

# Estrés oxidativo en el recién nacido con distress respiratorio tratado con oxígeno terapia ambiental

Oxidative stress in the term newborn infant with respiratory distress treated with room oxygen

VENTO, M. \*; GARCÍA-SALA, F. \*\*; ASENSI, M. y VIÑA, J. \*\*\*

## RESUMEN

Se ha estudiado la repercusión de la administración de oxígeno durante los primeros 3 días de vida posnatal a recién nacidos de más de 35 semanas de gestación aquejados de distress respiratorio por taquipnea transitoria neonatal (grupo C). Se han realizado determinaciones en sangre total de glutatión reducido (GSH), oxidado (GSSG), cociente GSH/GSSG, superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa y la Capacidad Antioxidante Total (CAT) medida en equivalentes Trolox. La presencia de lesión celular se han evaluado midiendo enzimas intracelulares como ALT, AST, LDH y especialmente Creatinkinasa. Los resultados obtenidos se han comparado con un grupo de fetos (grupo A) en los que se ha hecho la determinación previa a la separación del cordón umbilical de la placenta y con recién nacidos normales sin distress a los 3 días de vida (grupo B). Los resultados indican una tendencia al stress oxidativo (reducción del cociente GSH/GSSG) por incremento del denominador (GSSG) muy significativa por el simple tránsito fetal-neonatal (Grupo A versus B) y un grado mayor de afectación por la administración de suplementos de oxígeno (A versus C; B versus C). También se constata una respuesta moderada de la actividad de las enzimas antioxidantes y de la CAT. El recién nacido parece tener un retraso en la adaptación a la respiración aérea pulmonar en los días inmediatos al parto y es especialmente sensible al incremento de la fracción inspiratoria de oxígeno.

**Palabras clave:** Óxigenoterapia. Distrés respiratorio.

## ABSTRACT

We have studied the effects of oxygen administration to newborn infants older than 35 weeks of gestational age suffering from respiratory distress due to Transient Tachypnea (Group C) during their first three days of postnatal life. Following analytical determinations have been made in whole peripheral blood: GSH, GSSG, quotient GSH/

\* Departamento de Pediatría y Radioterapia, Universidad de Alicante. Facultad de Medicina. Carretera Valencia s/n. 03550. San Juan. Alicante.

\*\* Hospital Virgen del Consuelo. Calle Callosa de Ensarriá 12. 46007. Valencia.

\*\*\* Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad de Valencia. Avda. Blasco Ibáñez, 17. 46010. Valencia.

GSSG, Superoxide Dismutase, Catalase, Glutathione Peroxidase and Total Antioxidant Capacity (TAC) measured as Trolox Equivalents. Presence of cellular damage has been evaluated measuring intracellular enzymes such as ALT, AST, LDH and Creatinkinase. Results obtained have been compared with a match group of normal newborn babies before birth (Group A) and three days after birth (Group B). Results obtained show a very significant tendency towards oxidative stress (GSH/GSSG quotient reduction) caused just by the fetal-to-neonatal transition (A versus B); pro-oxidation is even greater when newborns are receiving oxygen supplementations (A versus C). We have found only a moderate response of antioxidant enzymes activity and of the TAC. Newborn infants seem to have a delay in their adaptation to aereal lung respiration in the first days after delivery and are especially to increments in the inspiratory fraction of oxygen.

**Key words:** Oxygentherapy. Respiratory distress.

Recibido: 28-11-96.

Aceptado: 13-12-96.

BIBLID [0004-2927(1996) 37:4; 997-1004]

## INTRODUCCIÓN

La maduración del sistema antioxidante en el feto humano es paralela a la del sistema surfactante pulmonar completándose entre las 34 y 36 semanas de vida posconcepcional (1), e indicando al menos desde un punto de vista teleológico la adaptación del nuevo ser a la vida extrauterina donde el intercambio gaseoso dejará de ser transplacentario para ser transalveolar lo que implica una llegada masiva de oxígeno a los tejidos del recién nacido.

En animales de experimentación sin embargo, hemos podido comprobar la presencia de un estrés oxidativo, entendido como un disbalance entre la capacidad pro-oxidante y antioxidante de la célula en favor de la primera (2), acompañando a la transición de la vida intrauterina a la extrauterina (3). Para medir el estrés oxidativo celular se procedió al análisis de la relación entre el glutatión reducido (GSH) y el glutatión oxidado (GSSG) en los hepatocitos aislados de fetos y de ratas recién nacidas (3) utilizando modificaciones metodológicas previas a la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) que permitían la estabilización inmediata en la muestra del GSH mediante la adición de N-etilmaleimida para evitar su rápida oxidación a GSSG que modificaría de forma sensible el cociente GSH/GSSG (4). El estudio de los enzimas del sistema de oxidorreducción del glutatión, es decir, glutatión peroxidasa, reductasa y S-transferasa confirmó los hallazgos del estatus del glutatión. De los resultados obtenidos se dedujo la presencia de un estrés oxidativo significativo en la transición fetal —neonatal— adultos en ratas que parecía indicar que hasta pasados varios días después del nacimiento no se

producía una adaptación total del sistema antioxidante intracelular a una atmósfera aérea y a una respiración pulmonar (3).

En un trabajo posterior con un planteamiento similar, procedimos a administrar un precursor del glutation, la N-Acetyl-Cisteina (NAC) a un grupo de ratas gestantes durante el embarazo y pudimos comprobar como los fetos de las camadas que habían recibido NAC mostraban niveles hepáticos de GSSG significativamente inferiores a los del grupo de control y por lo tanto mejoraban su cociente GSH/GSSG indicando una mejor adaptación al estrés oxidativo provocado por la transición fetal-neonatal-adulto (5).

El paso siguiente supuso la realización de un estudio similar en recién nacidos humanos al término de su embarazo (38-42 semanas de gestación) (6). El análisis de los enzimas de oxidorreducción del glutation y el cociente GSH/GSSG volvió a corroborar la presencia de un estrés oxidativo similar al descrito en animales de experimentación en el recién nacido maduro por el hecho de transitar de la vida intratuterina a la extrauterina. Es más incluso la evaluación del nivel plasmático de enzimas intracelulares (ALT, AST, LDH, Creatinkinasa) como evidencia directa de la presencia de un daño celular o la alteración de la capacidad antioxidante total según método descrito por Miller y colaboradores (7).

El objetivo de este último trabajo ha sido evaluar la repercusión en forma de estrés oxidativo en el recién nacido humano a término ante una situación de distress respiratorio neonatal leve a moderado y sin patología pulmonar estructural (S. de Avery) pero que conlleva un incremento del trabajo respiratorio en una atmósfera enriquecida con oxígeno.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Los pacientes estudiados han sido recién nacidos normales (sin malformaciones congénitas) nacidos tras embarazos de más de 35 semanas en la Maternidad de nuestro hospital.

Se han dividido en tres grupos: Grupo A en el que se ha procedido a una primera determinación basal mediante extracción de sangre en cordón umbilical previo el desprendimiento de la placenta, considerándose este grupo como control fetal. A las 72 horas de vida se han hecho determinaciones en sangre venosa periférica a un Grupo B formado por recién nacidos normales respirando aire ambiental y a un grupo C formado por recién nacidos afectados de distress respiratorio que han recibido suplementos de oxígeno (FiO<sub>2</sub>:0.35-0.4) como mínimo durante un período equivalente a 72 hrs.

Los tres grupos han presentado una edad de gestación, peso, y valoración de Apgar estadísticamente uniformes. El grupo C ha presentado una frecuencia respiratoria, cardíaca, valores de gases en sangre y saturación de oxígeno

de la hemoglobina medida por pulsoximetría significativamente distinta a la del grupo B y que no se detallan en este trabajo por las características de la publicación.

La determinación del glutatión reducido (GSH) se ha efectuado por el método de la glutatión-S-transferasa descrito por Brigelius et al (8). Brevemente, la reacción entre el clorodinitrobenzeno y el GSH en medio de bufer de fosfato potásico 0.1M, catalizada por la glutatión-S-transferasa y seguida a 340 nm. Este método es específico para la GSH dada la especificidad de la glutatión-S-transferasa por el glutatión.

El glutatión oxidado (GSSG) se ha determinado mediante HPLC (4). Las muestras de sangre se trataban con una mezcla de 0.5 ml de ácido perclórico helado (PCA) (12%) conteniendo N-etil-maleimida (NEM) 40 mM y 2 mM de ácido disulfónico de batofenantrolina. A continuación se derivatizaban las muestras de la siguiente forma: 50 µl de una solución interna estándar (1 mM de g-glutamylglutamato preparado en 0.3% de PCA) se añadían a 500 µl del sobrenadante ácido. Diez microlitros de una solución indicadora del pH (1mM m-cresol púrpura) y se neutralizaban las muestras hasta un pH de 8.0-8.5 con hidróxido de potasio 2M conteniendo ácido propanosulfónico 3-(N-morfolino) (MOPS) para prevenir una excesiva alcalinización. A continuación se centrifugaban las muestras a 15.000 g durante 5 minutos y una alícuota de 25 µl se colocaba en un tubo de cristal con 50 µl de 1-fluoro-2,4 dinitrobenzeno al 1% disuelto en etanol. Después de 45 minutos de incubación en oscuridad a temperatura ambiente, las muestras derivatizadas eran completamente disecadas al vacío. Tras la derivatización se almacenaban en la oscuridad a -20°C hasta su inyección. Las muestras así almacenadas son estables durante varias semanas. Las muestras eran finalmente disueltas en 50 µl de metanol al 80% (fase móvil A) y 25 µl eran inyectados en el HPLC. Nuestro sistema es un Waters Associates HPLC System® consistente en dos bombas 510, un detector de absorbancia 441 y un IBM PC XT 286. Se utilizó una columna Spherisorb® NH2 (20 x 0.4 cm). El ritmo de flujo fue de 1 ml/minuto durante el gradiente. La fase móvil y el gradiente fueron los mismos que los descritos previamente por Fariss y Reed (9). El solvente A era metanol al 80% y el solvente B acetato de sodio 0.5M en metanol al 64%. Tras la inyección de la muestra derivatizada la fase móvil se mantenía a un 80% de A, 20% de B durante 5 minutos seguido de gradiente lineal durante 10 minutos hasta un 1% de A y 99% de B (9). La actividad superóxido dismutasa (SOD) se determinó por el método de Flohé y Otting (10) basado en la inhibición de la reducción del citocromo c3+ que produce el radical superóxido por parte de la SOD. Como génesis constante de radicales superóxido se utiliza el sistema xantina/xantina-oxidasa. La velocidad de reducción del citocromo c3+ se sigue espectrofotométricamente a 550 nm.

La determinación de la actividad catalasa se ha realizado siguiendo el

procedimiento de Aebi (11) basado en la monitorización de la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalizada por la catalasa en el ultravioleta de 240 nm. El coeficiente de extinción a 240 nm de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es de 40.0 cm<sup>2</sup>/μmol.

La actividad de la glutatión peroxidasa se ha realizado por el método descrito por Flohé y Günzler (12) basado en la monitorización de la formación de GSSG. El GSSG formado durante la reacción de la glutatión peroxidasa es reducido de forma instantánea y continua por un exceso de glutatión reductasa proporcionando un nivel constante de GSH. La oxidación concomitante de GSSG es monitorizada al acoplarse con la reacción catalizada por la glutatión reductasa, registrándose la oxidación del NADPH espectrofotométricamente.

La actividad de la capacidad antioxidante total (CAT) ha sido descrita previamente por Miller y Rice-Evans (7). El método se fundamenta en la reacción del peróxido de hidrógeno con la metamioglobina para formar el radical ferrilmioglobina, el cual reacciona con el radical ABTS [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato diamónico)] para formar el radical ABTS+ (grupo cromógeno que presenta un pico de absorción a 734 nm). En presencia de antioxidantes se produce una inhibición de la absorbancia a 734 nm y este hecho es el que se utiliza para la determinación de la capacidad antioxidante total. Como curva de calibración se utilizan diferentes concentraciones de TROLOX, un derivado de la vitamina E, soluble en agua y con potente poder antioxidante.

La creatinkinasa, bilirrubina total, ácido úrico, ALT y AST han sido determinadas por métodos automatizados (Hitachi®) en el laboratorio clínico del hospital.

## RESULTADOS

Los resultados más significativos del estudio realizado vienen reflejados en la Tabla I. En ella se muestran media ± desviación estándar de los diversos parámetros y se comparan estadísticamente indicándose la significación en cada caso.

## DISCUSIÓN

Los estudios realizados en recién nacidos a término nos han confirmado datos previos en animales de experimentación y en humanos (3-6) en los que ya habíamos observado un estrés oxidativo inherente a la transición desde un ambiente de hipoxemia relativa intraútero a una situación de hiperoxia extraútero. Así, las disminuciones de GSH, el incremento de GSSG y el descenso muy

Tabla I.—Valores comparativos de los distintos parámetros estudiados en el grupo fetal (A), recién nacido normal (B) y recién nacido con distress respiratorio (C).

	Grupo A	Grupo B	Grupo C
GSH ( $\mu\text{M}$ )	1070 $\pm$ 273(12)	864 $\pm$ 241*(12)	848 $\pm$ 299*(11)
GSSG ( $\mu\text{M}$ )	21 $\pm$ 5(12)	31 $\pm$ 9**(12)	45 $\pm$ 16**#(11)
GSH/GSSG	55 $\pm$ 20(12)	29 $\pm$ 10**(12)	21 $\pm$ 10**(11)
CK (U/L)	37 $\pm$ 19(4)	76 $\pm$ 32**(4)	173 $\pm$ 58**#(6)
SOD (U/mg Hb)	1.56 $\pm$ 0.3(14)	1.83 $\pm$ 0.34**(14)	2.17 $\pm$ 0.5*(6)
Catalasa (k/g Hb)	161 $\pm$ 71(15)	206 $\pm$ 49*(15)	211 $\pm$ 40***(6)
GSH Px (U/g Hb)	48 $\pm$ 12(14)	49 $\pm$ 14(14)	45 $\pm$ 9(10)
CAT (Trolox eq.)	1.06 $\pm$ 0.13(12)	1.38 $\pm$ 0.44**(12)	1.64 $\pm$ 0.4(8)

Grupo A: Fetos en el momento del nacimiento.

Grupo B: Recién nacidos a término a los 3 días de vida

Grupo C: Recién nacidos a término a los 3 días de vida con distress y oxigenoterapia (FiO<sub>2</sub>:0.35-0.40)

\* p < 0.05 comparando A con Ba

\*\* p < 0.01 comparando A con Ba

\* (Test de Student para muestras apareadas)

# p < 0.05 comparando B con C

# (Test de Student para muestras no apareadas)

importante del cociente GSH/GSSG lo confirman. Frente a esta situación prooxidante la respuesta del organismo neonatal representada por el grado de actividad de las enzimas antioxidantes que se obtiene como respuesta a la agresión en los primeros días de vida estudiados es, aunque significativa, no suficiente. Así, la superóxido dismutasa y catalasa experimentan incrementos significativos en su grado de actividad. También la medición de sustancias antioxidantes plasmáticas como ácido úrico, bilirrubina, etc., acopladas en el parámetro C.A.T. (Capacidad antioxidante total) mediante una nueva técnica más reciente, fiable y reproducible (7), confirman el hecho de que el neonato es capaz de reaccionar ante el estrés oxidativo que acompaña al paso de una respiración placentaria a una alveolar, pero de esta reacción parece ser lenta, parcial e insuficiente durante las primeras 72 horas.

Se han estudiado diversos parámetros de lesión celular como enzimas intracelulares hepáticas, musculares etc..., y hemos puesto como paradigma la conducta de la creatinkinasa, que es extraordinariamente sensible al daño celular. Hemos podido comprobar como efectivamente se produce un incremento significativo en la misma por la transición fetal-neonatal, indicando un grado sensible de destrucción celular.

En la presencia de un distress respiratorio transitorio como es el Síndrome de Avery o Taquipnea Transitoria Neonatal, frecuente problemática en las

Unidades Neonatales y atribuido exclusivamente a un retraso en la reabsorción del líquido pulmonar, que se resuelve espontáneamente en el plazo de 3-4 días, y que suele afectar a recién nacidos de más de 35 semanas de gestación en los que se han desarrollado ya los sistemas de defensa antioxidante (13), hemos evidenciado un mayor grado de estrés oxidativo como muestran las cifras del cociente de GSH/GSSG y sobre todo el aumento significativo de GSSG ( $21\pm 5$  vs  $31\pm 9$  vs  $45\pm 16$ ) que ya de por sí indica agresión oxidativa. La CK (creatinkinasa) en pacientes con distress y oxigenoterapia (grupo C) también se ve significativamente afectada por la hiperoxia tanto en la comparación con fetos (A) como cuando se compara con los neonatos sanos al tercer día de vida (B), indicando que la adición de O<sub>2</sub> ocasiona un incremento en el grado de daño celular por radicales libres. Contrariamente a lo esperado no hemos observado un incremento significativo de los niveles de enzimas antioxidantes ni de la capacidad antioxidante total. Podríamos especular a la vista de los resultados obtenidos que existe una ventana de al menos 72 hrs en la que el recién nacido debe adaptarse a la respiración aérea alveolar y que, durante este período, es especialmente sensible a la elevación de las concentraciones de la fracción inspiratoria de oxígeno. Esto pone en entredicho muchas de las prácticas habituales de las Unidades Neonatales donde se aplica oxigenoterapia a los recién nacidos a término sin un control excesivo. También es práctica habitual la reanimación del recién nacido con oxígeno al 100% e incluso la American Heart Association lo considera una práctica exenta de riesgo (14).

Por lo tanto podemos afirmar que la transición fetal-neonatal produce un estrés oxidativo en el recién nacido a término dada su capacidad limitada de respuesta a la hiperoxia relativa del ambiente extrauterino. En presencia de un distress respiratorio que significa un mayor esfuerzo muscular en una atmósfera enriquecida de oxígeno (FiO<sub>2</sub> :0.35-0.40) se agrava la situación de estrés de forma evidente e incrementa la agresión por radicales libres, y así, vemos como hay una alteración importante del patrón de oxidación del glutatión como principal sistema antioxidante intracelular, pero también una drástica reducción del ácido úrico. De todo ello podemos concluir que el recién nacido a término muestra una capacidad de respuesta muy limitada e insuficiente para absorber el estrés oxidativo provocado por la hiperoxia ambiental subsiguiente a la oxigenoterapia ambiental. Tratándose de neonatos a término, que hasta ahora no habían sido considerados sujetos de la patología perinatal por radicales libres (13), estos resultados nos confirman que se deberían extremar las precauciones cuando se administre oxígeno en el nacido a término en cualquiera de las manipulaciones a que son sometidos.

**BIBLIOGRAFÍA**

- (1) LEE, F.: *Federation Proc* (1985), **44**:2328-2334.
- (2) SIES, H.: *Angewandte Chemie* (1986), **25**:1058-1071.
- (3) PALLARDÓ, F. V., SASTRE, J., ASENSI, M., RODRIGO, F. J., ESTRELA, J. M., VIÑA, J.: *Biochem J* (1991), **274**:891-893.
- (4) ASENSI, M., SASTRE, J., PALLARDÓ, F. V., ESTRELA, J., VIÑA J.: *Analytical Biochem* (1994), **217**:323-328.
- (5) SASTRE, J., ASENSI, M., RODRIGO, F., PALLARDÓ, F. V., VENTO, M., VIÑA, J.: *Life Sciences* (1994), **54**:2055-2059.
- (6) VENTO, M., ASENSI, M., GARCÍA-SALA, F., CATALÁ, J., VIÑA, J.: *Ped Res* (1995), **38**:460A.
- (7) MILLER, N. J., RICE-EVANS, C., DAVIS, M. J., GOPINATHAN, V., MILNER, A.: *Clinical Sciences* (1993), **84**:407-412.
- (8) BRIGELIUS, R., MUCKEL, C., AKERBOOM, T. P. M., SIES, H.: *Biochem Pharmacol* (1983), **32**:2529-2534.
- (9) FARISS, M. W., REED, D. J.: In: *Methods in Enzymology* (1987). Jakoby WB & Griffith OW Eds. Vol. 143. pp 101-109, Academic Press, San Diego.
- (10) FLOHÉ, L., OTTING, F.: *Methods in Enzymology* (1984), **105**:93-104.
- (11) AEBI, H.: *Methods in Enzymology* (1984), **105**:121-126.
- (12) FLOHÉ, L., GÜNZLER, W. A.: *Methods in Enzymology* (1984), **105**:114-121.
- (13) KLAUS, M. & FANAROFF, A.: In: *Care of the High Risk Neonate* (1995). 5th ed. pp 248-295. WB Saunders & Co., St Louis.
- (14) AMERICAN HEART ASSOCIATION. GUIDELINES FOR CARDIOPULMONARY RESUSCITATION AND EMERGENCY CARDIAC CARE: *J Am Med Assoc* (1992), **268**:2276-81.