p-tyr en cerebro de ratones P7 nacidos bajo diferentes FIO₂: normoxia (FIO₂=0.21) e hipoxia (FIO₂=0.14) reanimados y sin reanimar (FIO₂=1.0). A) Cociente m-tyr/Phe, B) cociente m-tyr/Phe, C) cociente 3NO₂-Tyr/p-Tyr y D) cociente 3Cl-Tyr/p-Tyr en cerebro de ratones P1 nacidos bajo diferentes FIO₂. La diferencia estadística se indica como sigue: * < 0.05 vs. Nx21/21/21 y & < 0.05 vs. Nx21/100/21. Los grupos Nx21/21/21 y Nx21/100/21 tienen n=8 y los grupos Hx14/21/21 y Hx14/100/21 n=7.

5. Estudio de daño al ácido desoxirribonucleico (ADN) por estrés oxidativo durante la transición fetal-neonatal en cerebro bajo una atmósfera hipóxica y reanimación postnatal: Oxidación de la guanina en posición C8, formación de la 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG).

Siguiendo con el estudio de biomarcadores de estrés oxidativo en cerebro de ratones con TFN bajo diferentes FIO₂ y su posterior reanimación, se decidió ver el daño oxidativo a otra biomolécula, el ADN. Para la evolución de este daño el biomarcador utilizado fue el cociente entre la 8-hidroxi-2-desoxiguanosina y la 2-desoxiguanosina (8-OHdG/2dG).

Resultados

5.1 Oxidación al ADN en cerebro de ratones P1 y P7

El cociente 8-OHdG/2dG a P1 muestra un aumento significativo para el grupo nacido bajo condiciones normóxicas y reoxigenado (Nx21/100/21) frente al control (Nx21/21/21) y el resto de grupos del estudio. Sin embargo, para el grupo Hx14/21/21 y el grupo Hx14/100/21 no hay diferencias respecto al control, lo que indicaría que hay un menor daño al DNA cuando la reanimación ocurre con el nacimiento al 14% de oxígeno (Figura 35 A).

Lo mismo ocurre en los cerebros a los siete postnatales (P7), aumento significativo del grupo Nx21/100/21 respecto al resto de grupos (Figura 35 B).

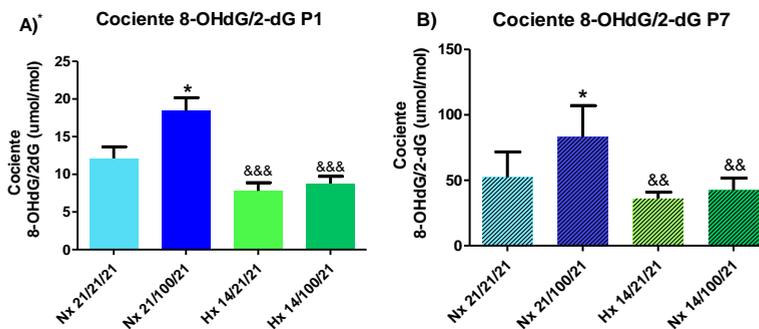


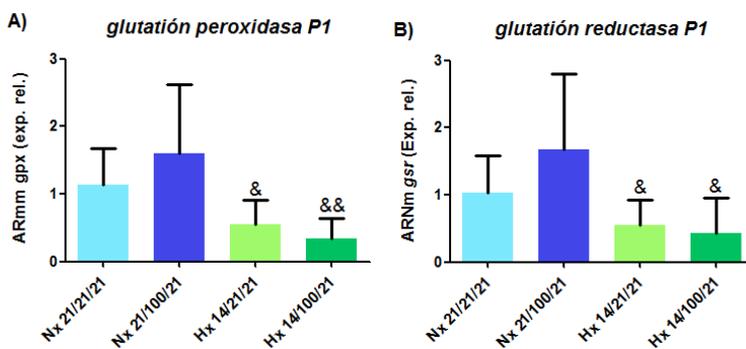
Figura 35. Determinación de daño oxidativo al ADN mediante el cociente 8-OHdG/2dG en cerebro de ratones P1 y P7 nacidos bajo diferentes FiO_2 : normoxia ($FiO_2=0.21$) e hipoxica ($FiO_2=0.14$) reanimados y sin reanimar ($FiO_2=1.0$). A) cociente 8-OHdG/2dG a P1, B) cociente 8-OHdG/2dG a P7 en cerebro de ratones nacidos bajo diferentes FiO_2 . La diferencia estadística se indica como sigue: * <0.05 vs. Nx21/21/21, && <0.01 vs. Nx21/100/21 y &&& <0.001 vs. Nx21/100/21. Para los diferentes grupos de estudio y tiempos de estudio la $n=7$.

*Figura obtenida del artículo (Torres-Cuevas, Aupi, et al. 2017).

6. Expresión de genes implicados en la defensa antioxidante en cerebros de ratones cuya transición fetal-neonatal se realiza bajo una atmósfera hipóxica y reanimación postnatal.

Tras el estudio de biomarcadores de estrés oxidativo, se analizó la expresión de algunos genes implicados en el metabolismo del glutatión como son la glutatión peroxidasa 1 (*gpx*), la glutatión reductasa (*gr*) y la glutamil-cisteína ligasa catalítica (*gclc*) tanto a P1 como P7.

En la figura 36 A, B y C se muestra una tendencia en el aumento de los niveles de los mensajeros de las tres enzimas en el grupo normóxico y reanimado (Nx21/100/21) frente al control sin reanimar (Nx21/21/21) y aumento significativo frente al resto de grupos nacidos en hipoxia, Hx14/21/21 y Hx14/100/21 que nos indicaría aumento de la defensa antioxidante frente al daño por EO en este grupo.



Resultados

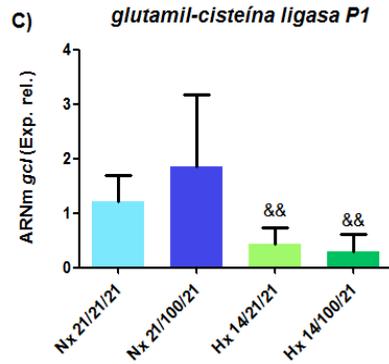


Figura 36. Expresión de ARNm de *gpx*, *gr* y *gcl* en cerebro de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO_2 : normoxia ($FiO_2=0.21$) e hipoxia ($FiO_2=0.14$) reanimados y sin reanimar ($FiO_2=1.0$). A) Niveles relativos de ARN de *gpx*, B) Niveles relativos de *gr* y C) Niveles relativos de *gcl* en cerebro de ratones P1 nacidos bajo condiciones diferentes FiO_2 . La diferencia estadística se indica como sigue: &<0.05 Vs Nx21/100/21, &&<0.01 Vs Nx21/100/21 y &&&<0.001 Vs Nx21/100/21. En todos los grupos la n=7.

Mientras que los niveles de mensajeros a P7 de la *gpx* se observa un aumento significativo del grupo Hx14/100/21 frente al resto de grupos de estudio. En el gen *gr* el aumento significativo del grupo Hx14/100/21 es frente al grupo Hx14/21/100 y Nx21/100/21, obteniéndose niveles similares al control. Por último, en los niveles de mensajero de *gcl* se observa una disminución significativa para el grupo Hx14/100/21 frente al control, lo que indicaría que no hay un aumento de la síntesis de los niveles de GSH, pero si lo hay en el grupo Hx14/100/21 respecto al grupo Hx14/21/21 (Figura 37 A, B y C).

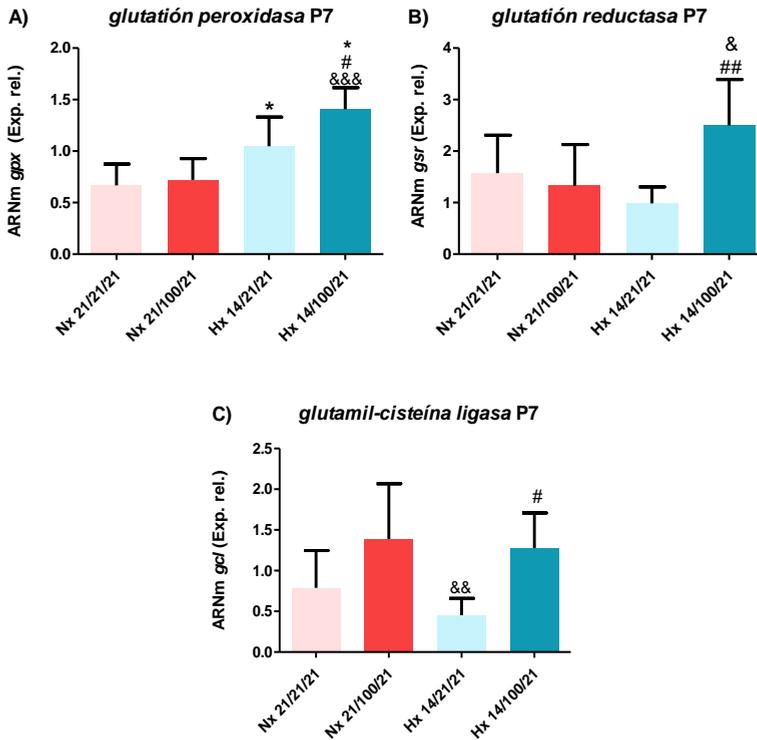


Figura 37. Expresión de ARNm de gpx, gsr y gcl en cerebro de ratones P7 nacidos bajo diferentes FiO_2 : normoxia ($FiO_2=0.21$) e hipoxia ($FiO_2=0.14$) reanimados y sin reanimar ($FiO_2=1.0$). A) Niveles relativos de ARN de gpx, B) Niveles relativos de gr y C) Niveles relativos de gcl en cerebro de ratones P7 nacidos bajo condiciones diferentes FiO_2 . La diferencia estadística se indica como sigue: #<0.05 Vs Hx14/21/21, ##<0.01 Vs Hx14/21/21, &<0.05 Vs Nx 21/100/21, &&<0.01 Vs Nx21/100/21 y &&&<0.001 Vs Nx21/100/21. En todos los grupos n=6.

7. Expresión de genes diana del Factor inducible por Hipoxia (HIF-1 α) a nivel cerebral en la transición fetal-neonatal se realiza bajo una atmósfera hipóxica y reanimación postnatal.

Al realizar el nacimiento bajo una $FiO_2=0.14$, la cual que representa las condiciones intrauterinas, resulta interesante ver si había una hipoxia tisular con esta FiO_2 y si se activaban los niveles de expresión de las dianas de HIF-1 α tan relevantes en el nacimiento como eran la eritropoyetina (*epo*) y el factor de crecimiento del endotelio vascular A (*vegfa*).

La Figura 38 muestra los resultados obtenidos para estas dos dianas de HIF-1 α en cerebro de ratones P1 y P7. Tanto para la *epo* a P1 como a P7 muestra niveles significativamente elevados para el grupo nacido en condiciones hipóxicas, Hx14/21/21, frente al control y en P1 también frente al grupo Nx21/100/21 (Figura 38 A y C). Sin embargo, los resultados obtenidos en la expresión génica de *vegfa* no muestran diferencias a P1 y a P7 para ninguno de los grupos de estudio (Figura 38 B y D). Lo que indica que en el nacimiento al 14% de oxígeno hay una hipoxia tisular que activa esta diana, pero en el grupo Hx14/100/21 esta activación se ve contrarrestada por el efecto de la reanimación (Figura 38 A y B) pero sin cambios a nivel de angiogénesis.

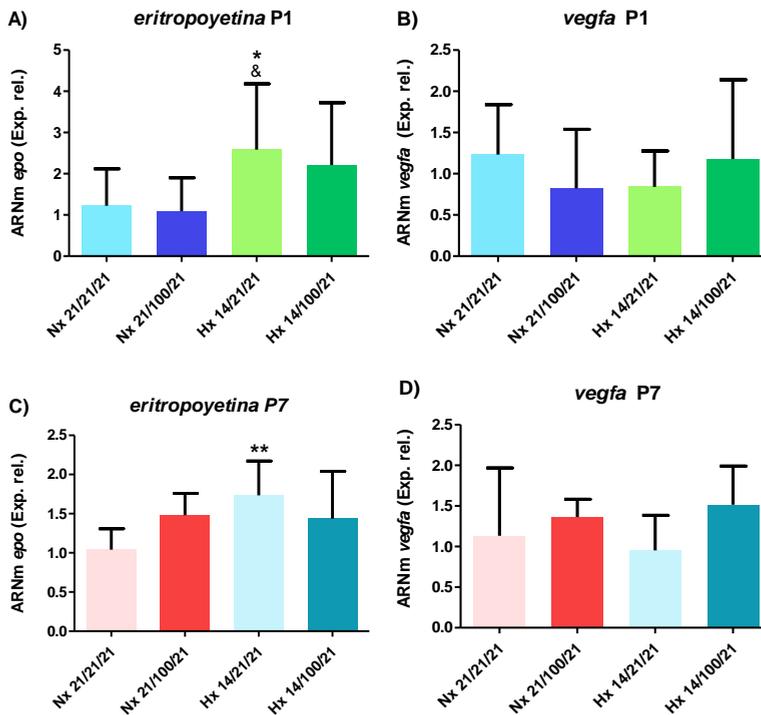


Figura 38. Expresión de ARNm de epo y vegfa en cerebro de ratones P1 y P7 nacidos bajo diferentes FiO_2 : normoxia ($FiO_2=0.21$) e hipoxia ($FiO_2=0.14$) reanimados y sin reanimar ($FiO_2=1.0$). A) Niveles relativos de ARN de epo P1, B) epo P7, C) vegfa P1 y D) vegfa P7 en cerebro de ratones P1 y P7 nacidos bajo diferentes FiO_2 . La diferencia estadística se indica como sigue $* < 0.05$ Vs Nx21/21/21, $** < 0.01$ Vs Nx21/21/21, $& < 0.01$ Vs Nx21/100/21 y $\# < 0.05$ Vs Hx14/21/21. Para los ratones P1 $n=10$ y para los ratones de P7 $n=6$.

8. Análisis en cerebro de genes relacionados con la inflamación durante la transición fetal neonatal bajo una atmósfera hipóxica y el periodo de reanimación.

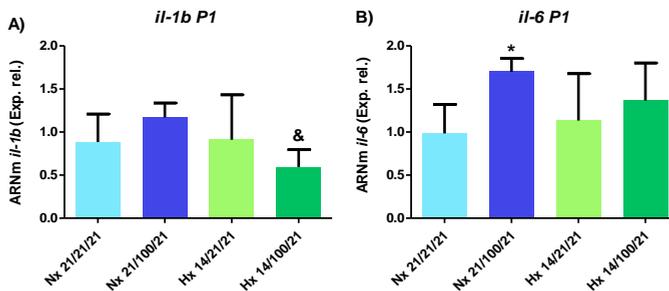
Una vez estudiado los biomarcadores de estrés oxidativo en cerebro y la activación de las dianas de HIF-1 α se estudió la implicación

Resultados

de genes inflamatorios en el proceso de TFN en cerebro en ratones P1 y P7. Los genes estudiados fueron 3 citoquinas: *il-1b*, *il-6* y *tnf-a*.

Tal y como muestra la figura 39, observamos que en una TFN en condiciones normóxicas o hipóxicas no hay diferencias en los niveles de ARNm de ninguno de los genes estudiados, solamente se observan cambios cuando se produce la reoxigenación en condiciones normóxicas (Nx21/100/21) aumentando los niveles de la *il-6* frente al grupo control y al grupo Hx14/21/21 y en el caso de la *il-1b*, en el grupo 14/100/21 hay una disminución significativamente frente al 21/100/21.

En ratones a P7 no se encontraron diferencias para ninguno de los genes, al no ser un efecto crónico no afecta a los niveles de mensajero a los siete días postnatales.



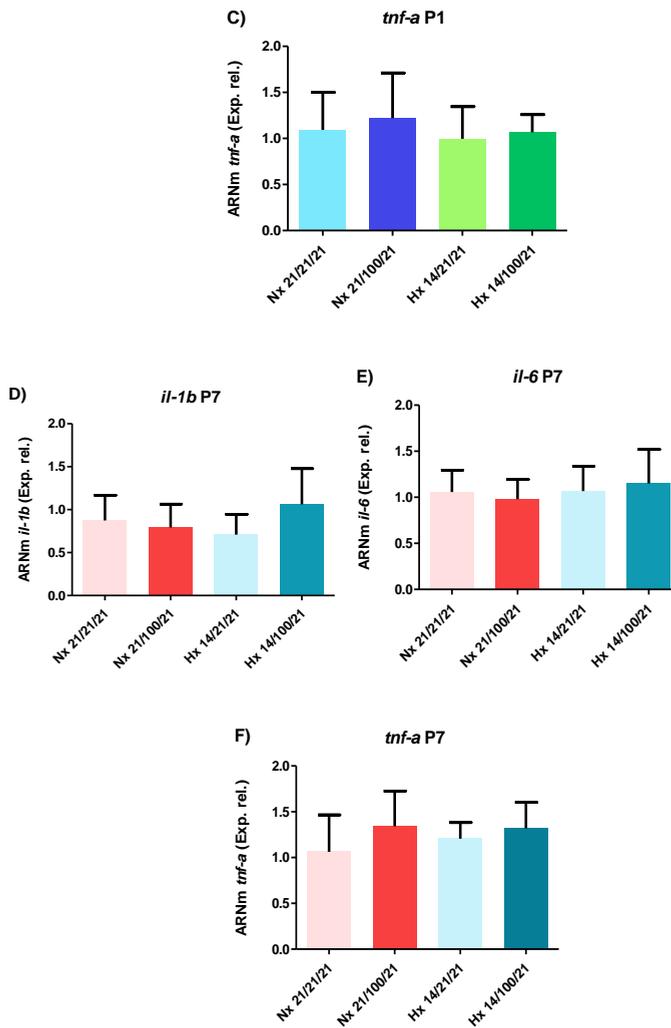


Figura 39. Expresión de ARNm de *il-1b*, *il-6* y *tnf-a* en cerebro de ratones P1 y P7 nacidos bajo diferentes FiO_2 : normoxia ($FiO_2=0.21$) e hipoxia ($FiO_2=0.14$) reanimados y sin reanimar ($FiO_2=1.0$). A) Niveles relativos de ARN de *il-1b* P1, B) *il-6* P1, C) *tnf-a* P1, D) *il-1b*, E) *il-6* y F) *tnf-a* P7, en cerebro de ratones P1 y P7 nacidos bajo condiciones diferentes FiO_2 . La diferencia estadística se indica como sigue <0.01 Vs Nx21/21/21, $&<0.01$ Vs Nx21/100/21. Para los ratones P1 n=6 y para los ratones de P7 n=6.**

9. Análisis en tejido cerebral de genes relacionados con la neurotransmisión durante la transición fetal neonatal bajo una atmósfera hipóxica y el periodo de reanimación.

Otro aspecto de estudio en la TFN es la neurotransmisión, ver cómo afecta los diferentes niveles de oxigenación al nacer sobre los receptores de dos los principales neurotransmisores, el glutamato y la adenosina. En cerebro se estudiaron los niveles de transcripción del receptor de glutamato (*nmda nr1*) y del receptor de adenosina A1 (*adora 1*) tanto a P1 como P7.

Para los niveles de *nmda* a P1 muestran una disminución significativa cuando la TFN ocurre bajo una atmósfera hipóxica respecto al control y al grupo Nx21/100/21, lo que indicaría que no hay hiperexcitabilidad en el nacimiento y reoxigenación cuando se produce bajo condiciones hipóxicas ($FiO_2=0.14$). Para el gen *adora 1* no hay cambios en ninguno de los grupos.

Sin embargo, a P7 los niveles de *nmda* son significativamente más elevados en el grupo Nx21/100/21 respecto a al control y al grupo Hx14/21/21 al igual que ocurre con el grupo Hx14/100/21 con lo que podemos indicar que a la semana del nacimiento sí que se produce un aumento en los niveles de expresión del receptor de glutamato en los grupos reoxigenados independientemente de las condiciones de FiO_2 en el nacimiento (Figura 40 C). Los niveles de expresión del gen *adora 1* aumentan significativamente en los grupos reoxigenados (Nx21/100/21 y Hx14/100/21) respecto al control (Figura 40 D).

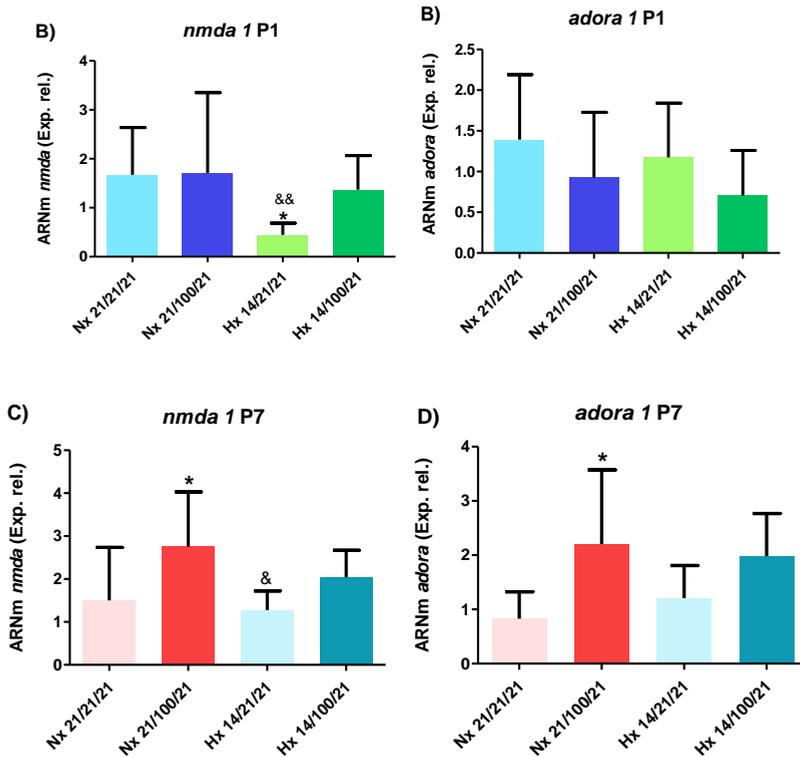


Figura 40. Expresión de ARNm de *nmda* y *adora* en cerebro de ratones P1 y P7 nacidos bajo diferentes FiO_2 : normoxia ($FiO_2=0.21$) e hipoxia ($FiO_2=0.14$) reanimados y sin reanimar ($FiO_2=1.0$). A) Niveles relativos de ARN de *nmda* 1 P1 (A), B) *adora* 1 P1, C) *nmda* 1 P7 y D) *adora* 1 P7 en cerebro de ratones P1 y P7 nacidos bajo diferentes FiO_2 . La diferencia estadística se indica como sigue * <0.05 Vs Nx21/21/21, ** <0.01 Vs Nx21/21/21, # <0.05 Vs Hx14/21/21 y && <0.01 Vs Nx21/100/21. Para los ratones P1 $n=6$ y para los ratones de P7 $n=8$.

10. Estudio histológico de la corteza cerebral de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO_2 y reanimados.

Finalmente, se decidió abordar el estudio histológico de la corteza cerebral, al ser una de las principales áreas afectadas en los recién nacidos pretérmino (Cedarbaum, Aisen, y Volpe 2017; Malavolti et al. 2017). Para realizar este estudio se adicionaron dos grupos experimentales más, el primero es Hx14 8h y el grupo Hx 14/14/14 (ver material y métodos apartado 1.1).

En esta parte del estudio nos centramos en 3 aspectos, por un lado en la descripción morfológica y estructural de la corteza, por otro inmunohistoquímica, para determinar muerte e inflamación y finalmente se llevó a cabo un estudio morfométrico de las mitocondrias en las neuronas corticales.

Análisis morfológico de las secciones a nivel de la corteza cerebral de ratones P1

Inicialmente el análisis morfológico se realizó sobre sesiones semifinas, obtenidas de la corteza cerebral. Esto permitió determinar con detalle las diferencias entre los diferentes niveles de oxigenación en ratones P1.

Las fotos que se muestran en la Figura 41, están realizadas con el objetivo 10X, y están representados los 6 grupos de estudio. Aparentemente no se encuentran diferencias en la distribución de las

células en las diferentes capas, aunque parece que en el grupo Nx21/100/21 hay un menor número de células, con mayores espacios entre los somas celulares respecto al grupo control y al grupo nacido en hipoxia y reanimado Hx14/100/21. También parece llamativo la presencia de núcleos más condensados (más violetas) posiblemente sean células picnóticas al igual que el grupo 14/100/21 pero en menor cantidad (Figura 41).

Resultados

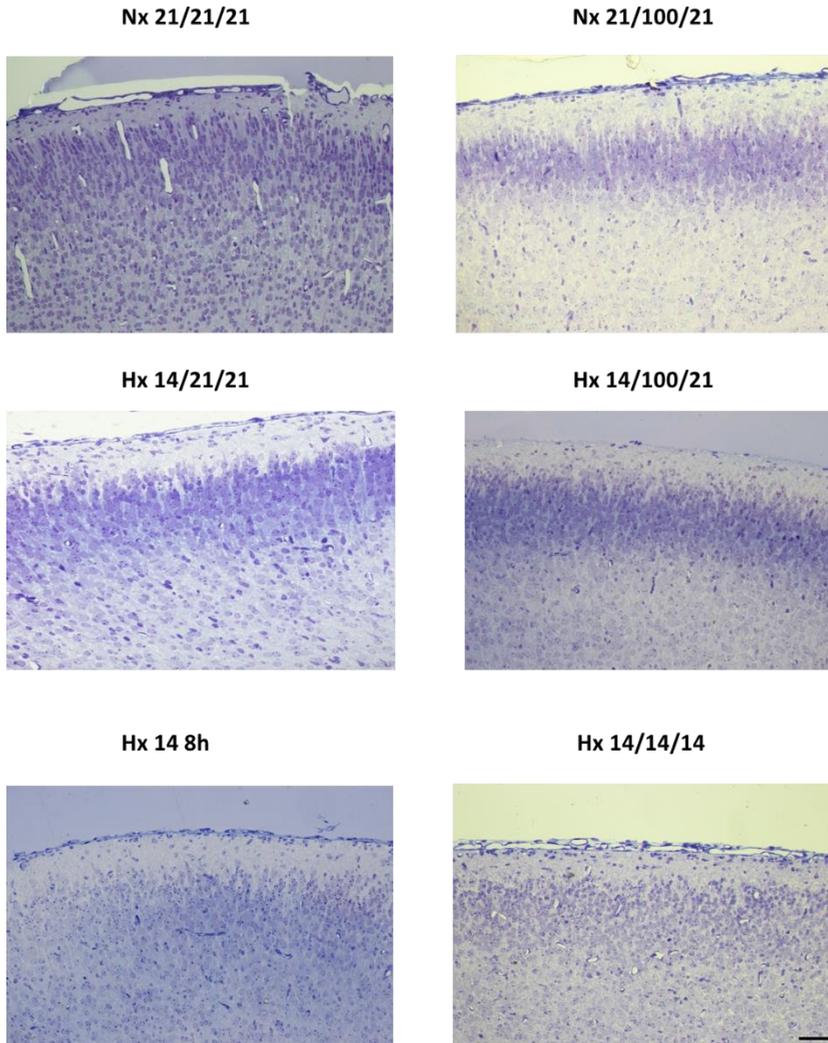


Figura 41. Panorámica de semifinos de 1.5 μm realizadas a 10x de la corteza cerebral de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO_2 . Nx21/21/21, grupo nacido en normoxia ($\text{FiO}_2=0.21$), Hx14/21/21, grupo nacido en hipoxia ($\text{FiO}_2=0.14$), Nx21/100/21 y Hx14/100/21 grupos reanimados ($\text{FiO}_2=1.0$), Hx14 8H grupo nacido en hipoxia ($\text{FiO}_2=0.14$) y Hx14/14/14, grupo nacido en hipoxia ($\text{FiO}_2=0.14$) y mantenido hasta P1. Barra de calibración 100 μm . Grupo Nx21/21/21 n=5, Nx21/100/21 n=5, Hx14/21/21 n=5, Hx14/100/21 n=4, Hx14 8H n=2 y Hx14/14/14 n=2.

A continuación, para poder observar con mayor detalle la corteza cerebral de los ratones P1, se tomaron las fotografías a mayores

aumentos 100X. En la Figura 42 se pueden ver las imágenes de las diferentes capas de la corteza cerebral, de cada uno de los grupos, que paso a detallar. Estas seis capas se han agregado en parejas (I y II, III y IV, V y VI) ya que a esta edad es difícil separar con precisión las 6 capas individualmente en estos ratones.

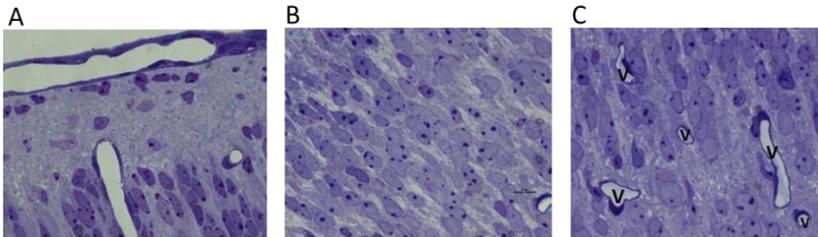
En todos los grupos la capa I y II muestran células dispersas con claras características de inmadurez, sin que se observaran diferencias en cuanto a la distribución de las células. Por el contrario, sí que se encontraron claras diferencias si nos referimos al contenido del neuropilo. Así en el caso del Nx21/100/21, este mostró un aspecto más irregular respecto a las expansiones celulares comparado con los otros grupos y con mayores espacios intercelulares (flechas figura 42 2.A) que en el resto de grupos. Estos amplios espacios intercelulares también se observaron en el grupo Hx14/14/14 (flechas figura 42 6.A).

Respecto a las capas III y IV, también se observaron amplios espacios intracelulares en el grupo Nx21/100/21 (Figura 42 2.B) al igual que en el grupo Nx14/14/14 (Figura 42 6.B). Además, se observaron células claramente picnóticas (flechas figura 42 2.B) en el grupo Nx21/100/21. Por otro lado, en el resto de grupos observamos el neuropilo con menor espacios intercelulares. En todos los grupos se pueden observar numerosas células fusiforme presumiblemente migradoras, formando cadenas con diferentes estados de maduración, aunque en el grupo Nx21/100/21, se observaron menor células con esta orientación.

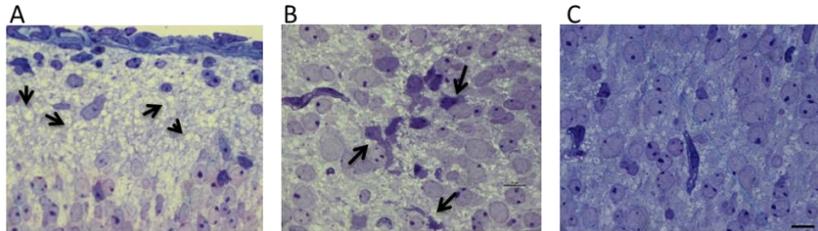
Resultados

La capa V y VI, para los grupos nacidos bajo una atmósfera del 21%, el grupo Nx21/21/21 y Nx21/100/21 muestran un aspecto celular normal, aunque aparentemente con menor nº de células en el grupo Nx21/100/21. Sin embargo, el resto de grupos nacidos bajo una atmósfera del 14%, estas capas se encuentran afectadas, con un menor número de células y mayores espacios intercelulares como se observa en la Figura 42 3,4,5 y 6.C. Es interesante resaltar que estas capas son las primeras en formarse.

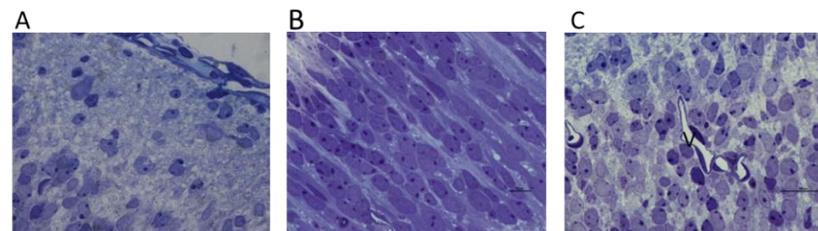
1. Grupo control Nx21/21/21



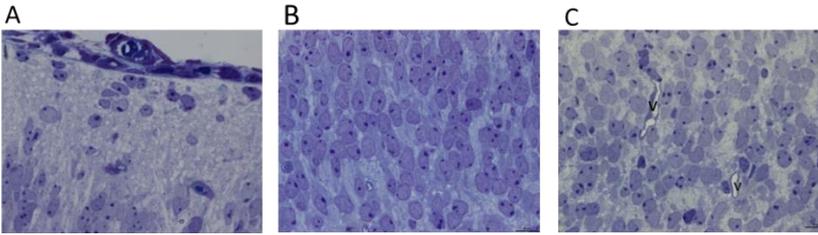
2. Grupo Nx21/100/21



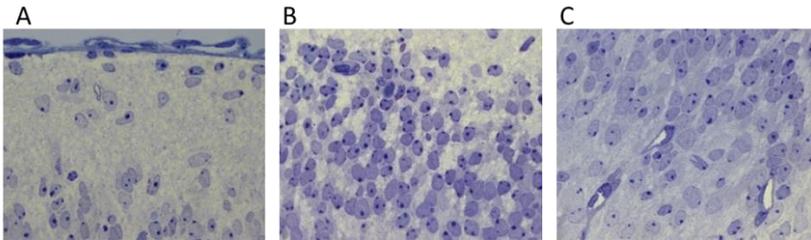
3. Grupo Hx14/21/21



4. Grupo Hx14/100/21



5. Grupo Hx14 8H



6. Grupo Hx14/14/14

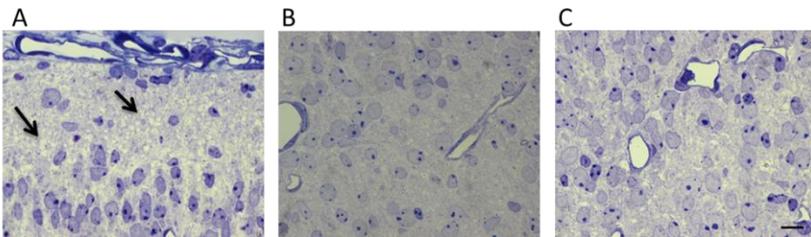


Figura 42. Panorámica a mayores aumentos (100X) de la corteza cerebral de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO_2 . Nx21/21/21 es el grupo nacido en normoxia ($FiO_2=0.21$), Hx14/21/21 el grupo nacido en hipoxia ($FiO_2=0.14$), Nx21/100/21 y Hx14/100/21 grupos reanimados ($FiO_2=1.0$) y dos grupos en hipoxia ($FiO_2=0.14$) 8 Horas y 1 día, Hx14 8H y Hx14/14/14. Barra de calibrado 10 μm . Grupo Nx21/21/21 n=5, Nx21/100/21 n=5, Hx14/21/21 n=5, Hx14/100/21 n=4, Hx14 8H n=2 y Hx14/14/14 n=2.

Después de observar las diferencias en los grupos de estudio en la figura anterior decidimos realizar un estudio más detallado de la corteza bajo el microscopio electrónico.

Resultados

En el grupo Nx21/21/21 o grupo control, se pueden apreciar claramente neuroblastos caracterizados por su morfología fusiforme, así como abundantes neuronas inmaduras (Figura 43 A y B). También pueden observarse ocasionales astrocitos, así como células de microglia.

Los neuroblastos presentan una morfología fusiforme y en general pocos orgánulos citoplásmicos, con algunos polirribosomas y una red de microtúbulos orientados en la dirección de sus expansiones radiales. El resto de orgánulos, aparato de Golgi, cisternas del retículo endoplásmico rugoso presentan poco desarrollo sin llegar alcanzar el grado de las neuronas maduras de estadios posteriores. Por el contrario, las neuronas que hemos caracterizado como inmaduras, presentan una mayor cantidad de citoplasma y abundantes orgánulos comparadas a las células migradoras. Tienen dictiosomas aunque con pocos sáculos, una gran población de vesículas en sus proximidades, abundantes microtúbulos, neurofilamentos y largas mitocondrias. También pueden apreciarse algunos lisosomas. Hay que destacar que tanto estas neuronas inmaduras como las células migradoras (neuroblastos) pueden presentar un cilio primario (Figura 43 C).

Respecto a los astrocitos, a estas edades, estos no aparecen muy abundantes ni fácil de identificar, solamente cuando se pueden observar células con un citoplasma con un menor número de orgánulos citoplásmicos, comparados con el resto de células y claramente aparecen numerosos haces de filamentos intermedios, probablemente GFAP, podemos afirmar que estamos ante un astrocito (Figura 43 D). Por último, las células de microglia se caracterizan por

una matriz nuclear y citoplásmica muy electrodensa que contienen en su citoplasma numerosos lisosomas y gránulos de lipofucsina (Figura 43 E).

Respecto al neuropilo, en este estadio presenta grandes espacios intercelulares que facilitan la movilidad y ya se pueden detectar el inicio de los primeros contactos sinápticos (Figura 43 F), así como abundantes conos de crecimiento.

Por último, en las partes más externas de la corteza justo debajo de las meninges pueden apreciarse largos haces de axones amielínicos que todavía no se han mielinizado debido a la inmadurez del cerebro a P1 (Figura 43 G).

Tanto en las células migradoras como las neuronas inmaduras, la cromatina aparece laxa, homogéneamente distribuida por todo el núcleo. Los núcleos no presentan invaginaciones nucleares y pueden tener varios nucléolos generalmente asociados a su membrana nuclear. Las nuevas neuronas van progresivamente incrementando el volumen citoplásmico, así como el número de orgánulos. Por otro lado el núcleo adopta una clara morfología esférica.

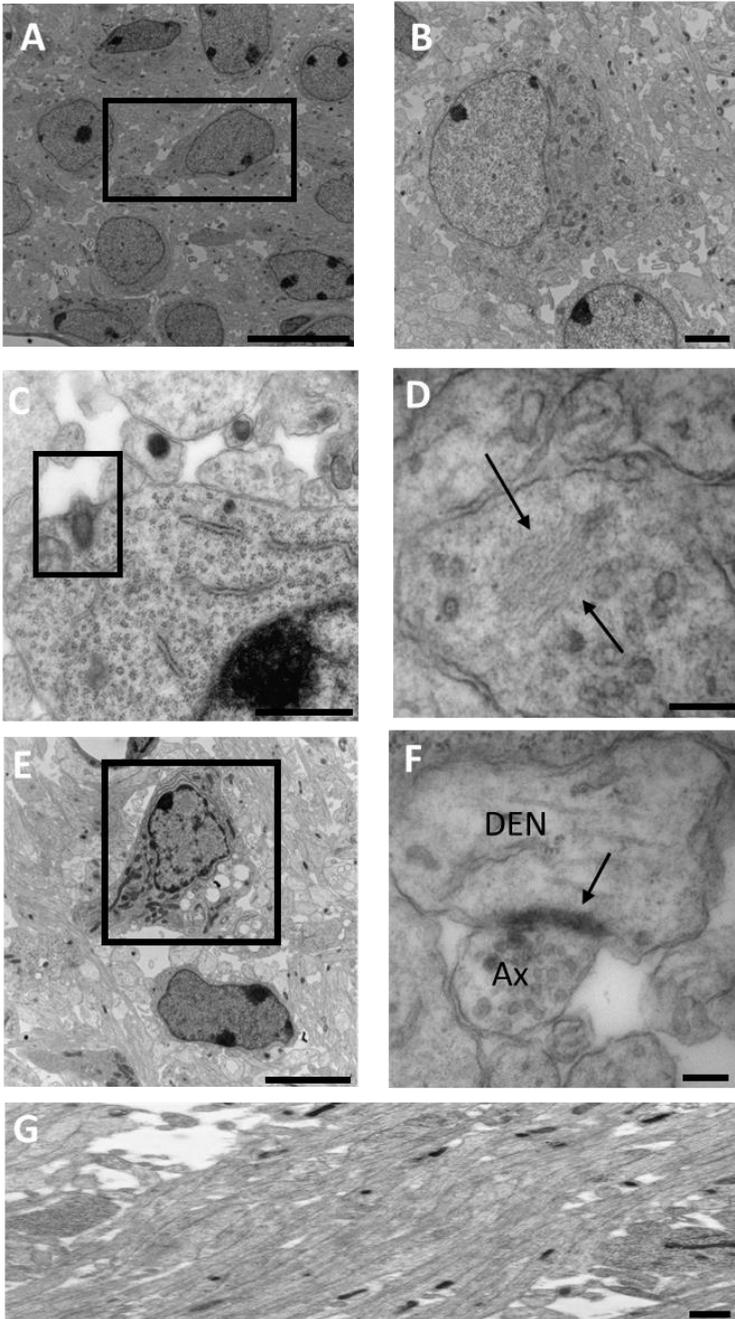
Respecto al grupo Nx21/100/21, como ya observamos en sesiones semifinas, en las capas superficiales se observan amplios espacios intercelulares. Otra diferencia que se observa es la recesión de los microtúbulos que en este estado, no tienen un claro aspecto rectilíneo. Respecto al resto de orgánulos no observamos grandes diferencias.

Resultados

Por último, la presencia de células picnóticas/necróticas presentan un núcleo y citoplasma muy electrodenso, una desorganización de los orgánulos citoplásmicos y presentan numerosas estructuras vacuolares en su interior (Figura 44 B y C). En este grupo, también pueden observarse con frecuencia clara células de microglia, ocasionalmente en forma de satélites (Figura 44 D).

En el resto de grupos de estudio no observamos grandes diferencias con el control, excepto en la organización celular de las capas V, VI de los estadios Hx14/21/21 y Hx14 8H donde se apreciaban amplios espacios intercelulares. Estas diferencias se pueden apreciar mejor en la capa VI (Figura 45). Respecto a las capas II y III no se observaron claras diferencias, presentando las células una clara morfología migradora como puede apreciarse en los grupos Hx14 8H y Hx14/100/21 (Figura 45 C y D). Por último, en las capas I y II y más especialmente en la capa I, en el grupo HX14 8H, si se vio con respecto al resto de grupos diferencias en cuanto a que había un mayor número de espacios celulares en la Figura 45 B, que podemos comparar con uno de Hx14/21/21 (Figura 45 A). En todos los ejemplares de estudio se observaron mitosis, aunque preferentemente en las capas V y VI.

Grupo control Nx21/21/21



Resultados

Figura 43. Imágenes de la ultraestructura de la corteza cerebral de ratones P1 grupo Nx21/21/21. A) Neuroblastos de la corteza cerebral. Barra de calibrado 10 μ m. B) Neuroblastos a mayores aumentos de la corteza cerebral. Barra de calibrado 6 μ m C) Cilio primario. Barra de calibrado 1 μ m D) Dictisomas. Barra de calibrado 200nm E) Microglia. Barra de calibrado 5 μ m F) Sinapsis (flecha) DEN (dendrita) Ax (axón). Barra de calibrado 200nm G) Axones amielínicos. Barra de calibrado 2 μ m.

Grupo experimental Nx21/100/21

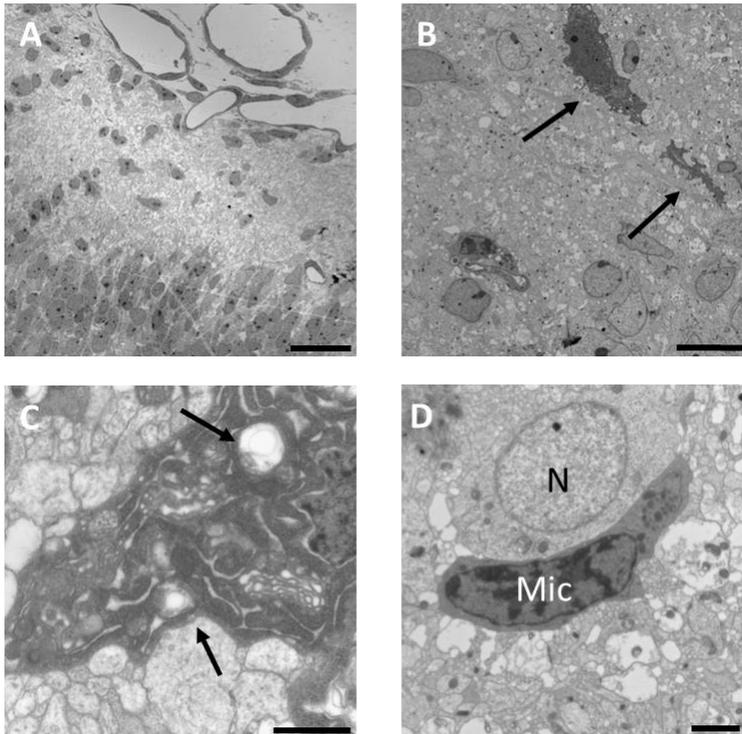
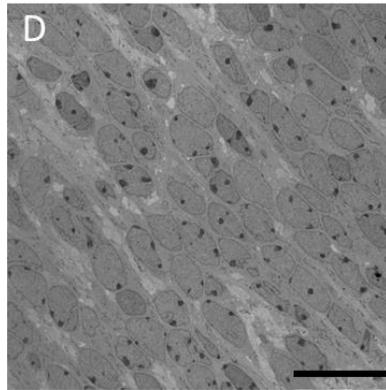
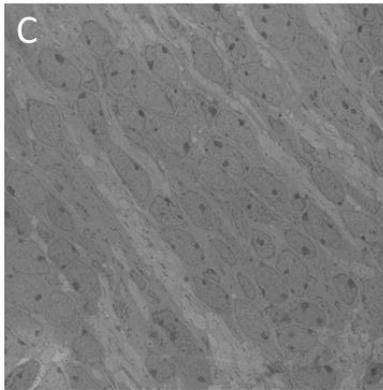
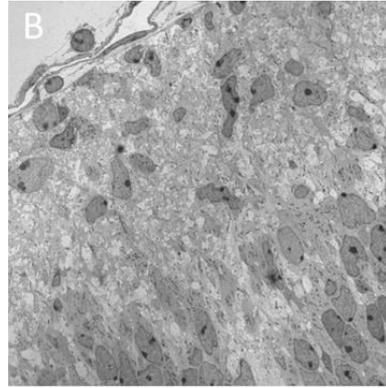
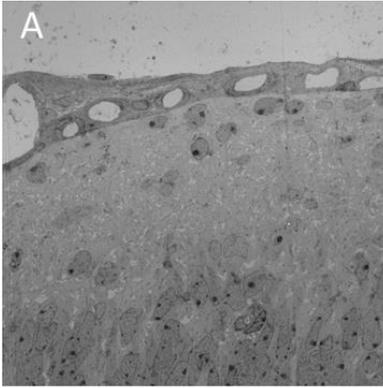


Figura 44. Imágenes de la ultraestructura de la corteza cerebral de ratones P1 grupo Nx21/100/21. A) Neuroblastos de la corteza cerebral capas III y IV. Barra de calibrado de 10 μ m. B) Células picnóticas de la corteza cerebral capa III y IV. Barra de calibrado 10 μ m. C) Detalle de célula apoptótica. Barra de calibrado 1 μ m. D) Microglia (Mic) junto a la neurona. Barra de calibrado 2 μ m.

Grupos experimentales nacidos en condiciones hipóxicas



Resultados

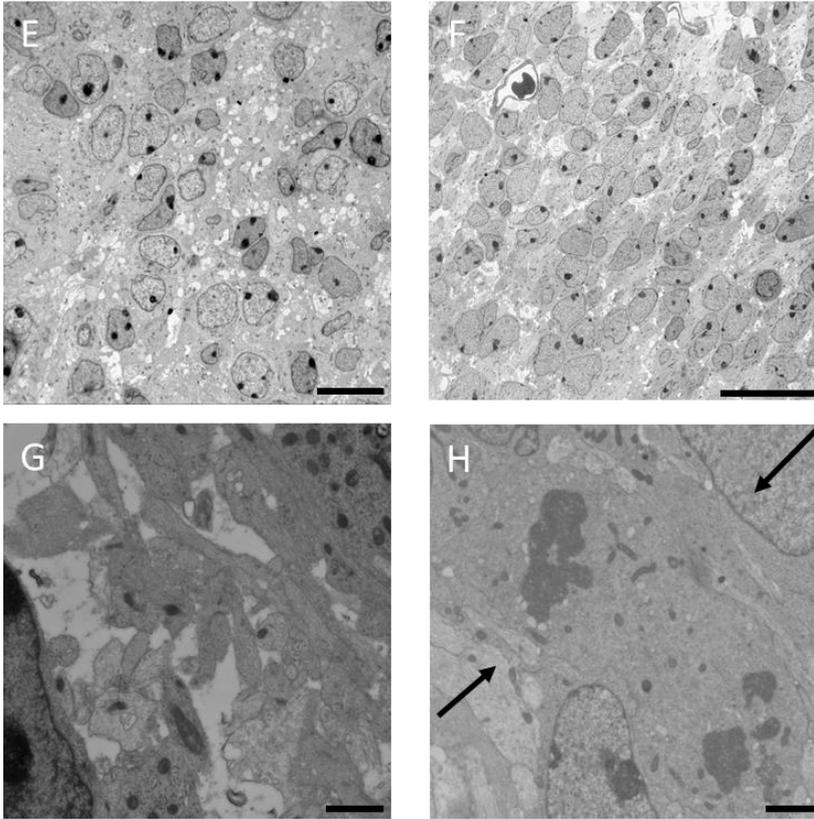


Figura 45. Imágenes de la ultraestructura de las diferentes capas de la corteza cerebral de ratones P1 grupos nacidos en condiciones hipóxicas. A)B) Capa superficial de la corteza cerebral capa I, II. C) D) Neuroblastos de la corteza cerebral capa III y IV. E)F) Neuroblastos de la corteza capa V-VI. G) Espacios de la capa V, VI. H) Detalle de mitosis. (A,B,C y D Barra de calibración 20 μm), (E y F Barra de calibración 10 μm), (G y H Barra de calibración 2 μm).

Estudio Inmuno-histoquímico

Para determinar si había diferencias entre los diferentes grupos de estudio en cuanto a muerte celular se realizó un marcaje con caspasa-3 que es un marcador de muerte celular programada (apoptosis). También se llevó a cabo la técnica TUNEL (Terminal deoxinucleotidil

transferasa) para detectar fragmentación del ADN debida a cascadas de señalización apoptóticas y otro aspecto analizado en relación con el proceso de muerte celular, fue la presencia de células de microglía activadas en la corteza y en el cuerpo calloso. Para ello empleamos el marcador específico de microglía “ionized calcium binding adapter molecule 1” (Iba1).

El recuento de células positivas para caspasa-3 en la corteza cerebral indicó que había un aumento significativo para el grupo Nx21/100/21 frente al resto de grupo de estudio. En el cuerpo calloso también se realizó el conteo y encontramos diferencias significativas en el grupo Hx14 8H y Hx14/14/14 que aumentan respecto al resto de grupos.

Resultados

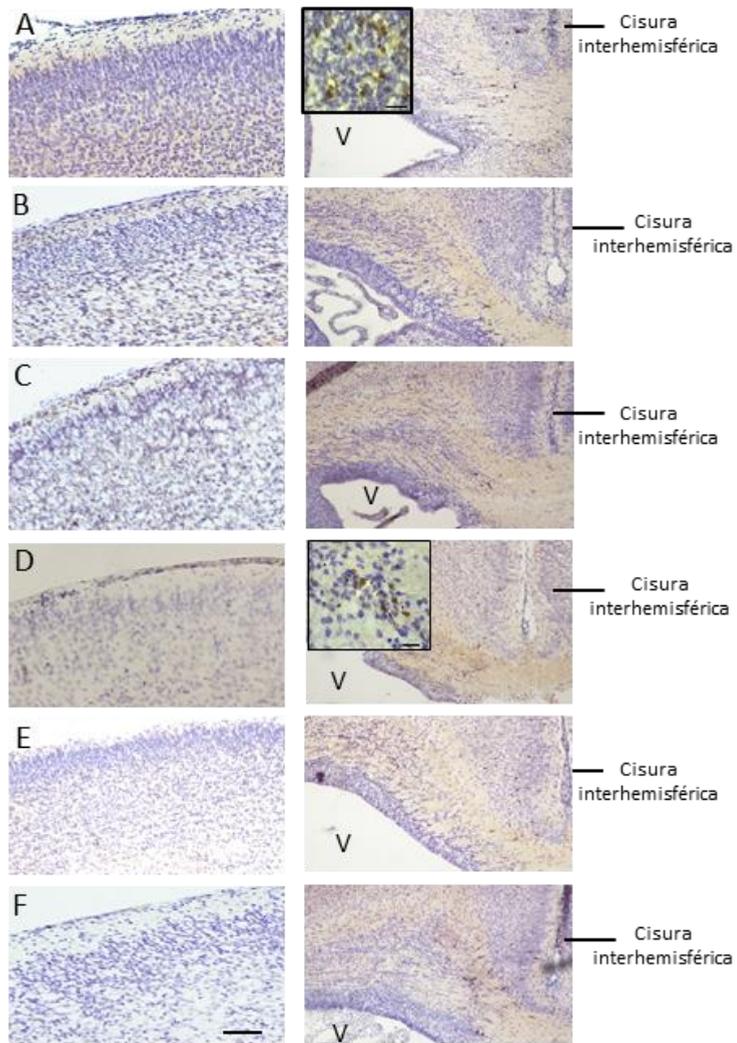


Figura 46. Ensayo inmunohistoquímico de la muerte celular en corteza cerebral y cuerpo calloso de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO_2 . Imágenes de la corteza (1^o columna) y cuerpo calloso (2^o columna). A) Grupo Nx21/21/21, B) Grupo Nx21/100/21, C) Grupo Hx14/21/21, D) Grupo Hx14/100/21, E) Grupo Hx14 8H, F) Grupo Hx14/14/14. Ventrículo (V). Barra de calibrado 100 μ m. Detalle de las células macadas caspas-3 positivas, imagen 2-A y 2-F. Barra de calibrado 10 μ m.

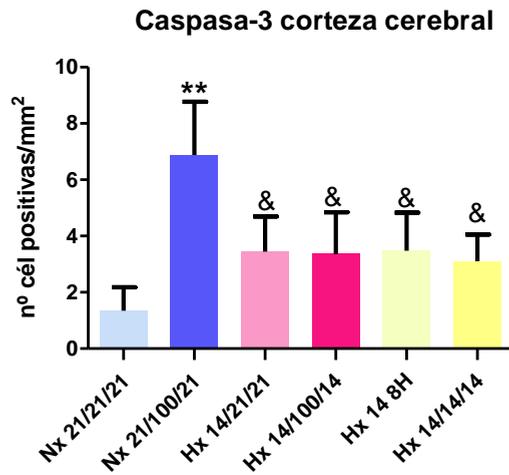


Figura 47. Ensayo inmunohistoquímico de la muerte celular en corteza cerebral de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO_2 . Imágenes de la corteza (primera columna) y cuerpo caloso (segunda columna) (A-F) y representación gráfica de la proteína caspasa-3, en relación del área de la corteza. La diferencia estadística se indica como sigue $* < 0.05$ Vs 21/21/21, $*** < 0.001$ Vs 21/21/21, $& < 0.05$ Vs Nx21/100/21, $## < 0.01$ Vs Hx14/21/21, $^< 0.05$ Vs 14/100/21. Grupo Nx21/21/21 n=5, Nx21/100/21 n=5, Hx14/21/21 n=5, Hx14/100/21 n=4, Hx14 8H n=2 y Hx14/14/14 n=2.

Los resultados en corteza cerebral del TUNEL muestran también un aumento significativo para el grupo Nx21/100/21 y una disminución significativa en cuanto a número de células positivas de los grupos nacidos bajo condiciones hipóxicas (Figura 48).

Resultados

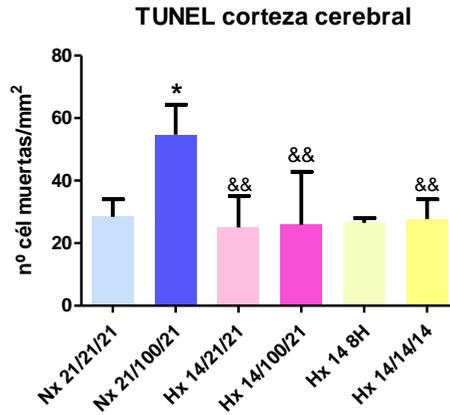


Figura 48. Determinación de células apoptóticas positivas mediante TUNEL presentes en la corteza cerebral de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO_2 . La diferencia estadística se indica como sigue * <0.05 Vs 21/21/21, && <0.01 Vs Nx21/100/21. Grupo Nx21/21/21 n=4, Nx21/100/21 n=4, Hx14/21/21 n=4, Hx14/100/21 n=3, Hx14 8H n=2 y Hx14/14/14 n=2.

El análisis de la microglia no reveló cambios significativos para ninguno de los grupos, pero se puede observar en la corteza cerebral, una tendencia en el grupo Nx21/100/21, Hx14 8h y Hx14/14/14 en el número de células positivas no significativos respecto al resto de grupos y en el cuerpo calloso se observa una disminución relevante en los grupos nacidos en hipoxia, Hx14/21/21 y Hx14/100/21, esta disminución para el grupo Hx14/21/21 es significativa respecto al grupo Nx21/100/21 y Hx14 8H (Figura 50).

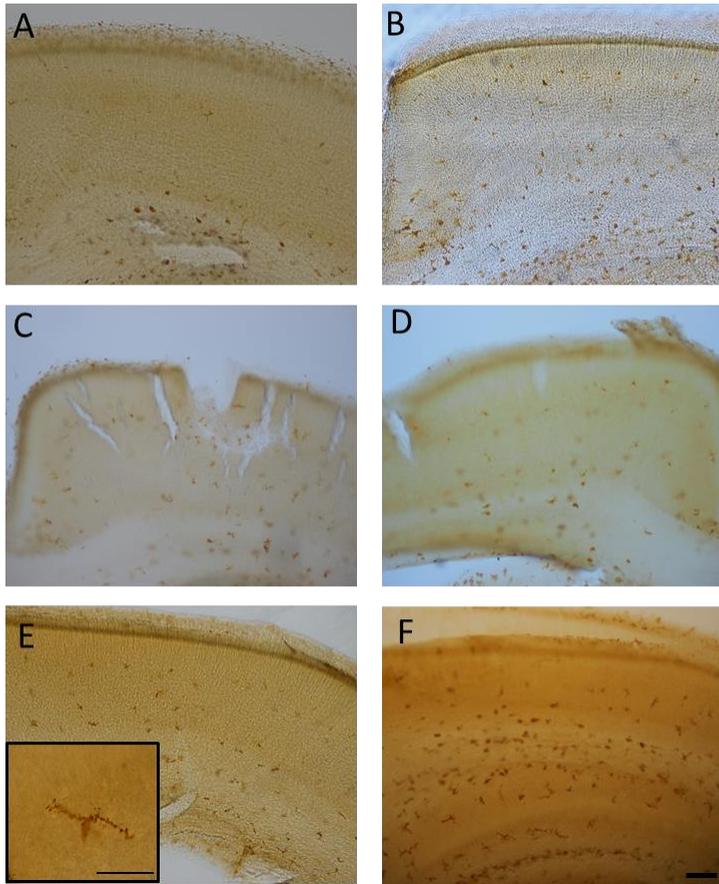


Figura 49. Imágenes de las células de microglia presentes en la corteza cerebral y cuerpo calloso de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO_2 . Inmunohistoquímica contra la proteína Iba1 específica de microglia en corteza y cuerpo calloso de cada uno de los grupos de estudio A) Grupo Nx21/21/21, B) Grupo Nx21/100/21, C) Grupo Hx14/21/21, D) Grupo Hx14/100/21, E) Grupo Hx14 8H, F) Grupo Hx14/14/14. Barra de calibrado 100µm. Detalle célula microglia barra de calibrado 50µm.

Resultados

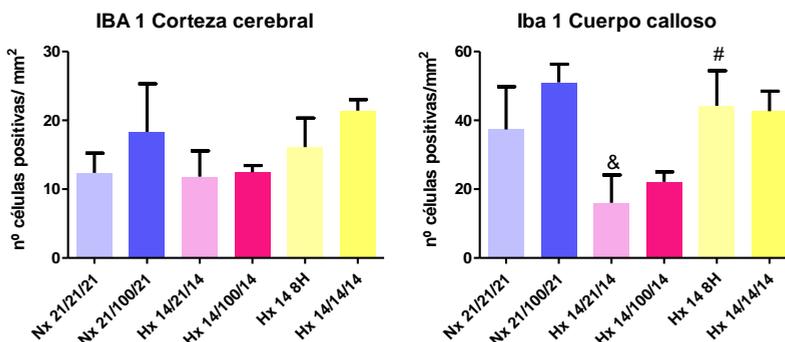


Figura 50. Análisis de las células de microglia presentes en la corteza cerebral y cuerpo calloso de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO_2 . Inmunohistoquímica contra la proteína Iba1 específica de microglia en corteza y cuerpo calloso representado el número de células positivas frente al área. La diferencia estadística se indica como sigue: $&<0.05$ Vs Nx21/100/21, $\#<0.05$ Vs Hx14/21/21. Grupo Nx21/21/21 n=5, Nx21/100/21 n=5, Hx14/21/21 n=5, Hx14/100/21 n=4, Hx14 8H n=2 y Hx14/14/14 n=2.

Análisis mitocondrial por microscopía electrónica.

En este apartado se hizo un estudio para caracterizar a las mitocondrias de la corteza cerebral de ratones P1 nacidos bajo diferentes FiO_2 . El estudio se basó en el análisis de las mitocondrias desde la capa superficial hasta la más profunda en las cuales se hizo un estudio morfométrico, se determinaron el área mitocondrial, la circularidad, estructuras vacuolares en la matriz mitocondrial (MM), presencia de dilataciones en la MM, número de crestas, tortuosidad de la membrana mitocondrial interna (MMI) y rotura de la membrana mitocondrial externa (MME).

En primer lugar, se describe la morfología y distribución de las mitocondrias de los ratones controles, grupo **Nx21/21/21**. La mayoría

de estas presentaban crestas transversales con una matriz mitocondrial densa. Las crestas estaban poco dilatadas y en su mayor parte ocupaban el volumen mitocondrial, es decir, había pocos espacios libres de crestas. Por último, no se observaban alteraciones del espacio intermembranoso. En este grupo las mitocondrias aparecen distribuidas tanto por el soma como por sus prolongaciones sin que aparecieran altas concentraciones en determinadas zonas del citoplasma celular.

El grupo **Nx21/100/21**, se observaban y con mucha frecuencia mitocondrias con tendencia a ser esféricas, con contornos irregulares muchas veces provocadas por espacios libres a modo de vacuolas, y en ocasiones las crestas estaban poco definidas, presentaban dilataciones en las que no se apreciaban crestas mitocondriales. En algunos casos incluso era difícil de detectar crestas mitocondriales.

En el grupo **Hx14/21/21**, las mitocondrias presentaban formas fusiformes con crestas muy bien definidas y preferentemente distribuidas transversalmente. Mitocondrias con estructuras vacuolares fueron raramente observadas mostrando en líneas generales morfologías casi idénticas a las del grupo control.

El grupo **Hx14/100/21**, presentaban morfología muy variada que va desde fusiforme hasta claramente esferoidales. En este grupo muchas de las mitocondrias observadas carecían de crestas o bien estas estaban poco definidas.

Resultados

En el grupo **Hx14 8h**, aunque algunas células presentaban mitocondrias estándar, forma fusiforme y número de crestas mayoritariamente transversales, matriz mitocondrial electrodensa y sin dilataciones en los espacios intermembranosos, algunas mitocondrias presentaban dilataciones, generalmente con pocas crestas o poco definidas. Algunas incluso se podían ver a modo de pequeños bultos que sobresalían de la forma fusiforme típica de las mitocondrias.

Por último, el grupo **Hx14/14/14**, aunque aparecían mitocondrias fusiformes con abundantes crestas y con pocos espacios entre las crestas, también se observaban y con mucha frecuencia mitocondrias como si estuvieran hinchadas que presentaban dilataciones en las que no se apreciaban crestas mitocondriales. Las mitocondrias de este grupo se distribuían homogéneamente por el citoplasma de la célula.

1. Grupo Nx21/21/21

2. Grupo Nx21/100/21

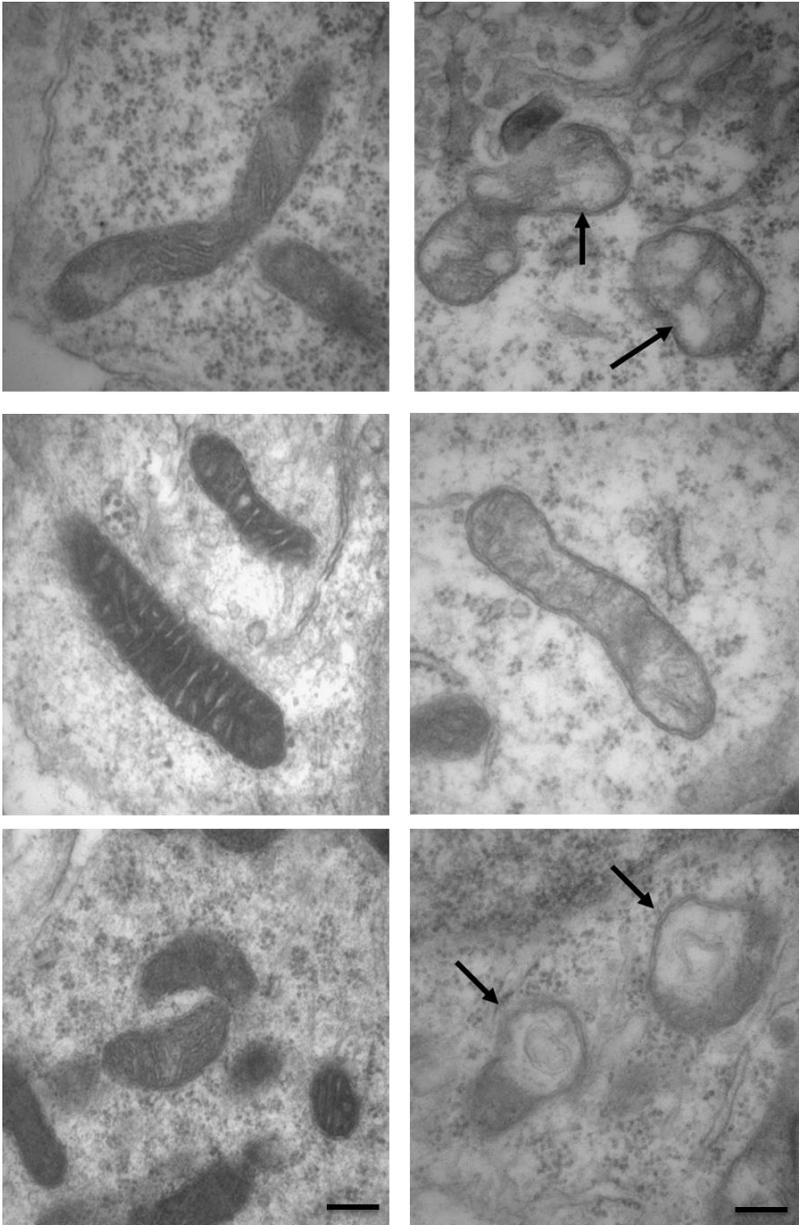
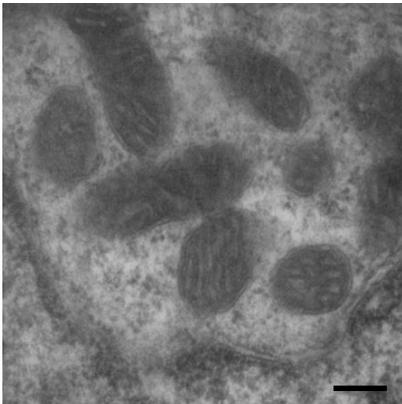
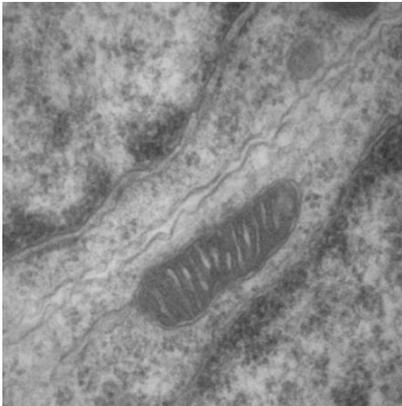


Figura 51. Imágenes de mitocondrias obtenidas a 60000X de ratones P1 del grupo control, Nx21/21/21 y grupo Nx21/100/21. Fotografías del grupo 2 (flechas) muestran dilataciones de la MM y estructuras vacuolares de la mitocondria. Barra de calibrado 200nm.

Resultados

3. Grupo Hx14/21/21



4. Grupo Hx14/100/21

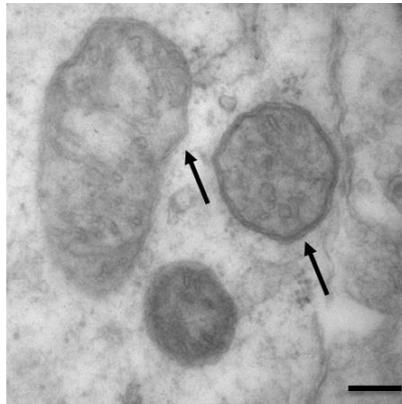
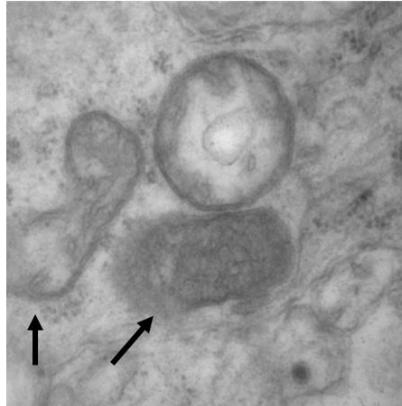


Figura 52. Imágenes de mitocondrias obtenidas a 60000X de ratones P1 del grupo experimental Hx14/21/21 y Hx14/100/21. Fotografías del grupo 4 (flechas) muestran rotura de la MME y tortuosidad de la MMI de la mitocondria. Barra de calibrado 200nm.

5. Grupo Hx14 8H

6. Grupo Hx14/14/14

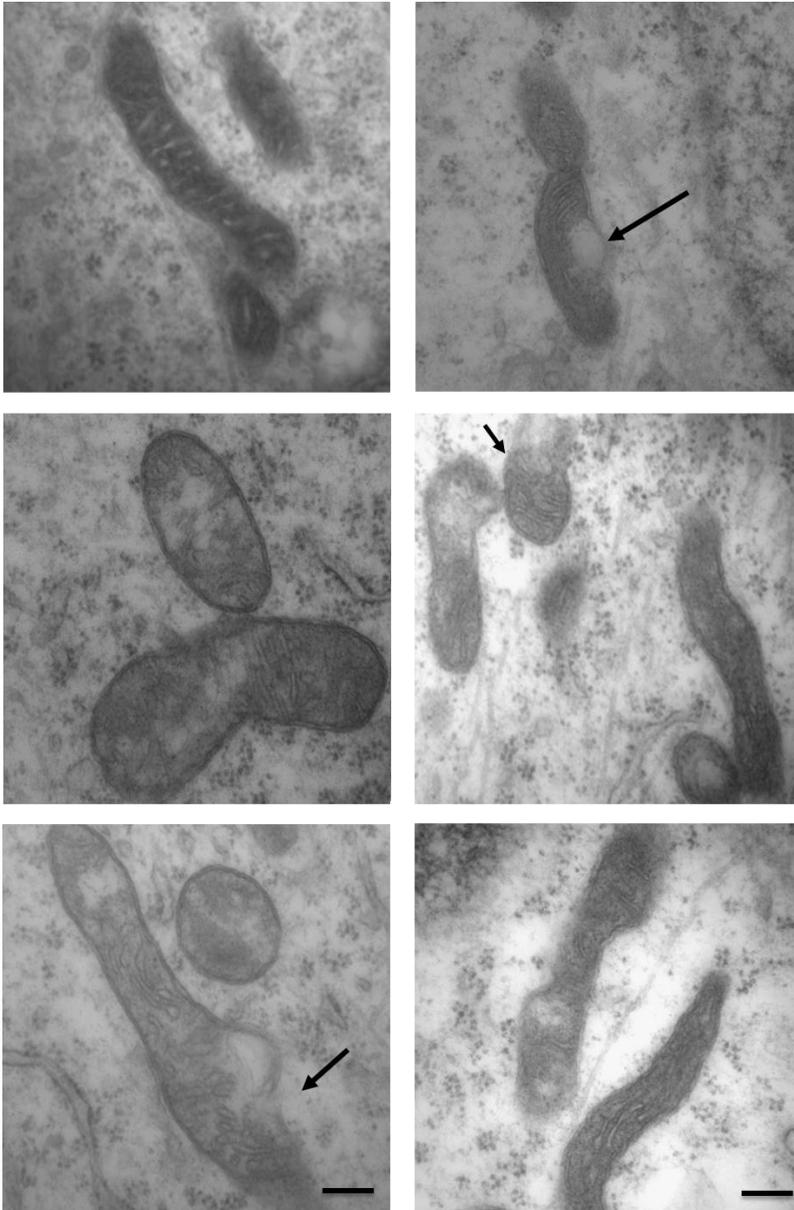
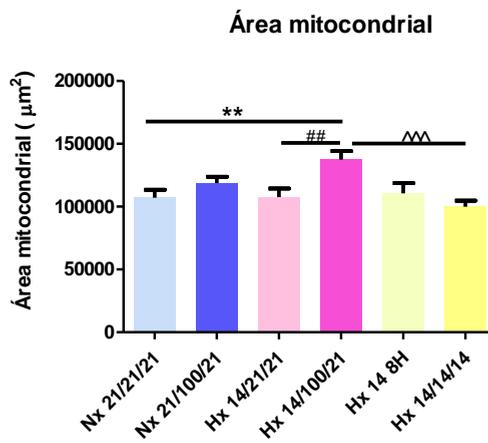


Figura 53. Imágenes de mitocondrias obtenidas a 60000X de ratones P1 del grupo experimental Hx14 8H y Hx14/14/14. Fotografías del grupo 5 (flecha) muestran rotura de la MME y grupo 6 (flechas) rotura MME y dilataciones de la MM. Barra de calibrado 200nm.

Resultados

En el análisis morfométrico de las mitocondrias obtuvimos una mayor área para el grupo Hx14/100/21 que fue significativa respecto al grupo control, al grupo Hx14/21/21 y al grupo Hx14/14/14. En cuanto a la circularidad, el grupo más alejado del valor 1, es decir menos circular, es el Hx14/21/21. Esta disminución es significativa frente a los grupos Nx21/21/21, Nx21/100/21. También hay disminución con diferencias estadísticas en el grupo Nx21/100/21 frente Hx14/100/21 y Hx14/14/14 (Figura 54).



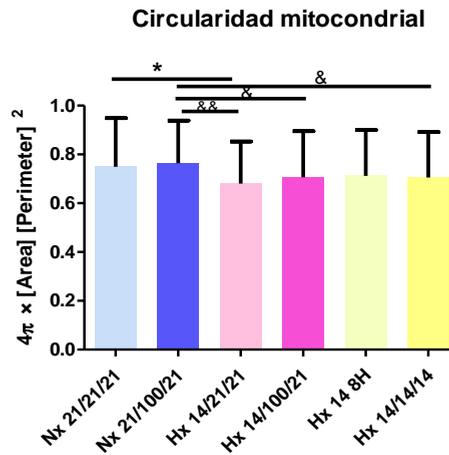


Figura 54. Determinación de parámetros de forma mitocondrial. Representación gráfica del área y circularidad de mitocondrias de la corteza cerebral de ratones P1. La diferencia estadística se indica como sigue * <0.05 Vs Nx21/21/21, & <0.05 Vs Nx21/100/21, && <0.01 Vs Nx21/100/21, ## <0.01 Vs Hx14/21/21 y ^^^ <0.001 Vs Hx14/100/21.

Respecto a las estructuras vacuolares presenten en la matriz mitocondrial (MM), nos basamos en la presencia de estructuras similares a una vacuola que se encuentra en el interior de la MM, similar a una gran dilatación que podría terminar rompiendo la mitocondria. El resultado fue un elevado porcentaje de este tipo de estructuras en los grupos Nx21/100/21, Hx14/100/21. El aumento del grupo Nx21/100/21 fue significativo respecto a los grupos Nx21/21/21, Hx14/100/21, Hx14 8h y Hx14/14/14 y por otro lado el aumento del grupo Hx14/100/21 fue significativo respecto al grupo Hx14/21/21 y Hx14/14/14 (Figura 55 A).

La siguiente variable son dilataciones en la MM, se refiere a la presencia de espacios mitocondriales por la desaparición de las crestas mitocondriales, con el consiguiente aclaramiento de la MM (color más claro). Estas dilataciones están más presentes en los grupos Nx21/100/21 y Hx14/100/21. El aumento del grupo Nx21/100/21 es significativo respecto a los grupos

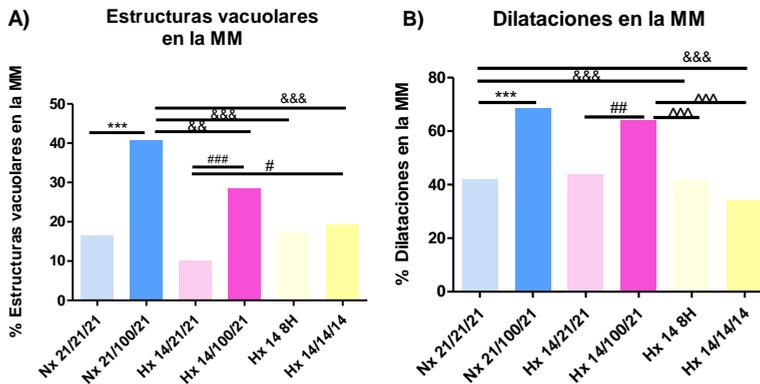
Resultados

Nx21/21/21, Hx14/21/21, Hx14 8h y Hx14/14/14. Y el aumento del grupo Hx14/100/21 fue significativo respecto a los grupos Nx21/21/21, Hx14/21/21, Hx14 8h y Hx14/14/14 (Figura 55 B).

Otro variable que hemos tenido en cuenta es la tortuosidad de la MMI, con tortuosidad nos referimos a la forma curva que adquiere a lo largo de la mitocondria la MMI, los grupos con mayor porcentaje fueron Nx21/21/21, Nx21/100/21 y Hx14/100/21. El de menor tortuosidad fue el grupo Hx14/21/21 (Figura 55 C).

La rotura de la MME fue otra variable que valoramos y el resultado fue un alto porcentaje de rotura en el grupo Hx14/14/14 significativo frente al resto de grupos (Figura 5 D).

Por último, se hizo un recuento del número de crestas en aquellas mitocondrias que las presentaban, siendo el grupo Hx14/21/21 el que más crestas presentaba seguido del grupo Hx14/100/21 (Figura 55 E).



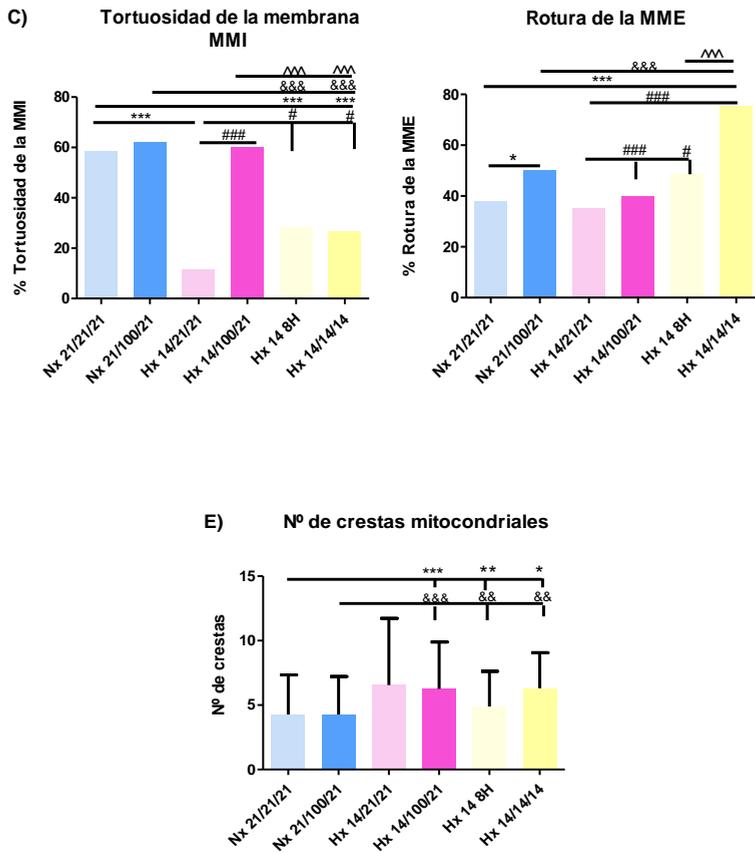


Figura 55. Caracterización mitocondrial de mitocondrias de la corteza cerebral de ratones P1. Representación gráfica del A) % Estructuras vacuolares, B) % Dilatación en la MM, C) % Tortuosidad de la MMI, D) % Rotura de la MME y E) Nº de crestas. La diferencia estadística se indica como sigue; * <0.05 Vs Nx21/21/21, ** <0.01 Vs Nx21/21/21, *** <0.001 Vs Nx21/21/21, & <0.05 Vs Nx21/100/21, && <0.01 Vs Nx21/100/21, &&& <0.001 Vs Nx21/100/21, # <0.05 Vs Hx14/21/21, ## <0.01 Vs Hx14/21/21, ### <0.001 Vs Hx14/21/21, ^ <0.05 Vs Hx14/100/21, ^^ <0.01 vs Hx14/100/21 y ^^ <0.001 Vs Hx14/100/21.

VI. DISCUSIÓN

La transición fetal-neonatal (TFN) es uno de los momentos más críticos en la vida de cualquier mamífero y durante la misma pueden producirse situaciones como la prematuridad o la asfixia perinatal que pueden comprometer la viabilidad y supervivencia del recién nacido. En las últimas décadas se ha reducido la mortalidad, sin embargo, se han mantenido cifras estables de morbilidad en diversos ámbitos de la neonatología como son la encefalopatía hipóxico isquémica (EHI) o la prematuridad con sus secuelas como la displasia broncopulmonar (DBP), el distrés respiratorio o la retinopatía del prematuro (ROP) entre otras (Lehtonen et al. 2017).

El daño cerebral perinatal es una causa común de déficit neurológico para toda la vida, por lo tanto, es necesario entender mejor la fisiopatología y encontrar estrategias para su prevención y tratamiento. Estos daños cobran especial importancia debido a que pueden producir trastornos motores, cognitivos, sensoriales y/o conductuales que en ocasiones perduran toda la vida del individuo (Lea, Smith-Collins, y Luyt 2017).

Por todo ello, la representación de la TFN en un modelo animal es un paso necesario para el estudio de patologías asociadas a este evento. Hoy en día no hay modelos experimentales ni *in vitro* ni *in vivo* para el estudio de la TFN («Neonatal Hypoxia Ischaemia: Mechanisms, Models, and Therapeutic Challenges» 2017). El modelo experimental diseñado en este trabajo permite abordar algunas de las problemáticas que se presenta en el periodo perinatal, centrándonos en la TFN. Por tanto, nuestra apuesta para el desarrollo del modelo

Discusión

experimental presentado puede considerarse pionero en el campo de la investigación perinatal.

En el caso de los recién nacidos pretérmino con una adecuada adaptación postnatal y sin precisar reanimación, el periodo hasta alcanzar una SpO_2 estable de alrededor del 90% dura aproximadamente unos 8-10 minutos lo que representa unos 3-5 minutos más que en el caso de recién nacidos a término (Dawson et al. 2010). Por lo tanto, nos planteamos si el mantenimiento del prematuro después del nacimiento en condiciones de oxígeno intrauterinas ($FiO_2=0.14$) podría inducir cambios en la oxigenación tisular para mejorar la adaptación postnatal o si por el contrario los minutos de retraso hasta alcanzar saturaciones de oxígeno adecuadas pudiera causar posibles complicaciones a nivel cerebral. Además de poder estudiar cuál sería la respuesta a nivel cerebral ante una situación clínica que necesitara ser reanimado con aporte suplementario de oxígeno.

En este estudio el modelo experimental desarrollado se realizó la TFN en ratones bajo una atmósfera hipóxica ($FiO_2=0.14$), manteniendo condiciones similares a las intraútero, de modo que la transición a la respiración de aire ambiente se efectuara después de la adaptación postnatal. El objetivo fue estudiar si el retraso de la oxigenación tisular una vez ocurrida la TFN induce cambios en el nivel de estrés oxidativo inherente a la transición fetal neonatal (Pallardo et al. 1991), en la respuesta antioxidante e inflamatoria activada durante ese período a nivel cerebral (Saugstad et al. 2012) y un estudio más profundo de los cambios y/o daños ocurridos en la corteza cerebral, para poder

establecer si el período transitorio de hipoxemia podría actuar como preconditionante y favorecer una mejor adaptación de los recién nacidos al medio extrauterino orientándonos acerca de cómo abordar el tema de la reanimación del prematuro.

Para caracterizar el modelo hemos comparado que ocurre a nivel fisiológico entre una TFN en condiciones ambientales ($FiO_2=0.21$) frente a un en condiciones hipóxicas ($FiO_2=0.14$) y cuál es la respuesta frente a un insulto hiperóxico ($FiO_2=1.0$) durante una hora (ver Figura 16). Para que todos estos cambios en la FiO_2 fueran posibles de un modo similar a la práctica clínica ha sido fundamental el desarrollo de la cámara de oxigenación controlada y poder tener controlado el momento exacto del parto y las condiciones de oxigenación para cada uno de los grupos y poder desarrollar el modelo.

1. Estudio del metabolismo oxidativo cerebral en ratones P0 sometidos a una hipoxia moderada.

Antes de empezar con el modelo experimental explicado anteriormente, hemos estudiado diferentes parámetros del metabolismo oxidativo a nivel cerebral en ratones recién nacidos (P0) sometidos a hipoxia moderada ($FiO_2=0.14$) durante dos, cuatro, seis y ocho horas, frente al control ($FiO_2=0.21$).

Queríamos evaluar si este periodo de hipoxia ($FiO_2=0.14$) produciría cambios en el metabolismo oxidativo a las 8 horas hacía un metabolismo anaerobio o si el cerebro sería capaz de asumir esta disminución de oxígeno y ver cómo es esa adaptación.

Discusión

En primer lugar determinamos los niveles de lactato en sangre y cerebro, considerando que el lactato es un metabolito producto del metabolismo anaeróbico, y más recientemente ha quedado claro que es sintetizado y consumido en condiciones aeróbicas, por tanto es nexo de unión entre el metabolismo glucolítico y oxidativo (Brooks et al. 2009). Los resultados obtenidos nos muestran que no hay cambios durante los diferentes periodos de tiempo en los niveles de lactato respecto a las condiciones ambientales tanto en sangre como en cerebro. A las 8 horas de la hipoxia tenemos niveles similares a los del grupo control (Figura 27). Por tanto, durante este periodo de hipoxia moderada el lactato no se está acumulando. Podríamos pensar que el lactato se está consumiendo para la obtención de glucosa y síntesis de ATP.

Para confirmar estos resultados hemos determinado algunas enzimas implicadas en la vía glucolítica como son la HK, la PK y la LDH (C. Guo et al. 2013). En este caso los resultados muestran que a las dos horas de someter a los ratones a una $FiO_2=0.14$ en cerebro se produce un aumento significativo de las actividades enzimáticas HK, PK y LDH. Estas actividades no varían significativamente respecto al control a las 4, 6 u 8 horas (Figura 28). Con estos resultados podemos afirmar que el cerebro detecta esta pequeña variación en la FiO_2 pero es capaz de responder aumentando la actividad para poder mantener el metabolismo energético.

El aumento de estas actividades tendría que producir un aumento en los niveles de lactato, al menos tras dos horas de exposición a una hipoxia moderada. Sin embargo, como hemos comentado

anteriormente, los niveles de lactato en sangre y en cerebro no varían significativamente durante todo el periodo hipóxico. Una posible explicación de esta paradoja es que a nivel cerebral se produce una regulación del flujo sanguíneo cerebral, con una vasodilatación que podría aumentar los niveles de oxígeno y el lactato se consume a través de la lanzadera de lactato entre el astrocito y la neurona (Attwell et al. 2010) (Figura 57).

Uno de los principales mecanismos que hemos observado en los resultados (Figura 27 y 28) ante esta situación de hipoxia moderada es una adaptación de las células de un metabolismo aeróbico a uno anaeróbico, conocido como *Efecto Pasteur* (Seagroves et al. 2001).

Cuando determinamos la concentración de los nucleótidos, ATP, ADP y AMP y calculamos la carga energética (C.E), que nos refleja cómo está la energía del cerebro a cada tiempo de la hipoxia. Los resultados obtenidos reflejan una disminución significativa de la C.E. a las 2 y 4 horas respecto al control, pero se restablecen a las 6 manteniéndose a las 8 horas (Figura 29 D).

Estos resultados deberían ir acompañados en primer lugar de un aumento en los niveles de lactato tanto en sangre como en cerebro que no vemos reflejados. El posible mecanismo por lo cual esto no ocurre a nivel sanguíneo se debe al ciclo de Cori, conocido como el ciclo glucosa-lactato, el exceso de lactato producido por los tejidos extrahepáticos es captado por el hígado y convertido en glucosa mediante la gluconeogénesis que es exportada a la circulación (van Hall 2010; Andersen et al. 2013) y transportada al resto de órganos

Discusión

para realizar la glucólisis anaeróbica. Gracias a este ciclo es posible que no tengamos cambios en los niveles de lactato en sangre a pesar del aumento de la vía glucolítica.

Por otro lado, las variaciones en la concentración de oxígeno en el tejido cerebral alteran el acoplamiento neurovascular de dos maneras. El nivel de oxígeno afecta a la síntesis de los mensajeros gliales y también altera los niveles de lactato y adenosina que modulan las vías por las que estos mensajeros alteran el flujo cerebral, a través del control del diámetro permitiendo ampliar el diámetro del vaso con el fin de aumentar el flujo cerebral y satisfacer las demandas de energía (Attwell et al. 2010). Mejorando el flujo se aumenta el suministro de oxígeno, glucosa y otros nutrientes necesarios para las células, mientras que al mismo tiempo elimina productos del metabolismo como el dióxido de carbono (Gordon et al. 2008). Los astrocitos son el “puente físico” entre las sinapsis y los vasos del cerebro, característica que ya fue identificada en 1913 por Santiago Ramón y Cajal. Los astrocitos pueden detectar directamente los cambios en la actividad sináptica, que está estrechamente ligada al metabolismo y con el consumo de oxígeno, y transmitir esta información a los vasos cerebrales para iniciar los cambios adecuados en flujo cerebral (Simard et al. 2003; Gordon et al. 2008).

La hipoxia moderada parece provocar un cambio a un metabolismo anaeróbico que produce ATP pero, al mismo tiempo, aumenta la producción de lactato en el cerebro que es metabolizado por los astrocitos mediante la lanzadera de lactato astrocito-neurona. El lactato generado se libera a través de transportadores de

monocarboxilato (MCT1) por difusión facilitada y puede ser absorbido y consumido como combustible en un medio de metabolismo oxidativo en las neuronas (Pellerin 2003; Riske et al. 2017; Halestrap y Wilson 2012; Matsui et al. 2017).

La hipótesis de la lanzadera lactato astrocito-neurona conllevaría a un incremento del flujo cerebral que aumenta la biodisponibilidad de oxígeno al cerebro. Los cambios que se producen a nivel del lactato y en el aumento de la adenosina que se produce a las 2 y 4 horas al disminuir el ATP produce una respuesta. El lactato extracelular promueve la vasodilatación por la inhibición de la recaptación de la PGE₂ por parte del astrocito, por tanto, aumenta la PGE₂ extracelular produciendo vasodilatación (Niwa et al. 2001; Takano et al. 2006). Por otra parte, ante una situación de hipoxia moderada aumentan los niveles de adenosina la cual induce vasodilatación cerebral inhibiendo los factores vasoconstrictores. En lugar de facilitar la vasodilatación, la cual inhibe los factores constrictores como el 20-HETE, mediante la activación de los receptores A_{2A} directamente sobre las células del músculo liso vascular (Lange y Kader 1997; Mulligan y MacVicar 2004).

Tanto la elevación del lactato extracelular como la adenosina promueven una respuesta hacia una vasodilatación (Figura 56).

Discusión

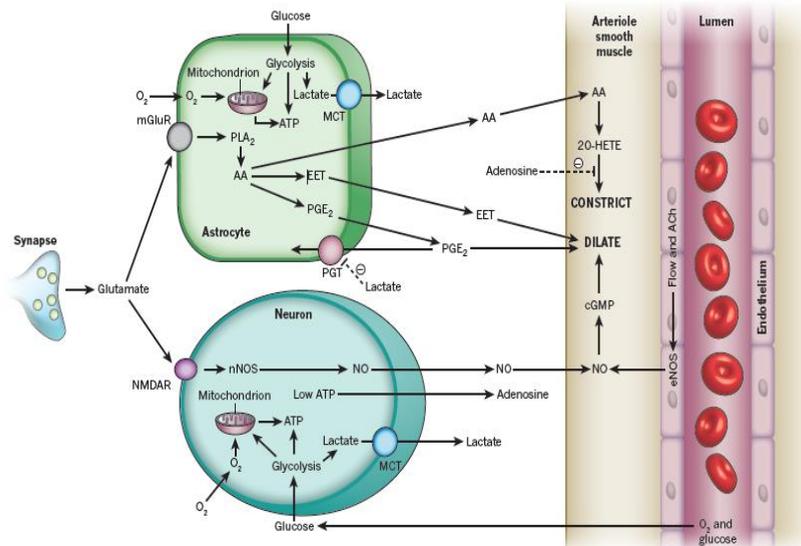


Figura 56. El lactato y la adenosina afectan la señalización neurovascular en condiciones de disminución de concentración de oxígeno. Las bajas concentraciones de O₂ conducen a la falta de fosforilación oxidativa mitocondrial. Para consumir todo el piruvato producido por la glucólisis, se produce una exportación de lactato por los MCTs. El lactato extracelular inhibe la recaptación de PGE₂ por el transportador de prostaglandinas (PGT), promoviendo la vasodilatación. Los bajos niveles de energía también conducen a la formación de adenosina, que inhibe 20-HETE mediada por la constricción arteriolar actuando sobre adenosina A_{2A} receptores (Attwell et al., 2010).

El metabolismo de los astrocitos puede ser una variable importante que relaciona cambios en la demanda de energía del tejido con cambios en el flujo sanguíneo (Zonta et al. 2003). En este caso se produce un aumento en el metabolismo glucolítico.

De acuerdo con el lactato derivado de astrocitos. En el cerebro, el sistema de transferencia de lactato entre astrocito-neurona en el cerebro cumple una función protectora para asegurar un suministro de sustratos para el metabolismo cerebral, y los oligodendrocitos

parecen influir también en la disponibilidad de lactato (Brooks et al. 2009). Cada vez hay más pruebas de que el lactato actúa como una molécula de señalización en el cerebro para vincular el metabolismo, la disponibilidad del sustrato, el flujo sanguíneo y la actividad neuronal. El lactato puede ser transportado por los monocarboxilatos (MCTs), proteínas transportadoras de lactato (Pellerin 2003). Los MCT1s, tienen alta afinidad por el lactato y se encuentran en los oligodendrocitos, exportando el lactato desde las células (Bergersen 2015). Los astrocitos contienen MCT4s y en las neuronas poseemos los MCT2s (Vijay y E. Morris 2014; Mosienko, Teschemacher, y Kasparov 2015). Estos permiten a las neuronas atraer el lactato como combustible de manera eficiente, incluso en condiciones de sustrato pobres.

De acuerdo con la hipótesis de la lanzadera de lactato, los astrocitos metabolizan la glucosa o glucógeno a lactato y este lactato se transfiere a las neuronas («The lactate receptor, G-protein-coupled receptor 81/hydroxycarboxylic acid receptor 1: Expression and action in brain - Morland - 2015 - Journal of Neuroscience Research - Wiley Online Library» 2017). El aumento de lactato que se produce como consecuencia de la glucólisis anaeróbica iniciada en las primeras horas de la hipoxia es utilizado por las neuronas para la síntesis de ATP. Las neuronas luego convierten el lactato en piruvato que entra en el metabolismo oxidativo, y así se incorporan en el ciclo de Krebs para continuar con la fosforilación oxidativa dando como resultado la formación de ATP (Tarczyluk et al. 2013) (Figura 57).

Discusión

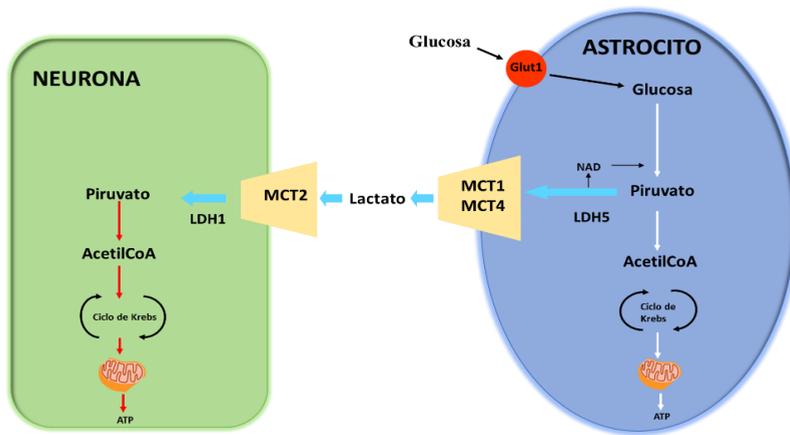


Figura 57. Elementos de la regulación energética en el cerebro. Los astrocitos expresan MCT1 o MCT4 y la liberación de lactato por astrocitos a través de estos dos MCTs contribuye al mantenimiento del pool de lactato extracelular. EL MCT2 es el MCT neuronal que transporta el lactato extracelular al interior de la neurona, especialmente durante los períodos de mayor demanda de energía. GLUT = transportador de glucosa; LDH = lactato deshidrogenasa.

Todos estos mecanismos que se dan a nivel cerebral podrían ser indicativos de una recuperación a nivel de metabolismo energético evitando así el daño a nivel cerebral por declive de reservas de energía.

También puede ser que haya una adaptación fisiológica con cambios cardiorrespiratorios como aumento de la frecuencia cardiaca o respiratoria que produzcan un aumento de la saturación de oxígeno y se restablezca el metabolismo.

Para reforzar los resultados obtenidos, se podría llevar a cabo la determinación de metabolitos del ciclo de Krebs, determinación de la expresión o síntesis de los monocarboxilatos, dianas de HIF-1 α y parámetros sanguíneos que nos ayuden a conocer en profundidad los mecanismos implicados en estas condiciones.

2. Efecto del retraso en la oxigenación y del insulto hiperóxico en las crías de ratón recién nacidas (P1) y (P7), sobre el estrés oxidativo, respuesta antioxidante e inflamatoria

Para llevar a cabo los estudios planteados, realizamos varios experimentos para determinar el grado de estrés oxidativo en los ratones recién nacidos (P1) y la evolución a los siete días postnatales (P7) en nuestras condiciones experimentales en cerebro.

En los cerebros de los ratones nacidos observamos que, en condiciones hipóxicas, simulando las condiciones de oxigenación intraútero de los fetos ($FiO_2=0.14$), presentan un estrés oxidativo similar al control, nacido en aire ambiente ($FiO_2=0.21$). Pero cuando se produce el insulto hiperóxico ($FiO_2=1.0$) el grupo reanimado que ha nacido en condiciones hipóxicas (Hx14/100/21), parece que responde mejor frente al estrés oxidativo que el grupo nacido en condiciones ambientales y sometido a una concentración del 100% (Nx21/100/21). Este efecto es incluso más evidente a los 7 días postnatales en los grupos reanimados, para algunas de las determinaciones que hemos realizado. Es decir, aparentemente el breve período de hipoxia al que son sometidos los ratones recién nacidos es protector frente al estrés y daño oxidativos secundarios al paso del ambiente hipóxico relativo intraútero al extraútero. Así, los niveles de los biomarcadores de daño a proteínas y ADN son significativamente inferiores en el grupo hipóxico (Hx14/100/21) frente al normóxico (Hx21/100/21). Por lo tanto, en el caso de ser sometidos a una reanimación con concentraciones elevadas de oxígeno, el grupo hipóxico sufriría menos

Discusión

daño oxidativo que el normóxico. Este hallazgo tiene una elevada importancia clínica porque un porcentaje muy elevado de los prematuros extremos precisa la suplementación con oxígeno en la sala de partos para lograr una estabilización postnatal; sin embargo, si la estabilización se realizara de forma gradual con aumento paulatino de la saturación de oxígeno, el paciente se podría beneficiar de una menor agresión oxidativa (García-Muñoz Rodrigo et al. 2015).

En primer lugar, el grado de estrés oxidativo queda reflejado por la relación del cociente GSH/GSSG que, a pesar de que las crías nacidas con una $FiO_2=0.14$ permanecen solo 8 horas en estas condiciones, el efecto sobre el estado redox cerebral se puede apreciar incluso una semana después del nacimiento (Escobar, Cubells, et al. 2013b). Por tanto, estos datos sugieren que una TFN gradual y menos brusca que la fisiológica, retrasando la oxigenación de las crías del ratón varias horas tras el nacimiento, podría estar induciendo una serie de cambios bioquímicos encaminados a mejorar el potencial redox de las crías favoreciendo un estado más reducido.

Los resultados obtenidos a P1 en la relación GSH/GSSG nos indican que tanto el nacimiento en estas condiciones hipóxicas o ambientales a nivel de estrés oxidativo no hay cambios. Sin embargo, sí que vemos que el cociente disminuye en los grupos re-oxigenados (Sifringer et al. 2013; S. Endesfelder et al. 2017). En el grupo $Nx21/100/21$ se debe a una disminución de los niveles de GSH y en el grupo $Hx14/100/21$ se debe a un aumento en los niveles de GSSG.

En recién nacidos asfixiados y re-oxigenados con 100% de oxígeno se pudo demostrar que existía una disminución significativa del cociente GSH/GSSG en las primeras horas después del nacimiento cuando se comparaba con neonatos reanimados con aire ambiente. Es más, 4 semanas después de la reanimación el grupo reanimado con 100% de oxígeno continuaba teniendo valores del cociente GSH/GSSG significativamente inferiores a los controles o a los reanimados con aire (Vento et al. 2001). Aparentemente, el estrés oxidativo de la TFN causado por la hiperoxia tras una hipoxia-isquemia era capaz de disparar mecanismos pro-oxidantes de larga duración (Vento et al. 2001). En un estudio posterior se analizaron las actividades enzimáticas del ciclo redox del glutatión y enzimas antioxidantes y se pudo demostrar un aumento de las actividades antioxidantes y de la GPX y GR (Vento et al. 2003).

Al determinar los niveles de ARN mensajero de las enzimas involucradas en la oxidación y reducción del GSH, *gpx* y *gr*, vemos que en el grupo nacido en condiciones de aire ambiente más reoxigenación (Nx21/100/21) hay un aumento de la expresión de estos genes en comparación con los grupos nacidos en hipoxia (Hx14/21/21) y (Nx14/100/21). Ello nos indica que existe un mayor nivel de estrés oxidativo en el cerebro del grupo de aire ambiente y la expresión de estas enzimas reflejaría una reacción de defensa frente a la agresión oxidativa inherente a la TFN y especialmente por la hiperoxia. Además, ello concuerda con que los niveles de mensajero de una de las enzimas involucradas en la síntesis de GSH, la *gcl*, están aumentados en los grupos nacidos en condiciones ambientales (S. Endesfelder et al.

Discusión

2017). Esto podría ser indicativo de que las condiciones de hiperoxia requieren mayores niveles de GSH para mantener el estado redox intracelular dentro de los límites de viabilidad celular (Dean P. Jones y Sies 2015) Así, en los estudios previamente descritos (Vento et al. 2001, 2003) se producía una disminución del cociente GSH/GSSG en los nacidos reanimados con aire ambiente frente a los controles. A diferencia de lo que ocurre en nuestros experimentos estos pacientes no fueron luego sometidos a hiperoxia. Sin embargo, en recién nacidos prematuros a los que se determinaron marcadores de estrés oxidativo a las 24 y 48 horas en la UCI neonatal cuando estaban recibiendo oxígeno, si se pudo demostrar la presencia de niveles de marcadores de daño al ADN y a lípidos aumentados comparativamente con controles (Vento et al. 2009).

Sin embargo, en los nacidos en hipoxia y reanimados, los niveles de mensajero de las tres enzimas están disminuidos al igual que ocurre en el grupo Hx14/21/21. Se podría decir que hay una ralentización del ciclo de óxido-reducción ya que los niveles de GSH y GSSG no están alterados en el grupo Hx14/21/21 pero si hay un aumento de GSSG en el grupo Hx14/100/21 que será producido por la reanimación. Puede ser que haya una disminución de la actividad de la enzima GR o falta de NADPH, sustrato reductor de esta reacción (Wallin, Kronovall, y Majewski 2000). Alternativamente puede ser que los efectos de la hiperoxia estén atenuados por la hipoxia pre-condicionante preservando los niveles de GSH y que no sea necesario reducir el GSH oxidado de manera inmediata para mantener el estado reductor intracelular (Felderhoff-Mueser et al. 2004).

Si observamos este cociente a la semana (P7) vemos que en los grupos nacidos en condiciones hipóxicas se obtienen niveles similares al control, lo que podría estar indicando que hay un menor estrés oxidativo en el grupo Hx14/100/21 que en el grupo Nx21/100/21 que sigue siendo muy bajo (Pinheiro et al. 2016). Si observamos los niveles de mensajero de *gpx* y *gr* están aumentados en el grupo Hx14/100/21 respecto a Hx14/21/21, probablemente porque el nacimiento en hipoxia induce respuesta frente a la posterior reanimación que se hace más evidente a más largo plazo y activándose los mecanismos para proteger al cerebro frente al estrés oxidativo (Li et al., s. f.).

En el par redox cisteína/cistina a P1 obtenemos niveles altos para el grupo control respecto al resto de grupos de estudio. Concretamente, en el grupo Hx14/21/21, tenemos niveles significativamente elevados de cisteína respecto al resto de grupos, pero hay disminución del cociente debido al aumento de los niveles de cistina. Además de la disponibilidad de cisteína existe otro factor que limita la síntesis de GSH, la actividad de la enzima GCL (Seelig, Simonsen, y Meister 1984; Lu 2013)(Lu 2013)(172), la cual aparece sobre-expresada a nivel de mensajero en el grupo control, pero no en el grupo Hx14/21/21. En cambio, no existen diferencias entre ambos grupos en cuanto a los niveles de los precursores de la cisteína, homocisteína y cistationina y de GSH, γ -glutamil-cisteína, lo que indicaría que la transulfuración está funcionando correctamente en ambos grupos. Todo apunta a que mientras en el grupo control, la síntesis de GSH aparece sobre-activada sobre el grupo Hx14/21/21 y la cisteína que se acumula se va oxidando rápidamente a cistina. La

Discusión

cisteína es un metabolito altamente oxidable con alto potencial redox y es el primer escalafón del entramado que conforma el circuito redox (Dean P. Jones et al. 2004) en la amortiguación de las variaciones redox dentro y fuera de la célula. Por tanto, nuestros resultados indican que la hipoxia preconditionante podría promover un ambiente más reductor después del nacimiento en comparación al nacimiento en normoxia, utilizando como tampón redox el par cisteína/cistina sin necesidad de bajar de escalafón del circuito redox favoreciendo la acumulación del GSH y otros metabolitos antioxidantes de menor potencial redox como la homocisteína o la γ -glutamyl-cisteína en su forma reducida.

Este papel protector de la hipoxia preconditionante se hace evidente al observar a los grupos experimentales que fueron sometidos a 1h de hiperoxia 100% posteriormente al nacimiento. A P1 se observa una disminución de los cocientes GSH/GSSG, cisteína/cistina y homocisteína/homocistina en ambos grupos reanimados con oxígeno 100% después del nacimiento (Hx14/100/21) y (Nx21/100/21) en comparación a los no reanimados, lo que indica el efecto deletéreo de la hiperoxia a nivel oxidativo. Sin embargo, si observamos los niveles de ARNm de gpx, gr y gcl, se aprecia que en el grupo Nx21/100/21 hay un intento por activar la transcripción, aumentan ligeramente los niveles de mensajero de las tres enzimas sin llegar a ser significativo en el momento analizado, a P1, mientras que en el grupo Hx14/21/100 no se observa ese intento de activación. Parece como si la reserva de estos metabolitos antioxidantes, favorecida por la hipoxia preconditionante, serían suficiente para

hacer frente a la hiperoxia de manera eficaz y mucho más rápida que promoviendo la activación enzimática como ocurriría en condiciones de normoxia. A P7 el efecto protector de la hipoxia preconditionante frente a la posterior hiperoxia 100% es incluso más evidente que a P1. Los cocientes GSH/GSSG y cisteína/cistina recupera niveles normales claramente en el grupo Hx14/100/21, algo que no ocurre en el grupo Nx21/100/21. Y si miramos a la expresión génica, observamos que a diferencia del grupo Nx21/100/21, en el grupo Hx14/100/21 aparecen aumentada de manera significativa los niveles de ARNm de las tres enzimas, *gpx*, *gr* y *gcl*.

Estos resultados nos indicarían que la hipoxia preconditionante no solo preserva la reducción de los equivalentes redox de cara a afrontar un insulto como la reanimación postnatal, sino que también favorecería una recuperación más eficaz y rápida. Es reseñable destacar que estos resultados estarían confirmando estudios preliminares de nuestro grupo de investigación (Escobar et al., 2013)

Por otro lado, cuando hay estrés oxidativo se produce un aumento de las ERO y ERN que pueden causar un daño estructural o funcional a las principales biomoléculas, que dan como producto un daño molecular. Estos biomarcadores son utilizados como biomarcadores de daño oxidativo y alguno de ellos de inflamación (Schieber y Chandel 2014; Gupta 2016; Whiteman y Spencer 2008). Hemos querido estudiar si el estrés oxidativo anteriormente descrito se traducía en un

Discusión

daño oxidativo a nivel proteico y del ADN. Estos biomarcadores de daño determinados apoyan los resultados de estrés obtenidos.

Los biomarcadores de daño proteico muestran un aumento significativo a P1 de los cocientes de m-Tyr/Phe y 3Cl-Tyr/p-tyr (Figura 33), en el grupo nacido en normoxia y reanimado con $FiO_2=1.0$ (Nx21/100/21) frente al resto de grupos del estudio. Este resultado que apoya la idea de que el nacimiento bajo condiciones hipóxicas podría ser protector frente a una reanimación (Niatsetskaya et al. 2012; Bouch et al. 2015; Torres-Cuevas, Parra-Llorca, et al. 2017).

A la semana después del nacimiento solo se observa un aumento significativo en el cociente $3NO_2$ -Tyr/p-tyr que sigue el aumento en el grupo Nx21/100/21, sin embargo, este cociente refleja alteraciones a nivel oxidativo, nitrosativo e inflamatorio en ese grupo. Por tanto, parece que el daño oxidativo inducido por la reanimación de las crías de ratón con oxígeno 100% a corto y largo plazo, es contrarrestado por la exposición de los animales a la hipoxia preconditionante durante la transición-fetal-neonatal. Cabe destacar que la expresión de la isoforma neuronal de la óxido nítrico sintasa (nNOS) de la corteza cerebral en hipoxia de ratas recién nacidos es mayor a P5. Después de este pico, la expresión de nNOS disminuye lentamente desde P7 hasta P20 (Rodrigo et al. 2005). Por tanto, la formación de la $3NO_2$ -Tyr en el grupo Nx21/100/21 estaría indicando un aumento peroxinitrito, un radical libre altamente reactivo y que se libera en condiciones de estrés oxidativo/nitrosativo. Este biomarcador, la $3NO_2$ -Tyr, se observa en diversos estados patológicos o enfermedades y parece desempeñar un papel importante en el daño cerebral inducido por

procesos de isquemia/reperfusión o hipoxia/hipoxia reoxigenación (Serrano et al., 2003; Castro-Blanco et al., 20003; Encinas et al., 2004). En estudios de desarrollo postnatal de P0 a P10, se ha visto que hay una alta expresión de nNOS, iNOS y aumento de los niveles de 3NO₂-Tyr. Estas moléculas parecen desempeñar un papel importante en la maduración, plasticidad cortical e inflamación produciendo daño cerebral (Serrano et al., 2005; Brodsky et al., 2012).

El biomarcador de daño al ADN que hemos determinado, cociente 8-OHdG/2-dG, muestra un perfil similar al obtenido en el daño a proteínas. La 8-OHdG es una de las principales lesiones de ADN formado a partir de ERO. La guanina tiene un bajo potencial de oxidación y se oxida fácilmente a 8-OHdG. La modificación de la base es mutagénica, ya que puede causar transversiones de GC a TA si no son reconocidos y reparados (Yngve Sejersted 2017). Los resultados obtenidos reflejan, aumento significativo del cociente en el grupo Nx21/100/21. Este aumento no solo lo observamos en P1 sino que se mantiene hasta la semana (P7) este daño. Sin embargo, no observamos daño al ADN en el grupo Hx14/100/21. Con lo que podemos concluir que la hiperoxia produce un mayor daño oxidativo en el ADN (Puente et al. 2014; D. Endesfelder et al. 2014) en las crías nacidas en normoxia en comparación con las nacidas en condiciones hipóxicas.

En estudios clínicos con recién nacidos reoxigenados con diferentes FiO₂ se ha observado un aumento de estos biomarcadores de daño tanto en plasma como en orina, y se correlacionan directamente con

Discusión

la concentración de O₂ durante la reanimación (Vento et al. 2001, 2003, 2005, 2009; Rook et al. 2014).

No solo se confirman estos resultados a nivel metabólico, sino que lo vemos a nivel de daño en las biomoléculas. Es muy probable que la hipoxia preconditionante protege no solo ante un insulto agudo, sino que también activa un mecanismo que a la semana mantiene un estado reductor en el cerebro de las crías de ratón.

Por otro lado, hemos analizado la expresión de varios genes como dianas del factor de transcripción HIF1- α ; factor de crecimiento endotelial vascular a (vegfa) y eritropoyetina (epo) para evaluar la respuesta hipóxica en nuestro modelo y la expresión de genes inflamatorios como il-6, il1- β y tnf- α , de los receptores de adenosina A1 purinérgicos (adora1) y del gen de la subunidad nr1 del receptor glutaminérgico NMDA para ver como se afectan por el uso de diferentes FiO₂ durante la TFN.

En cuanto a las dianas de HIF-1 α , a P1 encontramos un aumento significativo de *epo* en el grupo Hx14/21/21, que se mantiene incluso hasta P7. Sabemos que la EPO desempeña un papel importante en el sistema nervioso ya que tanto la EPO como su receptor aumentan su expresión en células gliales, neuronas y células endoteliales bajo condiciones hipóxicas y puede ejercer funciones neuroprotectoras, antiinflamatorias y pro-angiogénicas (Fan et al. 2009). La EPO tiene propiedades neuroprotectoras *in vivo* e *in vitro* y parece actuar de una manera doble. Por un lado, protegiendo directamente a las neuronas del daño isquémico y por otro estimulando las células endoteliales y

apoyando de ese modo el efecto angiogénico de VEGF en el sistema nervioso. Por lo tanto, la activación de la expresión de *epo* a nivel génico inducida por la hipoxia preconditionante podría ser parte de un mecanismo de protección fisiológica autorregulado para prevenir la lesión neuronal, especialmente bajo condiciones de hipoxia o frente a una hiperoxia, mecanismo que no precisaría la activación de *vegfa* (Terraneo et al. 2017). En otros modelos animales se ha observado que una hipoxia más severa induce la expresión de *vegfa* ocurre de manera inmediata después de haber sometido a hipoxia a ratones neonatales (a las 0 horas). Puede ser que el pico de expresión del ARNm del gen se haya producido ya y que a P1 sea tarde para observar el aumento de los niveles del mensajero (Bernaudin et al. 2002).

Por tanto, los cambios que observamos en el grupo reoxigenado y nacido en condiciones normóxicas, relacionados con inflamación a P1 y expresión de receptores a largo plazo podrían ser debidos al estrés causado por la propia TFN y acentuados por el insulto hiperóxico que sigue manifestándose a la semana del insulto (Perígolo-Vicente et al. 2013; Knox et al. 2013; Millar et al. 2017) que no observamos en el grupo Hx14/100/21.

Desde un punto de vista traslacional, nuestros datos sugieren que un posible retraso en la oxigenación a nivel extrauterino, después del nacimiento induciría una serie de modificaciones en la regulación redox que podría ser protectoras a nivel cerebral (Vento et al. 2009; Ezaki et al. 2009; Kapadia et al. 2013; Rook et al. 2014; Tataranno et al. 2015).

3. Estudio histológico de la corteza cerebral

En el campo de la neurociencia, el desarrollo de las diferencias entre humanos y la maduración del cerebro de roedores son conocidas, pero determinar las equivalencias exactas en el desarrollo entre una especie y otra es una tarea multidimensional y una sola respuesta no siempre es posible (Pressler y Auvin 2013) .

En general, aunque la escala de tiempo es considerablemente diferente, la secuencia de eventos claves en la maduración del cerebro es en gran medida consistente entre los humanos y los roedores (Tabla 8).

Tabla 8. Comparación de los principales procesos de desarrollo a nivel cerebral entre ratones y humanos. (Semple et al., 2013).

Human	Rodent	Developmental milestones	Reference (s)
23-32 wk gestation (pre-term infant)	pnd 1-3	Oligodendrocyte maturation state changes—pre-dominance of mitotically active pre-OLs ^a . Immune system development. Establishment of the blood-brain barrier.	Craig et al. (2003), Lodygensky et al. (2010), Dean et al. (2011a,b) Holsapple et al. (2003) Engelhardt (2003), Daneman et al. (2010)
36-40 wk gestation (term infant)	pnd 7-10	Peak brain growth spurt. Peak in gliogenesis. Increasing axonal and dendritic density.	Dobbing and Sands (1979), Bockhorst et al. (2008) Catalani et al. (2002), Kriegstein and Alvarez-Buylla (2009) Cowan (1979), Bockhorst et al. (2008), Baloch et al. (2009)
		Oligodendrocyte maturation state changes—switch to a pre-dominance of immature OLs. Consolidation of the immune system.	Craig et al. (2003), Dean et al. (2011a,b) Holsapple et al. (2003)
2-3 year old	pnd 20-21	Brain reaches 90-95% of adult weight. Peak in synaptic density at 50% > adult levels. Peak in myelination rate. Neurotransmitter and receptor changes.	Dobbing and Sands (1973, 1979), Dekaban et al. (1987), Giedd et al. (1999) Huttenlocher (1979), Micheva and Beaulieu (1996) Keshavan et al. (2002) Hedner et al. (1986), Romijn et al. (1991)
4-11 year old	pnd 25-35	Fractionation/specialization of prefrontal cortex neural networks (structural maturation). Maximum volume of grey matter and cortical thickness.	Tsujimoto (2008) Sowell et al. (1999), Bansal et al. (2008)
12-18 year old	pnd 35-49	Reduced synapse density, reaching a plateau at adult levels. Refinement of cognitive-dependent circuitry. Ongoing myelination; increasing white matter volume and fractional anisotropy.	Huttenlocher (1979), Lidow et al. (1991) Giedd et al. (1999), Chahboune et al. (2007), Baloch et al. (2009), Brouwer et al. (2012)
20 years +	pnd 60+	Adult levels of neurotransmitters. Adult levels of synaptic density. Ongoing myelination and declining grey matter.	Romijn et al. (1991) Huttenlocher (1979) Lebel and Beaulieu (2011), Lebel et al. (2012)

^a OL: oligodendrocyte.

En nuestros estudios trabajamos con ratones P1 y P7. Los ratones recién nacidos, entre P1 y P3, corresponde a un cerebro de un niño prematuro de entre 23-32 semanas de gestación, son cerebros inmaduros al igual que en los recién nacidos pretérmino. Por otro lado, los ratones de día 7 posnatal (P7), corresponde a un desarrollo cerebral de 36-40 semanas de edad gestacional en el feto humano (Semple et al. 2013).

En los estudios histológicos nos hemos centrado en el ratón P1 para ver los primeros cambios que ocurren en las crías cuando la TFN se da en condiciones normóxicas o hipóxicas, y el efecto de la reanimación en ambas condiciones. La corteza cerebral de los ratones, concretamente el neocórtex, al igual que la de los mamíferos está formada por 6 capas celulares y en cada una de las capas predomina una clase de neuronas. Aunque el desarrollo estructural y funcional de la corteza cerebral durante las primeras etapas es similar en diferentes especies los puntos temporales y los períodos de distintos procesos de desarrollo (neurogénesis, migración, diferenciación, sinaptogénesis, apoptosis) difieren debido a las grandes diferencias en los períodos de gestación (Z. Molnár y Cheung 2006; Z. Molnár y Clowry 2012).

En la mayoría de las especies, las seis capas de la corteza cerebral se generan durante las etapas prenatal y postnatal temprana siguiendo un patrón de dentro hacia fuera. La corticogénesis ocurre en la zona ventricular y subventricular del cerebro durante el periodo de desarrollo. La migración de las células postmitóticas ocurre a través de la zona intermedia y se producen movimientos intracorticales de los grupos de neuronas formados sucesivamente a medida que alcanzan

Discusión

sus posiciones definitivas en el neocórtex (Z. Molnár y Cheung 2006; Salmaso et al. 2014; H. J. Luhmann 2017). Las neuronas en la capa (L) 6 son las primeras que nacen en la zona ventricular (VZ) y migran hacia la superficie para dividir la capa plexiforme primordial (PPL) en la zona marginal superficial (MZ) y la subplaca profunda (SP) (Figura 58).

Las neuronas de L3 y L2 como podemos observar en la Figura 58 se generan más tarde y migran a través de las capas inferiores, que están pobladas con neuronas post migratorias que tienen propiedades más maduras. Hay dos poblaciones de neuronas que son generadas de manera temprana y neuronas transitorias que tienen funciones importantes en la corticogénesis: 1. Neuronas Cajal-Retzius (CRN) que se localizan en la MZ (que más tarde se convierte en L1) y controlan la migración neuronal radial (Kirischuk, Luhmann, y Kilb 2014), y 2. Neuronas de la subplaca (SPNs) localizadas entre la sustancia blanca (WM) y L6, jugando un papel importante en los circuitos tempranos tálamocorticales y en la maduración de la arquitectura neocortical (Kanold y Luhmann 2010). Las células CRN y las SPNs muestran propiedades funcionales relativamente maduras en la corteza de ratones recién nacidos, como son las descargas de potenciales de acción repetitiva y entradas sinápticas prominentes, esto ha sugerido que las SPNs están muy conectadas y pueden actuar como amplificadores y eje de las redes neocorticales tempranas (C. C. Luhmann 2009; Kanold y Luhmann 2010). Cuando todas las capas se han formado, alrededor de P4-P5 en ratones, en humanos recién nacidos se ha formado a corto plazo poco antes del nacimiento, la mayoría de CRNs y una parte de las SPNs desaparecen y comienza el

desarrollo de las redes neocorticales bajo una extensa reorganización durante el período posterior de los diferentes sistemas sensoriales.

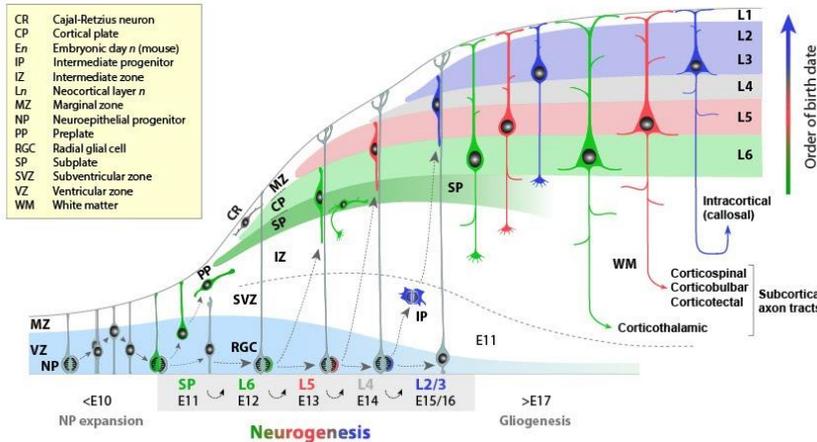


Figura 58. Neurogénesis y migración neuronal del neocórtex de ratón.

Con los resultados obtenidos en la presente tesis podemos comparar como afecta la TFN bajo diferentes FiO_2 y la reanimación posterior, en las diferentes capas celulares y si estos cambios afectan los tipos celulares de la corteza.

Los resultados nos muestran que el nacimiento bajo condiciones normóxicas con una posterior reanimación afecta principalmente a las capas I, II, III y IV mientras que las capas V, VI resultan menos afectadas (Figura 42 y 44). En estas capas apreciamos células picnóticas que nos indican muerte celular y mayores espacios entre los somas lo cual nos indicaría falta de células, porque que hay células que han muerto o porque las células que deberían ocupar esos espacios mueren antes de llegar o porque las células han perdido volumen celular (Figura 42 2). Cuando observamos las imágenes de los grupos nacidos en hipoxia,

Discusión

los cambios se ven en las capas más bajas V-VI, hay mayores espacios intercelulares sobre todo en los grupos Hx14 8H y Hx14/14/14 respecto al control como podemos ver en la Figura 42. Sin embargo, en el grupo que mantenemos con una $FiO_2=0.14$ todo tiempo hasta el sacrificio, Hx14/14/14, observamos cambios en todas las capas incluso con núcleos picnóticos.

Estos resultados podrían indicar que cuando el nacimiento tiene lugar en condiciones ambientales y se produce una reanimación el oxígeno afecta a las capas más superficiales con presencia de muerte celular, sin embargo en el nacimiento en condiciones hipóxicas, Hx14/21/21, las capas más profundas se ven algo afectadas, estas capas se corresponden con las más ventriculares donde hay una mayor proliferación y por tanto, la falta el oxígeno necesario para poder mantenerse en las condiciones normales de desarrollo y proliferación y cuando se produce la transición al 21% ese oxígeno adicional es necesario para continuar con el desarrollo. Por otro lado si la transición se realiza con una $FiO_2=1.0$, al necesitar las células el oxígeno asumen mejor ese 100%, no como tal, sino como si fuera una menor proporción de oxígeno y por eso los cambios que se observamos no conllevan muerte celular. Pero si no se realiza la transición, Hx14/14/14, parece ser que se produce una afectación de todas las capas de la corteza incluso observamos muerte en las capas más profunda, porque el efecto de la hipoxia es prolongado y las células necesitan el oxígeno para poder seguir desarrollarse correctamente.

En el grupo Hx14 8H, en el cual no se realiza la transición al 21%, vemos todavía comparado con el resto de grupo que falta desarrollo

de las capas, esta corteza es más inmadura, pero aun así, la afectación en capas más bajas puede apreciarse, por tanto, podríamos indicar que los cambios en esas capas se debe a la hipoxia y no a la propia transición.

Los cambios que se producen con la hipoxia los podríamos describir como una ralentización en el proceso de desarrollo o migración hasta la llegada del oxígeno. Pero esta ralentización producida como un preconditionamiento no llega a producir muerte significativa en los grupos que realizan la transición, Hx14/21/21 y Hx14/100/21. Además, los resultados que obtenemos de caspasa-3 y TUNEL confirman estos resultados, hay un aumento significativo en el grupo Nx21/100/21 en las capas de la corteza, siendo menor en el resto de grupos. Hay estudios de hipoxia preconditionante ante un episodio de hipoxia-isquemia (HI) en el cual la activación de caspasa-3 disminuye en los grupos expuestos a hipoxia (Carlioni, Buonocore, y Balduini 2008) y numerosos estudios que indican una mayor muerte celular durante la reperfusión o altas concentraciones de oxígeno (Faa et al. 2014; «Vitexin Protects Against Hypoxic-Ischemic Injury via Inhibiting Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II and Apoptosis Signaling in the Neonatal Mouse Brain» 2017; Nishimura et al. 2017). En los resultados en el cuerpo calloso hay un aumento significativo en los grupos Hx14 8H y Hx14/14/14, que coincide con lo observado en las imágenes, este resultado se puede deber a que estamos en una región más cercana a la proliferación, capas más profundas afectadas por el oxígeno como veíamos en los semifinos.

Discusión

Por tanto, el desarrollo normal del cerebro fetal puede verse afectado por varios factores genéticos, inflamación, cambios en señales extrínsecas e intrínsecas (Haydar et al. 1996; Carpentier et al. 2013). Posiblemente la señalización del oxígeno en los neuroprogenitores parece ser un mecanismo crucial para la supervivencia durante el desarrollo del cerebro. Estudios *in vitro* demostraron que una reducción de la concentración de oxígeno atmosférico al 3% promueve la proliferación y el mantenimiento de células madre de células progenitoras neurales aisladas (Storch et al., 2001; Studer et al., 2000). El análisis detallado del mecanismo molecular subyacente de la sensibilidad al oxígeno de los neuroprogenitores mostró que HIF-1 α actúa como regulador positivo de la supervivencia, crecimiento y diferenciación de NPCs *in vitro* e *in vivo* (Milosevic et al. 2007; Tomita et al. 2003; C. Zhao, Deng, y Gage 2008; Mazumdar et al. 2010). Más tarde en modelos *in vivo* se evaluó y se demostró ser un factor esencial sólo para la angiogénesis, pero no regulaba directamente ningún subtipo de progenitor (Wagenführ et al. 2015). Los cambios en la corticogénesis *in vivo* pueden ser provocados por varios mecanismos que controlan el desarrollo del cerebro fetal, como alteraciones en la proliferación, supervivencia celular, diferenciación y migración (Marín y Rubenstein 2003; Molyneaux et al. 2007). Comprender y saber exactamente cómo actúa el oxígeno en este proceso no es del todo fácil. También se realizaron experimentos reduciendo el oxígeno atmosférico al 10% en ratonas preñadas a E14 para ver el efecto en las crías que producía en el tejido hipóxico un aumento de apoptosis en el prosencéfalo de su descendencia, lo que dio lugar a una volumen cerebral reducido y grosor cortical o les

inducían hiperoxia con 75% de oxígeno produciendo una expansión de células proliferativas dando lugar a una nueva capa celular neurogénica que contribuía a la corticogénesis (Wagenführ et al. 2015) con lo que muestran que la proliferación de los progenitores basales y la generación de neuronas corticales superiores fueron disminuidas por la hipoxia en el cerebro fetal. O por ejemplo en lesiones producidas por hipoxias crónicas durante el período postnatal, observaron una migración acelerada hacia las capas V y II, pero el número final de neuronales en la edad adulta era el mismo (Šimonová et al. 2003). Estudios en los que inducen una lesión cerebral temprana (P2) de HI se ve una interrupción de la actividad cortical con hallazgos similares en prematuros humanos recién nacidos con lesión cerebral. Esto se debe a una disminución de la actividad cerebral asociada con la expresión retardada de las subunidades y los transportadores del receptor del glutamato (Ranasinghe et al. 2015). Parece que existe un umbral en el cual la hipoxia es beneficiosa, pero por debajo de ese umbral la proliferación de los progenitores y la neurogénesis están obstaculizados debido al aumento de la muerte celular en las capas germinales.

En nuestro modelo también hemos hecho TUNEL para confirmar la muerte por activación de caspasa y los resultados indican que en la corteza hay más muerte en el grupo Nx/21/100/21 respecto al resto de grupos del estudio. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el daño al ADN cuando determinamos el cociente 8-oxodG/2dG (Figura 35).

Discusión

También hemos visto activación de la microglia y aunque no hay diferencias significativas en los grupos de estudio hay una tendencia a aumentar en los grupos Hx21/100/21 y Hx14/14/14 que apoyan los resultados vistos hasta el momento como en el marcador de daño proteico 3NO₂-Tyr y los niveles de mensajeros de *Il-1b*, *Il-6* y *TNF- α* (Figuras 33 y 39).

Cuando se produce una lesión cerebral como consecuencia de una hipoxia-isquemia seguida por reperfusión se produce un aumento de los niveles de oxígeno que resulta en una producción de ERO (Schieber y Chandel 2014). Estas pueden dañar ácidos nucleicos, proteínas y lípidos y los componentes mitocondriales son especialmente susceptibles a la oxidación debido a su proximidad a la producción de ERO (Chouchani et al. 2014). De modo que las mitocondrias están involucradas en la producción de ERO, pero también son objetivos del estrés oxidativo. A medida que las enzimas que degradan la membrana se activan, el estrés oxidativo y el aumento de los niveles de Ca²⁺ pueden afectar a la integridad de la membrana subcelular, mientras que el agotamiento de los niveles de ATP previene la reparación eficiente. Todo ello conlleva a una disminución gradual de la integridad celular y funcionalidad (J. Y. Guo, Xia, y White 2013).

A pesar de que las mitocondrias tienen una alta capacidad para secuestrar Ca²⁺, estas cantidades pueden deteriorar la función mitocondrial. Un desacoplamiento masivo de fosforilación oxidativa y reducción del potencial de la membrana mitocondrial, produciría la muerte celular (Picard y McEwen 2014). Se piensa que los efectos

combinados de las ERO y los niveles elevados de Ca^{2+} conducen a la mitocondria a la apertura del poro de transición de la permeabilidad de la membrana interna (MPT) (Dirnagl, Iadecola, y Moskowitz 1999; Mergenthaler, Dirnagl, y Meisel 2004; Sesso et al. 2012). Una vez abierto, la MPT rompe la permeabilidad de la membrana MMI, permitiendo el paso libre de cualquier molécula más pequeña que 1500 Dalton. El movimiento de protones sin restricciones a través de la membrana interna no desacopla la fosforilación oxidativa, sino que también invierte la acción de la ATPasa, resultando en una hidrólisis activa de ATP en lugar de síntesis de ATP (Dirnagl y Meisel 2008).

Otra consecuencia de la MPT es que las moléculas se equilibran a través de la membrana interna, aumentando la presión osmótica coloidal de las proteínas de la matriz, causando una acumulación de agua e hinchamiento de la matriz, conocido como efecto swelling mitocondrial. A menos que se inhiba la MPT, la reducción de los niveles de ATP afecta a la homeostasis iónica y metabólica que activa proteasas, fosfolipasas y nucleasas que degradan biomoléculas celulares (Halestrap, Clarke, y Khaliulin 2007). Además, el swelling conduce a una ruptura de la MME y, por tanto, libera proteínas proapoptóticas intermembranas, incluyendo el citocromo c, que activa la caspasa 9 y posteriormente Caspasa 3 (Martinou y Green 2001; Hagberg 2004).

En el análisis morfométrico de las “estructuras vacuolares” y dilataciones de la matriz mitocondrial (MM) en los grupos reoxigenados, que son los que han sufrido un insulto hiperóxico ($\text{FiO}_2=1.0$) observamos el efecto swelling mitocondrial. El grupo con

Discusión

mayor efecto swelling es el Nx21/100/21, sin embargo en el grupo Hx14/100/21 observamos mayores dilataciones de la matriz mitocondrial lo que nos indicaría que hay un efecto causado por la hiperoxia pero al estar previamente en condiciones hipóxicas no llegaría a producirse la rotura y subsecuente la muerte de la mitocondria. También la tortuosidad de la membrana está relacionada con los cambios que se producen en la MMI, bien sea por la dilatación o por el efecto swelling.

Por otro lado, la rotura de la MME que afecta mayoritariamente al grupo Hx14/14/14, indica que una hipoxia prolongada no produce swelling sino probablemente una rotura de la membrana que acabará destruyendo a la mitocondria ya que no consigue adaptarse a estas condiciones.

En cuanto al número de crestas en los grupos nacidos con hipoxia es donde más encontramos, indicando que en el grupo Hx14/21/21 son en el que mejor están desarrolladas y formadas.

Por otro lado, observamos que el grupo de mayor área mitocondrial es el Hx14/100/21, respecto al control, al grupo Hx14/21/21 y Hx14/14/14, por las imágenes obtenidas en este grupo al ser reanimado con el 100% de oxígeno hay un alto porcentaje de células con dilataciones de la matriz mitocondrial, debido a esto podría estar aumentando el área. Respecto a la circularidad, la forma típica de las mitocondrias es más elongada coincidiendo con el grupo Hx14/21/21, en el cual la morfología de las mitocondrias es la típica mitocondrial, elongadas con crestas transversales.

El daño cerebral en el periodo perinatal es una causa común de déficit neurológico, por lo tanto, es necesario entender mejor la fisiopatología y encontrar estrategias para su prevención y tratamiento. El estrés oxidativo es una característica temprana de la asfixia, hipoxia-isquemia perinatal y está relacionada con la discapacidad mitocondrial, exitotoxicidad y muerte celular por apoptosis en cerebros inmaduros. Estos cerebros son más vulnerables al estrés oxidativo y las mitocondrias son las primeras dianas. Una diferencia importante en el cerebro en función del grado de madurez es, que el cerebro inmaduro ante un daño por estrés oxidativo, libera proteínas proapoptóticas desde la mitocondria y el maduro no (Blomgren y Hagberg 2006). En el cerebro inmaduro se activan mecanismos apoptóticos que requieren la liberación de proteínas proapoptóticas desde las mitocondrias. Las mitocondrias son importantes reguladores de la muerte celular a través de su papel en el metabolismo energético, la homeostasis del calcio, y su capacidad para liberar proteínas apoptogénicas y producir ERO (Valko et al. 2007). La formación de las ERO es una de las dianas prometedoras para la neuroprotección a nivel cerebral.

Por tanto, las mitocondrias desempeñan un papel crítico en la iniciación de la muerte celular. Dado que los inhibidores de la apertura MPT tienen actividad citoprotectora en los efectos del corazón y el cerebro (Halestrap, Clarke, y Khaliulin 2007), la MPT podría ser modulado por una isquemia precondicionada. De hecho, la citoprotección inducida por este precondicionamiento ha sido demostrada en la inhibición de la MPTP durante la isquemia de

Discusión

miocardio (Javadov et al. 2003). El papel funcional de MPT en el preacondicionamiento en el cerebro está todavía por demostrar.

En el ser humano el cerebro produce la neurogénesis y el hipocampo termina de madurar en las primeras etapas postnatal con neuronas ya maduras y se lanza a la corteza a establecer las conexiones (Ábrahám et al. 2007; Wierenga et al. 2014). La inmensa mayoría han conectado, pero deja algunas y van conectando con los años, pero no se producen nuevas. El gran número de neuronas jóvenes que continúan migrando en el cerebro humano al nacer y durante los primeros meses de vida, las lesiones durante este tiempo como la hipoxia, isquemia, podría afectar el reclutamiento neuronal (Chouchani et al. 2014; Salmaso et al. 2014) y pueden contribuir a las desventajas sensoriomotoras y déficit neurocognitivos, incluidos los que observamos en epilepsia, parálisis cerebral y autismo (Marín-Padilla 2012).

En el ratón ocurre lo contrario cuando nace, el hipocampo no está formado, sin embargo la corteza está avanzada en el desarrollo, pero termina de desarrollarse a nivel postnatal (Wagenführ et al. 2015). Si la corteza no se forma bien el hipocampo no puede establecer las conexiones con la corteza. Por tanto, es importante que las concentraciones de oxígeno sean las adecuadas para que se produzcan todas las oleadas de migraciones y se establezcan las conexiones.

Es cierto que el desarrollo del cerebro presenta grandes diferencias entre los mamíferos. Esto no quiere decir que la información que se obtenga en ratones no sea válida para el humano, pero la translación

clínica debe hacerse con cuidado, por ejemplo, es conocido que los humanos tienen una neurogénesis en la corteza cerebral corta mientras que en ratones esta neurogénesis es todavía es más larga y que se prolonga a lo largo de toda la vida (Paredes et al. 2016).

De todos modos, con nuestros nuevos resultados todavía no podemos descartar que nuestro modelo podría inducir efectos perjudiciales en los ratones recién nacidos, pero que inequívocamente estos nuevos datos refuerzan la idea de que la transición fetal neonatal en condiciones hipóxicas ($FiO_2=0.14$) podría tener ciertas ventajas a corto y largo plazo al menos en tejidos como el cerebro frente a una posible reanimación. Estos hallazgos podrían ser de especial relevancia en situaciones patofisiológicas como la reanimación con oxígeno y especialmente en la prematuridad.

VII. CONCLUSIÓN

1. To put forward a novel mice model of fetal-to-neonatal transition that allows changes in the inspiratory fraction of oxygen (FiO_2) resembling the clinical situation.
2. To fulfill the study design requirements an *ad hoc* oxy-chamber that allowed for rapid changes in the breathing oxygen content, observation of the fetus, and assessment of birth timing was designed and validated.
3. Regarding the aerobic metabolism, we found that mice pups subjected to hypoxia showed an increased anaerobic metabolism (lower energetic charge) and increased glycolytic enzymes' activities in the first 4 hours; however, after 8 hours of hypoxia aerobic metabolism was restored with ATP levels, energetic charge and glycolytic enzymatic activities recovering normal values.
4. A hypoxic environment (14%) maintained during transition and the first 8 h immediately after birth causes a preconditioning that keeps lower levels of oxidative stress and oxidative damage biomarkers until P7 when confronted with a hyperoxic insult.
5. One hour hyperoxic insult ($FiO_2=1.0$) in mice born in normoxia ($FiO_2= 0.21$) causes a greater increase in death along the brain cortex than if born under hypoxic conditions ($FiO_2=0.14$).

Conclusión

6. Mice offspring maintained from birth to P1 with an $\text{FiO}_2=0.14$ exhibit morphologic changes characterized by increased intercellular spaces and death especially in layers V and VI of the cerebral cortex.
7. Mitochondria from the group Nx21/100/21 exhibited an increased swelling, dilatation of the mitochondrial matrix, rupture of the mitochondrial external membrane and number of creases as compared to Hx14/100/21 revealing a partial protective effect of hypoxic preconditioning.
8. Our results provide analytical and histological evidence of some protective effect of transient hypoxia during the adaptation period immediately after birth. However, medium- and long-term follow up is necessary to fully evaluate the consequences of this intervention.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

Ábrahám, Hajnalka, Béla Veszprémi, Éva Gömöri, Krisztina Kovács, András Kravják, y László Seress. 2007. «Unaltered development of the archi- and neocortex in prematurely born infants: genetic control dominates in proliferation, differentiation and maturation of cortical neurons». *Progress in Brain Research, From Action to Cognition*, 164 (enero): 3-22. doi:10.1016/S0079-6123(07)64001-1.

Accorsi, Pier A., Elena Carloni, Paola Valsecchi, Roberta Viggiani, Matteo Gamberoni, Carlo Tamanini, y Eraldo Seren. 2008. «Cortisol Determination in Hair and Faeces from Domestic Cats and Dogs». *General and Comparative Endocrinology* 155 (2): 398-402. doi:10.1016/j.ygcen.2007.07.002.

Aguar M., Cubells E., Escobar J., Kuligowski J., Iriondo M., Izquierdo M., Nuñez A., Cernada M., Vento M. Preterm babies randomly assigned to be blindly resuscitated with higher (60%) vs. lower (30%) initial FiO₂: effects on oxidative stress and mortality. *EPAS*. 2014;3843:540.

Ahearne, C. E., N. M. Denihan, B. H. Walsh, S. N. Reinke, L. C. Kenny, G. B. Boylan, D. I. Broadhurst, y D. M. Murray. 2016. «Early Cord Metabolite Index and Outcome in Perinatal Asphyxia and Hypoxic-Ischaemic Encephalopathy». *Neonatology* 110 (4): 296-302. doi:10.1159/000446556.

Andersen, Lars W., Julie Mackenhauer, Jonathan C. Roberts, Katherine M. Berg, Michael N. Cocchi, y Michael W. Donnino. 2013. «Etiology and Therapeutic Approach to Elevated Lactate Levels». *Mayo Clinic Proceedings* 88 (10): 1127-40. doi:10.1016/j.mayocp.2013.06.012.

Atkinson, Daniel E. 1968. «Energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers». *Biochemistry* 7 (11): 4030-34. doi:10.1021/bi00851a033.

Attwell, David, Alastair M. Buchan, Serge Charpak, Martin Lauritzen, Brian A. MacVicar, y Eric A. Newman. 2010. «Glial and Neuronal

Control of Brain Blood Flow». *Nature* 468 (7321): 232-43. doi:10.1038/nature09613.

Bałasz, Michał, Ryszard Szkilnik, Ryszard Brus, Jolanta Malinowska-Borowska, Sławomir Kasperczyk, Damian Nowak, Richard M. Kostrzewa, y Przemysław Nowak. 2015. «Perinatal Manganese Exposure and Hydroxyl Radical Formation in Rat Brain». *Neurotoxicity Research* 27: 1-14. doi:10.1007/s12640-014-9474-z.

Barregard, Lars, Peter Møller, Trine Henriksen, Vilas Mistry, Gudrun Koppen, Pavel Rossner, Radim J. Sram, et al. 2013. «Human and Methodological Sources of Variability in the Measurement of Urinary 8-Oxo-7,8-Dihydro-2'-deoxyguanosine». *Antioxidants & Redox Signaling* 18 (18): 2377-91. doi:10.1089/ars.2012.4714.

Bartz, Raquel R., y Claude A. Piantadosi. 2010. «Clinical Review: Oxygen as a Signaling Molecule». *Critical Care (London, England)* 14 (5): 234. doi:10.1186/cc9185.

Battelli, Maria Giulia, Letizia Polito, Massimo Bortolotti, y Andrea Bolognesi. 2016. «Xanthine Oxidoreductase-Derived Reactive Species: Physiological and Pathological Effects». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016: 3527579. doi:10.1155/2016/3527579.

Beharry, Kay D., Charles L. Cai, Gloria B. Valencia, Arwin M. Valencia, Douglas R. Lazzaro, Fayez Bany-Mohammed, y Jacob V. Aranda. 2017. «Neonatal Intermittent Hypoxia, Reactive Oxygen Species, and Oxygen-Induced Retinopathy». *Reactive Oxygen Species* 3 (7): 12-25.

Berger, Thomas M., Balz Frei, Nader Rifai, Mary Ellen Avery, Jung Suh, Bradley A. Yoder, y Jacqueline J. Coalson. 1998. «Early High Dose Antioxidant Vitamins Do Not Prevent Bronchopulmonary Dysplasia in Premature Baboons Exposed to Prolonged Hyperoxia: APilot Study».

Bibliografía

Pediatric Research 43 (6): 719-26. doi:10.1203/00006450-199806000-00002.

Bernaudin, Myriam, Yang Tang, Melinda Reilly, Edwige Petit, y Frank R. Sharp. 2002. «Brain Genomic Response Following Hypoxia and Re-Oxygenation in the Neonatal Rat IDENTIFICATION OF GENES THAT MIGHT CONTRIBUTE TO HYPOXIA-INDUCED ISCHEMIC TOLERANCE». *Journal of Biological Chemistry* 277 (42): 39728-38. doi:10.1074/jbc.M204619200.

Bharadwaj, Shruti, Vishnu B. Bhat, V. Vickneswaran, B. Adhisivam, Bobby Zachariah, y S. Habeebullah. 2017. «Oxidative stress in preeclamptic mother – newborn dyads and its correlation with early neonatal outcome – a case control study». *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 0 (0): 1-6. doi:10.1080/14767058.2017.1319933.

Blomgren, Klas, y Henrik Hagberg. 2006. «Free radicals, mitochondria, and hypoxia–ischemia in the developing brain». *Free Radical Biology and Medicine* 40 (3): 388-97. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.08.040.

Bouch, Sheena, Megan O'Reilly, Richard Harding, y Foula Sozo. 2015. «Neonatal Exposure to Mild Hyperoxia Causes Persistent Increases in Oxidative Stress and Immune Cells in the Lungs of Mice without Altering Lung Structure». *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 309 (5): L488-96. doi:10.1152/ajplung.00359.2014.

Bradley, Sophie A., y Joern R. Steinert. 2016. «Nitric Oxide-Mediated Posttranslational Modifications: Impacts at the Synapse». Research article. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. doi:10.1155/2016/5681036.

Breusing, Nicolle, Tilman Grune, Luka Andrisic, Mustafa Atalay, Grzegorz Bartosz, Fiorella Biasi, Suzana Borovic, et al. 2010. «An Inter-Laboratory Validation of Methods of Lipid Peroxidation Measurement in UVA-Treated Human Plasma Samples». *Free Radical Research* 44 (10): 1203-15. doi:10.3109/10715762.2010.499907.

Brooks, B. R., C. L. Brooks, A. D. Mackerell, L. Nilsson, R. J. Petrella, B. Roux, Y. Won, et al. 2009. «CHARMM: The Biomolecular Simulation Program». *Journal of Computational Chemistry* 30 (10): 1545-1614. doi:10.1002/jcc.21287.

Bubb, Kristen J., Asa Birna Birgisdottir, Owen Tang, Thomas Hansen, y Gemma A. Figtree. 2017. «Redox modification of caveolar proteins in the cardiovascular system- role in cellular signalling and disease». *Free Radical Biology and Medicine, Regulation of Cardiovascular Redox Signaling in Health and Disease*, 109 (agosto): 61-74. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.012.

Burton, Graham J. 2009. «Oxygen, the Janus gas; its effects on human placental development and function». *Journal of Anatomy* 215 (1): 27-35. doi:10.1111/j.1469-7580.2008.00978.x.

Cadet, Jean, y J. Richard Wagner. 2013. «DNA Base Damage by Reactive Oxygen Species, Oxidizing Agents, and UV Radiation». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (2). doi:10.1101/cshperspect.a012559.

Campbell, Iain. 2017. «Intermediary metabolism». *Anaesthesia & Intensive Care Medicine, Intensive Care*, 18 (3): 147-49. doi:10.1016/j.mpaic.2016.11.017.

Cantu-Medellin, Nadiezhda, y Eric E. Kelley. 2013. «Xanthine Oxidoreductase-Catalyzed Reactive Species Generation: A Process in

Bibliografía

Critical Need of Reevaluation». *Redox Biology* 1 (junio): 353-58. doi:10.1016/j.redox.2013.05.002.

Carloni, Silvia, Giuseppe Buonocore, y Walter Balduini. 2008. «Protective Role of Autophagy in Neonatal Hypoxia-Ischemia Induced Brain Injury». *Neurobiology of Disease* 32 (3): 329-39. doi:10.1016/j.nbd.2008.07.022.

Carpentier, Pamela A., Ursula Haditsch, Amy E. Braun, Andrea V. Cantu, Hyang Mi Moon, Robin O. Price, Matthew P. Anderson, et al. 2013. «Stereotypical Alterations in Cortical Patterning Are Associated with Maternal Illness-Induced Placental Dysfunction». *The Journal of Neuroscience* 33 (43): 16874-88. doi:10.1523/JNEUROSCI.4654-12.2013.

Cedarbaum, Jesse M., Mindy Aisen, y Bruce T. Volpe. 2017. «Fletcher H. McDowell MD 1923-2017». *Annals of Neurology*, mayo. doi:10.1002/ana.24959.

Cháfer-Pericás, C., L. Rahkonen, A. Sánchez-Illana, J. Kuligowski, I. Torres-Cuevas, M. Cernada, E. Cubells, et al. 2015. «Ultra High Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry Determination of Lipid Peroxidation Biomarkers in Newborn Serum Samples». *Analytica Chimica Acta* 886 (julio): 214-20. doi:10.1016/j.aca.2015.06.028.

Cháfer-Pericás, C., I. Torres-Cuevas, A. Sanchez-Illana, J. Escobar, J. Kuligowski, R. Solberg, H. T. Garberg, M. U. Huun, O. D. Saugstad, y M. Vento. 2016. «Development of a Reliable Analytical Method to Determine Lipid Peroxidation Biomarkers in Newborn Plasma Samples». *Talanta* 153: 152-57. doi:10.1016/j.talanta.2016.03.010.

Chance, B., H. Sies, y A. Boveris. 1979. «Hydroperoxide Metabolism in Mammalian Organs». *Physiological Reviews* 59 (3): 527-605.

Cheeseman, K. H., y T. F. Slater. 1993. «An Introduction to Free Radical Biochemistry». *British Medical Bulletin* 49 (3): 481-93.

Chouchani, Edward T., Victoria R. Pell, Edoardo Gaude, Dunja Aksentijević, Stephanie Y. Sundier, Ellen L. Robb, Angela Logan, et al. 2014. «Ischaemic Accumulation of Succinate Controls Reperfusion Injury through Mitochondrial ROS». *Nature* 515 (7527): 431-35. doi:10.1038/nature13909.

Circu, Magdalena L., y Tak Yee Aw. 2010. «REACTIVE OXYGEN SPECIES, CELLULAR REDOX SYSTEMS AND APOPTOSIS». *Free radical biology & medicine* 48 (6): 749-62. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022.

Codega, Paolo, Violeta Silva-Vargas, Alex Paul, Angel R Maldonado-Soto, Annina M DeLeo, Erika Pastrana, y Fiona Doetsch. 2014. «Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their in vivo niche». *Neuron* 82 (3): 545-59. doi:10.1016/j.neuron.2014.02.039.

Crain, P. F. 1990. «Preparation and Enzymatic Hydrolysis of DNA and RNA for Mass Spectrometry». *Methods in Enzymology* 193: 782-90.

Dalle-Donne, Isabella, Ranieri Rossi, Roberto Colombo, Daniela Giustarini, y Aldo Milzani. 2006. «Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease». *Clinical Chemistry* 52 (4): 601-23. doi:10.1373/clinchem.2005.061408.

Dalle-Donne, Isabella, Andrea Scaloni, Daniela Giustarini, Eleonora Cavarra, Gianluca Tell, Giuseppe Lungarella, Roberto Colombo, Ranieri Rossi, y Aldo Milzani. 2005. «Proteins as Biomarkers of Oxidative/Nitrosative Stress in Diseases: The Contribution of Redox Proteomics». *Mass Spectrometry Reviews* 24 (1): 55-99. doi:10.1002/mas.20006.

Bibliografía

Davies, K. J., M. E. Delsignore, y S. W. Lin. 1987. «Protein Damage and Degradation by Oxygen Radicals. II. Modification of Amino Acids». *The Journal of Biological Chemistry* 262 (20): 9902-7.

Dawson, Jennifer A., C. Omar F. Kamlin, Maximo Vento, Connie Wong, Tim J. Cole, Susan M. Donath, Peter G. Davis, y Colin J. Morley. 2010. «Defining the Reference Range for Oxygen Saturation for Infants after Birth». *Pediatrics* 125 (6): e1340-1347. doi:10.1542/peds.2009-1510.

Dirnagl, Ulrich, Costantino Iadecola, y Michael A. Moskowitz. 1999. «Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view». *Trends in Neurosciences* 22 (9): 391-97. doi:10.1016/S0166-2236(99)01401-0.

Dirnagl, Ulrich, y Andreas Meisel. 2008. «Endogenous neuroprotection: Mitochondria as gateways to cerebral preconditioning?» *Neuropharmacology*, Special issue on cerebral ischemia, 55 (3): 334-44. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.02.017.

Dixon, Brandon J., Cesar Reis, Wing Mann Ho, Jiping Tang, y John H. Zhang. 2015. «Neuroprotective Strategies after Neonatal Hypoxic Ischemic Encephalopathy». *International Journal of Molecular Sciences* 16 (9): 22368-401. doi:10.3390/ijms160922368.

Douglas-Escobar, Martha, y Michael D. Weiss. 2015. «Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: A Review for the Clinician». *JAMA Pediatrics* 169 (4): 397-403. doi:10.1001/jamapediatrics.2014.3269.

Downing, Nicholas S., Nilay D. Shah, Jenerius A. Aminawung, Alison M. Pease, Jean-David Zeitoun, Harlan M. Krumholz, y Joseph S. Ross. 2017. «Postmarket Safety Events Among Novel Therapeutics Approved by the US Food and Drug Administration Between 2001 and 2010». *JAMA* 317 (18): 1854-63. doi:10.1001/jama.2017.5150.

Ecker, Christine, John Suckling, Sean C. Deoni, Michael V. Lombardo, Ed T. Bullmore, Simon Baron-Cohen, Marco Catani, et al. 2012. «Brain Anatomy and Its Relationship to Behavior in Adults with Autism Spectrum Disorder: A Multicenter Magnetic Resonance Imaging Study». *Archives of General Psychiatry* 69 (2): 195-209. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2011.1251.

Endesfelder, David, Wolfgang zu Castell, Alexandria Ardissonne, Austin G. Davis-Richardson, Peter Achenbach, Michael Hagen, Maren Pflueger, et al. 2014. «Compromised Gut Microbiota Networks in Children with Anti-Islet Cell Autoimmunity». *Diabetes* 63 (6): 2006-14. doi:10.2337/db13-1676.

Endesfelder, Stefanie, Ulrike Weichelt, Evelyn Strauß, Anja Schlör, Marco Siffringer, Till Scheuer, Christoph Bühner, y Thomas Schmitz. 2017. «Neuroprotection by Caffeine in Hyperoxia-Induced Neonatal Brain Injury». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (1). doi:10.3390/ijms18010187.

Escobar, Javier, María Cernada, y Máximo Vento. 2011. «Oxygen and Oxidative Stress in the Neonatal Period». *NeoReviews* 12 (11): e613-24. doi:10.1542/neo.12-11-e613.

Escobar, Javier, Elena Cubells, Masahiro Enomoto, Guillermo Quintás, Julia Kuligowski, Cristina Martínez Fernández, Isabel Torres-Cuevas, Juan Sastre, Jaques Belik, y Máximo Vento. 2013a. «Prolonging in utero-like oxygenation after birth diminishes oxidative stress in the lung and brain of mice pups». *Redox Biology* 1 (1): 297-303. doi:10.1016/j.redox.2013.04.002.

Escobar, Javier, Ángel Sánchez-Illana, Julia Kuligowski, Isabel Torres-Cuevas, Rønnaug Solberg, Håvard T. Garberg, Marianne U. Huun, Ola D. Saugstad, Máximo Vento, y Consuelo Cháfer-Pericás. 2016. «Development of a Reliable Method Based on Ultra-Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry to Measure Thiol-Associated Oxidative Stress in Whole Blood Samples».

Bibliografía

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 123 (mayo): 104-12. doi:10.1016/j.jpba.2016.02.007.

Escobar, Javier, Kari Teramo, Vedran Stefanovic, Sture Andersson, Miguel A. Asensi, Alessandro Arduini, Elena Cubells, Juan Sastre, y Máximo Vento. 2013. «Amniotic Fluid Oxidative and Nitrosative Stress Biomarkers Correlate with Fetal Chronic Hypoxia in Diabetic Pregnancies». *Neonatology* 103 (3): 193-98. doi:10.1159/000345194.

Ezaki, Shoichi, Keiji Suzuki, Clara Kurishima, Masumi Miura, Wan Weilin, Reiichi Hoshi, Shizue Tanitsu, et al. 2009. «Resuscitation of Preterm Infants with Reduced Oxygen Results in Less Oxidative Stress than Resuscitation with 100% Oxygen». *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 44 (1): 111-18. doi:10.3164/jcbrn.08-221.

Faa, G., V. Fanos, D. Fanni, C. Gerosa, A. Faa, M. Fraschini, M. E. Pais, et al. 2014. «Reoxygenation of Asphyxiated Newborn Piglets: Administration of 100% Oxygen Causes Significantly Higher Apoptosis in Cortical Neurons, as Compared to 21% Oxygen». *BioMed Research International*. doi:10.1155/2014/476349.

Fan, Xiyong, Cobi J. Heijnen, Michael A. van der Kooij, Floris Groenendaal, y Frank van Bel. 2009. «The role and regulation of hypoxia-inducible factor-1 α expression in brain development and neonatal hypoxic–ischemic brain injury». *Brain Research Reviews* 62 (1): 99-108. doi:10.1016/j.brainresrev.2009.09.006.

Felderhoff-Mueser, Ursula, Petra Bittigau, Marco Sifringer, Bozena Jarosz, Elzbieta Korobowicz, Lieselotte Mahler, Turid Piening, et al. 2004. «Oxygen Causes Cell Death in the Developing Brain». *Neurobiology of Disease* 17 (2): 273-82. doi:10.1016/j.nbd.2004.07.019.

Finer, Neil N., Wade Rich, Casey Wang, y Tina Leone. 2009. «Airway Obstruction during Mask Ventilation of Very Low Birth Weight Infants during Neonatal Resuscitation». *Pediatrics* 123 (3): 865-69. doi:10.1542/peds.2008-0560.

Formentini, Laura, Marta P. Pereira, Laura Sánchez-Cenizo, Fulvio Santacatterina, José J. Lucas, Carmen Navarro, Alberto Martínez-Serrano, y José M. Cuezva. 2014. «In Vivo Inhibition of the Mitochondrial H⁺-ATP Synthase in Neurons Promotes Metabolic Preconditioning». *The EMBO Journal* 33 (7): 762-78. doi:10.1002/emj.201386392.

Fransen, Marc, Marcus Nordgren, Bo Wang, y Oksana Apanasets. 2012. «Role of Peroxisomes in ROS/RNS-Metabolism: Implications for Human Disease». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1822 (9): 1363-73. doi:10.1016/j.bbadis.2011.12.001.

Gao, Yu, Adrian Raine, Peter H. Venables, Michael E. Dawson, y Sarnoff A. Mednick. 2010. «Association of Poor Childhood Fear Conditioning and Adult Crime». *The American Journal of Psychiatry* 167 (1): 56-60. doi:10.1176/appi.ajp.2009.09040499.

Gao, Yuansheng, y J. Usha Raj. 2010. «Regulation of the Pulmonary Circulation in the Fetus and Newborn». *Physiological Reviews* 90 (4): 1291-1335. doi:10.1152/physrev.00032.2009.

García-Muñoz Rodrigo, Fermín, Ana Lucía Díez Recinos, Alfredo García-Alix Pérez, Josep Figueras Aloy, y Máximo Vento Torres. 2015. «Changes in Perinatal Care and Outcomes in Newborns at the Limit of Viability in Spain: The EPI-SEN Study». *Neonatology* 107 (2): 120-29. doi:10.1159/000368881.

Bibliografía

Giordano, Frank J. 2005. «Oxygen, Oxidative Stress, Hypoxia, and Heart Failure». *The Journal of Clinical Investigation* 115 (3): 500-508. doi:10.1172/JCI24408.

Gordon, Grant R. J., Hyun B. Choi, Ravi L. Rungta, Graham C. R. Ellis-Davies, y Brian A. MacVicar. 2008. «Brain Metabolism Dictates the Polarity of Astrocyte Control over Arterioles». *Nature* 456 (7223): 745-49. doi:10.1038/nature07525.

Granger, Adam J., Yun Shi, Wei Lu, Manuel Cerpas, y Roger A. Nicoll. 2013. «LTP Requires a Reserve Pool of Glutamate Receptors Independent of Subunit Type». *Nature* 493 (7433): 495-500. doi:10.1038/nature11775.

Granger, Bradi B., Inger Ekman, Adrian F. Hernandez, Tenita Sawyer, Margaret Bowers, Tracy DeWald, Yanfang Zhao, Janet Levy, y Hayden B. Bosworth. 2015. «Results of the Chronic Heart Failure Intervention to Improve Medication Adherence (CHIME) Study: A Randomized Intervention in High-Risk Patients». *American heart journal* 169 (4): 539-48. doi:10.1016/j.ahj.2015.01.006.

Granger, D. Neil, y Peter R. Kvietys. 2015. «Reperfusion Injury and Reactive Oxygen Species: The Evolution of a Concept». *Redox Biology* 6 (diciembre): 524-51. doi:10.1016/j.redox.2015.08.020.

Guéraud, F., M. Atalay, N. Bresgen, A. Cipak, P. M. Eckl, L. Huc, I. Jouanin, W. Siems, y K. Uchida. 2010. «Chemistry and Biochemistry of Lipid Peroxidation Products». *Free Radical Research* 44 (10): 1098-1124. doi:10.3109/10715762.2010.498477.

Guo, Chunyan, Li Sun, Xueping Chen, y Danshen Zhang. 2013. «Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases». *Neural Regeneration Research* 8 (21): 2003-14. doi:10.3969/j.issn.1673-5374.2013.21.009.

Guo, Jessie Yanxiang, Bing Xia, y Eileen White. 2013. «Autophagy-Mediated Tumor Promotion». *Cell* 155 (6): 1216-19. doi:10.1016/j.cell.2013.11.019.

Gupta, Ramesh C. 2016. *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity*. Academic Press.

Haber, F., y J. Weiss. 1932. «Über die Katalyse des Hydroperoxydes». *Naturwissenschaften* 20 (diciembre): 948-50. doi:10.1007/BF01504715.

Hagberg, Henrik. 2004. «Mitochondrial Impairment in the Developing Brain After Hypoxia–Ischemia». *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 36 (4): 369-73. doi:10.1023/B:JOB.0000041770.00567.4f.

Halestrap, Andrew P., Samantha J. Clarke, y Igor Khaliulin. 2007. «The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1767 (8): 1007-31. doi:10.1016/j.bbabi.2007.05.008.

Halestrap, Andrew P., y Marieangela C. Wilson. 2012. «The Monocarboxylate Transporter Family--Role and Regulation». *IUBMB Life* 64 (2): 109-19. doi:10.1002/iub.572.

Hall, Gerrit van. 2010. «Lactate Kinetics in Human Tissues at Rest and during Exercise». *Acta Physiologica* 199 (4): 499-508. doi:10.1111/j.1748-1716.2010.02122.x.

Halliwell, B., y J. M. Gutteridge. 1995. «The Definition and Measurement of Antioxidants in Biological Systems». *Free Radical Biology & Medicine* 18 (1): 125-26.

Bibliografía

Hassell, K Jane, Mojgan Ezzati, Daniel Alonso-Alconada, Derek J Hausenloy, y Nicola J Robertson. 2015. «New horizons for newborn brain protection: enhancing endogenous neuroprotection». *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition* 100 (6): F541-52. doi:10.1136/archdischild-2014-306284.

Hay, W. W. 2000. «Pulse Oximetry: As Good as It Gets?» *Journal of Perinatology: Official Journal of the California Perinatal Association* 20 (3): 181-83.

Hay, W. W., J. M. Brockway, y M. Eyzaguirre. 1989. «Neonatal Pulse Oximetry: Accuracy and Reliability». *Pediatrics* 83 (5): 717-22.

Haydar, T. F., M. E. Blue, M. E. Molliver, B. K. Krueger, y P. J. Yarowsky. 1996. «Consequences of Trisomy 16 for Mouse Brain Development: Corticogenesis in a Model of Down Syndrome». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 16 (19): 6175-82.

Hooper, Stuart B., Arjan B. Te Pas, Justin Lang, Jeroen J. van Vonderen, Charles Christoph Roehr, Martin Kluckow, Andrew W. Gill, Euan M. Wallace, y Graeme R. Polglase. 2015. «Cardiovascular Transition at Birth: A Physiological Sequence». *Pediatric Research* 77 (5): 608-14. doi:10.1038/pr.2015.21.

Hoshino, Daisuke, Yuki Tamura, Hiroyuki Masuda, Yutaka Matsunaga, y Hideo Hatta. 2015. «Effects of decreased lactate accumulation after dichloroacetate administration on exercise training-induced mitochondrial adaptations in mouse skeletal muscle». *Physiological Reports* 3 (9). doi:10.14814/phy2.12555.

Hu, Yaozhong, Jing Liu, y He Huang. 2013. «Recent Agents Targeting HIF-1 α for Cancer Therapy». *Journal of Cellular Biochemistry* 114 (3): 498-509. doi:10.1002/jcb.24390.

Islam, Md Torequl. 2017. «Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction-Linked Neurodegenerative Disorders». *Neurological Research* 39 (1): 73-82. doi:10.1080/01616412.2016.1251711.

Jacobs, Susan E., Marie Berg, Rod Hunt, William O. Tarnow-Mordi, Terrie E. Inder, y Peter G. Davis. 2013. «Cooling for Newborns with Hypoxic Ischaemic Encephalopathy». *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, n.º 1 (enero): CD003311. doi:10.1002/14651858.CD003311.pub3.

Javadov, Sabzali A, Samantha Clarke, Manika Das, Elinor J Griffiths, Kelvin H H Lim, y Andrew P Halestrap. 2003. «Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart». *The Journal of Physiology* 549 (Pt 2): 513-24. doi:10.1113/jphysiol.2003.034231.

Johnston, Michael V., Ali Fatemi, Mary Ann Wilson, y Frances Northington. 2011. «Treatment Advances in Neonatal Neuroprotection and Neurointensive Care». *The Lancet. Neurology* 10 (4): 372-82. doi:10.1016/S1474-4422(11)70016-3.

Johnston, W. K., P. J. Unrau, M. S. Lawrence, M. E. Glasner, y D. P. Bartel. 2001. «RNA-Catalyzed RNA Polymerization: Accurate and General RNA-Templated Primer Extension». *Science (New York, N.Y.)* 292 (5520): 1319-25. doi:10.1126/science.1060786.

Jones, D. P. 2010. «Redox Sensing: Orthogonal Control in Cell Cycle and Apoptosis Signalling». *Journal of Internal Medicine* 268 (5): 432-48. doi:10.1111/j.1365-2796.2010.02268.x.

Jones, Dean P., Young-Mi Go, Corinna L. Anderson, Thomas R. Ziegler, Joseph M. Kinkade, y Ward G. Kirlin. 2004. «Cysteine/Cystine Couple Is a Newly Recognized Node in the Circuitry for Biologic Redox Signaling

Bibliografía

and Control». *The FASEB Journal* 18 (11): 1246-48. doi:10.1096/fj.03-0971fje.

Jones, Dean P., y Helmut Sies. 2015. «The Redox Code». *Antioxidants & Redox Signaling* 23 (9): 734-46. doi:10.1089/ars.2015.6247.

Juul, Sandra E., y Donna M. Ferriero. 2014. «Pharmacological neuroprotective strategies in neonatal brain injury». *Clinics in perinatology* 41 (1): 119-31. doi:10.1016/j.clp.2013.09.004.

Kadiiska, M. B., B. C. Gladen, D. D. Baird, D. Germolec, L. B. Graham, C. E. Parker, A. Nyska, et al. 2005. «Biomarkers of Oxidative Stress Study II: Are Oxidation Products of Lipids, Proteins, and DNA Markers of CCl4 Poisoning?» *Free Radical Biology & Medicine* 38 (6): 698-710. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.09.017.

Kalinowski, Leszek, Anna Janaszak-Jasiecka, Anna Siekierzycka, Sylwia Bartoszewska, Marcin Woźniak, Dawid Lejnowski, James F. Collawn, y Rafal Bartoszewski. 2016. «Posttranscriptional and Transcriptional Regulation of Endothelial Nitric-Oxide Synthase during Hypoxia: The Role of microRNAs». *Cellular & Molecular Biology Letters* 21 (1): 16. doi:10.1186/s11658-016-0017-x.

Kanold, Patrick O., y Heiko J. Luhmann. 2010. «The Subplate and Early Cortical Circuits». *Annual Review of Neuroscience* 33: 23-48. doi:10.1146/annurev-neuro-060909-153244.

Kapadia, Vishal S., Lina F. Chalak, John E. Sparks, James R. Allen, Rashmin C. Savani, y Myra H. Wyckoff. 2013. «Resuscitation of Preterm Neonates With Limited Versus High Oxygen Strategy». *Pediatrics* 132 (6): e1488-96. doi:10.1542/peds.2013-0978.

Kawahara, Tsukasa, Mark T Quinn, y J David Lambeth. 2007. «Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes». *BMC Evolutionary Biology* 7 (julio): 109. doi:10.1186/1471-2148-7-109.

Kirischuk, S., H. J. Luhmann, y W. Kilb. 2014. «Cajal-Retzius Cells: Update on Structural and Functional Properties of These Mystic Neurons That Bridged the 20th Century». *Neuroscience* 275 (septiembre): 33-46. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.06.009.

Kiserud, Torvid. 2005. «Physiology of the Fetal Circulation». *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 10 (6): 493-503. doi:10.1016/j.siny.2005.08.007.

Knobloch, Marlen, y Sebastian Jessberger. 2017. «Metabolism and Neurogenesis». *Current Opinion in Neurobiology* 42 (febrero): 45-52. doi:10.1016/j.conb.2016.11.006.

Knox, Renatta, Chong Zhao, Dario Miguel-Perez, Steven Wang, Jinwei Yuan, Donna Ferriero, y Xiangning Jiang. 2013. «Enhanced NMDA receptor tyrosine phosphorylation and increased brain injury following neonatal hypoxia–ischemia in mice with neuronal Fyn overexpression». *Neurobiology of Disease*, Mitochondrial dynamics and quality control in neuropsychiatric diseases, 51 (marzo): 113-19. doi:10.1016/j.nbd.2012.10.024.

Koh, Jae Young, y Dennis W. Choi. 1987. «Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay». *Journal of Neuroscience Methods* 20 (1): 83-90. doi:10.1016/0165-0270(87)90041-0.

Kuligowski, Julia, Marta Aguar, Denise Rook, Isabel Lliso, Isabel Torres-Cuevas, Javier Escobar, Guillermo Quintás, et al. 2015. «Urinary Lipid Peroxidation Byproducts: Are They Relevant for Predicting Neonatal

Bibliografía

Morbidity in Preterm Infants?» *Antioxidants & Redox Signaling* 23 (2): 178-84. doi:10.1089/ars.2015.6262.

Kuligowski, Julia, Javier Escobar, Guillermo Quintás, Isabel Lliso, Isabel Torres-Cuevas, Antonio Nuñez, Elena Cubells, Denise Rook, Johannes B. van Goudoever, y Máximo Vento. 2014. «Analysis of Lipid Peroxidation Biomarkers in Extremely Low Gestational Age Neonate Urines by UPLC-MS/MS». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406 (18): 4345-56. doi:10.1007/s00216-014-7824-6.

Kuligowski, Julia, Isabel Torres-Cuevas, Guillermo Quintás, Denise Rook, Johannes B. van Goudoever, Elena Cubells, Miguel Asensi, et al. 2014. «Assessment of Oxidative Damage to Proteins and DNA in Urine of Newborn Infants by a Validated UPLC-MS/MS Approach». *PLoS ONE* 9 (4). doi:10.1371/journal.pone.0093703.

Lafuente, Hector, Maria R. Pazos, Antonia Alvarez, Nagat Mohammed, Martín Santos, Maialen Arizti, Francisco J. Alvarez, y Jose A. Martinez-Orgado. 2016. «Effects of Cannabidiol and Hypothermia on Short-Term Brain Damage in New-Born Piglets after Acute Hypoxia-Ischemia». *Frontiers in Neuroscience* 10 (julio). doi:10.3389/fnins.2016.00323.

Lai, J. C., y J. P. Blass. 1984. «Neurotoxic Effects of Copper: Inhibition of Glycolysis and Glycolytic Enzymes». *Neurochemical Research* 9 (12): 1699-1710.

Lai, J. C., T. K. Leung, W. Marr, y L. Lim. 1980. «The Activity of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in Liver and Hypothalamus of the Female Rat: Effects of Administration of Ethinyloestradiol and the Progestogens Norethisterone Acetate and D-Norgestrel». *Biochemical Society Transactions* 8 (5): 606.

Lange, Diana L., y Adel A. Kader. 1997. «Elevated Carbon Dioxide Exposure Alters Intracellular pH and Energy Charge in Avocado Fruit Tissue». *Journal of the American Society for Horticultural Science* 122 (2): 253-57.

Lea, Charlotte L., Adam Smith-Collins, y Karen Luyt. 2017. «Protecting the Premature Brain: Current Evidence-Based Strategies for Minimising Perinatal Brain Injury in Preterm Infants». *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition* 102 (2): F176-82. doi:10.1136/archdischild-2016-311949.

Ledo, Ana, Alessandro Arduini, Miguel A. Asensi, Juan Sastre, Raquel Escrig, María Brugada, Marta Aguar, Pilar Saenz, y Maximo Vento. 2009. «Human Milk Enhances Antioxidant Defenses against Hydroxyl Radical Aggression in Preterm Infants». *The American Journal of Clinical Nutrition* 89 (1): 210-15. doi:10.3945/ajcn.2008.26845.

Lehtonen, Liisa, Ana Gimeno, Anna Parra-Llorca, y Máximo Vento. 2017. «Early Neonatal Death: A Challenge Worldwide». *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 22 (3): 153-60. doi:10.1016/j.siny.2017.02.006.

Li, Sijie, Adam Hafeez, Fatima Noorulla, Xiaokun Geng, Guo Shao, Changhong Ren, Guowei Lu, Heng Zhao, Yuchuan Ding, y Xunming Ji. s. f. «Preconditioning in neuroprotection: From hypoxia to ischemia». *Progress in Neurobiology*. doi:10.1016/j.pneurobio.2017.01.001.

Loft, Steffen, Pernille Danielsen, Mille Løhr, Kim Jantzen, Jette G. Hemmingsen, Martin Roursgaard, Dorina Gabriela Karotki, y Peter Møller. 2012. «Urinary Excretion of 8-Oxo-7,8-Dihydroguanine as Biomarker of Oxidative Damage to DNA». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 518 (2): 142-50. doi:10.1016/j.abb.2011.12.026.

Bibliografía

Lu, Shelly C. 2013. «Glutathione synthesis». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, Cellular functions of glutathione, 1830 (5): 3143-53. doi:10.1016/j.bbagen.2012.09.008.

Luhmann, Christian C. 2009. «Temporal Decision-Making: Insights from Cognitive Neuroscience». *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 3: 39. doi:10.3389/neuro.08.039.2009.

Luhmann, Heiko J. 2017. «Review of Imaging Network Activities in Developing Rodent Cerebral Cortex in Vivo». *Neurophotonics* 4 (3): 031202. doi:10.1117/1.NPh.4.3.031202.

Malavolti, Anna M, Vann Chau, Meisan Brown-Lum, Kenneth J Poskitt, Rollin Brant, Anne Synnes, Ruth E Grunau, y Steven P Miller. 2017. «Association between Corpus Callosum Development on Magnetic Resonance Imaging and Diffusion Tensor Imaging, and Neurodevelopmental Outcome in Neonates Born Very Preterm». *Developmental Medicine & Child Neurology* 59 (4): 433-40. doi:10.1111/dmcn.13364.

Maltepe, Emin, y Ola Didrik Saugstad. 2009a. «Oxygen in Health and Disease: Regulation of Oxygen Homeostasis--Clinical Implications». *Pediatric Research* 65 (3): 261-68. doi:10.1203/PDR.0b013e31818fc83f.

Marín, Oscar, y John L. R. Rubenstein. 2003. «Cell Migration in the Forebrain». *Annual Review of Neuroscience* 26: 441-83. doi:10.1146/annurev.neuro.26.041002.131058.

Marín-Padilla, Miguel. 2012. «The human brain intracerebral microvascular system: development and structure». *Frontiers in Neuroanatomy* 6 (septiembre). doi:10.3389/fnana.2012.00038.

Martinou, J. C., y D. R. Green. 2001. «Breaking the Mitochondrial Barrier». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2 (1): 63-67. doi:10.1038/35048069.

Matayatsuk, Chutima, Anne Poljak, Sonia Bustamante, George A. Smythe, Ruchaneekorn W. Kalpravidh, Pornpan Sirankapracha, Suthat Fucharoen, y Prapin Wilairat. 2007. «Quantitative Determination of Ortho- and Meta-Tyrosine as Biomarkers of Protein Oxidative Damage in Beta-Thalassemia». *Redox Report: Communications in Free Radical Research* 12 (5): 219-28. doi:10.1179/135100007X200272.

Matsui, Takashi, Hideki Omuro, Yu-Fan Liu, Mariko Soya, Takeru Shima, Bruce S. McEwen, y Hideaki Soya. 2017. «Astrocytic Glycogen-Derived Lactate Fuels the Brain during Exhaustive Exercise to Maintain Endurance Capacity». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (24): 6358-63. doi:10.1073/pnas.1702739114.

Mazumdar, Jolly, W. Timothy O'Brien, Randall S. Johnson, Joseph C. LaManna, Juan C. Chavez, Peter S. Klein, y M. Celeste Simon. 2010. «O₂ Regulates Stem Cells through Wnt/ β -Catenin Signalling». *Nature Cell Biology* 12 (10): 1007-13. doi:10.1038/ncb2102.

McCord, J. M. 1985. «Oxygen-Derived Free Radicals in Postischemic Tissue Injury». *The New England Journal of Medicine* 312 (3): 159-63. doi:10.1056/NEJM198501173120305.

Mergenthaler, Philipp, Ulrich Dirnagl, y Andreas Meisel. 2004. «Pathophysiology of Stroke: Lessons from Animal Models». *Metabolic Brain Disease* 19 (3-4): 151-67. doi:10.1023/B:MEBR.0000043966.46964.e6.

Millar, Lancelot J., Lei Shi, Anna Hoerder-Suabedissen, y Zoltán Molnár. 2017. «Neonatal Hypoxia Ischaemia: Mechanisms, Models, and

Bibliografía

Therapeutic Challenges». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11 (mayo). doi:10.3389/fncel.2017.00078.

Milosevic, Javorina, Martina Maisel, Florian Wegner, Julia Leuchtenberger, Roland H. Wenger, Manfred Gerlach, Alexander Storch, y Johannes Schwarz. 2007. «Lack of Hypoxia-Inducible Factor-1 α Impairs Midbrain Neural Precursor Cells Involving Vascular Endothelial Growth Factor Signaling». *Journal of Neuroscience* 27 (2): 412-21. doi:10.1523/JNEUROSCI.2482-06.2007.

Molnár, Gergo A., Vanda Nemes, Zolt Biró, Andrea Ludány, Zoltán Wagner, y István Wittmann. 2005. «Accumulation of the Hydroxyl Free Radical Markers Meta-, Ortho-Tyrosine and DOPA in Cataractous Lenses Is Accompanied by a Lower Protein and Phenylalanine Content of the Water-Soluble Phase». *Free Radical Research* 39 (12): 1359-66. doi:10.1080/10715760500307107.

Molnár, Zoltán, y Amanda F. P. Cheung. 2006. «Towards the classification of subpopulations of layer V pyramidal projection neurons». *Neuroscience Research* 55 (2): 105-15. doi:10.1016/j.neures.2006.02.008.

Molnár, Zoltán, y Gavin Clowry. 2012. «Cerebral Cortical Development in Rodents and Primates». *Progress in Brain Research* 195: 45-70. doi:10.1016/B978-0-444-53860-4.00003-9.

Molyneaux, Bradley J., Paola Arlotta, Joao R. L. Menezes, y Jeffrey D. Macklis. 2007. «Neuronal Subtype Specification in the Cerebral Cortex». *Nature Reviews. Neuroscience* 8 (6): 427-37. doi:10.1038/nrn2151.

Morgan, Philip E., David I. Pattison, y Michael J. Davies. 2012. «Quantification of Hydroxyl Radical-Derived Oxidation Products in Peptides Containing Glycine, Alanine, Valine, and Proline». *Free*

Radical Biology & Medicine 52 (2): 328-39.
doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.448.

Mosienko, Valentina, Anja G Teschemacher, y Sergey Kasparov. 2015. «Is L-Lactate a Novel Signaling Molecule in the Brain?» *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 35 (7): 1069-75.
doi:10.1038/jcbfm.2015.77.

Mulligan, Sean J., y Brian A. MacVicar. 2004. «Calcium Transients in Astrocyte Endfeet Cause Cerebrovascular Constrictions». *Nature* 431 (7005): 195-99. doi:10.1038/nature02827.

Murphy, Michael P. 2009. «How mitochondria produce reactive oxygen species». *Biochemical Journal* 417 (Pt 1): 1-13.
doi:10.1042/BJ20081386.

Nath, Sunil, y John Villadsen. 2015. «Oxidative Phosphorylation Revisited». *Biotechnology and Bioengineering* 112 (3): 429-37.
doi:10.1002/bit.25492.

«Neonatal Hypoxia Ischaemia: Mechanisms, Models, and Therapeutic Challenges». 2017. *PubMed Journals*. Accedido junio 30.
<https://ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/28533743/>.

Niatsetskaya, Zoya V., Sergei A. Sosunov, Dzmitry Matsiukevich, Irina V. Utkina-Sosunova, Veniamin I. Ratner, Anatoly A. Starkov, y Vadim S. Ten. 2012. «The Oxygen Free Radicals Originating from Mitochondrial Complex I Contribute to Oxidative Brain Injury Following Hypoxia–Ischemia in Neonatal Mice». *Journal of Neuroscience* 32 (9): 3235-44.
doi:10.1523/JNEUROSCI.6303-11.2012.

Niaudet, Colin, Stéphanie Bonnaud, Maëva Guillonneau, Sébastien Gouard, Marie-Hélène Gaugler, Soizic Dutoit, Natacha Ripoche, et al.

Bibliografía

2017. «Plasma Membrane Reorganization Links Acid Sphingomyelinase/Ceramide to p38 MAPK Pathways in Endothelial Cells Apoptosis». *Cellular Signalling* 33 (mayo): 10-21. doi:10.1016/j.cellsig.2017.02.001.

Nishida, Naoshi, y Masatoshi Kudo. 2013. «Oxidative Stress and Epigenetic Instability in Human Hepatocarcinogenesis». *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)* 31 (5-6): 447-53. doi:10.1159/000355243.

Nishimura, Akiyuki, Caroline Sunggip, Sayaka Oda, Takuro Numaga-Tomita, Makoto Tsuda, y Motohiro Nishida. 2017. «Purinergic P2Y Receptors: Molecular Diversity and Implications for Treatment of Cardiovascular Diseases». *Pharmacology & Therapeutics*, junio. doi:10.1016/j.pharmthera.2017.06.010.

Niwa, K., C. Haensel, M. E. Ross, y C. Iadecola. 2001. «Cyclooxygenase-1 Participates in Selected Vasodilator Responses of the Cerebral Circulation». *Circulation Research* 88 (6): 600-608.

Odeh, M. 1991. «The Role of Reperfusion-Induced Injury in the Pathogenesis of the Crush Syndrome». *The New England Journal of Medicine* 324 (20): 1417-22. doi:10.1056/NEJM199105163242007.

Oei, Ju Lee, Maximo Vento, Yacov Rabi, Ian Wright, Neil Finer, Wade Rich, Vishal Kapadia, et al. 2017. «Higher or Lower Oxygen for Delivery Room Resuscitation of Preterm Infants below 28 Completed Weeks Gestation: A Meta-Analysis». *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition* 102 (1): F24-30. doi:10.1136/archdischild-2016-310435.

Pallardo, F. V., J. Sastre, M. Asensi, F. Rodrigo, J. M. Estrela, y J. Viña. 1991. «Physiological Changes in Glutathione Metabolism in Foetal and

Newborn Rat Liver». *Biochemical Journal* 274 (3): 891-93. doi:10.1042/bj2740891.

Paredes, Mercedes F., David James, Sara Gil-Perotin, Hosung Kim, Jennifer A. Cotter, Carissa Ng, Kadellyn Sandoval, et al. 2016. «Extensive Migration of Young Neurons into the Infant Human Frontal Lobe». *Science* 354 (6308): aaf7073. doi:10.1126/science.aaf7073.

Pellerin, Luc. 2003. «Lactate as a pivotal element in neuron–glia metabolic cooperation». *Neurochemistry International*, Glutamine, Glutamate and GABA in the CNS: Transport and Metabolism in Health and Disease, 43 (4): 331-38. doi:10.1016/S0197-0186(03)00020-2.

Pérez, Salvador, Javier Pereda, Luis Sabater, y Juan Sastre. 2015. «Pancreatic Ascites Hemoglobin Contributes to the Systemic Response in Acute Pancreatitis». *Free Radical Biology & Medicine* 81 (abril): 145-55. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.008.

Perígolo-Vicente, Rafael, Karen Ritt, Mariana Rodrigues Pereira, Patrícia Maria Mendonça Torres, Roberto Paes-de-Carvalho, y Elizabeth Giestal-de-Araujo. 2013. «IL-6 treatment increases the survival of retinal ganglion cells in vitro: The role of adenosine A1 receptor». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 430 (2): 512-18. doi:10.1016/j.bbrc.2012.12.004.

Perlman, Jeffrey M., Jonathan Wyllie, John Kattwinkel, Myra H. Wyckoff, Khalid Aziz, Ruth Guinsburg, Han-Suk Kim, et al. 2015. «Part 7: Neonatal Resuscitation: 2015 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science With Treatment Recommendations (Reprint)». *Pediatrics* 136 Suppl 2 (noviembre): S120-166. doi:10.1542/peds.2015-3373D.

Bibliografía

Picard, Martin, y Bruce S. McEwen. 2014. «Mitochondria Impact Brain Function and Cognition». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (1): 7-8. doi:10.1073/pnas.1321881111.

Pinheiro, Daniel Faria de Campos, Belchor Fontes, John Kioshi Shimazaki, Ana Maria Cattani Heimbecker, Jacqueline de Fátima Jacysyn, Samir Rasslan, Edna Frasson de Souza Montero, y Edivaldo Massazo Utiyama. 2016. «Ischemic Preconditioning Modifies Mortality and Inflammatory Response». *Acta Cirurgica Brasileira* 31 (1): 1-7. doi:10.1590/S0102-865020160010000001.

Plank, Megan S., Teleka C. Calderon, Yayesh Asmerom, Danilo S. Boskovic, y Danilyn M. Angeles. 2011. «Biochemical Measurement of Neonatal Hypoxia». *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, n.º 54 (agosto). doi:10.3791/2948.

Poulsen, Henrik E., Laia Llovera Nadal, Kasper Broedbaek, Peter E. Nielsen, y Allan Weimann. 2014. «Detection and Interpretation of 8-oxodG and 8-oxoGua in Urine, Plasma and Cerebrospinal Fluid». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1840 (2): 801-8. doi:10.1016/j.bbagen.2013.06.009.

Prabhakar, Nanduri R., y Gregg L. Semenza. 2015. «Oxygen Sensing and Homeostasis». *Physiology (Bethesda, Md.)* 30 (5): 340-48. doi:10.1152/physiol.00022.2015.

Prauchner, Carlos André. 2017. «Oxidative Stress in Sepsis: Pathophysiological Implications Justifying Antioxidant Co-Therapy». *Burns* 43 (3): 471-85. doi:10.1016/j.burns.2016.09.023.

Pressler, Ronit, y Stéphane Auvin. 2013. «Comparison of Brain Maturation among Species: An Example in Translational Research Suggesting the Possible Use of Bumetanide in Newborn». *Frontiers in Neurology* 4 (abril). doi:10.3389/fneur.2013.00036.

Pryor, W. A. 1973. «Free Radical Reactions and Their Importance in Biochemical Systems». *Federation Proceedings* 32 (8): 1862-69.

Puente, Bao N., Wataru Kimura, Shalini A. Muralidhar, Jesung Moon, James F. Amatruda, Kate L. Phelps, David Grinsfelder, et al. 2014. «The Oxygen-Rich Postnatal Environment Induces Cardiomyocyte Cell-Cycle Arrest through DNA Damage Response». *Cell* 157 (3): 565-79. doi:10.1016/j.cell.2014.03.032.

Rabi, Yacov, Abhay Lodha, Amuchou Soraisham, Nalini Singhal, Keith Barrington, y Prakesh S. Shah. 2015. «Outcomes of Preterm Infants Following the Introduction of Room Air Resuscitation». *Resuscitation* 96 (noviembre): 252-59. doi:10.1016/j.resuscitation.2015.08.012.

Ranasinghe, Sumudu, Grace Or, Eric Y. Wang, Aiva Ievins, Merritt A. McLean, Cristopher M. Niell, Vann Chau, et al. 2015. «Reduced Cortical Activity Impairs Development and Plasticity after Neonatal Hypoxia Ischemia». *Journal of Neuroscience* 35 (34): 11946-59. doi:10.1523/JNEUROSCI.2682-14.2015.

Riske, Laurel, Rejish K. Thomas, Glen B. Baker, y Serdar M. Dursun. 2017. «Lactate in the Brain: An Update on Its Relevance to Brain Energy, Neurons, Glia and Panic Disorder». *Therapeutic Advances in Psychopharmacology* 7 (2): 85-89. doi:10.1177/2045125316675579.

Riviere, Daniel, Christopher J. D. McKinlay, y Frank H. Bloomfield. 2017. «Adaptation for Life after Birth: A Review of Neonatal Physiology». *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* 18 (2): 59-67. doi:10.1016/j.mpaic.2016.11.008.

Robertson, Laura, Phyllis Mushati, Jeffrey W. Eaton, Lovemore Dumba, Gideon Mavise, Jeremiah Makoni, Christina Schumacher, et al. 2013. «Effects of Unconditional and Conditional Cash Transfers on Child Health and Development in Zimbabwe: A Cluster-Randomised Trial».

Bibliografía

Lancet (London, England) 381 (9874): 1283-92. doi:10.1016/S0140-6736(12)62168-0.

Rodrigo, J., A. P. Fernández, J. Serrano, M. A. Peinado, y A. Martínez. 2005. «The role of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia». *Free Radical Biology and Medicine* 39 (1): 26-50. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.02.010.

Rook, Denise, Henk Schierbeek, Maximo Vento, Hester Vlaardingerbroek, Anne C. van der Eijk, Mariangela Longini, Giuseppe Buonocore, Javier Escobar, Johannes B. van Goudoever, y Marijn J. Vermeulen. 2014. «Resuscitation of Preterm Infants with Different Inspired Oxygen Fractions». *The Journal of Pediatrics* 164 (6): 1322-1326.e3. doi:10.1016/j.jpeds.2014.02.019.

Rossignol, Daniel A., y Richard E. Frye. 2014. «Evidence Linking Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Inflammation in the Brain of Individuals with Autism». *Frontiers in Physiology* 5: 150. doi:10.3389/fphys.2014.00150.

Salmaso, Natalina, Beata Jablonska, Joseph Scafidi, Flora M. Vaccarino, y Vittorio Gallo. 2014. «Neurobiology of Premature Brain Injury». *Nature Neuroscience* 17 (3): 341-46. doi:10.1038/nn.3604.

Sánchez-Illana, Ángel, Rønnaug Solberg, Isabel Lliso, Leonid Pankratov, Guillermo Quintás, Ola Didrik Saugstad, Máximo Vento, y Julia Kuligowski. 2017. «Assessment of phospholipid synthesis related biomarkers for perinatal asphyxia: a piglet study». *Scientific Reports* 7 (enero). doi:10.1038/srep40315.

Sanderson, Thomas H., Christian A. Reynolds, Rita Kumar, Karin Przyklenk, y Maik Hüttemann. 2013a. «Molecular Mechanisms of Ischemia-Reperfusion Injury in Brain: Pivotal Role of the Mitochondrial

Membrane Potential in Reactive Oxygen Species Generation». *Molecular Neurobiology* 47 (1): 9-23. doi:10.1007/s12035-012-8344-z.

Saugstad, Ola Didrik, Dagfinn Aune, Marta Aguar, Vishal Kapadia, Neil Finer, y Maximo Vento. 2014. «Systematic Review and Meta-Analysis of Optimal Initial Fraction of Oxygen Levels in the Delivery Room at ≤ 32 Weeks». *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)* 103 (7): 744-51. doi:10.1111/apa.12656.

Saugstad, Ola Didrik, Yngve Sejersted, Rønnaug Solberg, Embjørg J. Wollen, y Magnar Bjørås. 2012. «Oxygenation of the Newborn: A Molecular Approach». *Neonatology* 101 (4): 315-25. doi:10.1159/000337345.

Schafer, F. Q., y G. R. Buettner. 2001. «Redox Environment of the Cell as Viewed through the Redox State of the Glutathione Disulfide/Glutathione Couple». *Free Radical Biology & Medicine* 30 (11): 1191-1212.

Schieber, Michael, y Navdeep S. Chandel. 2014. «ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress». *Current Biology* 24 (10): R453-62. doi:10.1016/j.cub.2014.03.034.

Schneider, Bryan J., Shirish M. Gadgeel, Nithya Ramnath, Antoinette J. Wozniak, Grace K. Dy, Stephanie Daignault, y Gregory P. Kalemkerian. 2011. «Phase II Trial of Sunitinib Maintenance Therapy after Platinum-Based Chemotherapy in Patients with Extensive-Stage Small Cell Lung Cancer». *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 6 (6): 1117-20. doi:10.1097/JTO.0b013e31821529c3.

Seagroves, Tiffany N., Heather E. Ryan, Han Lu, Bradly G. Wouters, Merrill Knapp, Pierre Thibault, Keith Laderoute, y Randall S. Johnson. 2001. «Transcription Factor HIF-1 Is a Necessary Mediator of the

Bibliografía

Pasteur Effect in Mammalian Cells». *Molecular and Cellular Biology* 21 (10): 3436-44. doi:10.1128/MCB.21.10.3436-3444.2001.

Seelig, G. F., R. P. Simonsen, y A. Meister. 1984. «Reversible Dissociation of Gamma-Glutamylcysteine Synthetase into Two Subunits.» *Journal of Biological Chemistry* 259 (15): 9345-47.

Semenza, Gregg L. 2009. «Regulation of Oxygen Homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1». *Physiology* 24 (2): 97-106. doi:10.1152/physiol.00045.2008.

———. 2012. «Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine». *Cell* 148 (3): 399-408. doi:10.1016/j.cell.2012.01.021.

Semple, Bridgette D., Klas Blomgren, Kayleen Gimlin, Donna M. Ferriero, y Linda J. Noble-Haeusslein. 2013. «Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species». *Progress in Neurobiology* 106 (julio): 1-16. doi:10.1016/j.pneurobio.2013.04.001.

Sesso, Howard D., William G. Christen, Vadim Bubes, Joanne P. Smith, Jean MacFadyen, Miriam Schwartz, JoAnn E. Manson, Robert J. Glynn, Julie E. Buring, y J. Michael Gaziano. 2012. «Multivitamins in the Prevention of Cardiovascular Disease in Men: The Physicians' Health Study II Randomized Controlled Trial». *JAMA* 308 (17): 1751-60. doi:10.1001/jama.2012.14805.

Siddiqui, Maheen F, Clare Elwell, y Mark H Johnson. 2016. «Mitochondrial Dysfunction in Autism Spectrum Disorders». *Autism-open access* 6 (5). doi:10.4172/2165-7890.1000190.

Siew, Melissa L., Megan J. Wallace, Beth J. Allison, Marcus J. Kitchen, Arjan B. te Pas, M. Sirajul Islam, Robert A. Lewis, et al. 2013. «The Role of Lung Inflation and Sodium Transport in Airway Liquid Clearance

during Lung Aeration in Newborn Rabbits». *Pediatric Research* 73 (4-1): 443-49. doi:10.1038/pr.2012.197.

Sifringer, Marco, Ivo Bendix, Clarissa von Haefen, Stefanie Endesfelder, Alexander Kalb, Christoph Bührer, Ursula Felderhoff-Mueser, y Claudia D. Spies. 2013. «Oxygen Toxicity Is Reduced by Acetylcholinesterase Inhibition in the Developing Rat Brain». *Developmental Neuroscience* 35 (2-3): 255-64. doi:10.1159/000346723.

Simard, Sophie, Isabelle Rouleau, Julie Brosseau, Martine Laframboise, y Michel Bojanowsky. 2003. «Impact of Executive Dysfunctions on Episodic Memory Abilities in Patients with Ruptured Aneurysm of the Anterior Communicating Artery». *Brain and Cognition* 53 (2): 354-58.

Simmons, Rebecca A. 2006. «Developmental Origins of Diabetes: The Role of Oxidative Stress». *Free Radical Biology & Medicine* 40 (6): 917-22. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.12.018.

Simon, Gregory E., Evette J. Ludman, Jennifer A. Linde, Belinda H. Operskalski, Laura Ichikawa, Paul Rohde, Emily A. Finch, y Robert W. Jeffery. 2008. «Association between Obesity and Depression in Middle-Aged Women». *General Hospital Psychiatry* 30 (1): 32-39. doi:10.1016/j.genhosppsych.2007.09.001.

Šimonová, Zuzana, Katalin Štěrbová, Gustav Brožek, Vladimír Komárek, y Eva Syková. 2003. «Postnatal hypobaric hypoxia in rats impairs water maze learning and the morphology of neurones and macroglia in cortex and hippocampus». *Behavioural Brain Research* 141 (2): 195-205. doi:10.1016/S0166-4328(02)00366-2.

Solberg, Rønnaug, Jannicke H. Andresen, Raquel Escrig, Maximo Vento, y Ola Didrik Saugstad. 2007. «Resuscitation of Hypoxic Newborn Piglets with Oxygen Induces a Dose-Dependent Increase in

Bibliografía

Markers of Oxidation». *Pediatric Research* 62 (5): 559-63. doi:10.1203/PDR.0b013e318156e8aa.

Solberg, Rønnaug, Javier Escobar, Alessandro Arduini, Isabel Torres-Cuevas, Agustín Lahoz, Juan Sastre, Ola Didrik Saugstad, Máximo Vento, Julia Kuligowski, y Guillermo Quintás. 2013. «Metabolomic Analysis of the Effect of Postnatal Hypoxia on the Retina in a Newly Born Piglet Model». *PloS One* 8 (6): e66540. doi:10.1371/journal.pone.0066540.

Srinivasan, Satish, y Narayan G. Avadhani. 2012. «Cytochrome c Oxidase Dysfunction in Oxidative Stress». *Free Radical Biology & Medicine* 53 (6): 1252-63. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.07.021.

Stamati, Katerina, Vivek Mudera, y Umber Cheema. 2011. «Evolution of Oxygen Utilization in Multicellular Organisms and Implications for Cell Signalling in Tissue Engineering». *Journal of Tissue Engineering* 2 (1): 2041731411432365. doi:10.1177/2041731411432365.

Steinhorn, Robin H. 2010. «Neonatal Pulmonary Hypertension». *Pediatric Critical Care Medicine: A Journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies* 11 (2 Suppl): S79-84. doi:10.1097/PCC.0b013e3181c76cdc.

Takano, Takahiro, Guo-Feng Tian, Weiguo Peng, Nanhong Lou, Witold Libionka, Xiaoning Han, y Maiken Nedergaard. 2006. «Astrocyte-Mediated Control of Cerebral Blood Flow». *Nature Neuroscience* 9 (2): 260-67. doi:10.1038/nn1623.

Tarczyluk, Marta A, David A Nagel, John D O'Neil, H Rheinallt Parri, Erin HY Tse, Michael D Coleman, y Eric J Hill. 2013. «Functional Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle in a Human Stem Cell-Derived Neuronal

Network». *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 33 (9): 1386-93. doi:10.1038/jcbfm.2013.81.

Tataranno, M. L., J. L. Oei, S. Perrone, I. M. Wright, J. P. Smyth, K. Lui, W. O. Tarnow-Mordj, et al. 2015. «Resuscitating Preterm Infants with 100% Oxygen Is Associated with Higher Oxidative Stress than Room Air». *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)* 104 (8): 759-65. doi:10.1111/apa.13039.

Teramo, Kari A. 2010. «Obstetric Problems in Diabetic Pregnancy - The Role of Fetal Hypoxia». *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism* 24 (4): 663-71. doi:10.1016/j.beem.2010.05.005.

Terraneo, Laura, Rita Paroni, Paola Bianciardi, Toniella Giallongo, Stephana Carelli, Alfredo Gorio, y Michele Samaja. 2017. «Brain adaptation to hypoxia and hyperoxia in mice». *Redox Biology* 11 (abril): 12-20. doi:10.1016/j.redox.2016.10.018.

«The lactate receptor, G-protein-coupled receptor 81/hydroxycarboxylic acid receptor 1: Expression and action in brain - Morland - 2015 - Journal of Neuroscience Research - Wiley Online Library». 2017. Accedido junio 30. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jnr.23593/full>.

Tiskumara, R., S. H. Fakharee, C. Q. Liu, P. Nuntnarumit, K. M. Lui, M. Hammoud, J. K. F. Lee, et al. 2009. «Neonatal Infections in Asia». *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition* 94 (2): F144-148. doi:10.1136/adc.2008.139865.

Tolbert, N. E., y E. Essner. 1981. «Microbodies: Peroxisomes and Glyoxysomes». *The Journal of Cell Biology* 91 (3 Pt 2): 271s-283s.

Bibliografía

Tomita, Susumu, Lu Chen, Yoshimi Kawasaki, Ronald S. Petralia, Robert J. Wenthold, Roger A. Nicoll, y David S. Bredt. 2003. «Functional Studies and Distribution Define a Family of Transmembrane AMPA Receptor Regulatory Proteins». *The Journal of Cell Biology* 161 (4): 805-16. doi:10.1083/jcb.200212116.

Torres-Cuevas, Isabel, Miguel Aupi, Miguel Angel Asensi, Máximo Vento, Ángel Ortega, y Javier Escobar. 2017. «7,8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine/2'-deoxiguanosine Ratio Determined in Hydrolysates of Brain DNA by Ultrachromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry». *Talanta* 170 (agosto): 97-102. doi:10.1016/j.talanta.2017.03.072.

Torres-Cuevas, Isabel, Maria Cernada, Antonio Nuñez, Javier Escobar, Julia Kuligowski, Consuelo Chafer-Pericas, y Maximo Vento. 2016. «Oxygen Supplementation to Stabilize Preterm Infants in the Fetal to Neonatal Transition: No Satisfactory Answer». *Frontiers in Pediatrics* 4: 29. doi:10.3389/fped.2016.00029.

Torres-Cuevas, Isabel, Julia Kuligowski, María Cárcel, Consuelo Cháfer-Pericás, Miguel Asensi, Rønnaug Solberg, Elena Cubells, et al. 2016. «Protein-Bound Tyrosine Oxidation, Nitration and Chlorination by-Products Assessed by Ultrapformance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry». *Analytica Chimica Acta* 913 (marzo): 104-10. doi:10.1016/j.aca.2016.01.054.

Torres-Cuevas, Isabel, Anna Parra-Llorca, Angel Sánchez-Illana, Antonio Nuñez-Ramiro, Julia Kuligowski, Consuelo Cháfer-Pericás, María Cernada, Justo Escobar, y Máximo Vento. 2017. «Oxygen and oxidative stress in the perinatal period». *Redox Biology* 12 (marzo): 674-81. doi:10.1016/j.redox.2017.03.011.

Trachootham, Dunyaporn, Yan Zhou, Hui Zhang, Yusuke Demizu, Zhao Chen, Helene Pelicano, Paul J. Chiao, et al. 2006. «Selective Killing of Oncogenically Transformed Cells through a ROS-Mediated Mechanism

by Beta-Phenylethyl Isothiocyanate». *Cancer Cell* 10 (3): 241-52. doi:10.1016/j.ccr.2006.08.009.

Tsikis, Dimitrios. 2012. «Analytical Methods for 3-Nitrotyrosine Quantification in Biological Samples: The Unique Role of Tandem Mass Spectrometry». *Amino Acids* 42 (1): 45-63. doi:10.1007/s00726-010-0604-5.

Valko, Marian, Dieter Leibfritz, Jan Moncol, Mark T. D. Cronin, Milan Mazur, y Joshua Telser. 2007. «Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (1): 44-84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001.

Vannucci, R. C. 1990. «Experimental Biology of Cerebral Hypoxia-Ischemia: Relation to Perinatal Brain Damage». *Pediatric Research* 27 (4 Pt 1): 317-26. doi:10.1203/00006450-199004000-00001.

Vento, Máximo. 2014. «Oxygen Supplementation in the Neonatal Period: Changing the Paradigm». *Neonatology* 105 (4): 323-31. doi:10.1159/000360646.

Vento, Máximo, Marta Aguar, Javier Escobar, Alessandro Arduini, Raquel Escrig, María Brugada, Isabel Izquierdo, et al. 2009. «Antenatal Steroids and Antioxidant Enzyme Activity in Preterm Infants: Influence of Gender and Timing». *Antioxidants & Redox Signaling* 11 (12): 2945-55. doi:10.1089/ars.2009.2671.

Vento, Máximo, Miguel Asensi, Juan Sastre, Fernando García-Sala, Federico V. Pallardó, y José Viña. 2001. «Resuscitation With Room Air Instead of 100% Oxygen Prevents Oxidative Stress in Moderately Asphyxiated Term Neonates». *Pediatrics* 107 (4): 642-47.

Bibliografía

Vento, Máximo, Miguel Asensi, Juan Sastre, Ana Lloret, Fernando García-Sala, y José Viña. 2003. «Oxidative Stress in Asphyxiated Term Infants Resuscitated with 100% Oxygen». *The Journal of Pediatrics* 142 (3): 240-46.

Vento, Máximo, Javier Escobar, María Cernada, Raquel Escrig, y Marta Aguar. 2012. «The Use and Misuse of Oxygen during the Neonatal Period». *Clinics in Perinatology* 39 (1): 165-76. doi:10.1016/j.clp.2011.12.014.

Vento, Máximo, Juan Sastre, Miguel A. Asensi, y José Viña. 2005. «Room-Air Resuscitation Causes Less Damage to Heart and Kidney than 100% Oxygen». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 172 (11): 1393-98. doi:10.1164/rccm.200412-1740OC.

Vento, Máximo, y Kari Teramo. 2013. «Evaluating the Fetus at Risk for Cardiopulmonary Compromise». *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 18 (6): 324-29. doi:10.1016/j.siny.2013.08.003.

Vergeade, Aurélia, Paul Mulder, Cathy Vendeville, Renée Ventura-Clapier, Christian Thuillez, y Christelle Monteil. 2012. «Xanthine Oxidase Contributes to Mitochondrial ROS Generation in an Experimental Model of Cocaine-Induced Diastolic Dysfunction». *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 60 (6): 538-43. doi:10.1097/FJC.0b013e318271223c.

Vijay, Nisha, y Marilyn E. Morris. 2014. «Role of Monocarboxylate Transporters in Drug Delivery to the Brain». *Current Pharmaceutical Design* 20 (10): 1487-98.

«Vitexin Protects Against Hypoxic-Ischemic Injury via Inhibiting Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II and Apoptosis Signaling in the Neonatal Mouse Brain». 2017. *PubMed*

Journals. Accedido junio 30.
<https://ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/28424420/>.

Wagenführ, Lisa, Anne K. Meyer, Lena Braunschweig, Lara Marrone, y Alexander Storch. 2015. «Brain Oxygen Tension Controls the Expansion of Outer Subventricular Zone-like Basal Progenitors in the Developing Mouse Brain». *Development (Cambridge, England)* 142 (17): 2904-15. doi:10.1242/dev.121939.

Wallin, Ulf, Per Kronovall, y Marie-Louise Majewski. 2000. «Body Awareness Therapy in Teenage Anorexia Nervosa: Outcome after 2 Years». *European Eating Disorders Review* 8 (1): 19-30. doi:10.1002/(SICI)1099-0968(200002)8:1<19::AID-ERV329>3.0.CO;2-K.

Wang, Casey L., Christina Anderson, Tina A. Leone, Wade Rich, Balaji Govindaswami, y Neil N. Finan. 2008. «Resuscitation of Preterm Neonates by Using Room Air or 100% Oxygen». *Pediatrics* 121 (6): 1083-89. doi:10.1542/peds.2007-1460.

Wang, Z. M., R. N. Pierson, y S. B. Heymsfield. 1992. «The Five-Level Model: A New Approach to Organizing Body-Composition Research». *The American Journal of Clinical Nutrition* 56 (1): 19-28.

Whiteman, Matthew, y Jeremy P. E. Spencer. 2008. «Loss of 3-chlorotyrosine by inflammatory oxidants: Implications for the use of 3-chlorotyrosine as a bio-marker in vivo». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 371 (1): 50-53. doi:10.1016/j.bbrc.2008.03.153.

Wierenga, Lara, Marieke Langen, Sara Ambrosino, Sarai van Dijk, Bob Oranje, y Sarah Durston. 2014. «Typical development of basal ganglia, hippocampus, amygdala and cerebellum from age 7 to 24».

Bibliografía

NeuroImage 96 (agosto): 67-72.
doi:10.1016/j.neuroimage.2014.03.072.

Yngve Sejersted. 2017. «Accumulation of 8-Oxoguanine in Liver DNA During Hyperoxic Resuscitation of Newborn Mice». *PubMed Journals*. junio 30. <https://ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/19668103/>.

Zhao, Chunmei, Wei Deng, y Fred H. Gage. 2008. «Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis». *Cell* 132 (4): 645-60. doi:10.1016/j.cell.2008.01.033.

Zhao, Mingyi, Ping Zhu, Masayuki Fujino, Jian Zhuang, Huiming Guo, IdrisAhmed Sheikh, Lingling Zhao, y Xiao-Kang Li. 2016. «Oxidative Stress in Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies». *International Journal of Molecular Sciences* 17 (12). doi:10.3390/ijms17122078.

Zonta, Micaela, María Cecilia Angulo, Sara Gobbo, Bernhard Rosengarten, Konstantin-A. Hossmann, Tullio Pozzan, y Giorgio Carmignoto. 2003. «Neuron-to-Astrocyte Signaling Is Central to the Dynamic Control of Brain Microcirculation». *Nature Neuroscience* 6 (1): 43-50. doi:10.1038/nn980.