

- Daño cerebral por asfisia perinatal.**Cuando la ciencia básica debe darle un respiro a los pediatras.**

Dra. Alicia Seltzer
Investigador Adjunto CONICET
IHEM (Instituto de Histología y Embriología)
Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Cuyo
Mendoza

Introducción
Planteo del problema
Mecanismos moleculares
Nuestro aporte
Situación actual respecto a diagnóstico y terapéutica
Determinaciones bioquímicas
Conclusiones y futuro

Un episodio de asfisia intrauterina en el infante prematuro o en el nacido a término puede generar lesiones cerebrales a largo plazo, que muchas veces resultan devastadoras. Muchos de estos eventos ocurren casi inadvertidos, y en general son muy difíciles de diagnosticar. Debido a que el daño se ejerce sobre un tejido que aún está en formación, es bastante complejo determinar el pronóstico de dichas lesiones, ya que es muy probable que los mecanismos de reparación y neuroprotección se mimeticen con los normales de crecimiento y desarrollo. Es por eso que en muchos casos estos eventos aparentemente no dejan secuelas visibles en relación a funciones fisiológicas básicas, aunque resulta más complejo descartar alteraciones de funciones cognitivas superiores o de aquellas que demandan regiones altamente especializadas del sistema nervioso. Du Plessis 2002.

Los esfuerzos actualmente se orientan hacia la determinación de los eventos moleculares que se desencadenan desde el momento de la lesión hasta que ocurre la muerte celular. De este modo se podrá determinar la "ventana terapéutica" que posibilitará intervenciones más efectivas y de menor riesgo. Del mismo modo, se podrán encontrar tratamientos más específicos y desarrollar drogas que interfieran con los agentes que producen el deterioro celular. Lo ideal sería encontrar el modo de interferir con los mecanismos de muerte celular retardada, que son los que son desencadenados por lesiones de tipo hipóxico-isquémico, y otras similares que exacerban los efectos excitotóxicos del ácido glutámico. Para encarar este problema, hemos recurrido a la hormesis, un fenómeno cuyo conocimiento se generó en el S. XIX cuando Schultz (Ref. en Bukowski y col.) observó que muchos compuestos químicos estimulan el crecimiento de bacterias a dosis bajas, pero inhiben su crecimiento a dosis altas. En la actualidad este concepto evolucionó en el sentido de considerar hormesis a los efectos beneficiosos de las dosis bajas de cualquier sustancia potencialmente tóxica. Información más reciente indica que este fenómeno se aplica también no solo para los organismos inferiores, sino también para los tejidos de los mamíferos (Bukowski y Lewis, 2000). Entre los varios ejemplos que demuestran este fenómeno, hay uno que nos interesa explorar especialmente y es el de la capacidad adaptativa que tienen los tejidos a los efectos de una injuria.

La hipoxia moderada o la isquemia transitoria son capaces de ejercer esa capacidad. La tolerancia a las lesiones puede ser desarrollada por efecto del estrés subletal. Este estímulo preconditionante inicial puede desencadenar una cascada de mecanismos adaptativos endógenos, resultando en el desarrollo de tolerancia. Dependiendo de la naturaleza del estímulo preconditionante, la tolerancia retardada es iniciada durante varias horas y puede persistir durante varios días. En el cerebro, la tolerancia a la injuria isquémica ha sido demostrada después de hipertermia subletal (Ota y col., 2000), hipotermia (Nishio y col., 2000), isquemia subletal breve (Simon y col., 1993), depresión diseminada (spreading depression) (Kobayashi y col., 1995) y exposición a inhibidores metabólicos

(Wiegand y col,1999). También se observó que la hipoxia induce tolerancia a las lesiones cerebrales tanto in vitro como in vivo. De este modo, la exposición previa a una hipoxia protege a las neuronas en cultivo contra la privación de oxígeno-glucosa (Bruer y col, 1997). El acondicionamiento (PCon) hipóxico también previene el daño neuronal y las convulsiones asociadas con la administración de kainato en la rata adulta (Emerson y col, 2000) y reduce la lesión hipóxico-isquémica en las ratas neonatas (Brucklacher RM y col 2002, Miller y col, 2001). Los mecanismos de neuro-protección ejercidos por el PCon son un tema de gran interés en la actualidad.

Los mecanismos de PCon fueron descritos originalmente en el tejido cardíaco y luego en el cerebro inmaduro . PCon neuronal por isquemia se demostró que ocurre in vivo (Kitagawa y col., 90), en cortes de cerebro (Schurr y col, 1986) y en células en cultivo (Khaspekov y col, 1998) y el PCon por hipoxia en la rata inmadura, ante lesiones por hipoxia-isquemia, aunque ampliamente mencionados, aún no han sido totalmente dilucidados (Vanucci y col,1998).

Entre los mecanismos que han sido sugeridos como responsables del PCon cerebral están: una disminución de las células apoptóticas , fenómeno que ya había sido observado en el riñón y en el corazón; aumento de la tolerancia tisular a la anoxia por prevención del agotamiento de ATP y fosfocreatina y del gasto energético. En este mecanismo estarían involucrados también el óxido nítrico, Bcl-2 y Bcl-xl y el factor inducible de la hipoxia ó factor-1 (HIF-1), como inductor de eritropoyetina, que tiene capacidad neuroprotectora. (Cantagrel S, y col, 2003).

En nuestro laboratorio hemos encontrado que la hipoxia no afecta el número de neuronas Tiroxina Hidroxilasa positivas de la Substantia Nigra (SN) pero si esta se aplica previamente a una lesión de tipo excitotóxica, hay una disminución de neuronas dopaminérgicas (Ezquer y Seltzer, 2003). En estudios posteriores observamos que después de una hipoxia moderada y transitoria, ejercida sobre el animal neonato se produce una disminución significativa de la expresión del factor de crecimiento IGF-1 ($p<0.05$); y de las proteínas asociadas a IGF, BP3 ($p<0.05$) y BP5 ($p<0.05$) respecto del control, 24h después de la hipoxia, en el Cuerpo Estriado, una región del cerebro involucrada en el control del movimiento. En la SN encontramos un aumento significativo de la expresión de las sintasas del Oxido Nítrico, enzimas responsables de su síntesis de origen endotelial: eNos ($p<0.05$) 5h post hipoxia; neuronal: nNos e inducible: iNos ($p<0.05$) 48h después de la hipoxia. Este cambio se vio acompañado por un aumento de la inmunoreactividad de iNos ($p<0.05$) y de GFAP ($p<0.005$) 48h post hipoxia en la SN; esto último confirmado por inmunohistoquímica. GFAP es una proteína marcadora de astroglia activada, elementos claves indicadores de procesos inflamatorios en el tejido nervioso. A partir de estos hallazgos, concluimos que un episodio temprano de hipoxia desencadena una respuesta inflamatoria en la SN y un freno en la expresión de factores de crecimiento en el Cuerpo Estriado.

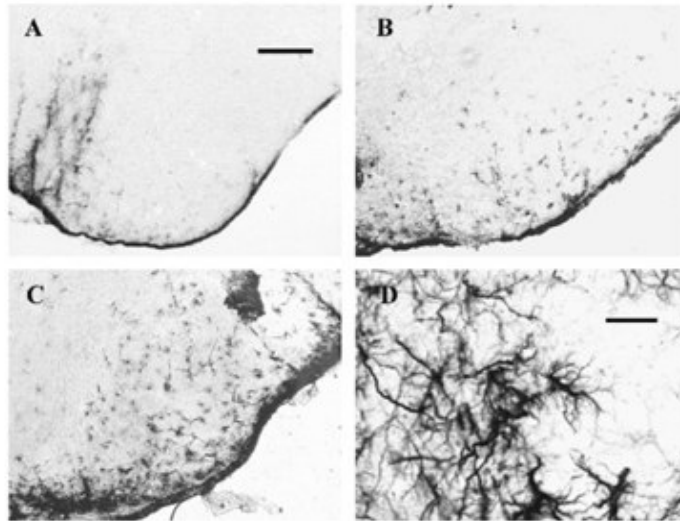
En otros estudios, encontramos que la hipoxia moderada en crías de rata al cuarto día postnatal, induce un aumento de la concentración de lactato sérico($p< 0.001$) . La hipoxia en la rata de 4 días de edad es un modelo experimental que reproduce el grado de madurez del tejido nervioso del feto humano durante el tercer trimestre del embarazo. La intensidad de la lesión histológica fue menor cuando se aplicó la Hipoxia 24 h antes de una lesión hipóxico-isquémica, y esta mejoría se vio reflejada en una disminución de la concentración de lactato. También encontramos que el GAP43, una proteína involucrada en el crecimiento de los axones y en la arborización de las neuritas, está aumentada ($p< 0.05$) en el cuerpo estriado a la semana posterior a la hipoxia y no pudimos demostrar una alteración en la memoria (retención) a los 40 días de edad en los animales hipoxiados, aunque una subpoblación de estos demostró ser hipoactiva. Concluimos que la hipoxia global aguda puede actuar como PCon, generando un estímulo neurogénico transitorio en determinadas áreas cerebrales, favoreciendo los procesos de reparación de los tejidos y que estas acciones serían efectivas solo entre las 24 y 48 previas a una lesión isquémica.

En experimentos adicionales confirmamos que los procesos sinápticos que sufrieron modificaciones por causa de la injuria, rápidamente retornaron a sus patrones normales. No

podemos asumir las consecuencias a largo plazo de estos eventos, que entre otras podrían ser la formación de sinapsis anómalas, y de acuerdo con otros autores, opinamos que en el cerebro inmaduro existe una interfase crítica entre los mecanismos de desarrollo normal y los de recomposición de tejido dañado por causas exógenas. En conjunto estos resultados indican que un episodio agudo de hipoxia en una etapa temprana de la vida exacerbaría la plasticidad normal del tejido nervioso en desarrollo. Por lo tanto, se entiende la importancia de desarrollar fármacos que reproduzcan del modo más preciso, las acciones horméticas de la hipoxia, tratando de evitar las que puedan exacerbar los mecanismos de destrucción tisular.

Sin duda estos mecanismos aún son entendidos en forma muy parcial y los esfuerzos deben ser enfocados en profundizar los conocimientos en este tema, sin olvidarnos de la finalidad principal que es la búsqueda de terapias adecuadas para tratar y prevenir al infante prematuro y en riesgo de sufrir asfixia perinatal.

Desde el punto de vista clínico, no es fácil diagnosticar la asfixia del feto, así como tampoco se puede determinar con exactitud la gravedad de los episodios de hipoxia que pueden ocurrir en el período inmediato después del nacimiento. Sin duda, este período es crítico para la toma de decisiones que influirán sobre el resto de la vida del paciente y de su familia. De allí la importancia de conocer a fondo ambos mecanismos, así sean los que llevan a la lesión y daño tisular como los que ejercen neuroprotección y reparación celular. Lamentablemente, hasta el presente son aún escasas las estrategias terapéuticas que pueden optar los pediatras para prevenir o aminorar las consecuencias de la asfixia perinatal y además con el agravante de que la llamada ventana terapéutica en estos casos, es muy breve, por lo que se acrecienta la importancia de desarrollar métodos diagnósticos y pronósticos más precisos y que puedan ser aplicados con celeridad. Aparte de los métodos diagnósticos por neuroimagen, que no siempre están al alcance de cualquier práctica asistencial, en un futuro no muy lejano, el bioquímico clínico podría aportar información útil a esta problemática mediante una batería de análisis que determinarían la presencia de proteínas relativamente específicas de las células cerebrales y que son liberadas al líquido cefalorraquídeo, sangre y orina por efecto de la asfixia. La utilidad clínica de la determinación de estas proteínas estará dada en la medida de que sus niveles se correlacionen con la severidad del insulto. Además, si se determina el patrón temporal de la presencia de las mismas durante las lesiones, se obtendría información acerca de cuándo ocurrió la asfixia y su evolución posterior. En un trabajo reciente realizado en infantes recién nacidos se determinaron los niveles séricos de creatina kinasa cerebral (CKBB), una isoenzima de la creatina kinasa presente en neuronas y astrogliá, y de la proteína S100, presente en la neuroglia y en algunas otras células extracerebrales. Ambas proteínas estaban elevadas significativamente a las 2 h de vida de los infantes que sufrieron asfixia, mientras que otra enzima, la enolasa neuronal, en estos mismos pacientes, no sufrió cambios durante un período de más de 6 h post asfixia (Nagdyman N, y col.2001). La combinación de estos datos de laboratorio, con otros parámetros que obtiene el pediatra, como por ejemplo los valores de pH, pO₂ y pCO₂ de la sangre del cordón umbilical, y el índice de Apgar, podrían reforzar ampliamente el arsenal que este dispone para afrontar una crisis en pacientes tan preciados. El reconocimiento de nuevos marcadores proteicos, de fácil acceso y determinación, sin duda constituirá un aporte de valor incalculable en este campo de la medicina.



Colaboraron en la realización de este trabajo: Susana Valdez (Bqca.), Marcelo Ezquer (Biol. Molec.), María Cristina Lama (Prof. Ciencias Nat.).
(Svaldez@lab.cricyt.edu.ar) (mezquer@lab.cricyt.edu.ar)

Dra. Alicia Seltzer
Investigador Adjunto CONICET
aseltzer@fcm.uncu.edu.ar

Alicia M Seltzer, Investigadora Adjunta de CONICET, Argentina. Doctorado en la Universidad Nacional de San Luis. Formación Post Doctoral en la Section on Pharmacology of the National Institutes of Mental Health, Bethesda, MD USA. Directora del Laboratorio de Neurobiología Molecular del Instituto de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo.

[Http://www.fcm.uncu.edu.ar/5-Investigacion/ihem/IHEM-Espaniol/png-principales/lab-selzer.htm](http://www.fcm.uncu.edu.ar/5-Investigacion/ihem/IHEM-Espaniol/png-principales/lab-selzer.htm)

Activación de la glía en la hipoxia neonatal identificada por inmuno-histoquímica utilizando el anticuerpo GFAP. A) Distribución de astrocitos en la sustancia nigra de ratas control de 9 días de edad. B,C) sustancia nigra de una rata hipoxiada a las 48 h de reperusión. D) magnificación mostrando astrocitos reactivos (48 h post hipoxia). Barra de escala: A=200µm; D=50µm.